

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

ing 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

a certain level of physiological quiescence is 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

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

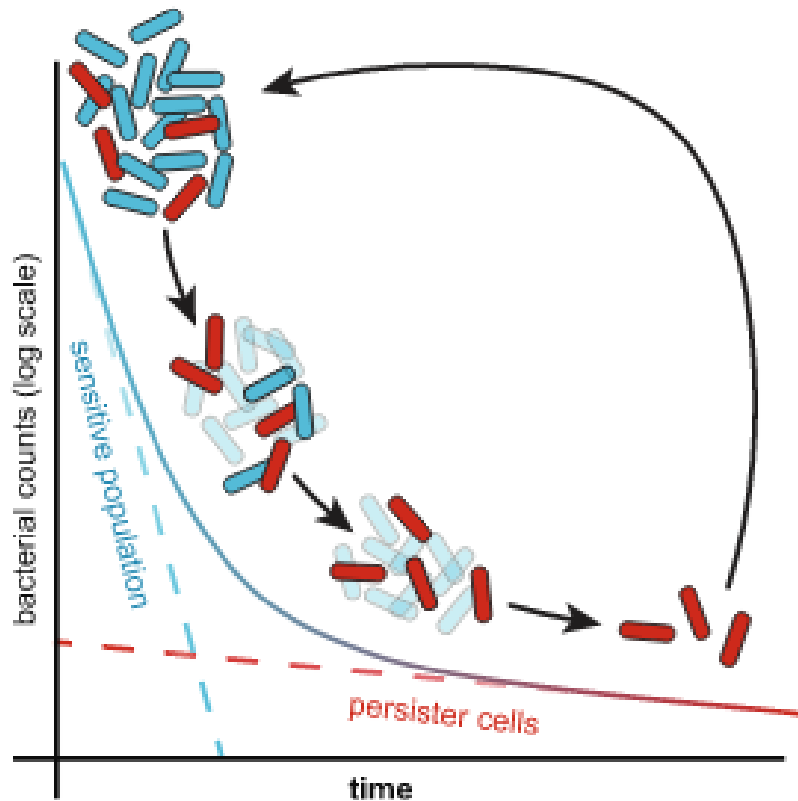


Fig. 1. Biphasic killing kinetics of bactericidal antibiotic treatment. A lethal dose of bactericidal antibiotic added at time zero rapidly eradicates the sensitive bulk of the population (blue) until only non-growing persister cells (red) that are killed at a slower rate remain. The slower killing has 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.

Che cos'è la persistenza??

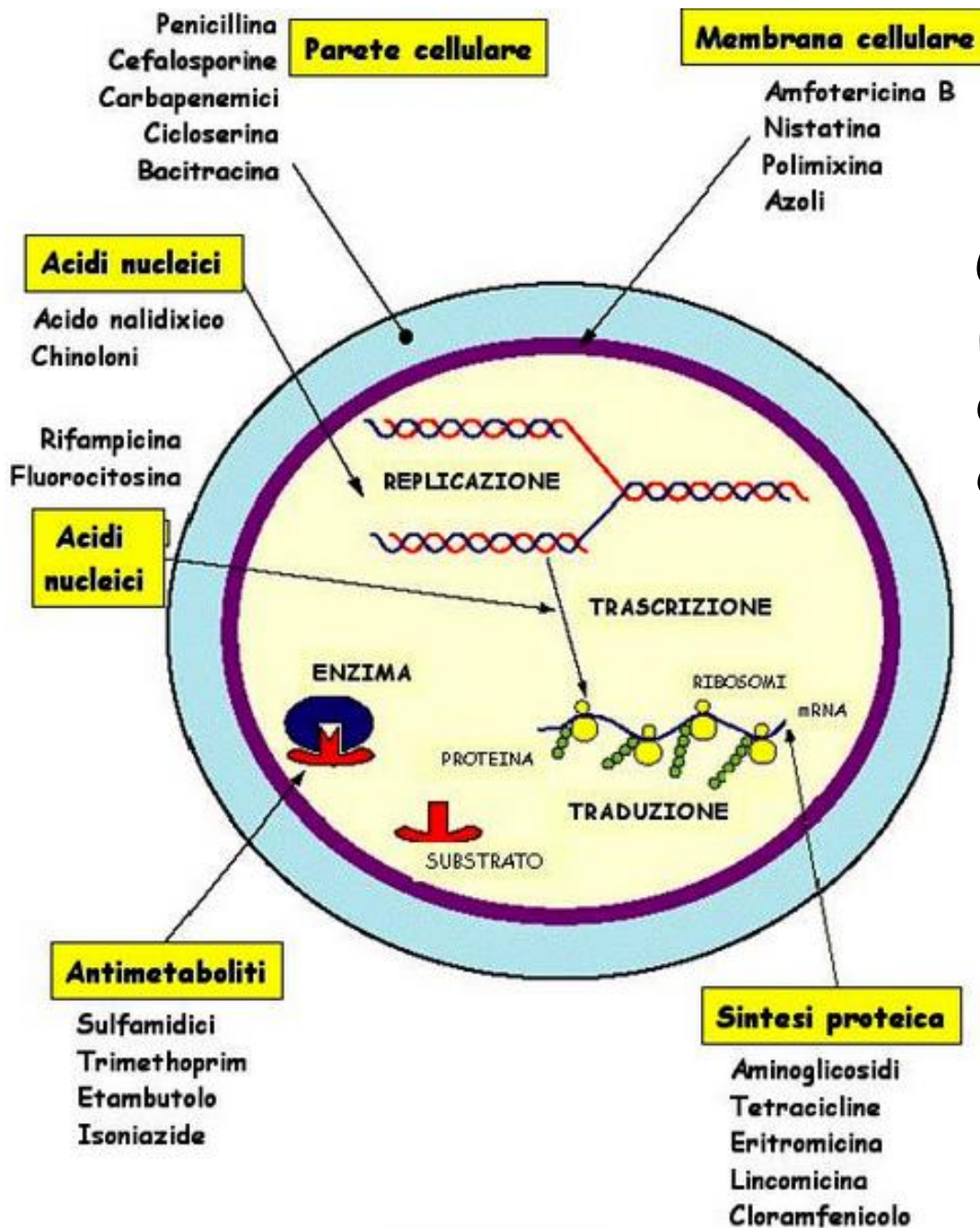
La persistenza è

- 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.

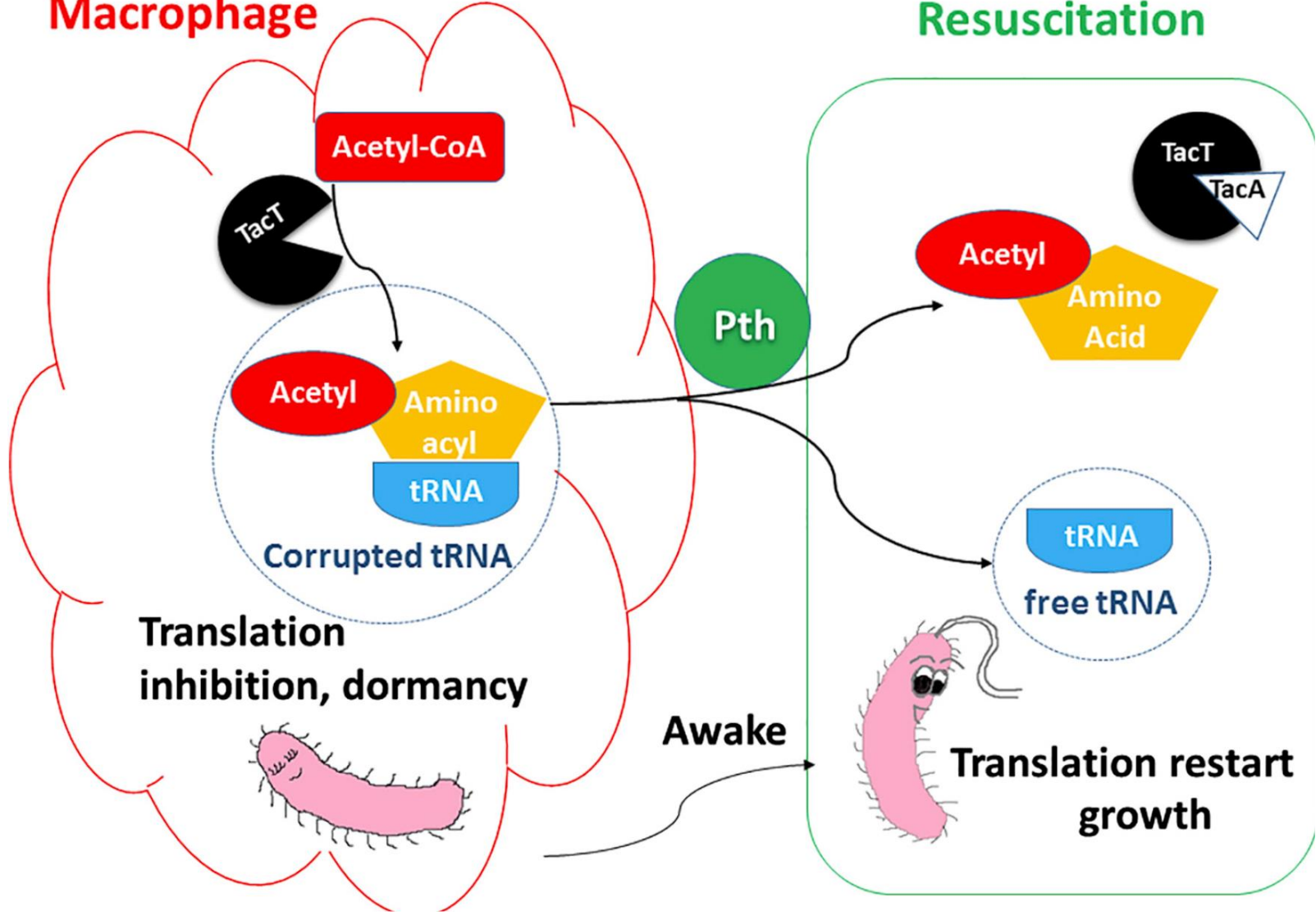
Il ritorno allo stato di crescita normale delle cellule persistenti può determinare completo fallimento della terapia antibiotica.



Gli antibiotici che inibiscono le funzioni della membrana cellulare

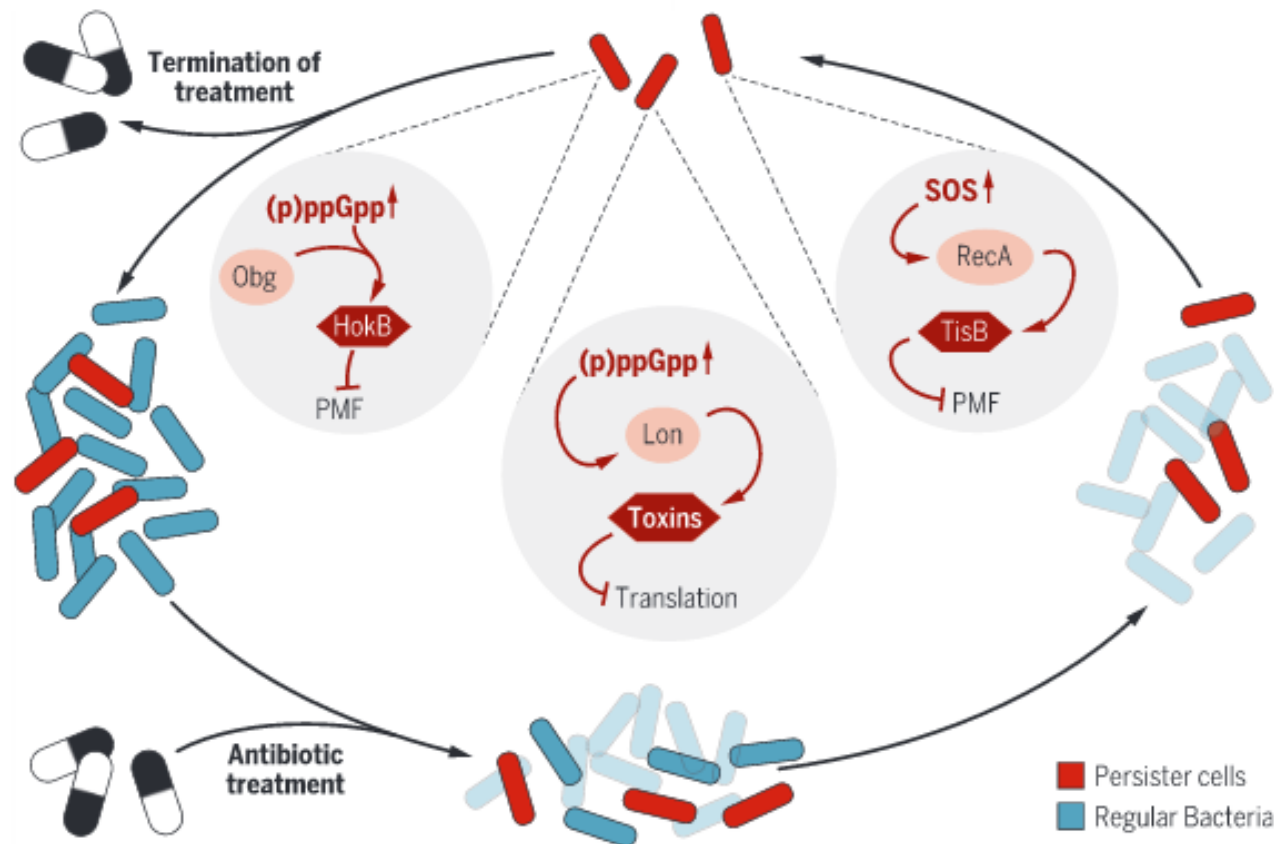
Macrophage

Resuscitation



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 .

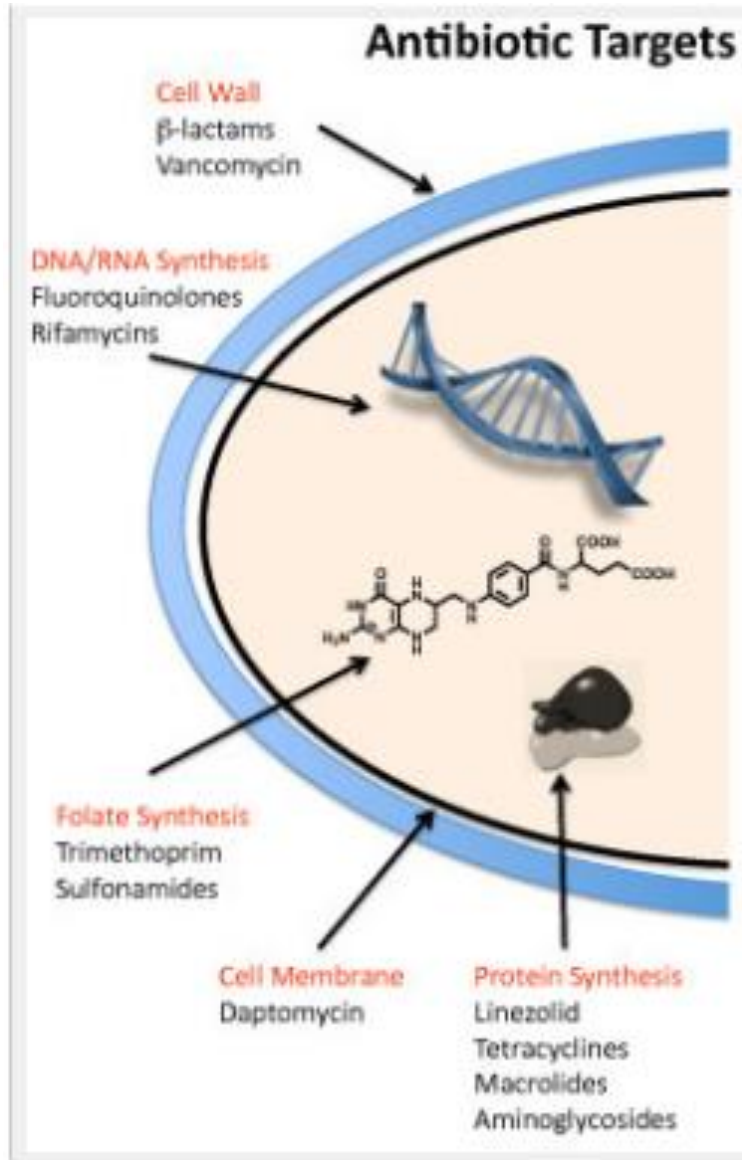
Purtroppo il trattamento standard delle infezioni croniche che è basato su cicli ripetuti di alte dosi di antibiotico è legato ad un incremento dei livelli di persister negli isolati clinici e alla selezione di mutanti che presentano un' alta frequenza di selezione di persisters.

Persisters e antibiotico resistenza.

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

Si passa quindi da uno stato di resistenza fenotipica ad una resistenza determinata da mutazioni

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.

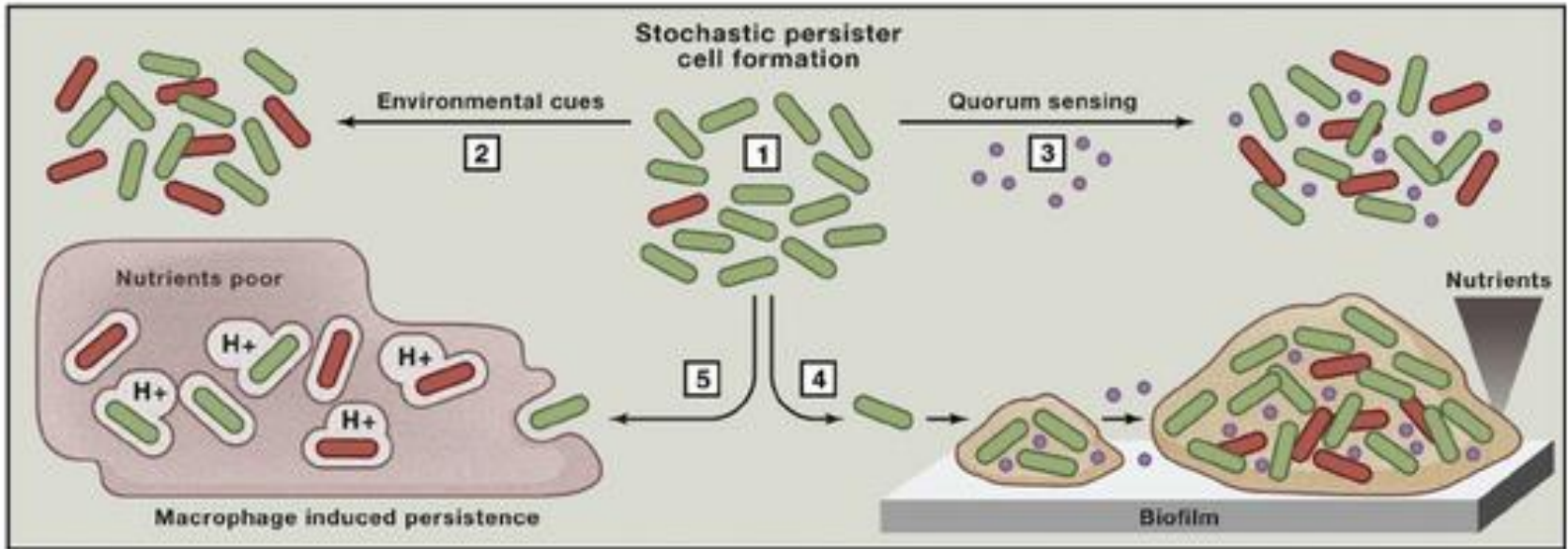
Quindi i PERSISTERS sono una strategia dei batteri per sopravvivere in ambienti dinamici e potenzialmente ostili

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 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.



Overview of Physiological and Environmental Cues Stimulating Persister Cell Formation (1) Bacterial persisters can arise stochastically in unstressed bacterial cultures as a bet-hedging strategy. (2) Environmental insults (i.e., starvation, oxidative and acid stress, heat shock) provoking persister cell formation. (3) Social engagement through quorum sensing promotes persister cell formation. (4) Heterogeneous and diffusion-limited biofilm microenvironments enhance persistence. (5) Host-pathogen interaction also induces formation of persisters.

Ma come si formano i persisters??

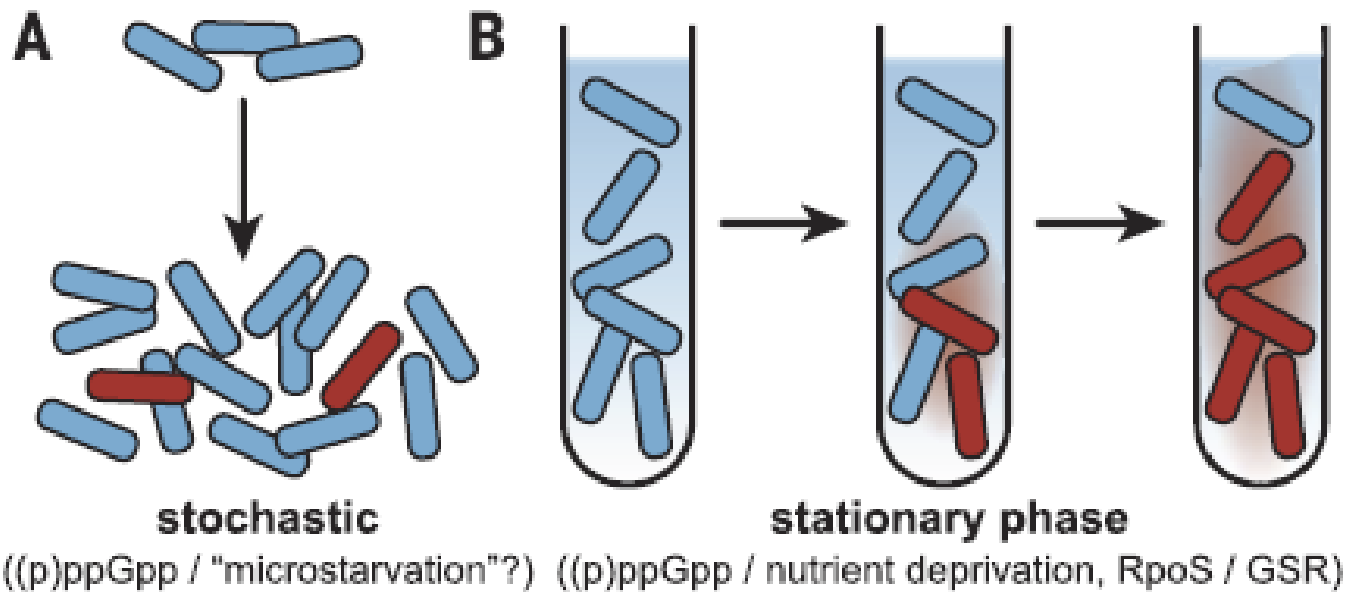
La formazione dei persisters è dovuta ad una combinazione tra meccanismi stocastici e di risposta che permettono ad un microrganismo di rispondere quando condizioni “pericolose” sono precedute da un segnale di stress.

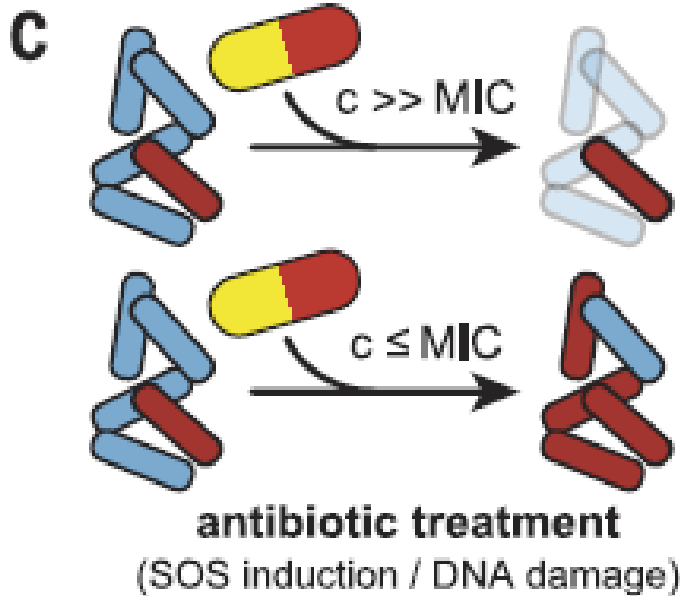
La formazione casuale di persisters viene interpretata come una SCOMMESSA ovvero come una particolare strategia per massimizzare la fitness di una popolazione in un ambiente dinamico. Questo concetto implica che alcuni persisters siano presenti nella popolazione prima per esempio del trattamento letale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

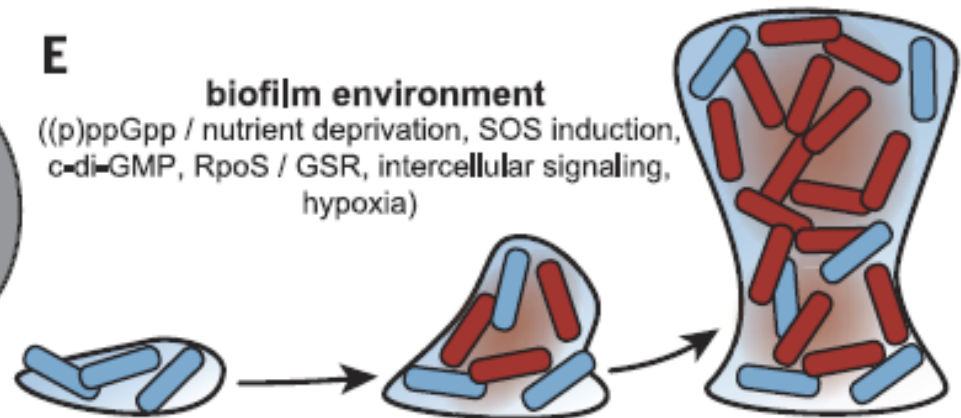
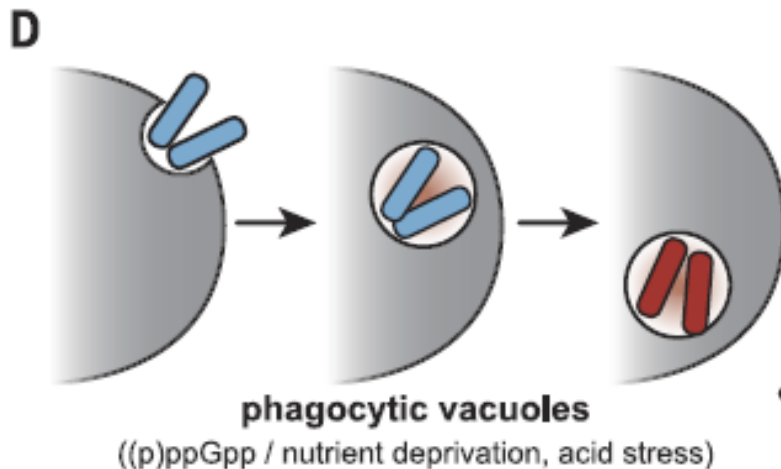
Sia la formazione di persister in modo casuale che stimolato sono controllati dallo stesso tipo di segnali. Questi includono componenti come la segnalazione da **ppGpp** che è in comune a tutti i pathway mentre altri pathway come la risposta SOS o l'ipossia hanno un ruolo modulatorio.



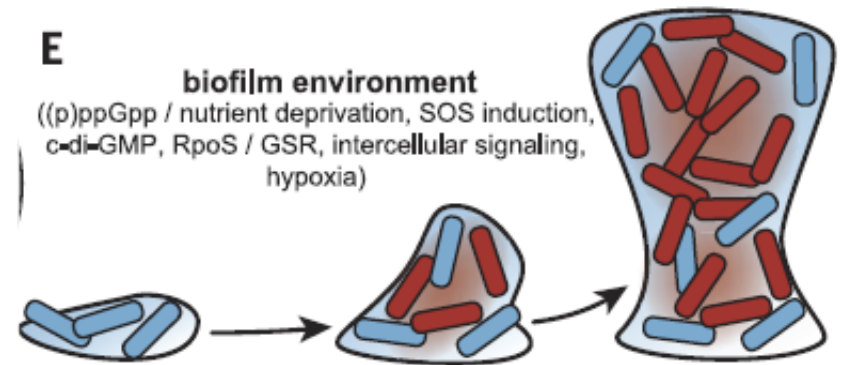


La formazione di persister è fortemente indotta da

- 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.

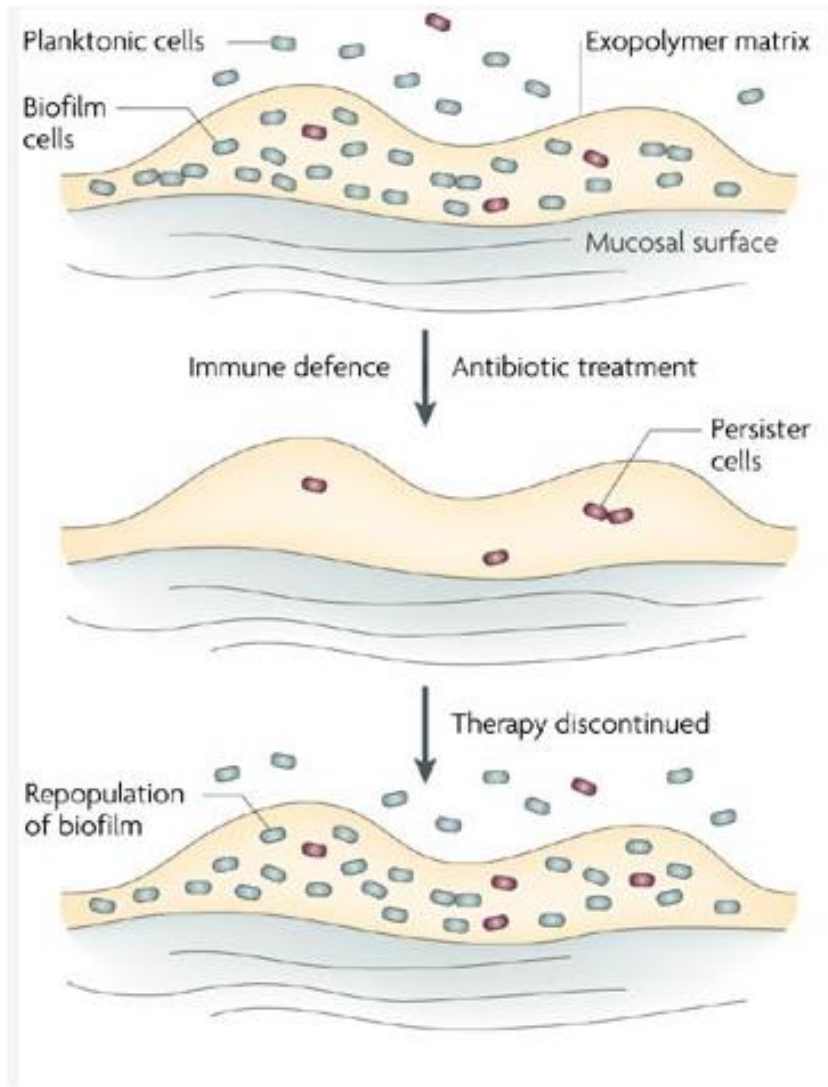


La nota resistenza dei biofilm ai trattamenti antibiotici e la propensione a recidive può essere attribuita all' elevata quantità di persisters che si formano all'interno di un biofilm. Da 100 a 1000 volte più persisters che in a cultura planctonica.

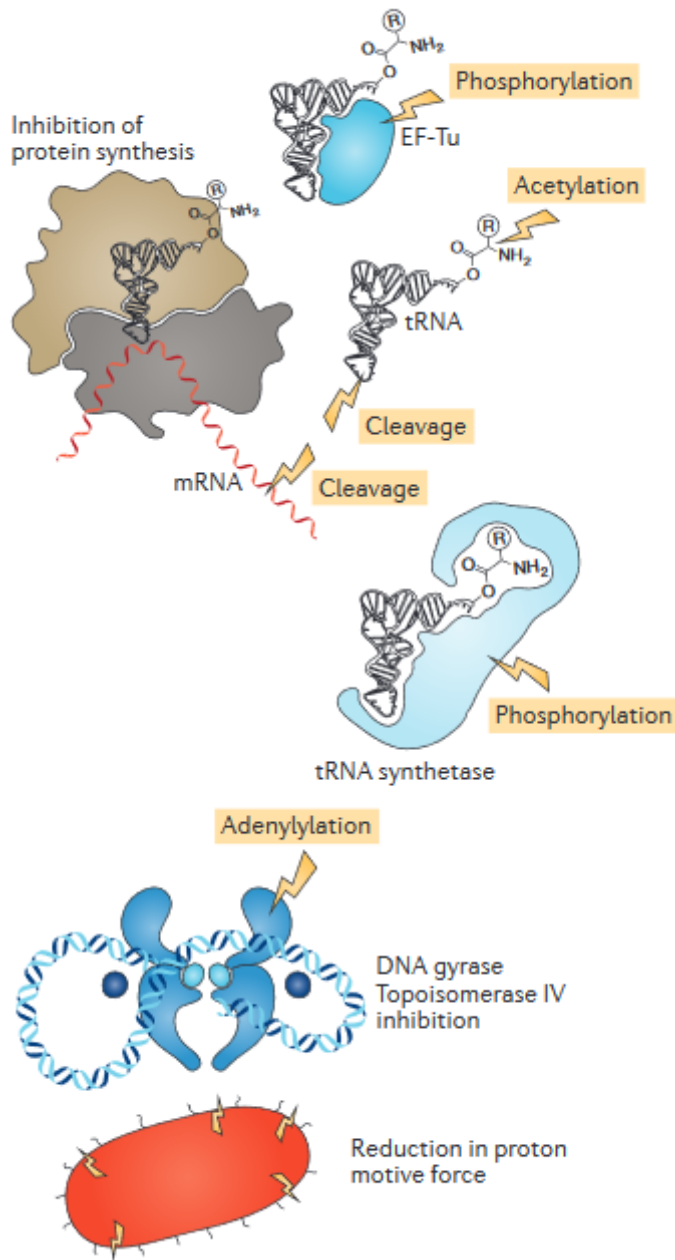
L'elevata quantità di persisters in un biofilm dipende dal
- ppGpp

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



Mechanisms of persister formation.

Toxin–antitoxin-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 elongation factor Tu (EF-Tu) by Doc,
- the acetylation of aminoacyl-tRNA by TacT,
- the phosphorylation of GltX by HipA89, and
- the cleavage of mRNA by RelE90 or tRNA by VapC.

The activity of DNA gyrase and topoisomerase IV (TopoIV) is inhibited by Fic through adenylylation, and pore-forming toxins, such as TisB, are able to reduce the proton motive force of the bacterial cell

Quali sono le molecole cruciali per la formazione dei persister?

ppGpp (Dubbi sul suo ruolo ???)

Il fattore Sigma RpoS

La risposta SOS

Quorum sensing

Sistema tossina-antitossina TA

1 pppGpp

ppGpp è una molecola segnale detta come allarmone

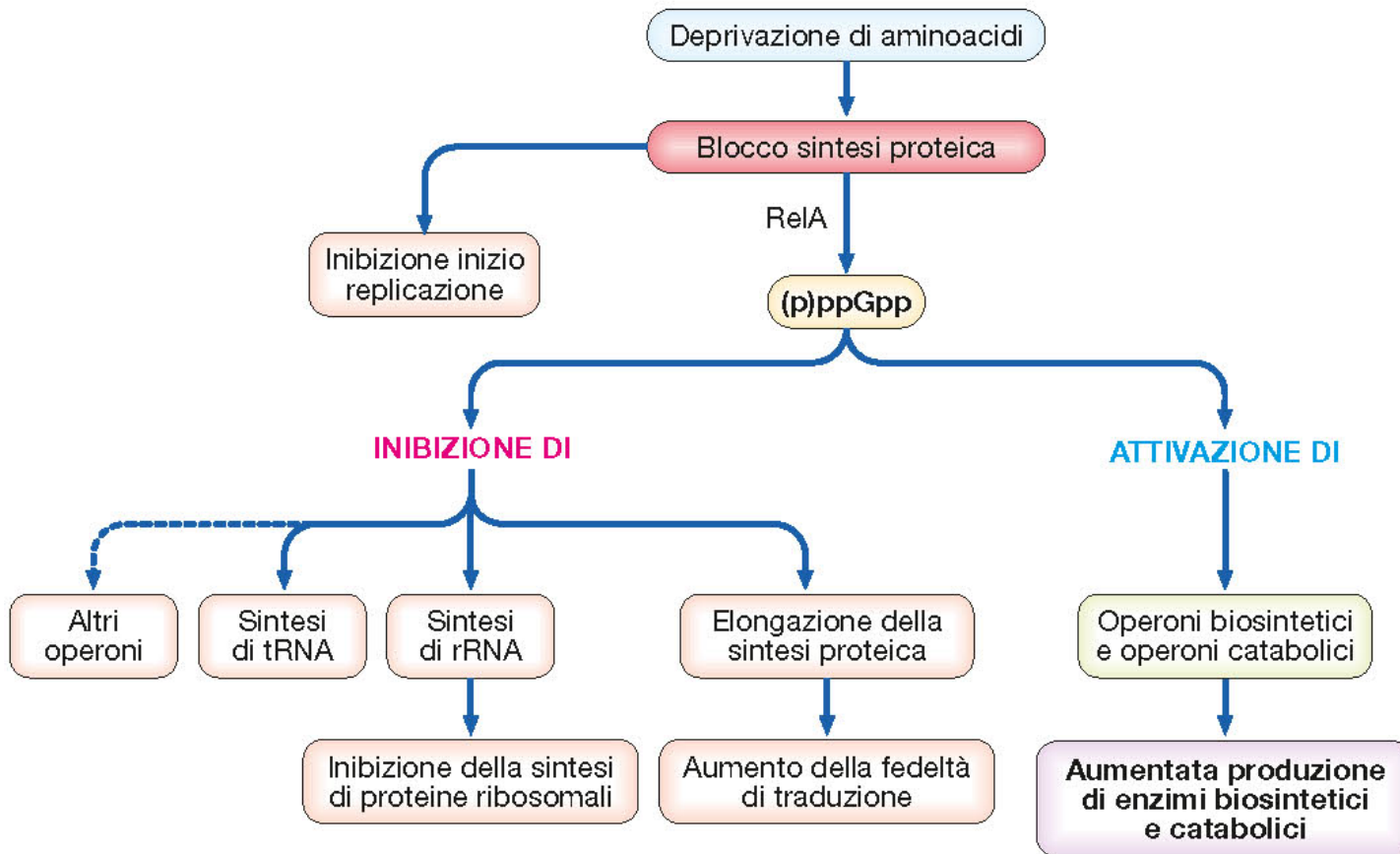
- Segnala uno stato fisiologico della cellula
- Come cAMP, controlla numerosi operoni
- permette la sopravvivenza in condizioni difficili.

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



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 .

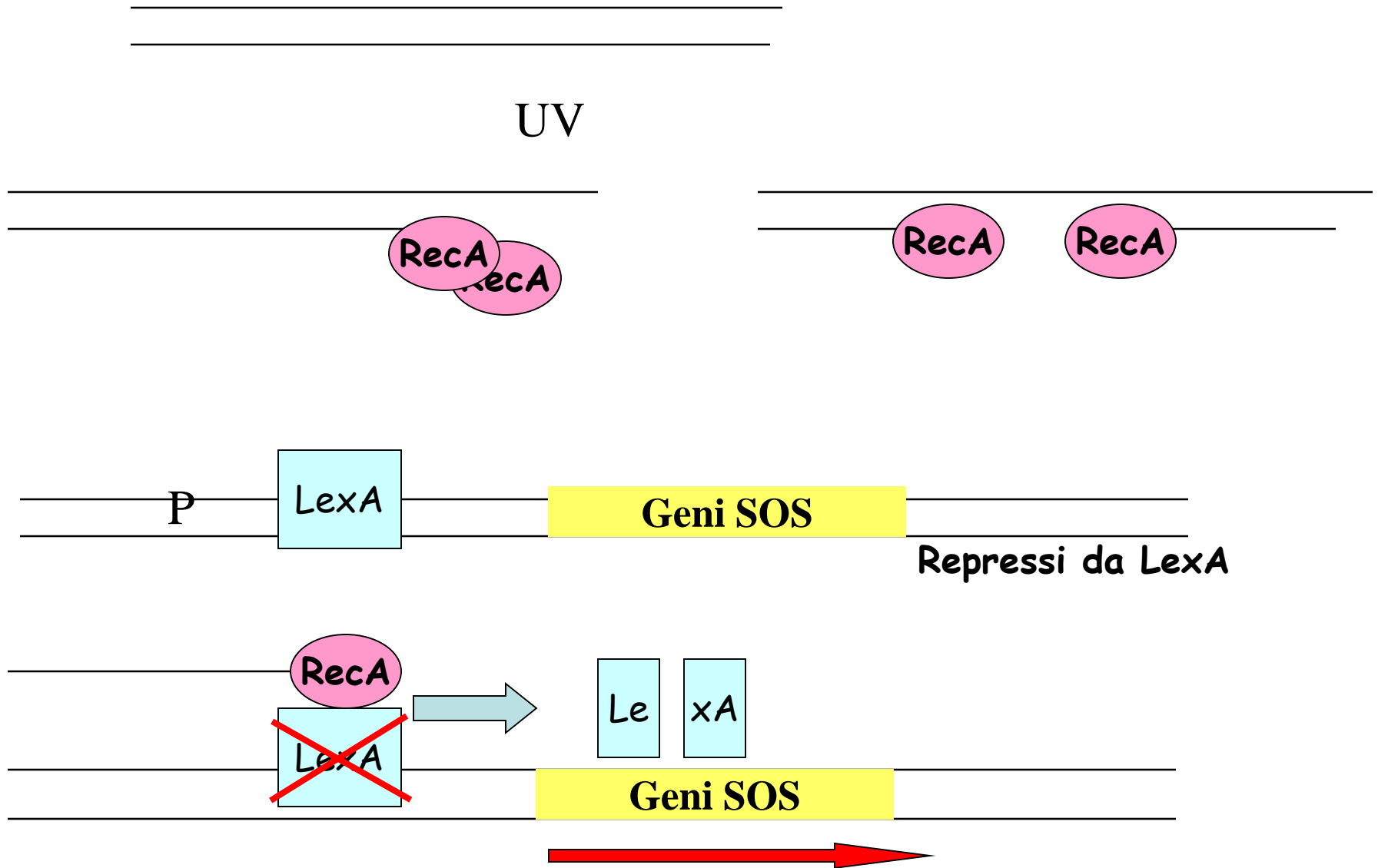
Il sistema SOS è indotto dalla proteina RecA che si attiva in presenza di DNA a SS.

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

UV



4. il QUORUM SENSING

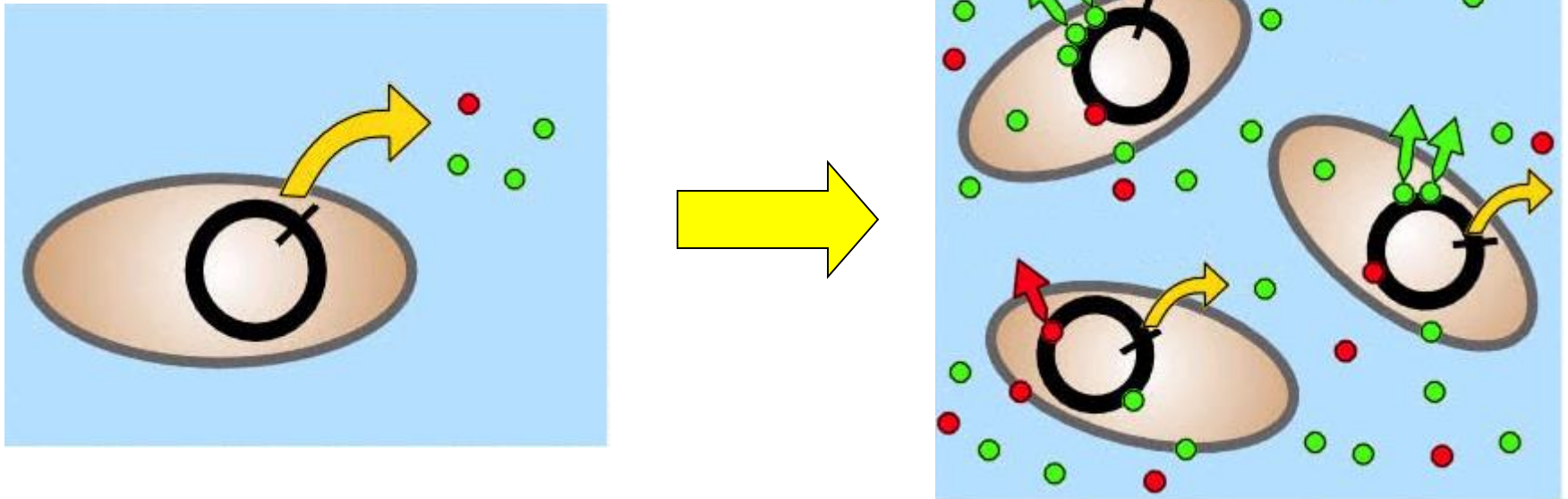
Le comunità batteriche ottimizzano la formazione di persister con l'aiuto di molecole di segnalazione intercellulare.

Per esempio molecole segnale come la piocianina o l'acil omoserina 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

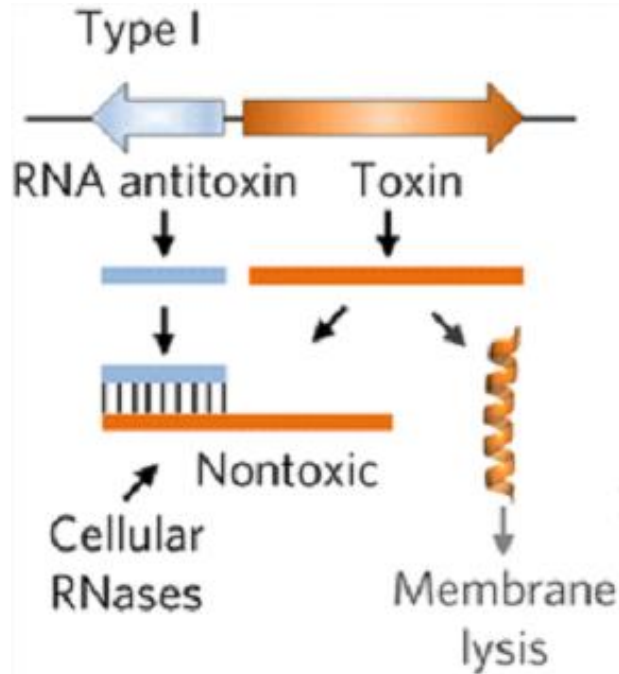
L'ANTITOSSINA che previene la sintesi della tossina o ne ostacola la funzionalità

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

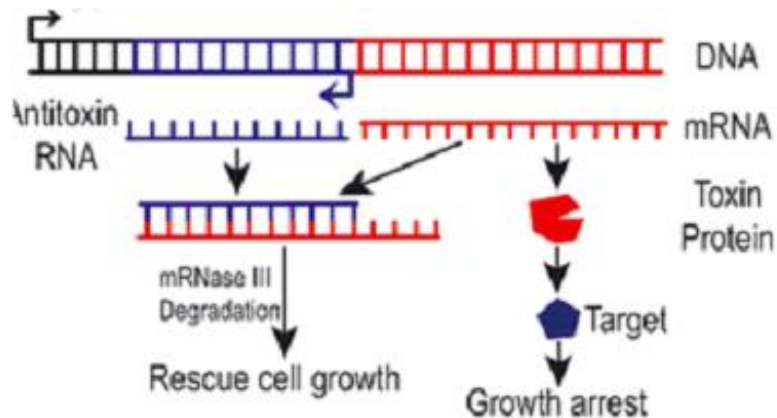
Tipo I se viene inibita la sintesi della tossina tramite sRNA

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

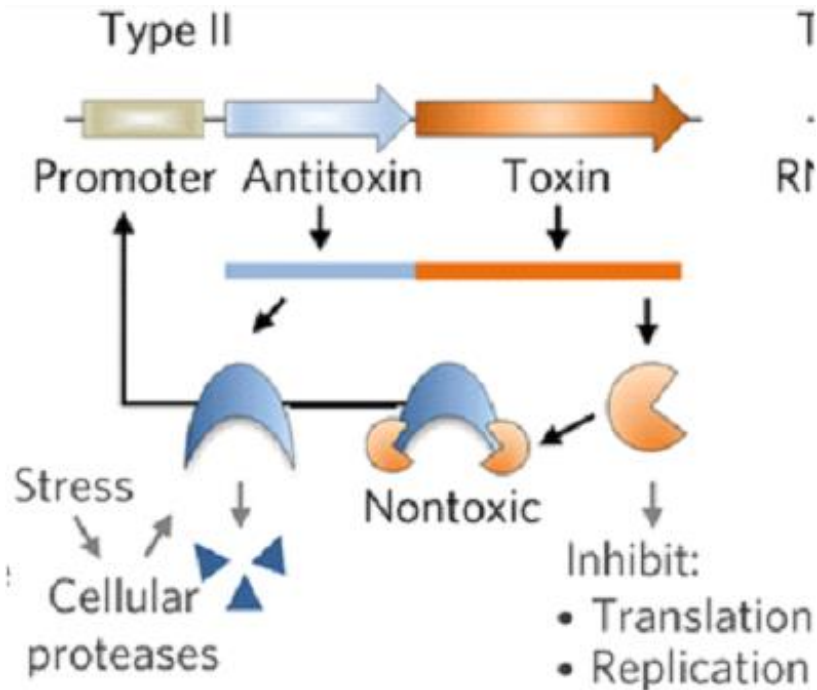


Tossine di tipo I sono generalmente piccole proteine che formano pori nella membrana citoplasmatica facendo collassare la forza proton motrice e la produzione di ATP



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

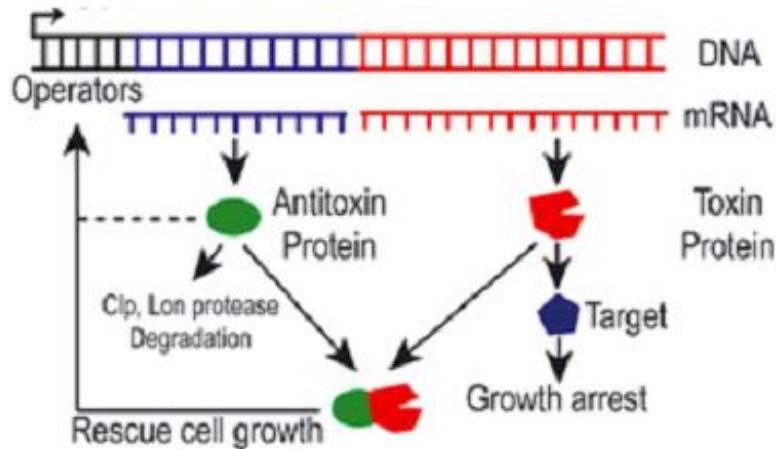
Meccanismo d'azione della tossina di Tipo II



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?

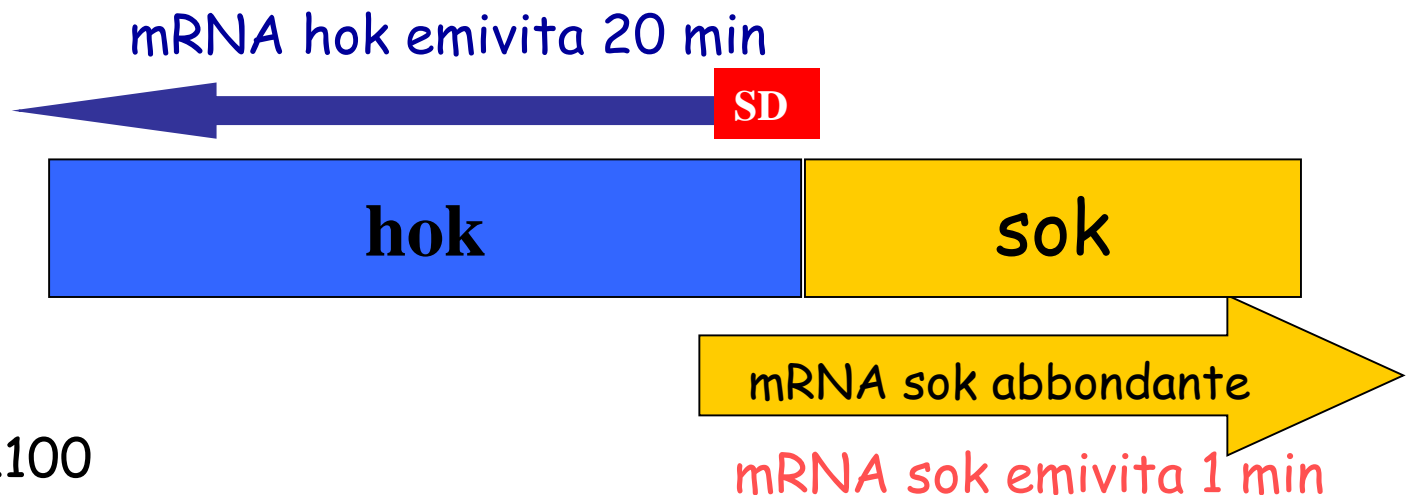
Alcuni plasmidi sintetizzano due proteine ParA e ParB che si legano ad un sito specifico sul plasmide parS mantenendo i plasmidi nel centro delle cellule in divisione (vicino al setto) fintanto che il processo di divisione non si sia concluso.

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



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.

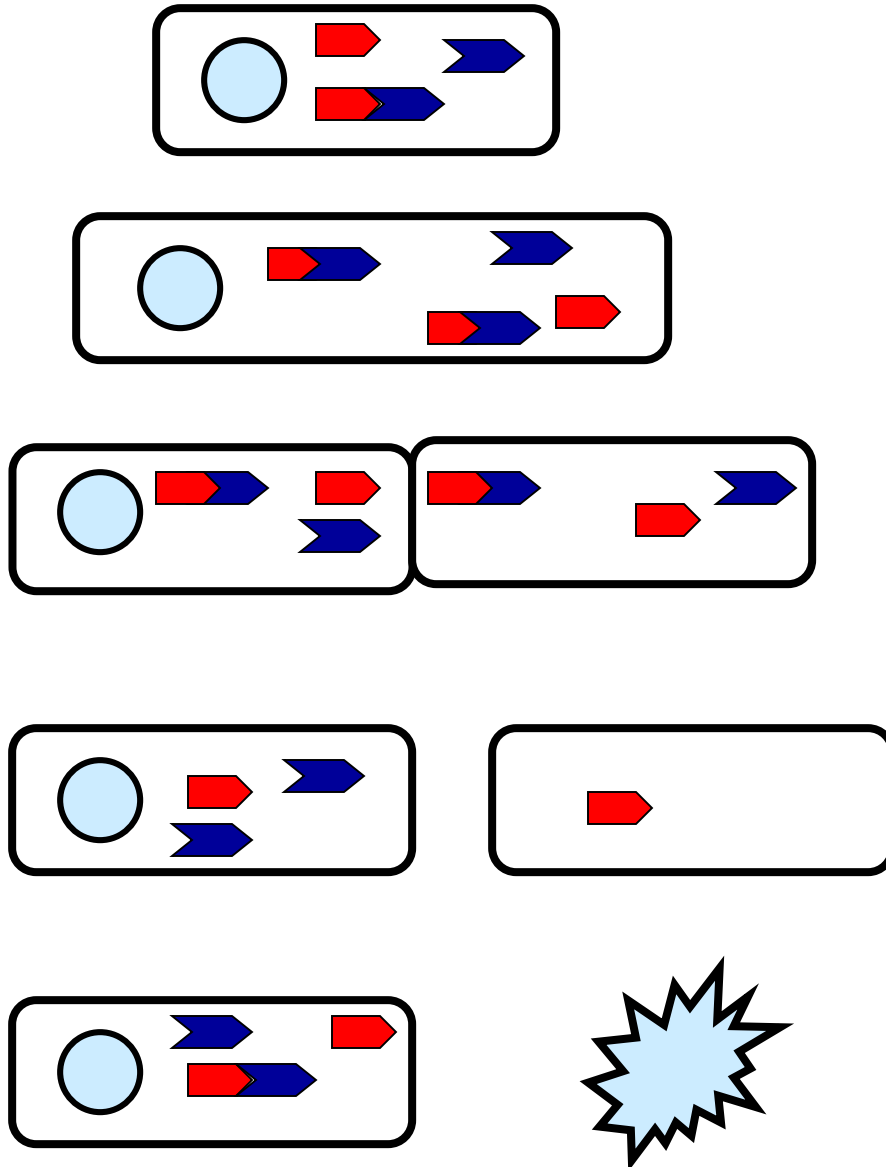
Sull'elica complementare del DNA di *hok* viene trascritta il mRNA del gene *sok* che ha una una regione di 128 nt complementare con la regione SD di *hok*. I 2 RNA hanno diversa emivita 20 min e 1 min. Hok non viene mai tradotto per azione del mRNA di *sok* e la cellula con R1 rimane pertanto vitale.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



Plasmide R1=R100

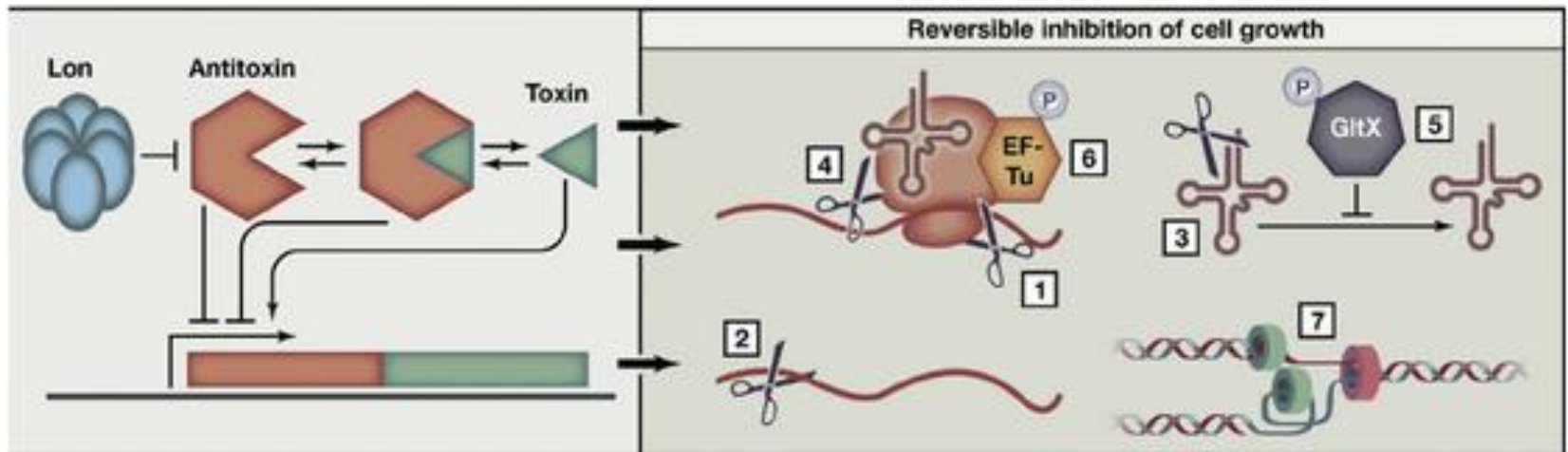
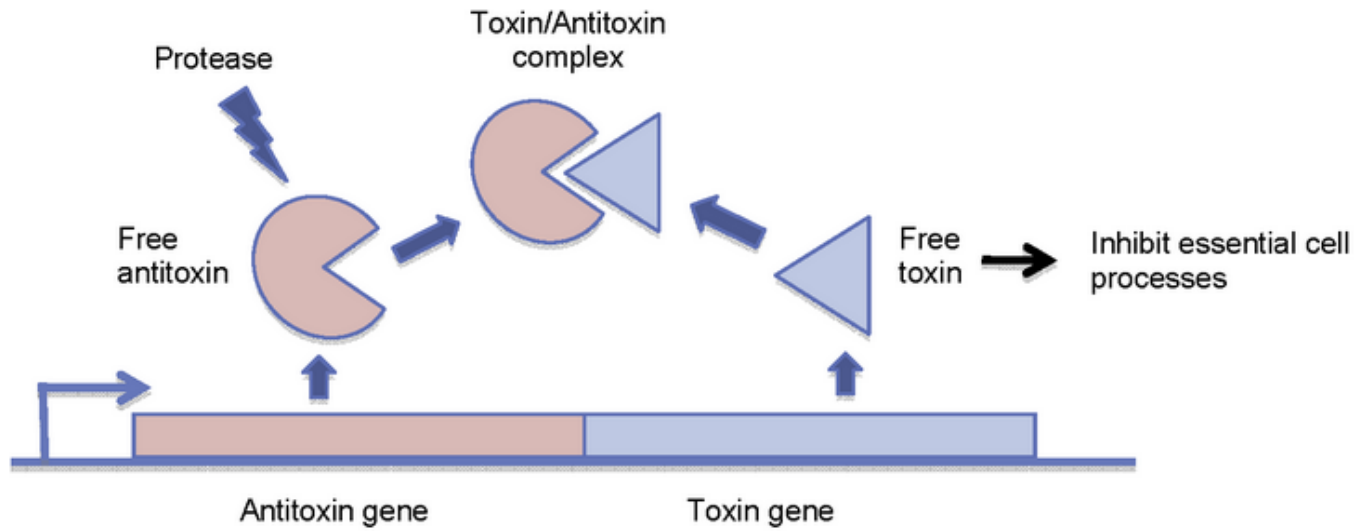
 Tossina stabile
 Antitossina labile

I sistemi TA di tipo II



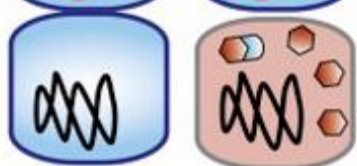
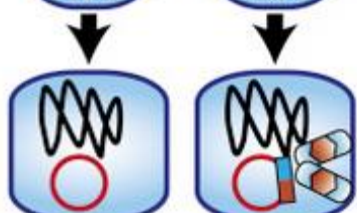
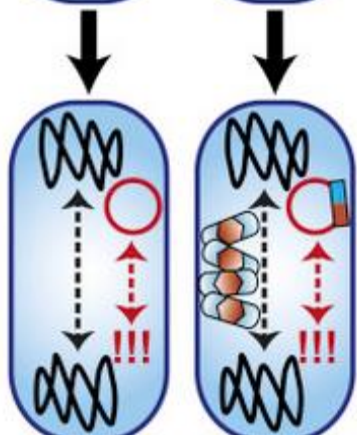
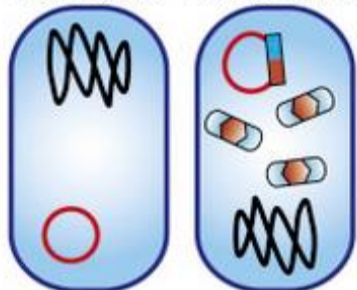
Il plasmide F sintetizza un sistema basato su tossina-antitossina in grado di eliminare le cellule che, in seguito ad un errore nella divisione cellulare non hanno ricevuto almeno una copia del plasmide F. La proteina CcdB è una tossina stabile (con bersaglio la DNA girasi) la cui funzione viene bloccata 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



A Post-segregational killing

no TA module with TA module

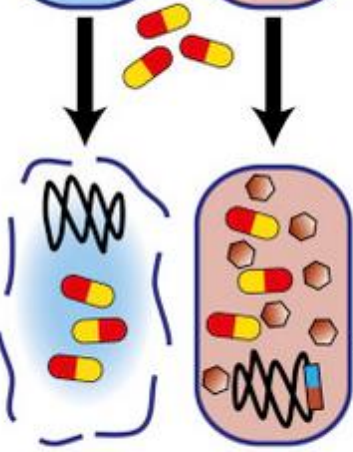
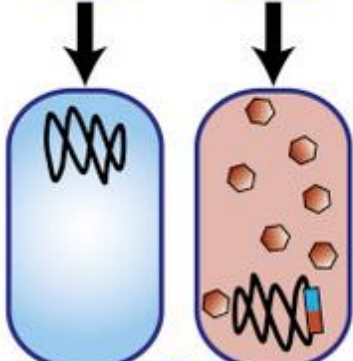
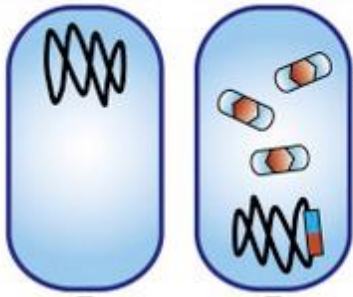


emergence of plasmid-free cells

death of plasmid-free cells

Persister formation

no TA module with TA module



antibiotic-induced cell death

antibiotic tolerance (dormancy)

Importanza dei moduli Toxin Antitoxin (TA)
Non solo nella segregazione dei plasmidi ma anche nell'insorgenza dei persister

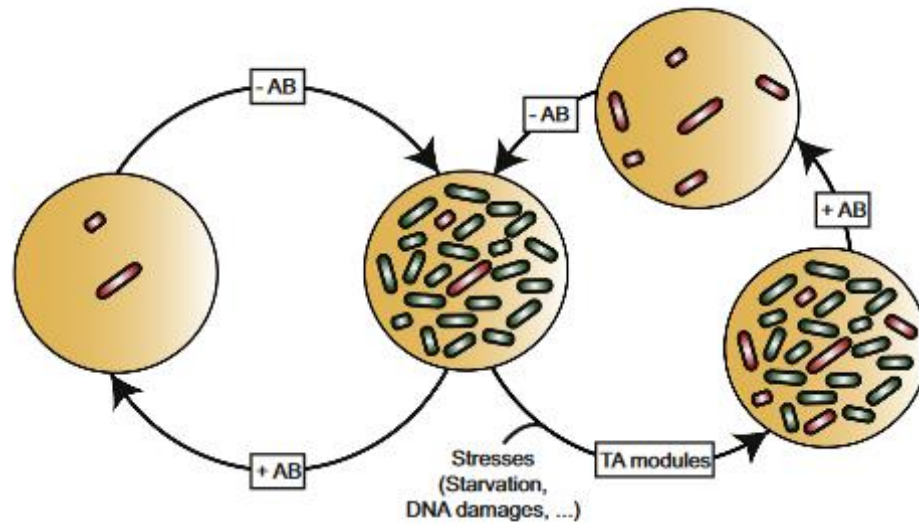


Fig. 3. Increased frequency of persister cells can be triggered by stress responses. Upon activation of stress responses induced by starvation or DNA damage, specific TA modules are activated and contribute to bacterial persistence by increasing the frequency of persister cells in the population under these harsh conditions.

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'allarmonone (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 .

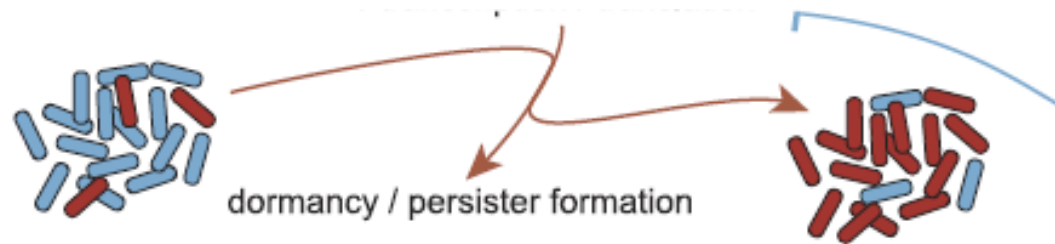
Se avviene un 'incremento dell'espressione delle tossine sia di Tipo I che II spesso si ha inibizione della crescita con aumento della tolleranza agli antibiotici.

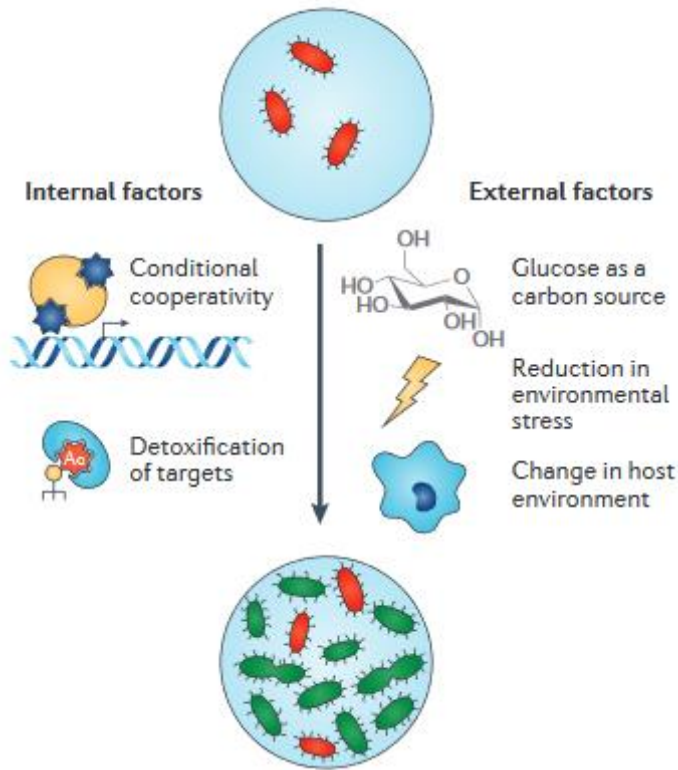
Nei trascrittomi di persisters si osservano un incremento dell'espressione dei TA.

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 microrganismi che hanno un adattamento dinamico all'ambiente incluse le infezioni croniche o acute può favorire l'eterogenità dei meccanismi nella formazione di persisters.

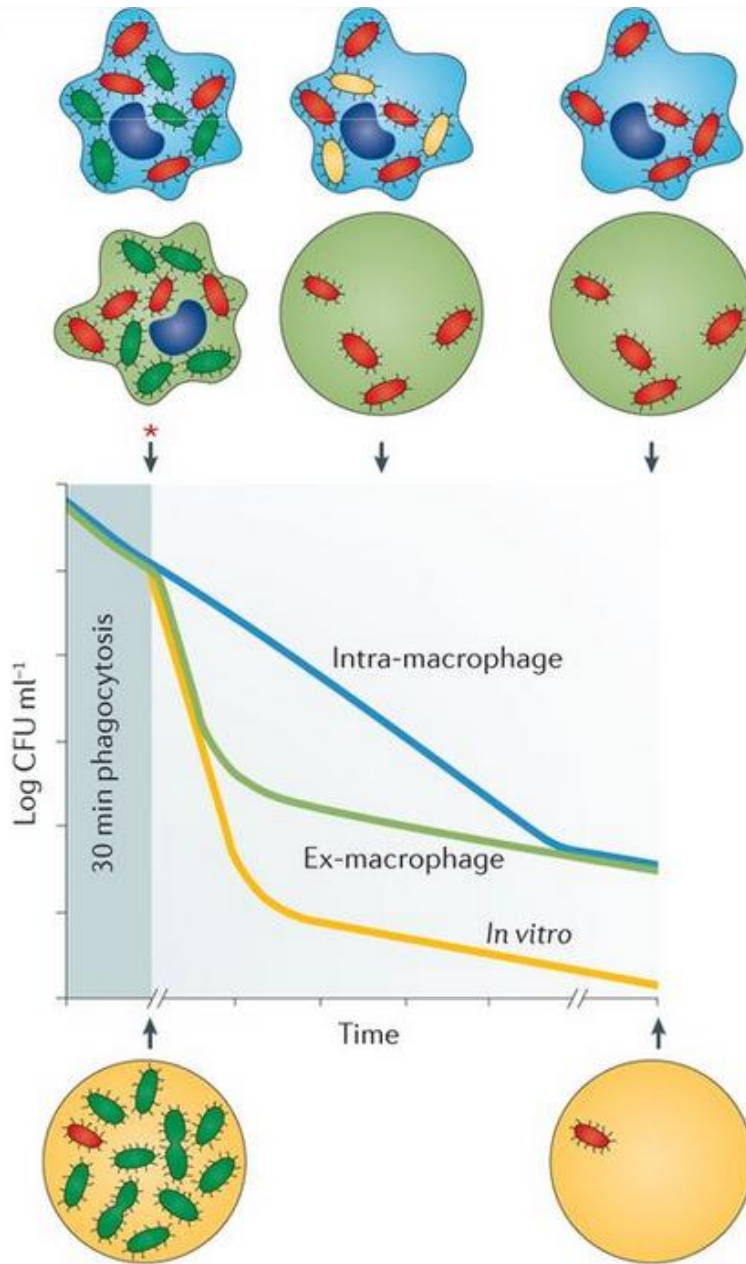




Mechanisms of persister regrowth.

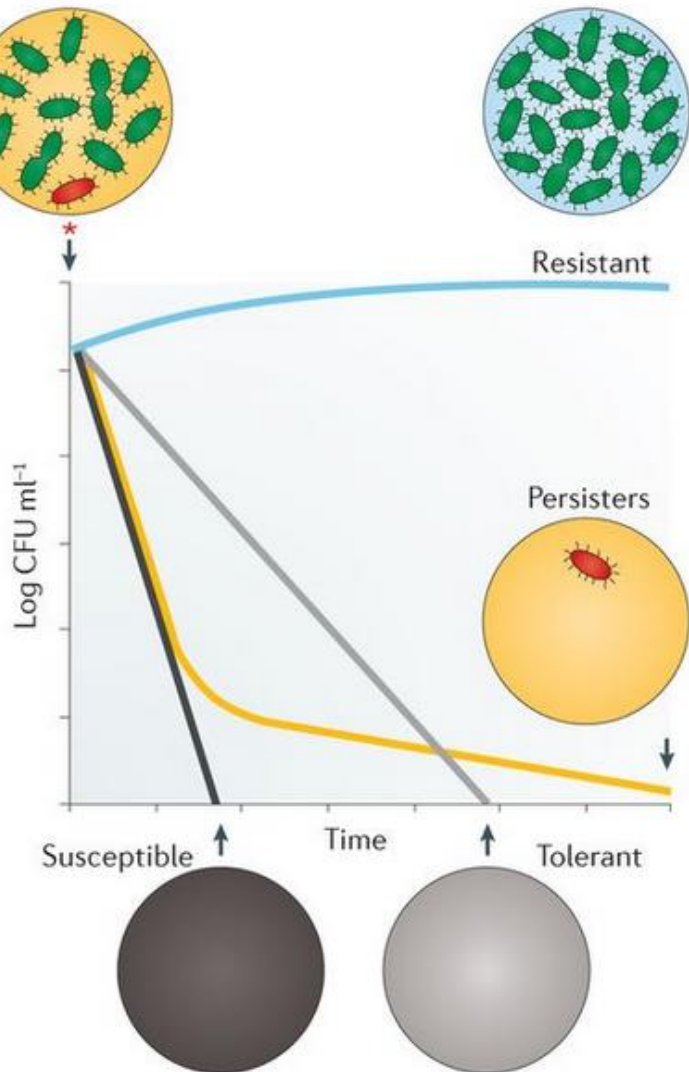
Internal and external factors determine the ability of persisters to regrow.

- **Internal factors** include the repression of toxin–antitoxin modules that are regulated through conditional cooperativity by lowering toxin:antitoxin ratios. Post-translational modifications (PTMs) that were added to cellular substrates by toxins will have to be removed to recycle cellular components, as is the case for TacT and Pth.
- **External factors** include the addition of a previously limited nutrient, such as glucose, or the reduction or removal of a limiting environmental stress. A change in host cell has been shown to enable regrowth.



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)⁴⁷.

a



Upon the addition of a bactericidal antibiotic (red asterisk) to a population of resistant bacteria (blue), growth still continues. Antibiotics are added at the start of the time course. A tolerant bacterial population (light grey) takes longer to be killed by an antibiotic when compared to a sensitive population (dark grey). The presence of persisters within a clonal population is revealed by a classic biphasic kill curve (orange) upon antibiotic treatment, with a period of rapid killing (of sensitive cells) followed by a much slower decrease in CFU (represented by the persister fraction).

