

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Eva Smělková**

Mechanismy bakteriální perzistence a klinický význam  
Mechanisms of bacterial persistence and clinical significance

Bakalářská práce

Školitel: doc. MVDr. Oto Melter, Ph.D.

Praha, 2018

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. MVDr. Otu Melterovi, Ph.D. za odborné vedení při psaní této bakalářské práce. Poděkování též patří Mgr. Janu Tkadlecovi, Ph.D. za cenné rady a konzultace, které mi po čas psaní práce poskytoval. V neposlední řadě také děkuji za podporu své rodině a příteli.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 17-30460A.  
Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 4. 2018

Podpis

## **Abstrakt**

Perzistentní bakterie, zkráceně perzisteri, jsou buňky význačné především svou odolností k antibiotikům. Nejedná se o rezistentní bakterie, jelikož takové mají svou rezistenci zapsanou v genetickém kódu. Perzisteri jsou geneticky neodlišitelní od jiných buněk, senzitivních k antibiotikům, a jedná se tedy spíše o přechodná fenotypová stádia. Schopnost tvorby perzistentních buněk není druhově limitovaná a perzistence byla popsána u řady bakteriálních druhů. Důvodem vzniku perzisterů může být náhlý stres, kdy jde o indukovaný vznik perzistence, či může jít o stochastickou fenotypovou variabilitu. Při stochastickém vzniku rozlišujeme v rámci geneticky uniformní populace řadu fenotypově odlišných subpopulací lišících se růstovými vlastnostmi a také odolností k antibiotikům. Jak vysvětluje tzv. bet-hedging strategy hypotéza, jedná se o pojištění před nebezpečím fluktuace vnějších podmínek. Při indukovaném vzniku perzistence dochází k hromadění alarmonu guanosintetrafosfátu či guanosinpentafosfátu, který upozorňuje buňku na nepříznivé podmínky a zahajuje přechod do odolnějšího stavu. Existence těchto odolných subpopulací nabývá na významu zejména při rekurentních chorobách, kdy malé subpopulace perzisterů dávají vznik nové stabilní populaci, komplikují léčbu a znemožňují uzdravení. Často se tak děje prostřednictvím tvorby biofilmu.

**Klíčová slova: Perzistence, antibiotika, (p)ppGpp, bet-hedging, biofilm**

## **Abstract**

Persistent bacteria, shortly persisters, are cells that are characterized by their tolerance to antibiotics without containing resistance genes. These are not resistant bacteria, because resistant bacteria are determined by genetic code. Persisters are indistinguishable from other antibiotic sensitive bacteria, and they are rather transient phenotypic subpopulations. Probably all types of bacteria can create a persistent stage, the ability is not species-bound and persistence has been described in a number of bacterial species. The reason for the formation of persistence may be sudden stress, then it is induced formation, or the reason may be an insurance for the future, then we call it stochastic phenotypic variability. Then a variety of phenotypes of different subpopulations within a genetically uniform population can be distinguished. They differ in growth properties and tolerance to antibiotics. Bet-hedging strategy is a hypothesis that describes persistence as insurance against the risk of external fluctuations. During stress an alarmon guanosine tetraphosphate or guanosine pentaphosphate is accumulated to alert the cell to unfavorable conditions and it initiates transition to a more tolerant state. The existence of these tolerant subpopulations is important in recurrent diseases because small subpopulations of persisters can give rise to a new stable population, complicate treatment and prevent healing, often through biofilm formation.

**Keywords: Persistence, Antibiotics, (p)ppGpp, Bet-hedging, Biofilm**

## Přehled použitých zkratek

<b>2-AA</b>	2-aminoacetophenone	2-aminoacetofenon
<b>AI</b>	acute infection	akutní infekce
<b>AMP</b>	adenosine monophosphate	adenosin monofosfát
<b>ATP</b>	adenosine triphosphate	adenosin trifosfát
<b>CSP</b>	competence-stimulating peptide	peptid stimulující kompetenci
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
<b>GDP</b>	guanosine diphosphate	guanosindifosfát
<b>GTP</b>	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
<b><i>hip</i></b>	high-persistence	vysoce perzistentní
<b>HipA</b>	high-persistence toxin A	vysoce perzistentní toxin A
<b>HipA7</b>	high-persistence toxin A7	vysoce perzistentní toxin A7
<b>HipB</b>	high-persistence antitoxin B	vysoce perzistentní antitoxin B
<b>HipBA</b>	high-persistence complex of toxin A and antitoxin B	vysoce perzistentní komplex toxinu A a antitoxinu B
<b>MDK</b>	minimum duration for killing	minimální doba pro eradikaci
<b>MIC</b>	minimal inhibitory concentration	minimální inhibiční koncentrace
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
<b>ppGpp</b>	guanosine tetraphosphate	guanosin tetrafosfát
<b>pppGpp</b>	guanosine pentaphosphate	guanosin pentafosfát
<b>PSM</b>	phenol-soluble modulín	modulín rozpustný ve fenolu
<b>Pth</b>	peptidyl-tRNA hydrolase	peptidyl-tRNA hydroláza
<b>RelA</b>	(p)ppGpp synthase/hydrolase	(p)ppGpp syntetáza/hydroláza
<b>RelE</b>	mRNA interferase toxin	mRNA interferázový toxin
<b>RI</b>	recurrent infection	recidivující infekce
<b>rRNA</b>	ribosomal ribonucleic acid	ribozomální ribonukleová kyselina
<b>SCV</b>	small-colony variants	trpasličí kolonie
<b>SpoT</b>	(p)ppGpp synthase/hydrolase	(p)ppGpp syntetáza/hydroláza
<b>TA</b>	toxin-antitoxin	toxin-antitoxin
<b>TisB</b>	SOS-induced toxin B	SOS odpovědí indukovaný toxin B
<b>tRNA</b>	transfer ribonucleic acid	transferová ribonukleová kyselina
<b>VBNC</b>	viable but nonculturable	životaschopné, ale nekultivatelné

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Vymezení definic .....	2
3. Mechanismy vzniku perzistence .....	5
3.1. Indukovaný a stochastický způsob vzniku .....	5
3.2. Strategie bet-hedging a buněčné stárnutí .....	6
3.3. Quorum sensing a jeho význam při perzistenci .....	7
3.4. Fagocytóza makrofágy .....	9
3.5. Úloha alarmonu (p)ppGpp .....	10
3.6. Systém toxin-antitoxin .....	11
3.7. SOS odpověď .....	15
4. VBNC buňky a jejich odlišnost od perzistentních .....	17
5. Klinický význam tvorby perzisterů .....	20
5.1. Úloha perzisterů při chronických infekcích .....	20
5.2. Problematika tvorby biofilmu .....	21
5.3. Nekultivovatelný krevní mikrobiom .....	23
Závěr .....	25
Seznam literatury .....	26

## 1. Úvod

Bakteriální perzistence označuje obecně schopnost buňky přežít působení nepříznivých podmínek a po jejich odstranění obnovit růst. Perzistující bakterie se často nacházejí ve stavu utlumeného metabolismu, někdy označovaném jako semidormance (Balaban et al. 2004). Perzistence může vznikat spontánně, přičemž mluvíme o tzv. strategii bet-hedging, tedy pojištění proti možné fluktuaci podmínek prostředí, nebo indukovaně, kdy je nutný stresový stimul, kterým může být nedostatek živin (Fasani a Savageau 2013).

S ohledem na klinický význam pro léčbu bakteriálních infekcí hovoříme o perzistenci nejčastěji ve vztahu k antibiotikům. Na rozdíl od rezistence nejde však o vlastnost dědičnou. Po přidání antibiotika k citlivé kultuře bakterií si malá frakce bakterií zachová životaschopnost – je perzistentní, a po odstranění antibiotika a obnovení růstu vznikne opět senzitivní populace se stejným podílem perzistentních buněk (Balaban et al. 2004). Nedědičnost a obvykle velmi nízký podíl perzistentní subpopulace tak činí komplikovanější výzkum a menší zájem vědeckých pracovníků. Ač byl fenomén popsán před více než 70 lety, stále je pro veřejnost i lékaře téměř neznámý i přesto, že spolu s tolerancí má neoddiskutovatelný potenciál přispívat ke vzniku a šíření antibiotické rezistence a s tím spojenému nárůstu selhávání léčby.

Předkládaná práce si klade za cíl literární rešerši dosavadních znalostí o fenoménu perzistence. Schopnost perzistence je univerzální a není vázaná na konkrétní bakteriální druh či kmen (Goneau et al. 2014). To podtrhuje klinický význam tohoto fenoménu, působícího potíže zejména v podobě chronických a rekurentních infekcí. Práce se v úvodní části zabývá problematikou definic, popisuje odlišnost perzistence od tolerance a rezistence, vlastní text se pak zaměřuje zejména na molekulární mechanismy vzniku s důrazem na systém interakce toxinu a antitoxinu, který hraje ústřední roli při vzniku perzisterů. V závěru práce je popsán klinický význam a současné nedostatky v léčbě bakteriálních infekcí. Stejně tak je snahou předložit možná řešení efektivnější léčby a výhledy do budoucna.

## 2. Vymezení definic

Z hlediska odolnosti bakteriálních populací k látkám s baktericidním účinkem můžeme rozlišit schopnost tolerance, rezistence a perzistence. Citlivost bakteriální populace k antimikrobní látce je vyjádřena pomocí tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace antimikrobní láky, kdy je inhibován viditelný růst testované bakterie (Andrews 2001). Tolerantní populace se od citlivé neliší v hodnotě MIC, ale v dynamice hynutí po vystavení antibiotiku (obr. 1). Zatímco u citlivé populace dochází v intervalu několika hodin k rychlému poklesu počtu živých buněk, u tolerantní populace je tento pokles mnohem pomalejší a úplná eliminace tolerantní populace může trvat násobně déle (Kester a Fortune 2014).

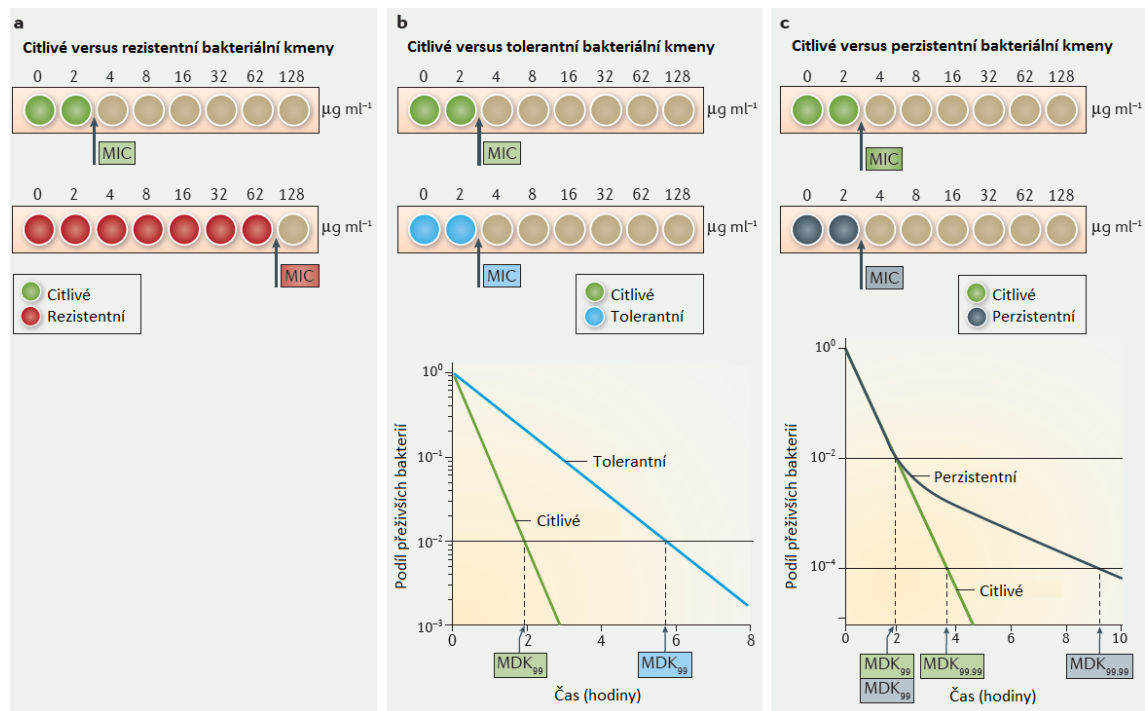
Rezistencí nazýváme dědičnou schopnost mikroorganismů odolávat vysokým koncentracím antibiotik, přičemž tuto schopnost charakterizuje MIC, která je vyšší než pro citlivou populaci. Rezistentní bakterie jsou schopny růstu při koncentraci antimikrobních látek, která by pro senzitivní bakterie byla letální, a to bez ohledu na dobu trvání léčby (Brauner et al. 2016).

O fenoménu perzistence, který je tématem této práce, se vůbec poprvé nepřímo zmínili Hobby, Meyer a Chaffee v roce 1942, kteří v rámci svého výzkumu s bakteriemi rodu *Streptococcus* nedokázali v *in vitro* podmínkách eradikovat beze zbytku k penicilinu senzitivní bakterie (Hobby, Meyer a Chaffee 1942). Jev však poprvé pojmenoval až Joseph Bigger ve své studii z roku 1944, kterému se taktéž nepovedlo kulturu senzitivních bakterií usmrtit penicilinem, a přežívající bakterie nazval perzistentními (Bigger 1944). Perzistence u bakterií bývá také nazývána fenotypová tolerance nebo adaptivní rezistence (Tuomanen a Tomasz 1990; Barclay, Begg a Chambers 1992). Více se pak tématem mikrobiální perzistence zabýval McDermott, který 14 let po Biggerovi popsal perzistentní bakterie jako buňky, jež dokáží přežít léčbu antibiotiky, ač nejsou vůči použitým léčivům rezistentní a při opětovné léčbě se u nich opět projeví citlivost. Uvádí také, že perzistence je často chápána více obecně, tedy jako schopnost bakterií přežít. McDermott ve své práci zmiňuje, že perzistence pravděpodobně souvisí se stavem pacienta a nemá vliv na genotyp, jde tedy pouze o adaptivní fenotypovou plasticitu (McDermott 1958). Podle recentní studie však perzistence či tolerance může být mezičlánkem vedoucím ke vzniku antibiotické rezistence (Levin-Reisman et al. 2017).



Balaban a kolektiv ve své studii uvádí, že bakterie, které jsou kultivovány v přítomnosti antibiotik, hynou, ale po odstranění antibiotika existuje populace bakterií, která stále přežívá. Tyto buňky nenesou geny pro rezistenci k tomuto antibiotiku a je možné je nakultivovat do nové populace se stejným podílem buněk, které přežijí opětovnou expozici antibiotikům. Tyto bakterie nazývají perzistentními. Ve své práci popisují fenotypové přepínání mezi rychlým růstem vegetativních buněk a stavem sníženého či zcela zastaveného růstu buněk perzistentních. Dále definují dva typy perzistentních bakterií: typ I, který potřebuje impuls k přechodu do perzistentního stavu, a typ II, u něž vznikají perzistentní bakteriální buňky kontinuálně a nezávisle na vnějších podmínkách. Popisují tedy uvnitř bakteriální populace 3 subpopulace, a to buňky vegetativní, perzistery typu I, kteří se vyskytují v rámci stacionární fáze a po inokulaci na čerstvé a nutričně bohaté médium spontánně přechází do fáze obnoveného růstu, a pomalu rostoucí perzistery typu II, kteří se mohou vyskytovat i v rámci fáze exponenciální (Balaban et al. 2004). U populace bakterie *Borrelia burgdorferi* bylo pozorováno zvyšování odolnosti vůči antibiotikům se stárnutím kultury, kdy v exponenciální fázi se nacházejí bakterie méně odolné v porovnání s buňkami stacionární fáze (Feng et al. 2014). S tím souvisí i morfologická změna ze spirochét (přítomných zejména v exponenciální fázi) na koky či bakterie tvořící mikrokolonie ve fázi stacionární. Z experimentů vyplynulo, že kultura nacházející se ve stacionární fázi obsahovala vyšší množství perzistujících buněk (Feng, Auwaerter a Zhang 2015).

Významu slova perzistentní se v lékařské terminologii užívá také jinak, a to ve smyslu rekurentní, tedy způsobující opakovaná a chronická onemocnění. Příčinou chronicity infekce mohou být i small-colony varianty (SCV) u *Staphylococcus aureus*, což jsou intracelulární auxotrofní buňky, které kvůli své neschopnosti syntetizovat esenciální živiny tvoří odlišnou fenotypovou variantu význačnou zejména menší velikostí kolonií oproti normálně rostoucím extracelulárním variantám této bakterie. Intracelulární fenotypová varianta bývá taktéž označována jako perzistentní, jelikož tvoří metabolicky utlumená stádia schopná přežít expozici antibiotikům (Schwerdt et al. 1995; Proctor et al. 2018). Termínu perzistentní nemusí být užito jen ve spojení s bakteriemi. Stejný princip byl popsán i u nádorových buněk, které během léčby téměř nerostou, tudíž terapii přežijí ve formě perzistentních buněk a následně jsou příčinou obnovení nádoru (Ramirez et al. 2016).



Obrázek 1. Srovnání reakce na léčbu rezistentních, tolerantních a perzistentních bakterií vůči citlivým. Bakteriální strategie názorně shrnuje výše uvedený obrázek 1, z něž je patrné, že rezistentní bakterie oproti tolerantním, perzistentním i citlivým rostou i za vyšších koncentrací antibiotik, a mají tedy posunutou hranici MIC směrem k vyšším hodnotám. Pro tolerantní, perzistentní a citlivé bakterie zůstává hranice MIC totožná a liší se v dynamice hynutí, která je charakterizována minimální dobou působení antibiotika, která je potřebná k likvidaci 99 % populace bakterií (MDK<sub>99</sub> – minimum duration for killing). MDK<sub>99</sub> pro tolerantních bakterie je vyšší než MDK<sub>99</sub> bakterií citlivých, z čehož vyplývá, že k zahubení tolerantních buněk je třeba delší doby působení antibiotik. Perzistentní bakterie do určitého bodu kopírují vývoj bakterií citlivých, ale poté můžeme pozorovat značné zpomalení hynutí. MDK<sub>99,99</sub> citlivých bakterií je značně nižší než perzistentních a křivka hynutí perzistentních bakterií je typicky dvojfázová. Převzato z (Brauner et al. 2016), upraveno.

Spojení mezi perzistencí, dormancí a metabolickou inaktivitou bylo několikrát zpochybněno (Orman a Brynildsen 2013a). Ač je toto pravidlem pro většinu dosud poznaných bakteriálních perzisterů, byly nalezeny i výjimky. Příkladem mohou být mykobakterie, jejichž populace obsahují perzistentní buňky mezi rychle rostoucími i pomalu rostoucími buňkami (Wakamoto et al. 2013). Experimenty, které zpochybňují požadavek utlumení aktivity a dormanci pro vznik perzistence, však byly následně označeny za nesprávně provedené a v současnosti se opět začíná preferovat nutnost dormance (Wood, Knabel a Kwan 2013). Je třeba si však uvědomit, že tvorba perzistentního stavu je pro každou bakteriální linii specifická a existuje více překrývajících se mechanismů, jak ho dosáhnout.

Ačkoliv není v současné době ustálená interpretace slova perzistentní, ve své bakalářské práci budu významu užívat ve zmíněném užším smyslu, jak jej nazvali Balaban a kolektiv ve své práci z roku 2004. Perzistentní bakterie definovali jako malou subpopulaci buněk, která přežívá vystavení koncentraci antibiotika vyšší než je MIC pro danou bakterii, ač ve svém genomu nenesou geny rezistence a fenotypově se neliší od bakterií citlivých (Balaban et al. 2004).

### 3. Mechanismy vzniku perzistence

#### 3.1. Indukovaný a stochastický způsob vzniku

Bakteriální perzistence může být zcela náhodná, přičemž mluvíme o spontánním stochastickém vzniku, či indukovaná vnějšími podmínkami jako je například stres při nedostatku živin (Kussell a Leibler 2005). V literatuře se často diskutuje nad indukcí vlivem antibiotik. Při experimentech s bakterií *Escherichia coli* bylo zjištěno, že v časné exponenciální fázi ani v lag fázi nedochází k navyšování množství perzistentních stádií ani za přítomnosti oxacilinu a ampicilinu, a perzisteři se objevují převážně až ve fázi stacionární (Keren et al. 2004). Oproti tomu experimenty se *S. aureus* dokazují, že bakterie vystavené subletálními dávkám gentamicinu a ciprofloxacinu po následném léčení gentamicinem, ciprofloxacinem, vankomycinem či oxacilinem v letálních koncentracích vykazují zvýšený nárůst perzistentních forem oproti bakteriím, které antibiotikům vystaveny nebyly (Johnson a Levin 2013). Tato širokospektrální odolnost může být vysvětlena tak, že ovlivnění translace či transkripce působením jednoho léčiva může mít tlumící účinky na následné procesy, které jsou potenciálním cílem jiného antibiotika (Goneau et al. 2014). Podobná snášenlivost vůči mnoha antibiotikům byla pozorována i u *Pseudomonas aeruginosa*, jejichž kultury byly izolovány od pacientů s cystickou fibrózou (Mulcahy et al. 2010). Pacienti s cystickou fibrózou trpí kvůli narušení funkce imunitního systému chronickými infekcemi. Z bakteriálních původců patří *P. aeruginosa* mezi nejobávanější patogeny u těchto pacientů a je na ni cílená antibiotická terapie, která ovšem v mnoha případech nedosáhne úplné eradikace (Döring a Gulbins 2009). Bakterie pocházející z pozdních izolátů vykazovaly nárůst perzistence nejen vůči oxacilinu, ale i tobramycinu a karbenicilinu. To je pravděpodobně způsobeno selekcí vysoce perzistentních *hip* (high-persistence) mutantů, kteří byli identifikováni v exponenciální i stacionární fázi růstu (Mulcahy et al. 2010). Tito *hip* mutanti vznikají pravděpodobně jako odpověď na poškození syntézy peptidoglykanu, a nikoliv v reakci

na specifické antibiotikum (Moyed a Bertrand 1983). Recentní studie však potvrdily indukci perzistentních *E. coli* při expozici subletálním dávkám rifampicinu a zároveň autoři pozorovali k rifampicinu méně odolné mutanty, kteří obsahovali defekty zejména v genech pro opravy DNA, syntézu efluxních pump či lipopolysacharidu. Tyto geny lze označit za geny perzistence (Cui et al. 2018). Názory na problematiku tedy ještě nejsou zcela ucelené.

I v nutričně bohatém médiu musí bakterie zhodnotit, zda je správnou strategií aktivní množení a rychlý růst, přičemž jim ale při nenadálém stresu hrozí eradikace, nebo zda je výhodnější růst zpomalit a případné nepříznivé podmínky v tomto stádiu přečkat, avšak za cenu snížení celkového fitness populace. Po vzniku perzistentního stádia však bakterie v tomto stavu nemusí zůstat natrvalo, nýbrž mohou opět přejít do stádia citlivého k antibiotikům, a stávají se tak nerozeznatelnými od běžných citlivých bakterií ve zbytku populace (Kussell et al. 2005).

### 3.2. Strategie bet-hedging a buněčné stárnutí

Fasani a Savageau vytvořili model, ve kterém popisují, že i za normálních podmínek existuje subpopulace bakterií, která předpokládá budoucí změnu podmínek, tudíž vykazuje perzistentní fenotyp jako pojištění proti eradikaci celé populace. Tato strategie, kdy jde čistě o jevy stochastické, se nazývá bet-hedging, volně přeloženo jako sázka na jistotu (Fasani a Savageau 2013). Perzistentní stav jako následek bet-hedging strategie, tedy utlumení růstu, náhodně zvolí řádově asi jen jedna bakterie z milionu (Moyed a Bertrand 1983). V souladu s touto teorií Thattai a Van Oudenaarden pozorovali izogenní bakteriální populaci a zjistili, že se díky stochastickým mechanismům tvoří malé subpopulace se sníženým růstem, ač všechny čelí stejným životním podmínkám. Tyto pomalu rostoucí subpopulace vykazují odlišnou genovou expresi oproti zbytku normálních bakterií a snížené fitness. Za laboratorních podmínek se uvedená heterogenita zdá být spíše nevýhodou, ovšem přirozené prostředí je typické změnami, které by pro homogenní populaci bakterií mohly být letální (Thattai a Van Oudenaarden 2004).

Buněčné stárnutí, jinak řečeno přechod do senescentního stavu, může být taktéž přirozeným způsobem, jak bakterie mohou v hostiteli přežívat. Projevy senescence však vykazují pouze asymetricky se dělící buňky, kdy jedna z dceřiných buněk ztrácí schopnost účinně růst a rozmnožovat se (Ackermann, Stearns a Jenal 2003). Aldridge a kolektiv zkoumali asymetrické prodlužování a následně i dělení v rámci klonální

populace *Mycobacterium smegmatis*. Bylo zjištěno, že po asymetrickém dělení vznikne rychle rostoucí dceřiná buňka, která je ve většině případů více senzitivní k antibiotikům než druhá dceřiná buňka, která roste pomalu (Aldridge et al. 2011).

### 3.3. Quorum sensing a jeho význam při perzistenci

Velký podíl perzistujících buněk tvoří populace bakterií *E. coli* či *S. aureus*, u kterých se fenomén perzistence nejvíc studuje, nicméně jev byl pozorován i u buněk *P. aeruginosa*. Perzistentní stav *P. aeruginosa* může být vyvolán mechanismem známým jako *quorum sensing* (Möker, Dean a Tao 2010). *Quorum sensing* je široce uplatňovaný způsob komunikace bakterií, který prostřednictvím uvolňování signálních molekul umožňuje buňkám rozpoznat denzitu bakterií v okolí a zajistit koordinovanou reakci na úrovni celé populace. Finální molekulou v rámci komunikace *P. aeruginosa* je sekundární metabolit patřící mezi fenaziny, pyocyanin, který je zároveň i faktorem virulence a na jiné druhy bakterií působí jako antibiotikum (Dietrich et al. 2006; Mahajan-Miklos et al. 1999). Ve výše zmíněné komplexní studii Möker a kolektiv dále pozorovali, že populace *P. aeruginosa* vystavená běžným stresovým podmínkám, jako je hyperosmotický a tepelný šok, oxidativní stres či přítomnost antibiotika, netvoří větší podíl perzistujících buněk. Následně experimentálně dokázali, že přidáním 2 mM pyocyaninu do exponenciálně rostoucí populace dojde až ke dvacetinásobnému nárůstu podílu perzistentních buněk, naopak stejný experiment provedený v rámci fáze stacionární nevyvolá žádné změny. Fungování pyocyaninu je specifické pro *P. aeruginosa*, což dokazuje skutečnost, že experiment zopakovaný s kulturami *E. coli* či *S. aureus* danou populaci eradikuje, jelikož pyocyanin zde figuruje jako antibiotikum. Působení pyocyaninu však nejspíš může nahradit jiná signální molekula, jelikož i mutantní kmeny neschopné látku produkovat mohou tvořit perzistentní stádia ve stejných koncentracích jako *wild type* kmeny (Möker, Dean a Tao 2010).

Výše zmíněné závěry dále podpořil výzkum vlivu 2-aminoacetofenonu (2-AA), další signální molekuly produkované bakterií *P. aeruginosa*. Bylo zjištěno, že mutantní kmeny neschopné produkovat 2-AA vykazují 10x nižší výskyt perzisterů než nemutované (*wild type*) kmeny. Po přidání 2-AA k této populaci se hodnoty výskytu perzisterů navrací k hodnotám podobným u *wild type* kmenů. Působení 2-AA vede ke snížení translace, a to zejména prostřednictvím utlumení exprese genů pro ribozomální proteiny, genů

pro syntézu tRNA a translačních faktorů. 2-AA také stimuluje tvorbu ribozomálních modulačních faktorů, které činí ribozomy inaktivními. 2-AA navíc pozitivně ovlivňuje tvorbu perzistentních stádií i u jiných druhů bakterií jako je *Burkholderia thailandensis* či *Acinetobacter baumannii*, které byly izolovány spolu s *P. aeruginosa* (Que et al. 2013; Yoshida et al. 2004).

Tvorba perzistentních stádií pod vlivem *quorum sensing* byla pozorována i u grampozitivní bakterie *Streptococcus mutans*. Tyto buňky tvoří perzistentní stadia zejména ve stacionární fázi, kde činí asi 1 % populace. Geny důležité pro fungování *quorum sensing* byly výrazně upregulovány za stresových podmínek, jako je teplota nad 50 °C, kyselé prostředí (pH 5) či v přítomnosti peroxidu vodíku, přičemž ve všech případech docházelo k měřitelnému nárůstu podílu perzistentních forem. Mutantní kmen neschopný odpovědi na signální feromon CSP, který v nemutovaném kmenu zajišťuje mezibuněčnou komunikaci, tvoří výrazně méně perzistentních stádií. Z toho plyne, že tvorba perzistentních stádií je odpovědí nejen na samotný stres nezávisle na systému *quorum sensing*, ale je ovlivněna i signálními molekulami v rámci mezibuněčné komunikace. Bakterie vystavené stresu tak připravují další bakterie v populaci na možné nepříznivé podmínky a umožňují jim přežít prostřednictvím transkripčních změn a tvorby perzistentních forem (Leung a Lévesque 2012). Výše zmíněné ovšem neplatí obecně. U bakterie *Staphylococcus epidermidis* po indukci *quorum sensing* nedocházelo k navýšení perzistentních stádií (Shapiro, Nguyen a Chamberlain 2011). To podporuje myšlenku, že perzistentní stav není vyvolán u všech bakterií stejným způsobem. U bakterie *S. aureus* byl také popsán vliv na přechod do perzistence prostřednictvím signální molekuly, konkrétně působením toxinu PSM (phenol-soluble modulín). V přítomnosti tohoto virulentního faktoru dochází k nižší tvorbě perzistentních stádií, což se děje zejména při akutních infekcích. Při chronických infekcích je naopak tvorba PSM utlumena a perzistentní stadia mohou vznikat. Molekula PSM podle autorů studie přímo interaguje s membránami perzistentních buněk a obnovuje jejich citlivost vůči gentamicinu a ciprofloxacinu, Výše uvedené poznatky vedou k závěrům, že perzistentní stav *S. aureus* může být ovlivněn změnami v buněčné stěně (Bojer et al. 2018; Xu et al. 2017).

### 3.4. Fagocytóza makrofágy

Bylo prokázáno, že přechod do perzistentního stavu může být vyvolán fagocytózou makrofágy. Tento jev byl zkoumán na bakteriích rodu *Salmonella*, jejíž populace po internalizaci makrofágem zvýšila podíl perzistentních stádií až tisíckrát v porovnání s inokulem. Pro označení těchto bakterií za perzistentní svědčí fakt, že jejich potomstvo je citlivé k antibiotikům. Populace fagocytovaných bakterií je heterogenní, kromě mrtvých či replikujících se buněk obsahuje i nereplikující se, avšak metabolicky aktivní buňky, přičemž ale jen část z nich může obnovit růst při nové infekci naivního makrofága, či při přechodu na čerstvé médium. Tuto subpopulaci pak autoři studie označují za perzistery, jelikož může dát vznik nové senzitivní populaci se stejným podílem perzistujících buněk, a být tak příčinou rekurentní infekce. Pokud uměle zabráníme fagocytóze, nedojde k výše zmíněnému nárůstu perzistentních forem, což naznačuje, že internalizace přechod k perzistenci podporuje. K tomu dochází pravděpodobně vlivem acidifikace, která u některých buněk umožní replikaci, u dalších naopak replikaci zabrání a umožní dlouhodobě v hostiteli perzistovat. U bakterie *E. coli* nebyl pozorován nárůst perzisterů po fagocytóze makrofágy, ač se u této bakterie stejně jako u bakterií rodu *Salmonella* významně uplatňuje systém toxin-antitoxin třídy II, který je zde aktivován mimo jiné právě acidifikací (viz kapitola 3.6.) (Helaine et al. 2014). Toxinem u *Salmonella enterica serovar Typhimurium* je acetyltransferáza TacT, která využívá acetylkoenzymu A k acylaci ribozomálních proteinů a aminokyseliny připojené k tRNA. Pokud je acetylována aminokyselina na nabitě tRNA, nemůže dojít k tvorbě peptidové vazby, což inhibuje translaci. Inhibice translace vede k zastavení růstu a dochází k prodloužení lag fáze, resp. přechodu do perzistentního stavu. Křivka hynutí je typicky dvojfázová a hodnota MIC se nemění, což je jasným znakem perzistence. Přechod do fáze obnovení růstu zůstává stále ne zcela jasný. Spekuluje se nad významem antitoxinů, které neutralizují toxiny. Jelikož však toxiny brání translaci, docházelo by k převaze antitoxinů jen stěží. Uplatňují se nejspíš další detoxifikační proteiny a peptidyl-tRNA hydroláza (Pth), která umožňuje recyklovat acetylované molekuly. Pro tvorbu perzisterů totiž není důležité absolutní množství toxinů jako především jejich poměr vůči Pth a antitoxinu (Cheverton et al. 2016).

Podobný fenomén byl zkoumán taktéž u mykobakterií, které vykazovaly po vystavení antibiotiku pro perzistery typickou dvojfázovou křivku hynutí. Po přeléčení

nakažené larvy *Danio rerio* isoniazidem v makrofázích stále přežívaly odolné bakterie a bylo taktéž prokázáno, že vhodně prostředí uvnitř makrofága napomáhá odolávat antibiotikům. MIC populace se nezměnila, což vede k závěrům, že nejde o geneticky podmíněnou rezistenci. Další pokusy ukázaly, že odolnost vykazují rostoucí a dělicí se bakterie, což je v rozporu s předpokladem, že jde o dormantní stádia. Zjistilo se, že intracelulární pobyt v makrofágu indukuje tvorbu efluxních pump, které jednak umožňují bakteriím růst a jednak i zapříčiňují odolnost vůči antibiotikům. Odolnost navíc přetrvává ještě několik dní po lýzi makrofága a uvolnění bakterií do extracelulárního prostoru (Adams et al. 2011). Již existující perzistentní buňky mohou taktéž být fagocytovány makrofágy. Vlivem změn na buněčné stěně jsou však perzisteri hůře rozpoznatelní ve srovnání s aktivními stádii, což má za následek jejich nižší fagocytózu a problematickou eliminaci ať už ve stavu perzistentním, či po resuscitaci (Mina a Marques 2016).

### 3.5. Úloha alarmonu (p)ppGpp

Na nepříznivé podmínky vyvolávající stres reagují bakterie prostřednictvím tzv. stringentní odpovědi a tvorbou alarmonů. Za alarmony považujeme látky, jejichž přítomnost signalizuje vliv stresového prostředí na buňku. Cashel a kolektiv popsali stringentní odpověď jako reakci na nedostatek aminokyselin, kdy bakterie zvýší syntézu proteolytických enzymů, a naopak utlumí syntézu ribozomálních a transferových RNA. Hlavním mediátorem tohoto procesu je guanosin tetrafosfát či guanosin pentafosfát, souhrnně (p)ppGpp (Michael Cashel a Gallant 1969). Tato molekula vzniká za účasti proteinu RelA, naopak cytosolický protein SpoT katalyzuje hydrolýzu alarmonu (p)ppGpp, může se však sníženou měrou podílet i na jeho syntéze (Avarbock, Avarbock, a Rubin 2000; Heinmeyer a Richter 1977; Haseltine et al. 1972). Úlohu stringentní odpovědi pro vznik perzistence prokázal Maisonneuve a kolektiv. Po provedení knockout mutace genů *relA* a *spoT* došlo přibližně k šedesátinásobnému poklesu počtu bakterií vykazující perzistenci po inkubaci s ciprofloxacinem a k přibližně třicetinásobnému poklesu po inkubaci s ampicilinem v porovnání s nemutovaným kmenem. Při experimentální expresi konstitutivně aktivního proteinu RelA v bakteriích došlo ke zvýšení počtu perzistentních bakterií pětaticetkrát (Maisonneuve, Castro-Camargo, a Gerdes 2013).



Regulace přechodu do stavu perzistence prostřednictvím stringentní odpovědi je zprostředkována skrze toxin-antitoxin systém a je závislá na koncentraci anorganického polyfosfátu. Navýšení koncentrace (p)ppGpp v cytoplasmě *E. coli* vede ke kompetitivní inhibici polyfosfatázy, která polyfosfát hydrolyzuje, a tím k nárůstu koncentrace polyfosfátu (Cashel et al. 1996). Polyfosfát následně tvoří komplex s Lon proteázou, která degraduje ribozomální proteiny (Kuroda et al. 2001), a zároveň degraduje nestabilní molekulu antitoxinu, což má za následek navození stavu perzistence (Maisonneuve, Castro-Camargo a Gerdes 2013), jak je blíže popsáno v následující kapitole. Alarmon (p)ppGpp také tlumí proteosyntézu inhibicí transportu methioninu, který pak nemůže být inkorporován do nově syntetizovaného polypeptidu (Svitil, Cashel a Zyskind 1993).

Ačkoliv (p)ppGpp svou signalizací může vést k perzistenci, není pro tento stav nezbytnou molekulou. Chowdhury a kolektiv při svých pokusech zjistili, že při absenci alarmonu dochází ke stonásobnému poklesu perzistence k ciprofloxacinu, nicméně jeho knockout nemá vliv na počet perzisterů za přítomnosti ampicilinu. To naznačuje, že perzistence může být navozena více na sobě nezávislými mechanismy. Pokud buňka postrádá (p)ppGpp, tak prostřednictvím jiných typů regulace sníží růstovou rychlost, čímž se stává perzistentní (Chowdhury, Kwan a Wood 2016).

### 3.6. Systém toxin-antitoxin

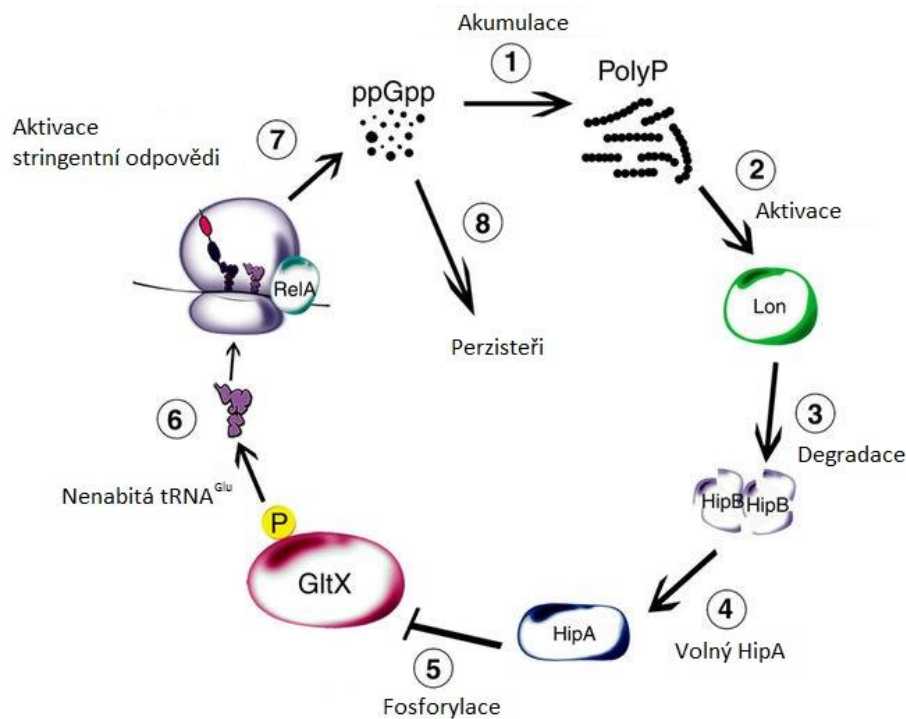
Systém toxin-antitoxin (TA) je kódován na chromozomu či plazmidu dvěma geny, které dávají vznik toxinu a antitoxinu. V současnosti je popsáno 7 typů TA systémů, jenž se v různém zastoupení nachází v genomu bakterií gramnegativních i grampozitivních a stejně tak i *Archaea*. Téměř všechny volně žijící bakterie obsahují systém toxin-antitoxin (Pandey a Gerdes 2005; Grønlund a Gerdes 1999). Antitoxin je obecně molekula méně stabilní, jelikož odhaluje flexibilní C-konec, který se stává cílem proteáz (Schumacher et al. 2009). S perzistencí je často spojován TA modul typu II (Keren et al. 2004), který je popsán níže na příkladu systému HipBA. Samotná přítomnost TA operonu však ještě nedeterminuje buňku k perzistentnímu stádiu, důležitá je buněčná koncentrace toxinů, afinita k antitoxinům (Germain et al. 2015; Rotem et al. 2010) a poměr toxinů k antitoxinům (Korch a Hill 2006).

Jako první dali TA systém do souvislosti s perzistencí Moyed a Bertrand, kteří izolovali mutanty *hip* (high-persistence) s vyšší hladinou toxinů u bakterie *E. coli*

a popsali gen *hipA* jakožto možný genetický element způsobující stav sníženého růstu (Moyed a Bertrand 1983), jeho funkce však byla popsána až později. Mnoho kopií TA modulů vykazují pomalu rostoucí volně žijící bakterie, zatímco jejich rychle rostoucí patogenní příbuzní jej obsahují pouze v několika kopiích. Genomy obligátních parazitů a dalších symbiotických organismů žijících v těsné blízkosti s jinými organismy TA systém nekódují, či s výrazně nižší frekvencí oproti volně žijícím. Pomalu rostoucí bakterie s mnoha TA kopiemi rostou často na nutričně chudých médiích či využívají energeticky málo výhodný metabolismus chemolitotrofie, tudíž kontrola genové exprese prostřednictvím TA systému může zajistit vyšší fitness. Naopak parazitické bakterie žijící za výhodných a konstantních podmínek TA systém nepotřebují (Pandey a Gerdes 2005).

Hip operon bakterie *E. coli* obsahuje kromě regulační sekvence dva geny, a to dlouhý *hipA* kódující toxin a krátký *hipB* kódující antitoxin, ležící ve většině případů upstream od toxinu (Black, Irwin a Moyed 1994; Pandey a Gerdes 2005). Pro správné fungování toxinu HipA a následný přechod do perzistentního stádia je nutná přítomnost molekul (p)ppGpp, polyfosfátu i Lon proteázy (Germain et al. 2015). Pokud hladina toxinů přesáhne prahovou hodnotu, může zapříčinit přechodnou zástavu bakteriálního růstu (Rotem et al. 2010). To může mít za následek odolnost k antibiotikům cíleným na aktivně rostoucí buňky, tedy stav perzistence (Balaban et al. 2004). Toxin HipA je serin/threonin proteinkinázou, tudíž je schopný vázat ATP a následně fosforylovat proteiny (Schumacher et al. 2009). Příkladem HipA fosforylovaného proteinu je enzym glutamyl-tRNA syntetáza, která váže aminokyselinu glutamát na tRNA. K fosforylaci dojde na serinu přítomném na konzervované smyčce aktivního centra, čímž dochází k inhibici aminoacylační aktivity syntetázy (Germain et al. 2013). V případě přítomnosti antitoxinu HipB se antitoxin váže do velkého žlábků DNA na *hipBA* operon a funguje jako transkripční autoregulátor. Následně se na komplex HipB-DNA vážou i dvě molekuly toxinu HipA. Pokud je molekula HipA takto vázána, dochází k její neutralizaci na základě konformační změny, přičemž HipA již nemůže indukovat perzistenci, a zároveň dochází k represi exprese *hipBA* operonu. K aktivaci operonu je nejprve nutné degradovat či odstranit HipB (Schumacher et al. 2009). Ač se původně myslelo, že výskyt toxinu HipA při poškození genu *hipB* je pro bakterii toxický a má za následek buněčnou smrt (Black, Irwin a Moyed 1994), později bylo prokázáno, že dlouhodobá přítomnost toxinu HipA při absenci antitoxinu HipB má za následek pouze vyšší pravděpodobnost navození dormantního stavu a nikoliv lýzi buňky. Dormantní stav je pouze přechodný

a k obnově růstu dochází vlivem antitoxinu HipB zpravidla po odstranění antibiotik (Korch a Hill 2006). Feng a kolektiv publikovali studii, ve které popsali model bistability. Podle autorů je pro vyvolání perzistentního stavu potřeba zvýšení hladiny toxinu HipA, přičemž koncentrace HipB zůstává za normálního i perzistentního stavu stejná. Jedním stabilním stavem označují stav normálního růstu, druhým pak stav perzistence. Určujícím faktorem je podle nich zředovací rychlost, která udává, zda jediným stabilním stavem budou buňky perzistentní, či vegetativní, případně zda budou vzájemně koexistovat. Při růstu populace přechází buňky do méně příznivých podmínek, zředovací rychlost klesá a stabilním stavem se stává stádium perzistence. Za těchto podmínek roste i množství toxinu HipA, který přechod do perzistence umožňuje. Tento model zároveň vysvětluje častější přítomnost perzisterů v rámci stacionární fáze (Feng et al. 2014).



Obrázek 2. Zjednodušené schéma možné regulace prostřednictvím systému toxin-antitoxin. Na počátku stacionární fáze dochází k hromadění alarmonu (p)ppGpp, vlivem toho dochází ke kumulaci polyfosfátu, který aktivuje Lon proteázu. Lon proteáza následně degraduje antitoxin HipB a uvolní z HipBA komplexu volný toxin HipA. HipA fosforyluje glutamyl-tRNA syntetázu, tudíž nedochází k nabití tRNA glutamátem. Kumulace nenabitých tRNA aktivuje protein RelA, což má za následek další hromadění (p)ppGpp a následný vznik perzistentních stádií. Převzato z (Kaspy et al. 2013), upraveno.

Buňky nesoucí mutantní alelu *hip*, která obsahuje bodovou substituci v genu *hipA*, vykazují vyšší odolnost vůči ampicilinu i jiným antibiotikům, jako jsou aminoglykosidy

to Bramycin a Kanamycin, stejně tak jsou více odolné k tepelnému šoku (Keren et al. 2004). Přítomnost mutantní alely *hipA7* zapříčiňuje podobnou míru vzniku perzistence jako nadprodukce *wild type* toxinu HipA, ačkoliv mutantní toxin HipA7 vykazuje sníženou schopnost ovlivňovat proteosyntézu (Korch a Hill 2006). Germain a kolektiv experimentálně potvrdili, že pokud je přítomná mutantní alela *hipA7*, jejíž produkt toxin HipA7 vykazuje sníženou vazbu na antitoxin HipB, dochází ke 100 až 1000násobnému nárůstu vzniku perzistentního stavu, který je takřka nezávislý na přítomnosti antitoxinu HipB kvůli nízké afinitě (Germain et al. 2015).

Shan a kolektiv potvrdili vliv toxin-antitoxin systému na vznik perzistence u bakterie *E. coli*, avšak zpochybnili dráhu aktivace přes alarmon, polyfosfát a Lon proteázu. Mutanti v Lon proteáze podle nich nevykazují nižší perzistenci vůči gentamicinu (Shan et al. 2015), nicméně autoři recentní studie tyto výsledky zpochybnili a označili je za artefakty. Při experimentech s *E. coli* pak prokázali význam Lon proteázy při vzniku perzistence. Rozdílnou interpretaci vysvětlili tak, že knockout enzymu Lon vede k poškození DNA, na které buňka reaguje utlumením růstu (Harms et al. 2017). Možnou interpretací rozdílných výsledků by byl také význam Lon proteázy pouze ve specializovaných případech, např. za přítomnosti výše zmiňovaného HipA/HipB toxin-antitoxin systému. Pro aktivaci jiných toxin-antitoxin systémů pravděpodobně její význam klesá (Chowdhury, Kwan a Wood 2016). Dříve předpokládaná hypotéza, že všechny antitoxiny typu II jsou degradovány Lon proteázou, je tedy diskutabilní a stále se nepotvrdil její obecný význam při vzniku perzistence (Ramisetty et al. 2016; Germain et al. 2015).

Možností regulace proteosyntézy pomocí TA modulů existuje více druhů. HipBA systém je oproti jiným TA systémům typu II relativně pomalý. Regulace prostřednictvím toxinu HipA trvá přibližně 40 minut (Korch a Hill 2006), kdežto odlišný toxin RelE využívající štěpení mRNA v A místě na ribozomu (Pedersen et al. 2003) reguluje řádově v jednotkách minut (Kjelstrup et al. 2002). Množství toxinu musí pro navození perzistence dosáhnout určité prahové hodnoty, která je závislá na množství antitoxinů. Kvantita toxinů navíc určuje i délku trvání perzistentního stavu, tedy čím více toxinů, tím později bakterie obnoví svůj růst (Rotem et al. 2010).

Geny pro toxin-antitoxin modul byly popsány na chromozomech i plazmidech bakterií. Vyskytují se však výhradně u volně žijících bakterií vystavených měnícím se životním podmínkám. Obligátně patogenní, symbiotické, či bakterie obecně žijící za konstantních podmínek TA systémy postrádají. Výjimkou z tohoto pravidla se zdají být intracelulární bakterie *Rickettsia conorii* a *Coxiella burnettii*, které TA moduly obsahují. To však může být způsobeno jejich nedokončeným evolučním vývojem, což potvrzuje i fakt, že příbuzná bakterie *Rickettsia prowazekii* s redukovanejším genomem TA systém neobsahuje (Pandey a Gerdes 2005).

Ačkoliv u gramnegativních bakterií hrají TA systémy důležitou roli při tvorbě perzistentních stádií, u grampozitivních bakterií zůstává jejich úloha nezodpovězená. U bakterie *S. aureus* byly provedeny experimentální knockouts TA modulů, nicméně nebyl pozorován žádný vliv na tvorbu perzistentních forem. Vysvětlením může být přítomnost jiného TA modulu, který převezme úlohu knockoutovaných genů, či jiný mechanismus vzniku perzistence závislý na nízké hladině ATP, jako je tomu u bakterií *S. aureus* ve stacionární fázi (Conlon et al. 2016).

### 3.7. SOS odpověď

Jako SOS odpověď označujeme stresovou reakci bakterií na poškození DNA, přičemž tato odpověď vyžaduje určité genetické vybavení (Radman 1975). Bylo zjištěno, že pokud experimentálně vyřadíme některou z drah pro opravy DNA, významně klesne podíl perzisterů, a to cca 40x až 100x v závislosti na typu vyřazené dráhy. Z experimentů také vyplývá, že po vystavení bakterií antibiotiku ciprofloxacinu, které spadá mezi fluorochinolony, je spuštěna SOS odpověď, která vede k tvorbě perzistentních stádií (Dörr, Lewis a Vulić 2009). Fluorochinolony jsou látky, které znemožňují správnou funkci topoizomerázy a gyrázy. Tato antibiotika se umí vázat na oba zmíněné enzymy, následkem čehož dojde k fragmentaci DNA, inhibici její syntézy a zástavě buněčného růstu (Malik, Zhao a Drlica 2006). Při blokaci SOS drah dochází k poklesu perzisterů v podobném množství jako při knockoutu dráhy pro opravy DNA. Výše uvedené potvrzuje i skutečnost, že bakterie s nepřetržitou indukcí SOS odpovědi formují perzistentní stádia v 20x větším množství než *wild type* kmen. Síla SOS odpovědi u perzistentních buněk však není příliš vysoká. Naopak buňky se silnou úrovní exprese SOS odpovědi sice umí nějaký čas odolávat, ale při dlouhodobém vystavení

ciprofloxacinu hynou. Z toho lze usuzovat, že bakterie sice spouští v reakci na antibiotikum SOS odpověď, ale samotné spuštění SOS odpovědi není pro vznik perzistence dostatečné. Jelikož perzistentní bakterie vykazují reakci v podobě SOS odpovědi, nemůžeme je označit za striktně dormantní. Mechanismy, jak přežít vystavení různým typům antibiotik, jsou však odlišné. Tedy pokud vyřadíme dráhu vedoucí k tvorbě perzisterů za přítomnosti ciprofloxacinu, jejich vznik za působení jiného antibiotika nemusí být ovlivněn. Závěry, že perzistentními se stávají buňky se slabě poškozenou DNA, které vykazují pouze mírnou SOS odpověď, vyplynuly z poznatků získaných z rostoucích kultur exponenciální fáze (Dörr, Lewis a Vulić 2009). V roce 2015 však byly zpochybněny díky experimentům na nerostoucích kulturách. Völzing a Brynildsen zjistili, že perzistenci vykazují jak buňky obsahující enzym RecA, který je typickou molekulou pro SOS odpověď, tak buňky bez něj, jež na zlomy DNA v průběhu expozice antibiotiku neodpovídají. Význam SOS odpovědi podle nich narůstá až v rámci regenerace, tedy po odstranění antibiotika, a záleží spíše na umístění a povaze poškození chromozomu než na jeho rozsahu (Völzing a Brynildsen 2015).

Alternativním vysvětlením vlivu SOS odpovědi na vznik perzistence může být působení na úrovni regulace toxin-antitoxin modulu, přičemž po aktivaci reakce na stres dochází i k indukci toxinu TisB. Pokud neumožníme bakterii produkovat TisB toxin, či znemožníme SOS odpověď, můžeme pozorovat pokles v tvorbě perzistentních forem (Dörr, Vulić a Lewis 2010). Toxin TisB tvoří póry v membráně, čímž dojde k poklesu protonmotivní síly a tvoří se méně ATP. Následuje přechod do stavu podobného dormanci a vznikají perzistentní stádia (Gurnev et al. 2012). Význam SOS odpovědi na vznik perzistence tedy není ještě zcela objasněn a je třeba dalšího výzkumu.

## 4. VBNC buňky a jejich odlišnost od perzistentních

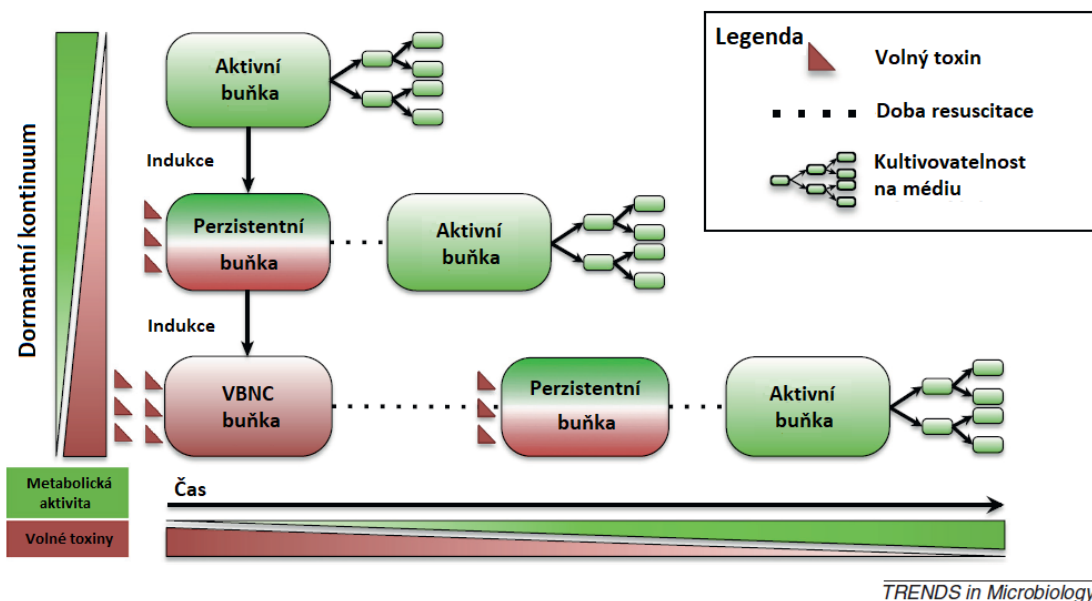
Stav bakterií, které za normálních okolností tvoří na běžných kultivačních médiích kolonie, ale za jiných okolností stejný kultivační postup selhává a buňky nerostou, označujeme jako „*viable but nonculturable*“ (VBNC). Za normálních podmínek jde však o rostoucí a metabolicky aktivní buňky, které lze převést do fáze obnoveného růstu (Oliver 2005).

Mezi buňky, které často tvoří VBNC formy, spadá mnoho významných, zejména lidských patogenů z řad grampozitivních i gramnegativních bakterií. Po vystoupení z VBNC stavu, který je velmi blízký dormanci, mohou tyto patogenní bakterie reiniciovat infekci. Příkladem může být *Vibrio cholerae* (Colwell et al. 1996), *Legionella pneumophila* (Steinert et al. 1997), *Listeria monocytogenes* (Gião a Keevil 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (Salina et al. 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Khan et al. 2010) či bakterie rodu *Salmonella* (Liao, Jiang a Zhang 2018). VBNC stav může tvořit i *S. aureus* v rámci biofilmu v reakci na přítomnost vankomycinu (Pasquaroli et al. 2013).

Stejně jako perzistence i VBNC stav bakterií komplikuje léčbu a umožňuje bakteriím přežít letální dávky antibiotik produkcí odolných stádií vlivem sníženého růstu (Nowakowska a Oliver 2013). Buňky přechází do stavu VBNC vlivem stresových podmínek, ke kterým jsou i následně odolnější. Indukční účinky má pravděpodobně nadměrná salinita, hladovění na nutričně chudých médiích a nízká teplota, zejména pak kombinace těchto faktorů (Wong a Wang 2004; Colwell 2000). Bylo zjištěno, že na tvorbu obou typů odolných stádií má taktéž vliv přítomnost lidského séra, které signifikantně zvyšuje podíl VBNC i perzistentních bakterií prostřednictvím aktivace toxin-antitoxin systému. Bylo tak potvrzeno, že toxin-antitoxin modul má podstatnou roli nejen při tvorbě perzistentního, ale i VBNC stavu (Ayrapetyan et al. 2015). Zatímco však perzistentní buňky jsou schopny obnovit svůj růst krátce po odstranění stresového faktoru, VBNC buňky vyžadují delší čas a specifické podmínky, které jsou odrazem podmínek, za kterých VBNC stádia vznikala. Příkladem mohou být VBNC buňky vznikající ve 4 °C, které obnoví svůj růst pouhým přechodem na nutričně bohaté médium. Naopak VBNC stádia ze stejné populace, která ovšem vznikla za pokojové teploty, neobnovila růst na žádném z dostupných médií (Pinto et al. 2011).

Kultura s VBNC stádii vykazuje podobnou dvojfázovou křivku hynutí jako kultura s perzistery. Ačkoliv jsou oba stavy málokdy dávány do vzájemné souvislosti, v roce

2015 byla vyslovena hypotéza o tzv. dormantním kontinuu. Tato teorie předpokládá, že perzistence je přechodnou fází mezi stavem normálního růstu a stavem VBNC, tedy hluboké dormance. VBNC buňky mají podle autorů ještě vyšší podíl toxinů vůči antitoxinům než buňky perzistentní, jelikož byly vystaveny dlouhodobějšímu stresu. A zatímco perzisteři mohou po odstranění stresu (antibiotikum) díky relativně nízkému podílu toxinů rychle obnovit růst, VBNC buňkám trvá odstranění vysokého podílu toxinů a přechod do rostoucího stádia mnohem déle. Existují tedy dva prahy podílu toxinů – nižší, který zapříčiňuje perzistenci, a vyšší, umožňující přechod do VBNC (Ayrapetyan, Williams a Oliver 2015).



Obrázek 3. Hypotéza dormantního kontinua, která popisuje perzistentní buňky jakožto mezistádia mezi metabolicky aktivními, rostoucími a kultivovatelnými buňkami a bakteriemi ve stavu VBNC, tedy hluboké dormance. VBNC buňky podle této hypotézy mají výrazně vyšší podíl toxinů vlivem dlouhodobějšího vystavení stresovým podmínkám, což má za následek delší čas nutný pro odstranění toxinů, a tedy delší dobu resuscitace. Perzisteři jsou naopak schopni rychlého přechodu do kultivovatelných a metabolicky aktivních forem. Převzato z (Ayrapetyan, Williams a Oliver 2015), upraveno.

Nejnovější studie však předkládají myšlenku, že VBNC a perzistence popisuje ten samý bakteriální stav. Kim a kolektiv ve svých experimentech vystavili buňky nutriční deprivaci, čímž získali VBNC formy, perzistenci pak indukovali antibiotikem rifampicinem. Buňky, které vytvořily kolonie na médiu vystavenému podmínkám indukujícím VBNC stav, se shodovaly s perzistentními a svůj růst obnovily krátce po přenesení do vhodných podmínek. Podobnost VBNC a perzistentních buněk potvrdilo i pozorování bakteriální morfologie. Zatímco buňky exponenciální fáze, které sloužily



jako pozitivní kontrola, byly tyčinkovitého tvaru, VBNC i část perzistentních vykazovaly tvar sférický. Některé nově zformované perzistentní buňky byly zpočátku tyčinkovité, ale se stárnutím podstupovaly morfologickou změnu a zkracovaly svůj tvar (Kim et al. 2018).

Vztah mezi VBNC a perzistencí tedy zůstává nejasný, nicméně je jisté, že oba stavy sdílí mnoho společných znaků. Obě odolná stádia například vznikají jako odpověď na stresové podmínky, ale i stochasticky v rámci exponenciální růstové fáze, tedy jako tzv. bet-hedging strategie čili pojištění do budoucna (Ayrapetyan, Williams a Oliver 2015).

## 5. Klinický význam tvorby perzisterů

### 5.1. Úloha perzisterů při chronických infekcích

V současné době se mikrobiologické laboratoře věnují spíše otázkám rezistence. Vzhledem k jasně měřitelnému nárůstu MIC u rezistentních bakterií jde v porovnání s perzistencí o snadno pozorovatelný fenomén. Při léčbě chronických infekcí se však lékaři často potýkají s problematickou eradikací bakterií, u kterých není z pohledu jejich citlivosti k antibiotikům důvod k selhání léčby. Po léčbě vysokými dávkami antibiotik sice dojde k vymizení citlivých bakterií, nikoliv však perzistentních. Souvislost mezi perzistencí a selháním léčby byla poprvé pozorována u populace bakterií *P. aeruginosa* izolované od pacienta s cystickou fibrózou. Pacienti s cystickou fibrózou bývají léčeni pravidelnými vysokými dávkami antibiotik, což vede k selekci high-persistence (*hip*) mutantů, a tedy k nárůstu perzisterů, kteří se v důsledku selekce objevují zejména v pozdních izolátech. Sekvence genomů bakterií z pozdních izolátů ukazuje hromadění mutací (mezi něž patří i *hip* mutace), které snižují virulenci, čímž nedochází k adekvátní odpovědi hostitelova imunitního systému. Tyto mutace vedou také k nárůstu rezistentních bakterií, vyšší nárůst však vykazují také multitolerantní perzisteři, kteří způsobují recidivu infekce dýchacích cest u pacientů s cystickou fibrózou (Mulcahy et al. 2010).

Goneau a kolektiv testovali uropatogenní kmeny *E. coli*, které byly izolovány jednak z akutní (AI) a jednak z recidivující (RI) infekce. Perzistentní bakterie původem z rekurentní infekce vykazovaly mírný růst i přes letální koncentraci antibiotik v dávkách běžně používaných v rámci léčby. Stejný trend byl však pozorován i při desetinásobném navýšení letální dávky. Naopak z výsledků bylo patrné, že AI kmeny měly nižší životaschopnost, a stejně tak i méně tvořily perzistentní stádia. Při inkubaci se subletálními dávkami ciprofloxacinu a gentamicinu byl pozorován nárůst perzistentních forem zejména u RI izolátů, při kultivaci za subletálních koncentrací samotného gentamicinu vzniká vyšší procento perzistentních stádií i u AI izolátů. To podporuje myšlenku vzniku perzistence v reakci na antibiotika. Z výše popsaného plyne také fakt, že profylaktické užívání antibiotik může vést k nárůstu rekurentních a chronických infekcí (Goneau et al. 2014).

V současnosti se zdá být pro eradikaci perzisterů vhodnou léčbou specifická kombinace dvou až tří antibiotik, přičemž část je účinná na rostoucí a část na nerostoucí buňky. Příkladem může být studie provedená na bakterii *B. burgdorferi*, která ukázala,

že kombinace daptomycinu, doxycyklinu a cefoperazonu byla schopná zcela vymýtit nejodolnější perzistentní subpopulace, což může mít v budoucnu význam pro pacienty nakažené lymfskou boreliózou (Feng, Auwaerter a Zhang 2015). Jinou možností terapie jsou biologické přípravky. Příkladem může být fágoterapie. Bakteriofág lambda je schopný infikovat perzistentní buňku a zabít ji ihned po přechodu do fáze růstu (Pearl et al. 2008).

Další z možností eradikace je také zpětný přechod do citlivého stavu, tedy probuzení perzisterů z dormance (Kim et al. 2011), či navození protonmotivní síly, což má za následek zvýšený import aminoglykosidů do perzistentní buňky (Allison, Brynildsen a Collins 2011). Protonmotivní síla může být vyvolána přidáním glycerolu či glukózy, jelikož perzistentní *E. coli* tyto substráty metabolizuje, a stává se tak citlivá k antibiotikům. Terapeuticky lze využít i jiné živiny jako mannitol či pyruvát, nicméně účinek je nižší (Orman a Brynildsen 2013b). Prax a kolektiv ve své studii uvedli, že expozice *S. aureus* daptomycinu a glukóze vede až k pětinasobně vyššímu účinku tohoto antibiotika oproti expozici bez glukózy. Při použití nemetabolizovatelné 2-deoxyglukózy tento trend nebyl pozorován (Prax et al. 2016). Oproti tomu pro laktózu existuje prahová hodnota, nad kterou se stává pro buňky toxická a bakterie rychle přechází do stavu utlumeného růstu, tedy tvoří perzistentní formy v reakci na její přítomnost (Ray, Wickersheim a Jalihal 2016).

## 5.2. Problematika tvorby biofilmu

Problematika biofilmu je téma velmi rozsáhlé, proto se v následující podkapitole budu věnovat pouze biofilmu ve vztahu k perzistentním bakteriím. Biofilmem myslíme společenstvo nepohyblivých bakterií vázající se k určitému povrchu, které je obklopeno polymery, jež samo vylučuje (Percival et al. 2011).

Bakterie *P. aeruginosa* působí potíže u pacientů s cystickou fibrózou mimo jiné právě tvorbou biofilmu (Singh et al. 2000). Zatímco volné planktonické formy této bakterie byly eradikovány za přispění vyšších dávek ciprofloxacinu, biofilm nebylo možné beze zbytku vyhubit ani po dlouhé expozici čtyřnásobné dávce antibiotika, které bylo účinné proti planktonickým formám. Ačkoliv při dlouhodobém vystavení antibiotiku velikost biofilmu značně klesá v porovnání s krátkodobou expozicí, nebylo možné biofilm zcela odstranit. Z uvedeného vyplývá, že biofilm je v porovnání s volnými stádii značně odolnější. Stejnou citlivost jako u planktonické formy však pozorujeme vůči kovovým kationtům, které jsou schopny při dlouhodobé expozici vyhubit jak

planktonickou kulturu, tak biofilm (Harrison, Turner a Ceri 2005). Podle studie, kterou provedl Mulcahy a kolektiv v rámci experimentů s bakteriemi *P. aeruginosa* izolovanými od pacientů s cystickou fibrózou, je však pro zvýšenou odolnost vůči antibiotikům důležitější možnost tvořit vysoce perzistentní mutanty než samotná schopnost formovat biofilm (Mulcahy et al. 2010).

Experimenty se *S. epidermidis* ukázaly, že perzistentní bakterie se tvoří jak v planktonické kultuře, tak v biofilmu. V biofilmu však jejich produkce roste pomaleji, jelikož je nutné dozrání biofilmu pro maximální produkci perzisterů. Perzistentní stádia v biofilmu se podobají pomalu rostoucím buňkám stacionární fáze. To má za následek jejich zvýšenou odolnost k antibiotikům cíleným na aktivně se dělící buňky, důvodem tedy není obtížný přístup antibiotika k buňkám v rámci biofilmu (Shapiro, Nguyen a Chamberlain 2011).

Stimulace perzistence v biofilmu může být vyvolána například pěstováním bakterií na diauxickém médiu, kdy po vyčerpání preferovaného zdroje uhlíku bakterie přechází na zdroj sekundární. Toto bylo pozorováno u populace *E. coli* pěstované za přítomnosti ofloxacinu či ampicilinu, přičemž různé sekundární zdroje uhlíku vyvolávaly odlišnou míru tvorby perzisterů, k čemuž podobně jako v planktonických podmínkách docházelo za podpory alarmonu (p)ppGpp. Nejsilnější produkce perzistentních buněk byla pozorována při kombinaci glukózy jako primárního zdroje a fumarátu jako sekundárního (Amato a Brynildsen 2014). Stejně tak při hladovění dochází v biofilmu ke vzniku perzistence. Při nedostatku živin bakterie zpomalují růst, což znemožní správnou účinnost antibiotika na aktivně rostoucí buňky. To však samo o sobě nestačí, hladovění je spojeno i s fyziologickými změnami v bakteriální buňce, které vyvolávají stringentní odpověď a umožňují přechod k perzistenci. Při experimentální inaktivaci stringentní odpovědi navíc dochází k poklesu množství enzymů katalázy a superoxiddismutázy, což ve výsledku vede k vyšší citlivosti vůči antibiotikům (Nguyen et al. 2011). Pro tvorbu odolného biofilmu v nutričně chudém prostředí je navíc vyžadována aktivace SOS odpovědi, avšak při experimentálním knockoutu SOS-dependentních toxin-antitoxin modulů nebylo pozorováno snížení perzistentního biofilmu. To vede k závěrům, že buď existuje více dosud nepoznaných toxin-antitoxin drah, či se perzistence biofilmu závislá na SOS odpovědi indukuje jiným způsobem. Přechod do perzistence je tedy aktivní děj, nejedná se o pouhé zastavení růstové rychlosti (Bernier et al. 2013).

Při analýze biofilmu bakterie *S. epidermidis* bylo zjištěno, že 99,99 % bakterií je ve stavu senzitivním k ciprofloxacinu. Zbytek populace však zahrnoval perzistentní buňky, přičemž nejodolnější z nich byly ve stavu hluboké dormance, které byly přechodně odolné k léčbě. Autoři studie předpokládali, že kombinace ciprofloxacinu a vankomycinu bude mít lepší eradikační účinky než ciprofloxacin samotný. Výsledky však ukázaly, že vyšší účinnost byla po expozici samotnému ciprofloxacinu. Z toho lze usuzovat, že perzisteri se v biofilmu tvoří také pod vlivem stresu, v tomto případě v reakci na vankomycin. Biofilm *S. epidermidis* lze stejně jako v jiných případech eradikovat dlouhodobým užíváním vhodně vybraného léčiva o správné koncentraci, což by mělo být i nadále předmětem dalšího výzkumu (Yang et al. 2015). Výběr vhodné léčby se odvíjí nejen od mechanismu vzniku perzistentního stavu, ale i od maximální rychlosti přechodu mezi stavem senzitivním a perzistentním. Pokud například přepínání závisí na složení substrátu, je pro dosažení vyšší účinnosti antibiotik možné do substrátu přidat antimikrobní látku. Vyšší účinek antibiotik se však neprojeví, pokud rychlost přechodů mezi bakteriálními stavy bude příliš nízká. Naopak přítomnost stresového stimulu v podobě antibiotika by mohla mít opačný účinek, tedy podpoření růstu biofilmu. Carvalho a kolektiv ve své studii dále uvedli, že účinného obnovení biofilmu dosahují perzisteri indukovaní antibiotiky, kteří se stávají senzitivními a obnovují infekci v podmínkách nízké koncentrace antibiotika (Carvalho et al. 2018).

### 5.3. Nekultivovatelný krevní mikrobiom

Na základě metagenomové analýzy výskytu sekvencí pro 16S rRNA bylo zjištěno, že krev jinak zdravého jedince, dlouho považovaná za sterilní prostředí, obsahuje mikrobiom. Erytrocyty, trombocyty a leukocyty pak pojímají převážnou část bakterií, zatímco plazmatická složka jich obsahuje méně. Z uvedeného vyplývá, že krevní buňky mohou sloužit jako nosiče patogenů, činit potíže při transfuzích a být původcem perzistentních infekcí. Bakterie v buněčné složce krve totiž zahrnují mnoho kmenů lidských patogenů. Převážnou část tvoří bakterie kmene Proteobacteria (Païssé et al. 2016) a velká část krevního mikrobiomu nejspíš pochází z trávicí soustavy (Ono et al. 2005). Tyto jinak životaschopné bakterie jsou však na běžných agarových médiích nekultivovatelné (McLaughlin et al. 2002).

Z krve byly izolovány i bakterie *S. aureus*, přičemž pravděpodobnost bakteriémie vyvolané těmito patogeny byla nižší u pacientů se sníženým množstvím neutrofilů (Velasco et al. 2006). Na základě těchto poznatků bylo zjištěno, že buňky *S. aureus*

přežívají intracelulárně ve vakuole krevních buněk (Gresham et al. 2000), a jsou tak chráněny před extracelulárními antibiotiky (Lam a Mathison 1983). Tato intracelulární stádia lze označit jako perzistentní, jelikož odolávají antibiotikům a mohou působit chronická a opakovaná onemocnění (Craven a Anderson 1979), a to na mnoha místech hostitelova organismu, kam jsou krví roznášena (Prajsnar et al. 2012). Obecně intracelulární stádia *S. aureus* mohou tvořit tzv. small-colony varianty, čímž se zvýší jejich snášenlivost vůči léčivům (von Eiff et al. 2001), která jsou navíc uvnitř buněk v nižší koncentraci a mají menší účinnost vlivem nízkého pH. Existuje hypotéza, že odolnost může být způsobena taktéž bakteriální dormancí (Lam a Mathison 1983). Odolnost small-colony variant je zapříčiněna mimo jiné upregulací genů zodpovědných za reakci na stresové podmínky (Moisan et al. 2006; Horsburgh et al. 2002). Bakterie je schopná adaptovat se na stav uvnitř buněk a brání jejich apoptóze, díky čemuž může v buňce dlouhodobě perzistovat a nakonec ji opustit (Kubica et al. 2008). Shrnuté poznatky ohledně perzistentního krevního mikrobiomu mohou v budoucnu vést k efektivnější léčbě a důslednějšímu předepisování antibiotik cílených nejen na extracelulární, ale taktéž na intracelulární bakterie. Výskyt perzistentních stadií v krvi i jinde v lidském organismu naznačují i výsledky molekulárně biologických metod v klinické mikrobiologii. Molekulárně biologické metody mají obecně vyšší záchyt oproti kultivačním metodám. Jedním z vysvětlení může být technicky daná vyšší citlivost, případně fakt, že je detekována DNA, a ne nutně živé bakterie. Nicméně alternativním vysvětlením může být také přítomnost bakterií v nerostoucím či perzistentním stádiu. To také odpovídá výše zmíněnému efektu lidského séra na vznik perzistence. Zároveň molekulárně biologické metody vykazují vysokou citlivost, i pokud se pro izolaci nukleových kyselin použije postup, který eliminuje DNA z mrtvých bakterií. V recentní studii Jonsson a kolektiv detekovali opakovaně *S. aureus* pomocí vysoce citlivé technologie spojující PCR s ESI-MS (ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry) v krvi u 3 pacientů ještě 2 a 7 dní poté, co byla po prvotním záchytu bakterie nasazena terapie, a to i přesto, že kultivační vyšetření byla opakovaně negativní (Jonsson et al. 2018).

## Závěr

Všechny druhy bakterií, jak z řad grampozitivních, tak gramnegativních, umí tvořit odolná stádia, a přežít tak ve stavu utlumeného růstu vystavení antibiotikům. K úspěšnému vyléčení infekce je třeba jak správného antibiotika, tak fungující imunitní systém. Antibiotika brání rychlému množení bakterií a umožní jejich eradikaci prostřednictvím hostitelova imunitního systému. Problém perzistence pak nastává u pacientů s defektním imunitním systémem, kde se neschopnost eradikace bakterií projevuje chronickou a recidivující infekcí (Goneau et al. 2014).

Z hlediska molekulární podstaty perzistence lze shrnout, že pro každou bakterii existují specifické mechanismy vzniku perzistence, které se liší podmínkami své indukce, mechanismem i účinností. K formování perzisterů existuje více možných prostředků, ústřední roli hraje zejména systém toxin-antitoxin (Keren et al. 2004), SOS odpověď (Dörr, Lewis a Vulić 2009) a buněčná komunikace *quorum sensing* (Möker, Dean a Tao 2010). Pro perzistenci má význam reakce na stres, tzv. stringentní odpověď spuštěná alarmonem (p)ppGpp, nicméně přesný účinek není ještě zcela znám (Chowdhury, Kwan a Wood 2016). Mechanismy jsou vzájemně provázané a při knockoutu jednoho z nich dochází k náhradě za jiný, což znesnadňuje experimentální zkoumání fenoménu perzistence.

Perzistentní buňky jsou ve stavu blízkém dormanci, proto se v posledních letech dávají do souvislosti s životaschopnými ale nekultivovatelnými buňkami, které podle současné hypotézy fungují stejně jako perzistentní, ale obsahují větší podíl toxinů, tudíž se nachází ve stavu hluboké dormance, zatímco perzistentní jsou schopné rychle obnovit růst (Ayrapetyan, Williams a Oliver 2015).

V závěru práce je soustředěn důraz na možnosti efektivnější léčby, přičemž v současnosti se zdá být nejlepším řešením kombinování vhodných antibiotik, které jsou schopné eradikace jak rostoucích, tak nerostoucích stádií (Feng, Auwaerter a Zhang 2015). Porozumění fenoménu perzistence je však stále v začátcích, je třeba dalšího výzkumu molekulárních mechanismů pro efektivnější zacílení antibiotik.

## Seznam literatury

- Ackermann, M., S. C. Stearns, and U. Jenal. 2003. "Senescence in a Bacterium with Asymmetric Division." *Science* 300 (5627): 1920.
- Adams, K. N., K. Takaki, L. E. Connolly, H. Wiedenhoft, K. Winglee, O. Humbert, P. H. Edelstein, Ch. L. Cosma, and L. Ramakrishnan. 2011. "Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism." *Cell* 145 (1). Elsevier Inc.: 39–53.
- Aldridge, B. B., M. Fernandez-Suarez, D. Heller, V. Ambravaneswaran, D. Irimia, M. Toner, and S. M. Fortune. 2011. "Asymmetry and Aging of Mycobacterial Cells Lead to Variable Growth and Antibiotic Susceptibility." *Science (New York, N.Y.)* 529 (2006): 100–105.
- Allison, K. R., M. P. Brynildsen, and J. J. Collins. 2011. "Metabolite-Enabled Eradication of Bacterial Persisters by Aminoglycosides." *Nature* 473 (7346). Nature Publishing Group: 216.
- Amato, S. M., and M. P. Brynildsen. 2014. "Nutrient Transitions Are a Source of Persisters in Escherichia Coli Biofilms." *PLoS ONE* 9 (3): 1–9.
- Andrews, J. M. 2001. "Determination of Minimum Inhibitory Concentrations." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 Suppl 1: 5–16.
- Avarbock, D., A. Avarbock, and H. Rubin. 2000. "Differential Regulation of Opposing Rel(Mtb) Activities by the Aminoacylation State of a tRNA.Ribosome.mRNA.Rel(Mtb) Complex." *Biochemistry* 39 (38): 11640–48.
- Ayrapetyan, M., T. C. Williams, R. Baxter, and J. D. Oliver. 2015. "Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum" 83 (11): 4194–4203.
- Ayrapetyan, M., T. C. Williams, and J. D. Oliver. 2015. "Bridging the Gap between Viable but Non-Culturable and Antibiotic Persistent Bacteria." *Trends in Microbiology* 23 (1). Elsevier Ltd: 7–13.
- Balaban, N. Q., J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, and S. Leibler. 2004. "Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch." *Science* 305 (5690): 1622–25.
- Barclay, M. L., E. J. Begg, and S. T. Chambers. 1992. "Adaptive Resistance Following Single Doses of Gentamicin in a Dynamic in Vitro Model." *Antimicrobial Agents*



- and Chemotherapy* 36 (9): 1951–57.
- Bernier, S. P., D. Lebeaux, A. S. DeFrancesco, A. Valomon, G. Soubigou, J. Y. Coppée, J. M. Ghigo, and Ch. Beloin. 2013. “Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin.” *PLoS Genetics* 9 (1).
- Bigger, J. W. 1944. “Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin by Intermittent Sterilisation.” *The Lancet* 244 (6320): 497–500.
- Black, D. S., B. Irwin, and H. S. Moyed. 1994. “Autoregulation of Hip, an Operon That Affects Lethality due to Inhibition of Peptidoglycan or DNA Synthesis.” *Journal of Bacteriology* 176 (13): 4081–91.
- Bojer, M. S., S. Lindemose, M. Vestergaard, and H. Ingmer. 2018. “Quorum Sensing-Regulated Phenol-Soluble Modulins Limit Persister Cell Populations in *Staphylococcus Aureus*.” *Frontiers in Microbiology* 9 (FEB): 1–12.
- \* Brauner, A., O. Fridman, O. Gefen, and N. Q. Balaban. 2016. “Distinguishing between Resistance, Tolerance and Persistence to Antibiotic Treatment.” *Nature Reviews Microbiology* 14 (5). Nature Publishing Group: 320–30.
- Carvalho, G., D. Balestrino, Ch. Forestier, and J. D. Mathias. 2018. “How Do Environment-Dependent Switching Rates between Susceptible and Persister Cells Affect the Dynamics of Biofilms Faced with Antibiotics?” *Npj Biofilms and Microbiomes* 4 (1). Springer US: 2–9.
- Cashel, M., D. R. Gentry, V. J. Hernandez, and D. Vinella. 1996. “*Escherichia Coli* and *Salmonella*.” *Cellular and Molecular Biology, 2nd Edn.* ASM Press, Washington, DC.
- Cashel, M., and J. Gallant. 1969. “Two Compounds Implicated in the Function of the RC Gene of *Escherichia Coli*.” *Nature* 221 (5183). Nature Publishing Group: 838.
- Colwell, R. R., P. Brayton, D. Herrington, B. Tall, A. Huq, and M. M. Levine. 1996. “Viable but Non-Culturable *Vibrio Cholerae* O1 Revert to a Cultivable State in the Human Intestine.” *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 12 (1): 28–31.
- Colwell, R. R. 2000. “Viable but Nonculturable Bacteria: A Survival Strategy.” *Journal of Infection and Chemotherapy* 6 (2). Springer: 121–25.
- Conlon, B. P., S. E. Rowe, A. B. Gandt, A. S. Nuxoll, N. P. Donegan, E. A. Zalis, G.

- Clair, J. N. Adkins, A. L. Cheung, and K. Lewis. 2016. “Persister Formation in *Staphylococcus Aureus* Is Associated with ATP Depletion.” *Nature Microbiology* 1. Nature Publishing Group: 16051.
- Craven, N., and J. C. Anderson. 1979. “The Location of *Staphylococcus Aureus* in Experimental Chronic Mastitis in the Mouse and the Effect on the Action of Sodium Cloxacillin.” *British Journal of Experimental Pathology* 60 (5). Wiley-Blackwell: 453.
- Cui, P., H. Niu, W. Shi, S. Zhang, W. Zhang, and Y. Zhang. 2018. “Identification of Genes Involved in Bacteriostatic Antibiotic-Induced Persister Formation.” *Frontiers in Microbiology* 9 (MAR): 1–10.
- Dietrich, L. E. P., A. Price-Whelan, A. Petersen, M. Whiteley, and D. K. Newman. 2006. “The Phenazine Pyocyanin Is a Terminal Signalling Factor in the Quorum Sensing Network of *Pseudomonas Aeruginosa*.” *Molecular Microbiology* 61 (5): 1308–21.
- \* Döring, G., and E. Gulbins. 2009. “Cystic Fibrosis and Innate Immunity: How Chloride Channel Mutations Provoke Lung Disease.” *Cellular Microbiology* 11 (2): 208–16.
- Dörr, T., K. Lewis, and M. Vulić. 2009. “SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia Coli*.” *PLoS Genetics* 5 (12).
- Dörr, T., M. Vulić, and K. Lewis. 2010. “Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB Toxin in *Escherichia Coli*.” *PLoS Biology* 8 (2): 29–35.
- Eiff, C. von, K. Becker, D. Metze, G. Lubritz, J. Hockmann, T. Schwarz, and G. Peters. 2001. “Intracellular Persistence of *Staphylococcus Aureus* Small-Colony Variants within Keratinocytes: A Cause for Antibiotic Treatment Failure in a Patient with Darier’s Disease.” *Clinical Infectious Diseases* 32 (11): 1643–47.
- Fasani, R. A., and M. A. Savageau. 2013. “Molecular Mechanisms of Multiple Toxin – Antitoxin Systems Are Coordinated to Govern the Persister Phenotype.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: E2528–2537.
- Feng, J., D. A. Kessler, E. Ben-Jacob, and H. Levine. 2014. “Growth Feedback as a Basis for Persister Bistability.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (1): 544–49.

- Feng, J., P. G. Auwaerter, and Y. Zhang. 2015. “Drug Combinations against *Borrelia burgdorferi* Persists in Vitro: Eradication Achieved by Using Daptomycin, Cefoperazone and Doxycycline.” *PLoS ONE* 10 (3): 1–15.
- Germain, E., D. Castro-Roa, N. Zenkin, and K. Gerdes. 2013. “Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA.” *Molecular Cell* 52 (2). Elsevier Inc.: 248–54.
- Germain, E., M. Roghanian, K. Gerdes, and E. Maisonneuve. 2015. “Stochastic Induction of Persister Cells by HipA through (p)ppGpp-Mediated Activation of mRNA Endonucleases.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (16): 5171–76.
- Gião, M. S., and Ch. W. Keevil. 2014. “*Listeria Monocytogenes* Can Form Biofilms in Tap Water and Enter into the Viable but Non-Cultivable State.” *Microbial Ecology* 67 (3): 603–11.
- Goneau, L. W., N. S. Yeoh, K. W. MacDonald, P. A. Cadieux, J. P. Burton, H. Razvi, and G. Reid. 2014. “Selective Target Inactivation rather than Global Metabolic Dormancy Causes Antibiotic Tolerance in Uropathogens.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (4): 2089–97.
- Gresham, H. D., J. H. Lowrance, T. E. Caver, B. S. Wilson, A. L. Cheung, and F. P. Lindberg. 2000. “Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection.” *The Journal of Immunology* 164 (7): 3713–22.
- Grønlund, H., and K. Gerdes. 1999. “Toxin-Antitoxin Systems Homologous with relBE of *Escherichia coli* Plasmid P307 Are Ubiquitous in Prokaryotes.” *Journal of Molecular Biology* 285 (4): 1401–15.
- Gurnev, P. A., R. Ortenberg, T. Dörr, K. Lewis, and S. M. Bezrukov. 2012. “Persister-Promoting Bacterial Toxin TisB Produces Anion-Selective Pores in Planar Lipid Bilayers.” *FEBS Letters* 586 (16). Federation of European Biochemical Societies: 2529–34.
- Harms, A., C. Fino, M. A. Sørensen, S. Semsey, and K. Gerdes. 2017. “Prophages and Growth Dynamics Confound Experimental Results with Antibiotic-Tolerant Persister Cells.” *mBio* 8 (6).
- Harrison, J. J., R. J. Turner, and H. Ceri. 2005. “Persister Cells, the Biofilm Matrix and Tolerance to Metal Cations in Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*.”

- Environmental Microbiology* 7 (7): 981–94.
- Haseltine, W. A., R. Block, W. Gilbert, and K. Weber. 1972. “MSI and MSII Made on Ribosome in Idling Step of Protein Synthesis.” *Nature* 238 (5364). Nature Publishing Group: 381.
- Heinmeyer, E. A., and D. Richter. 1977. “In Vitro Degradation of Guanosine Tetraphosphate (ppGpp) by an Enzyme Associated with the Ribosomal Fraction from *Escherichia Coli*.” *FEBS Letters* 84 (2).
- Helaine, S., A. Cheverton, K. Watson, L. M. Faure, S. A. Matthews, and D. W. Holden. 2014. *Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters*. *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 343.
- Hobby, G. L., K. M., and E. Chaffee. 1942. “Observations on the Mechanism of Action of Penicillin.” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 50 (2). SAGE Publications: 281–85.
- Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, L. Shaw, J. K. Lithgow, and S. J. Foster. 2002. “ $\sigma$ B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional rsbU Strain Derived from *Staphylococcus Aureus* 8325-4.” *Journal of Bacteriology* 184 (19): 5457–67.
- Cheverton, A. M., B. Gollan, M. Przydacz, Ch. T. Wong, A. Mylona, S. A. Hare, and S. Helaine. 2016. “A *Salmonella* Toxin Promotes Persister Formation through Acetylation of tRNA.” *Molecular Cell* 63 (1). The Authors: 86–96.
- Chowdhury, N., B. W. Kwan, and T. K. Wood. 2016. “Persistence Increases in the Absence of the Alarmone Guanosine Tetraphosphate by Reducing Cell Growth.” *Scientific Reports* 6 (October 2015). Nature Publishing Group: 1–9.
- Johnson, P. J. T., and B. R. Levin. 2013. “Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the Evolution of Persistence in *Staphylococcus Aureus*.” *PLoS Genetics* 9 (1).
- Jonsson, S., P. Mölling, V. Özenci, M. Ullberg, K. Strålin, and M. Sundqvist. 2018. “P1959 The Ability of a PCR / ESI-MS System to Detect Bacteria in Repeated Whole Blood Samples in Patients with Suspected Blood Stream Infection (BSI),” 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Madrid 2018.
- Kaspy, I., E. Rotem, N. Weiss, I. Ronin, N. Q. Balaban, and G. Glaser. 2013. “HipA-

- Mediated Antibiotic Persistence via Phosphorylation of the Glutamyl-tRNA-Synthetase.” *Nature Communications* 4. Nature Publishing Group: 1–7.
- Keren, I., N. Kaldalu, A. Spoering, Y. Wang, and K. Lewis. 2004. “Persister Cells and Tolerance to Antimicrobials.” *FEMS Microbiology Letters* 230 (1): 13–18.
- Keren, I., D. Shah, A. Spoering, N. Kaldalu, and K. Lewis. 2004. “Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in Escherichia Coli.” *Journal of Bacteriology* 186 (24): 8172–80.
- Kester, J. C., and S. M. Fortune. 2014. “Persisters and beyond: Mechanisms of Phenotypic Drug Resistance and Drug Tolerance in Bacteria.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 49 (2): 91–101.
- Khan, N. H., M. Ahsan, W. D. Taylor, and K. Kogure. 2010. “Culturability and Survival of Marine, Freshwater and Clinical Pseudomonas Aeruginosa.” *Microbes and Environments* 25 (4): 266–74.
- Kim, J., N. Chowdhury, R. Yamasaki, and T. K. Wood. 2018. “Viable But Non-Culturable and Persistence Describe the Same Bacterial Stress State.” *Environmental Microbiology*.
- Kim, J. S., P. Heo, T. J. Yang, K. S. Lee, D. H. Cho, Bum Tae Kim, Ji Hee Suh, et al. 2011. “Selective Killing of Bacterial Persisters by a Single Chemical Compound without Affecting Normal Antibiotic-Sensitive Cells.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (11): 5380–83.
- Kjelstrup, S., K. Pedersen, S. K. Christensen, and K. Gerdes. 2002. “Rapid Induction and Reversal of a Bacteriostatic Condition by Controlled Expression of Toxins  
Rapid Induction and Reversal of a Bacteriostatic Condition by Controlled Expression of Toxins and Antitoxins” 45 (February 2016): 501–10.
- Korch, S. B., and T. M. Hill. 2006. “Ectopic Overexpression of Wild-Type and Mutant hipA Genes in Escherichia Coli: Effects on Macromolecular Synthesis and Persister Formation.” *Journal of Bacteriology* 188 (11): 3826–36.
- Kubica, M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. Maciag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster, J. Potempa. 2008. “A Potential New Pathway for Staphylococcus Aureus Dissemination: The Silent Survival of S. Aureus Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages.” *PLoS ONE* 3 (1).

- Kuroda, A., K. Nomura, R. Ohtomo, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kornberg. 2001. "Role of Inorganic Polyphosphate in Promoting Ribosomal Protein Degradation by the Lon Protease in *E. Coli*." *Science* 293 (5530): 705–8.
- Kussell, E., R. Kishony, N. Q. Balaban, and S. Leibler. 2005. "Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments." *Genetics* 169 (4): 1807–14.
- Kussell, E., and S. Leibler. 2005. "Phenotypic Diversity, Population Growth, and Information in Fluctuating Environments," no. September: 2075–79.
- Lam, C., and G. E. Mathison. 1983. "Effect of Low Intraphagolysosomal pH on Antimicrobial Activity of Antibiotics against Ingested Staphylococci." *Journal of Medical Microbiology* 16 (3): 309–16.
- Leung, V., and C. M. Lévesque. 2012. "A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance." *Journal of Bacteriology* 194 (9): 2265–74.
- Levin-Reisman, I., I. Ronin, O. Gefen, I. Braniss, N. Shosh, and N. Q. Balaban. 2017. "Antibiotic Tolerance Facilitates the Evolution of Resistance." *Science* 355 (6327): 826–30.
- Liao, H., L. Jiang, and R. Zhang. 2018. "Induction of a Viable but Non-Culturable State in *Salmonella Typhimurium* by Thermosonication and Factors Affecting Resuscitation." *FEMS Microbiology Letters* 365 (2): 1–11.
- Mahajan-Miklos, S., M. W. Tan, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel. 1999. "Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas Aeruginosa*-*Caenorhabditis Elegans* Pathogenesis Model." *Cell* 96 (1): 47–56.
- Maisonneuve, E., M. Castro-Camargo, and K. Gerdes. 2013. "(p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity." *Cell* 154 (5). Elsevier Inc.: 1140–50.
- Malik, M., X. Zhao, and K. Drlica. 2006. "Lethal Fragmentation of Bacterial Chromosomes Mediated by DNA Gyrase and Quinolones." *Molecular Microbiology* 61 (3): 810–25.
- McDermott, W. 1958. "Microbial Persistence." *The Yale Journal of Biology and Medicine* 30 (4): 257–91.
- McLaughlin, R. W., H. Vali, P. C. K. Lau, R. G. E. Palfree, A. De Cicco, M. Sirois, D.

- Ahmad, R. Villemur, M. Desrosiers, and E. C. S. Chan. 2002. "Are There Naturally Occurring Pleomorphic Bacteria in the Blood of Healthy Humans?" *Journal of Clinical Microbiology* 40 (12): 4771–75.
- Mina, E. G., and C. N. H. Marques. 2016. "Interaction of Staphylococcus Aureus Persister Cells with the Host When in a Persister State and Following Awakening." *Scientific Reports* 6 (August). Nature Publishing Group: 1–10.
- Moisan, H., E. Brouillette, Ch. L. Jacob, P. Langlois-Bégin, S. Michaud, and F. Malouin. 2006. "Transcription of Virulence Factors in Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients Is Influenced by SigB." *Journal of Bacteriology* 188 (1): 64–76.
- Möker, N., Ch. R. Dean, and J. Tao. 2010. "Pseudomonas Aeruginosa Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules." *Journal of Bacteriology* 192 (7): 1946–55.
- Moyed, H. S., and K. P. Bertrand. 1983. "hipA, a Newly Recognized Gene of Escherichia Coli K-12 That Affects Frequency of Persistence After Inhibition of Murein Synthesis" 155 (2): 768–75.
- Mulcahy, L. R., J. L. Burns, S. Lory, and K. Lewis. 2010. "Emergence of Pseudomonas Aeruginosa Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis." *Journal of Bacteriology* 192 (23): 6191–99.
- Nguyen, D., A. Joshi-Datar, F. Lepine, E. Bauerle, O. Olakanmi, K. Beer, G. McKay, R. Siehnel, J. Schafhauser, and Y. Wang. 2011. "Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria." *Science* 334 (6058). American Association for the Advancement of Science: 982–86.
- Nowakowska, J., and J. D. Oliver. 2013. "Resistance to Environmental Stresses by Vibrio Vulnificus in the Viable but Nonculturable State." *FEMS Microbiology Ecology* 84 (1): 213–22.
- \* Oliver, J. D. 2005. "The Viable but Nonculturable State in Bacteria." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 43 Spec No (February): 93–100.
- Ono, S., H. Tsujimoto, A. Yamauchi, S. Hiraki, E. Takayama, and H. Mochizuki. 2005. "Detection of Microbial DNA in the Blood of Surgical Patients for Diagnosing Bacterial Translocation." *World Journal of Surgery* 29 (4): 535–39.

- Orman, M. A., and M. P. Brynildsen. 2013a. "Dormancy Is Not Necessary or Sufficient for Bacterial Persistence." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (7): 3230–39.
- Orman, M. A., and M. P. Brynildsen. 2013b. "Establishment of a Method to Rapidly Assay Bacterial Persister Metabolism." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (9): 4398–4409.
- Païssé, S., C. Valle, F. Servant, M. Courtney, R. Burcelin, J. Amar, and B. Lelouvier. 2016. "Comprehensive Description of Blood Microbiome from Healthy Donors Assessed by 16S Targeted Metagenomic Sequencing." *Transfusion* 56 (5): 1138–47.
- Pandey, D. P., and K. Gerdes. 2005. "Toxin-Antitoxin Loci Are Highly Abundant in Free-Living but Lost from Host-Associated Prokaryotes." *Nucleic Acids Research* 33 (3): 966–76.
- Pasquaroli, S., G. Zandri, C. Vignaroli, C. Vuotto, G. Donelli, and F. Biavasco. 2013. "Antibiotic Pressure Can Induce the Viable but Non-Culturable State in *Staphylococcus Aureus* Growing in Biofilms." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (8): 1812–17.
- Pearl, S., Ch. Gabay, R. Kishony, A. Oppenheim, and N. Q. Balaban. 2008. "Nongenetic Individuality in the Host-Phage Interaction." *PLoS Biology* 6 (5): 0957–64.
- Pedersen, K., A. V. Zavialov, M. Y. Pavlov, J. Elf, K. Gerdes, and M. Ehrenberg. 2003. "The Bacterial Toxin RelE Displays Codon-Specific Cleavage of mRNAs in the Ribosomal A Site." *Cell* 112 (1): 131–40.
- \* Percival, S. L., K. E. Hill, S. Malic, D. W. Thomas, and D. W. Williams. 2011. "Antimicrobial Tolerance and the Significance of Persister Cells in Recalcitrant Chronic Wound Biofilms." *Wound Repair and Regeneration* 19 (1): 1–9.
- Pinto, D., V. Almeida, M. A. Santos, and L. M. M. Chambel. 2011. "Resuscitation of *Escherichia Coli* VBNC Cells Depends on a Variety of Environmental or Chemical Stimuli." *Journal of Applied Microbiology* 110 (6): 1601–11.
- Prajsnar, T. K., R. Hamilton, J. Garcia-Lara, G. Mcvicker, A. Williams, M. Boots, S. J. Foster, and S. A. Renshaw. 2012. "A Privileged Intraphagocyte Niche Is



- Responsible for Disseminated Infection of Staphylococcus Aureus in a Zebrafish Model.” *Cellular Microbiology* 14 (10): 1600–1619.
- Prax, M., L. Mechler, Ch. Weidenmaier, and R. Bertram. 2016. “Glucose Augments Killing Efficiency of Daptomycin Challenged Staphylococcus Aureus Persisters,” 1–15.
- Proctor, R. A., P. Van Langevelde, M. Kristjansson, J. N. Maslow, R. D. Arbeit. 2018. “Persistent and Relapsing Infections Associated with Small-Colony Variants of Staphylococcus Aureus,” 20 (1): 95–102.
- Que, Y. A., R. Hazan, B. Strobel, D. Maura, J. He, M. Kesarwani, P. Panopoulos, A. Tsurumi, M. Giddey, J. Wilhelmy, M. N. Mindrinos, L. G. Rahme. 2013. “A Quorum Sensing Small Volatile Molecule Promotes Antibiotic Tolerance in Bacteria.” *PLoS ONE* 8 (12): 1–9.
- \* Radman, M.. 1975. “SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which Is Accompanied by Mutagenesis.” In *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, 355–67. Springer.
- Ramirez, M., S. Rajaram, R. J. Steininger, D. Osipchuk, M. A. Roth, L. S. Morinishi, L. Evans, W. Ji, Ch. Hsu, K. Thurley, S. Wei, A. Zhou, P. R. Koduru, B. A. Posner, L. F. Wu, S. J. Altschuler. 2016. “Diverse Drug-Resistance Mechanisms Can Emerge from Drug-Tolerant Cancer Persister Cells.” *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 1–8.
- Ramisetty, B. C. M., D. Ghosh, M. R. Chowdhury, and R. S. Santhosh. 2016. “What Is the Link between Stringent Response, Endoribonuclease Encoding Type II Toxin-Antitoxin Systems and Persistence?” *Frontiers in Microbiology* 8 (MAR).
- Ray, J. Ch. J, M. L. Wickersheim, and A. P. Jalihal. 2016. “Cellular Growth Arrest and Persistence from Enzyme Saturation,” 1–21.
- Rotem, E., A. Loinger, I. Ronin, I. Levin-Reisman, Ch. Gabay, N. Shores, O. Biham, and N. Q. Balaban. 2010. “Regulation of Phenotypic Variability by a Threshold-Based Mechanism Underlies Bacterial Persistence.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (28): 12541–46.
- Salina, E. G., G. N. Vostroknutova, M. O. Shleeva, and S. Kaprel’iants. 2006. “Cell-Cell Interactions during Formation and Reactivation Of ‘nonculturable’

- mycobacteria.” *Mikrobiologičia* 75 (4): 502–8.
- Shan, Y., D. Lazinski, S. Rowe, A. Camilli, and K. Lewis. 2015. “Genetic Basis of Persister Tolerance to Aminoglycosides in *Escherichia Coli*. *mBio* 6: e00078-15.”
- Shapiro, J. A., V. L. Nguyen, and N. R. Chamberlain. 2011. “Evidence for Persisters in *Staphylococcus Epidermidis* RP62a Planktonic Cultures and Biofilms.” *Journal of Medical Microbiology* 60 (7): 950–60.
- Schumacher, M., K. M. Piro, W. Xu, S. Hansen, K. Lewis, and R. G. Brennan. 2009. “Molecular Mechanisms of HipA-Mediated Multidrug Tolerance and Its Neutralization by HipB.” *October* 323 (5912): 396–401.
- Schwerdt, M., C. Neumann, B. Schwartbeck, S. Kampmeier, S. Herzog, D. Görlich, A. Dübbers, J. Große-Onnebrink, C. Kessler, P. Küster, H. Schültingkemper, J. Treffon, G. Peters, B. C. Kahl. 1995. “*Staphylococcus Aureus* in the Airways of Cystic Fibrosis Patients - A Retrospective Long-Term Study.” *International Journal of Medical Microbiology*, no. February.
- Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg. 2000. “Quorum-Sensing Signals Indicate That Cystic Fibrosis Lungs Are Infected with Bacterial Biofilms.” *Nature* 407 (October). Macmillian Magazines Ltd.: 762.
- Steinert, M., L. Emödy, R. Amann, and J. Hacker. 1997. “Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella Pneumophila Philadelphia JR32* by *Acanthamoeba Castellanii*.” *Applied and Environmental Microbiology* 63 (5): 2047–53.
- Svitil, A. L., M. Cashel, and J. W. Zyskind. 1993. “Guanosine Tetraphosphate Inhibits Protein Synthesis in Vivo.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (4): 2307–11.
- Thattai, M., and A. Van Oudenaarden. 2004. “Stochastic Gene Expression in Fluctuating Environments.” *Genetics* 167 (1): 523–30.
- Tuomanen, E., and A. Tomasz. 1990. “Mechanism of Phenotypic Tolerance of Nongrowing Pneumococci to Beta-Lactam Antibiotics.” *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum* 74: 102—112.
- Velasco, E., R. Byington, C. A. Martins, M. Schirmer, L. M. Dias, and V. M. Gonçalves. 2006. “Comparative Study of Clinical Characteristics of Neutropenic and Non-Neutropenic Adult Cancer Patients with Bloodstream Infections.”

- European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology 25 (1): 1–7.
- Völzing, K. G., and M. P. Brynildsen. 2015. “Stationary-Phase Persisters to Ofloxacin Sustain DNA Damage and Require Repair Systems Only during Recovery.” *mBio* 6 (5): 1–11.
- Wakamoto, Y., N. Dhar, R. Chait, K. Schneider, F. Signorino-Gelo, S. Leibler, and J. D. McKinney. 2013. *Dynamic Persistence of Antibiotic-Stressed Mycobacteria*. *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 339.
- Wong, H. C., and P. Wang. 2004. “Induction of Viable but Nonculturable State in *Vibrio Parahaemolyticus* and Its Susceptibility to Environmental Stresses.” *Journal of Applied Microbiology* 96 (2): 359–66.
- Wood, T. K., S. J. Knabel, and W. Kwan. 2013. “Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy” 79 (23): 7116–21.
- Xu, T., X. Y. Wang, P. Cui, Y. M. Zhang, W. H. Zhang, and Y. Zhang. 2017. “The Agr Quorum Sensing System Represses Persister Formation through Regulation of Phenol Soluble Modulins in *Staphylococcus Aureus*.” *Frontiers in Microbiology* 8 (NOV): 1–13.
- Yang, S., I. D. Hay, D. R. Cameron, M. Speir, B. Cui, F. Su, A. Y. Peleg, T. Lithgow, M. A. Deighton, and Y. Qu. 2015. “Antibiotic Regimen Based on Population Analysis of Residing Persister Cells Eradicates *Staphylococcus Epidermidis* Biofilms.” *Nature Publishing Group*, no. November. Nature Publishing Group: 1–11.
- Yoshida, H., H. Yamamoto, T. Uchiumi, and A. Wada. 2004. “RMF Inactivates Ribosomes by Covering the Peptidyl Transferase Centre and Entrance of Peptide Exit Tunnel.” *Genes to Cells* 9 (4): 271–78.

\* značí sekundární zdroj