

Persister Cells: Survival Strategies under Antimicrobial Stress

Myung-Jin Choi and Kwan Soo Ko*

Department of Molecular Cell Biology, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon, Korea

Persistence is dormant phenotypic variants of regular cells that are tolerant to antibiotics. The persistent cells did not acquire antibiotic resistance genetically, being produced in response to antibiotic stress. Because of dormant phenotypic variants due to little or no cell-wall synthesis, translation, or topoisomerase activity, persistent cells show antibiotic tolerance. Recently, such persistent cells have been reported in many bacterial pathogens and are known to play significant roles in clinical settings, particularly in chronic diseases such as cystic fibrosis. Therefore, development of anti-persister drug and appropriate antibiotic treatment are required to eliminate the persisters and to prevent the development of antibiotic resistance. Screening of genes related to persister formation would lead to new drugs to combat persisters during infection. By reviewing recent publications, we summarize phenomenon of survival and tolerance in persistent cells.

Key Words: Persister, Persistence, Antibiotic resistance, Infection

서 론

세균은 끊임없이 변화하는 환경에 적응하기 위해서 적절한 숫자의 변이를 형성하는데, 그 예로서 가장 대표적인 것이 존속성 세균(persistent cell, persister)이다 (1). 존속성 세균이란 유전적으로 동일한 집단에서 일정한 비율로 형성되는 세균으로서, 저하된 대사 과정을 가지며 분열을 하지 않고 약물에 민감하지 않는 특징을 나타내어 항생제에 대한 균의 완전한 사멸이 이루어지지 않는 결과를 초래한다. 이러한 존속성 세균은 항생제 내성 세균과 다르게 유전적으로 내성(antibiotic resistance)을 획득하는 것이 아닌 세균 집단의 일부가 일시적으로 항생제 관용을 나타내는 표현형을 나타내는 것으로 알려졌다 (2). 존속성 세균의 형성은 1942년 Hobby 등의 연구에서 높은 농도의 페니실린(penicillin)을 처리하였음에도 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 의한 감염이 재발되는 결과를 통해 처음 보고되었다 (3). 그 후, Bigger의 연구에서

페니실린을 처리하여 완벽한 세균의 사멸이 쉽게 이뤄지지 않는다는 결과가 밝혀졌으며, 그 중 생존한 세균을 존속성균(persisters)으로 명명하였다 (2).

오랫동안 존속성 세균의 존재는 간과되었는데, 가장 큰 이유는 대부분의 세균 감염 동안 면역작용에 의해 존속성 세균이 제거되기 때문이다. 그러나 최근 면역 체계가 결핍된 환자(immunodeficient patient)에게서 이러한 존속성 세균에 의한 감염의 위험성이 많이 보고되고 있다. 그 예로서, HIV와 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 환자에서 *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* 그리고 *Pseudomonas aeruginosa*와 같은 병원체의 존속성 세균으로 인한 사망이 보고되었다 (4). 따라서, 존속성 세균에 의한 감염을 예방하고자 여러 분자학적 연구가 수행되고 있으며 본 저자들은 항생제 관용을 나타내는 존속성 세균의 형성에 관련한 논문들의 요약과 견해를 전달하고자 한다 (1, 5, 6).

Received: January 31, 2013/ Revised: February 4, 2013/ Accepted: February 6, 2013

*Corresponding author: Kwan Soo Ko, Ph.D. Department of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon 440-746, Korea. Phone: +82-31-299-6223, Fax: +82-31-299-6229, e-mail: ksko@skku.edu

©This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

본 론

1. 존속성 세균의 형성 기전

존속성 세균의 형성은 세균의 생장곡선 중 정지기(stationary phase)에서 가장 빈번하게 일어나며, 최대 전체의 1% 정도까지 발생한다고 알려졌다 (7). K. Lewis는 세균이 초기 대수증식기(exponential phase)로 유지되도록 반복 계대배양할 경우, 존속성 세균이 사라진다는 것을 발견하였으며, 이를 통해서 존속성 세균은 미리 형성되기보다는 항생제와 같은 외부 환경으로부터의 스트레스에 의해 형성되는 것으로 보고 있다 (8). 실제로 Gefen과 Balaban의 연구를 통해, 세균이 항생제에 노출되었을 때 초기에는 급격한 균의 사멸이 이루어졌으나 그 후에 존속성 세균에 의해 균의 사멸 속도가 감소하는 것이 관찰되었으며, 본 저자의 연구에서도 *Klebsiella pneumoniae*에서의 colistin에 대한 존속성 세균의 형성이 관찰되었다(unpublished; Fig. 1). 존속성 세균은 항생제에 노출되지 않은 배양액에서 다시 본래의 대사활성을 가지는 균주로 증식되었으며 이 균주는 항생제에 대해 감수성을 나타낸다 (5). 이러한 현상은 존속성 세균의 형성이 항생제 노출과 같은 환경에 견디기에 적합하나, 세균의 최종 생존 전략은 소수의 존속성 세균의 형성이 아닌 활발한 대사 과정으로 인한 다수의 분열과 증식이기 때문으로 생각할 수 있다.

존속성 세균은 항생제에 노출되었을 때 일종의 스스로 보호하기 위한 방법의 하나로서 세균 집단의 일부가 대사활동이 저하된 상태로 유지된다고 알려져 있다. 존속성 세균의 형성에 관여하는 유전자의 활성 정도를 알아보기 위한 연구가 이루어졌으며, 에너지 생산과 관련된 유전자의 전사활성 감소와 세포 정지(arrest)와 관련된 유전자의 전사활성 증가가 보고되었다 (6).

이러한 결과는 기존에 알려진 존속성 세균의 비분화, 비활성 상태의 표현형과 일치한다. 존속성 세균의 형성에 관련된 많은 연구가 이뤄졌으며, Moyed와 Broderich은 *hipBA*라는 2개의 유전자로 구성된 하나의 오페론(operon)에 변이를 가지는 균주에서 존속성 세균의 형성이 1,000배 이상 증가되는 결과를 보고했다 (8). *hipBA*는 toxin-antitoxin (TA) module 중의 하나로서 HipA의 과발현이 성장 정지(arrest)를 유도하고 HipB에 의해 그 반대 현상이 유도된다고 알려져 있다. 그 외에도 *hipQ* 유전자가

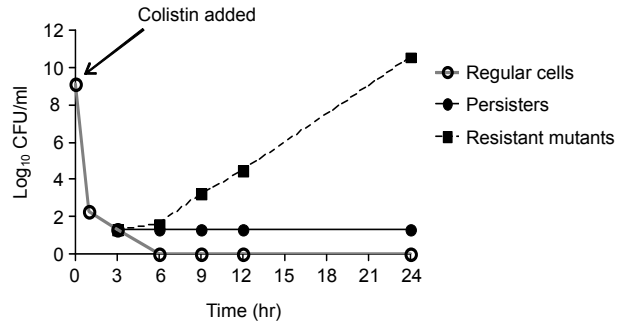


Figure 1. Formation of persistent cells (modified from Lewis. Ref. 6) in *K. pneumoniae*. Schematic killing curves of different responses to colistin in regular cells, persisters and resistant mutants.

DNA 복제를 억제시키는 퀴놀론계 항생제에 대한 존속성 세균의 형성에 중요한 작용을 한다고 알려져 있다 (9). 현재까지 존속성 세균의 형성과 관련된 명확한 유전자적 기능은 설명되지 않고 있으며, 다양한 스트레스 module들이 관여하고 있는 것으로 보고되고 있다.

2. 항생제 관용과 내성의 차이점

존속성 세균은 낮은 대사 과정의 활성을 통해서 항생제 관용 현상(drug tolerance)을 나타내게 된다. 이러한 항생제 관용은 항생제 내성 획득을 위한 유전자적 변이가 아닌 표현형적 변이로 간주 되고 있으며, 유전적으로는 동일한 세균 집단 내에서 발생하는 일정 비율의 소수 집단이 약물에 민감하지 않은(non-sensitive) 특징을 나타내는 것을 의미한다 (1). 항생제 관용은 일시적이고 가역적인 생리적인 현상으로서, Lewis의 연구 결과에서 항생제 관용을 나타내었던 존속성 세균이 항생제가 제거된 환경에서 다시 항생제에 감수성을 가지고 있는 자손 세대(progeny)로 증식한다고 보고하였다 (10). 항생제 관용에 비해 항생제 내성에 대한 분자학적 연구가 상대적으로 많이 진행되었는데, 항생제 내성 획득 기전은, 유전자 변이에 의한 표적 변경(target modification), 다른 표적(target)으로의 대체, 항생제의 변성, 항생제 efflux pump의 활성 증가, 항생제 침투력 저하 등 여러 유형이 있으나, 항생제가 표적에 결합하는 것이 억제되는 작용은 공통된다 (11).

이에 반해서 존속성 세균에서 항생제 관용 현상은 항생제가 표적에 결합은 하지만 항생제가 표적의 기능에 미치는 영향이 상쇄되는 것을 의미한다. 예를 들어, 존속성 세균에서 퀴놀론계(quinolones)의 항생제는 표적인

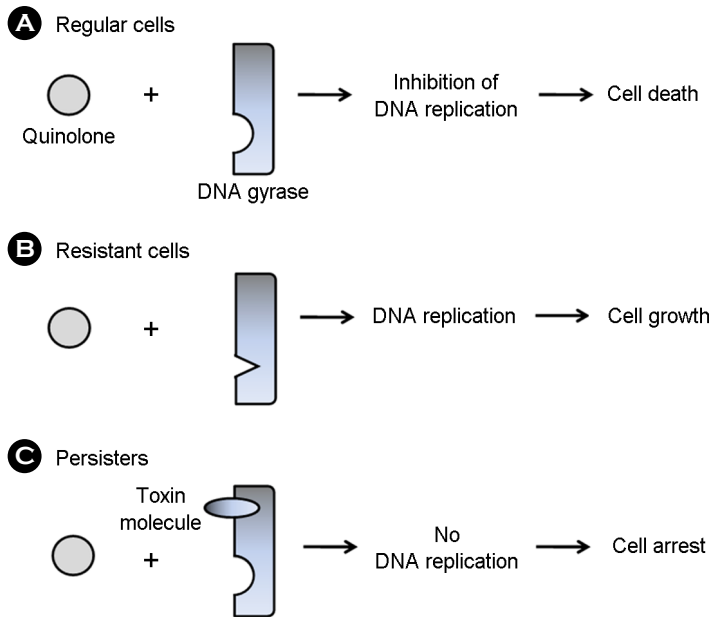


Figure 2. Resistance versus tolerance to bacterial antibiotics (modified from Wolfson *et al.*, Ref. 9). (A) The quinolone binds to the DNA gyrase altering its function, which causes cell death. (B) The DNA gyrase has been altered so that it fails to bind the quinolones and the cell grows. (C) A toxin molecule inhibits the function of DNA gyrase. This prevents the quinolone from corrupting its functions, resulting in tolerance.

DNA gyrase에 결합을 하지만 DNA 복제기능을 억제하는 인자가 표적에 결합함에 따라 항생제에 의한 살균작용은 상쇄되고 세균은 결국 세포 정지기(arrest)에 머물게 된다 (9) (Fig. 2). 존속성 세균은 대사 작용이 억제되어 있으며 세포벽 합성(cell wall synthesis), 번역(translation)의 과정을 통한 단백질 합성, topoisomerase 활성화에 의한 DNA 복제가 잘 이뤄지지 않는 상태이므로 이러한 작용과 관련된 표적에 항생제가 결합하여도 그 영향은 미미하기 때문에 항생제에 대한 관용을 가지게 되는 것이다 (6). 이런 결과로 존속성 세균은 항생제에 의해 사멸이 이루어지지 않으며 그 대가로 분화불가능의 상태에 놓이게 되는 것으로 보인다.

3. 존속성 세균의 임상적 의의

대부분의 존속성 세균의 연구는 *E. coli* K-12 비병원성 균주에서 수행되었으나, 최근 병원성 *Escherichia coli*, *M. tuberculosis*, *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에서도 존속성 세균의 형성이 관찰되었다 (5). 존속성 세균의 형성이 세균의 공통된 방어 기전이라면 임상적으로 항생제 처치 후에 생존한 세균으로 인한 문제점은 매우 심각하다고 할 수 있다. 많은 정균성(bacteriostatic) 항생제는 세균의 사멸이 아닌 성장의 억제를 통해 항균효과를 나타내므로, 항생제의 농도가 낮아지게 되면 생존한 세균의 빠른 증식이 일어나게 된다. 그러나 대부분의 세균 감염에서는 일반적으

로 신체 면역작용에 의해 빠른 세균의 증식이 억제되므로, 면역시스템이 작용하지 못하는 생리적 환경에서 존속성 세균의 형성이 문제되고 있다. 임상적으로 존속성 세균의 형성이 문제시 되는 요인으로서는 면역 결핍 환자, 면역 체계에 적응한 병원성 세균, 면역시스템이 작용하지 못하는 신체 내의 특정 장소로의 회피가 있다 (4). 존속성 세균 감염의 예로서, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 환자에서의 *P. aeruginosa*와 칸디다증(candidiasis) 환자에서의 *Candida albicans*의 감염이 보고되었으며, *M. tuberculosis*의 존속성 세균이 만성 감염과 사망에 이르는 임상 증상을 야기한다고 알려져 있다 (12, 13). 또한 감염성 질병에서의 존속성 세균의 항생제 관용이 항생제 내성 돌연변이의 출현 또는 다른 균주로부터의 수평적 유전자의 전달을 통한 항생제 내성인자 획득의 환경을 제공한다고 알려져 있다 (6).

이런 이유로, 감염 정도의 감소가 아닌 병원성 균주의 완전한 사멸을 위한 새로운 항생제 개발의 필요성이 대두되고 있다. Bigger는 항생제 투여 용량을 조절하여 *P. aeruginosa*의 존속성 세균을 사멸시킬 수 있다고 주장하였는데, 높은 용량의 항생제를 투여한 후에 낮은 용량을 처치하여 존속성 세균이 증식 가능하고 항생제에 민감한 자손을 생산하는 시점에서 다시 항생제를 투여하여 완전한 균의 사멸이 가능하다고 보고하였다 (14). 또한 최초로 국내에서 존속성 억제 물질을 개발하여 보고한 바 있

다 (15). 그러나 존속성 세균에 대한 새로운 항생제의 개발은 미국 식품의약품안전청(FDA)의 일반적인 항생제에 대한 평가에 적합하지 않으므로 상용화가 힘든 실정이다. Bigger의 항생제 투여 용량에 따른 존속성 세균의 사멸 방법 또한 환자에 따른 오차와 항생제 내성 균주의 출현 위험성 증가 등의 문제점이 제기되고 있다 (6). 현재까지 대부분의 존속성 세균에 대한 연구들은 *in vitro*에 국한되어 있으므로, 저자들은 *in vivo*에서의 추가적인 연구가 존속성 세균에 대한 새로운 항생제 요법 개발의 기회를 앞당길 것이라고 예상한다.

결론

세균은 외부 환경에 적응하기 위한 방법으로 유전적으로 동일한 집단 내에서 대사 과정을 저하시켜 분열하지 않는 존속성 세균을 형성한다. 이러한 존속성 세균은 여러 항생제에 대한 관용을 나타내며, 인체의 면역 체계로부터 회피한 존속성 세균은 만성 감염과 사망에 이르는 임상 증상을 야기한다. 이러한 존속성 세균이 가지는 항생제 관용은 꾸준히 임상적으로 문제가 됨에도 불구하고 현재까지 많은 연구가 이뤄지지 않았는데, 그 이유는 존속성 세균은 유전적으로 동일한 집단 내에서 발생한 소수의 집단이며, 항생제 관용은 일시적이고 가역적이며 여러 가지의 복잡한 기전이 관여하기 때문이다 (16). 이에 따라 항생제 투여 용량에 따른 존속성 세균의 완전한 사멸 방법이 제시되었으나 환자에 따른 각기 다른 약동학적 지표의 편차 그리고 항생제 내성 균주 발현 증가의 위험성에 따라 새로운 항생제 치료 요법 개발의 필요성이 대두되고 있다. 최근 많은 연구자들이 존속성 세균 형성에 관련된 유전자를 제시하고 있으며, 이러한 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 새로운 항생제의 개발이 이뤄질 수 있다고 예상된다.

참고 문헌

- 1) Dawson CC, Intapa C, Jabra-Rizk MA. "persisters": Survival at the cellular level. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002121.
- 2) Bigger JW. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Irish J Med Sci* 1944;19:553-68.
- 3) Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the

- mechanism of action of penicillin. *Exp Biol Med* 1942;50:281-5.
- 4) Nataro JA, Blaser MJ, Cunningham-Rundles S. Persistent Bacterial Infections. Washington D. C.: ASM press; 2000. P.453.
- 5) Gefen O, Balaban NQ. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33:704-17.
- 6) Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:48-56.
- 7) Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 2004;230:13-8.
- 8) Moyed HS, Broderick SH. Molecular cloning and expression of HipA, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 1986;166:399-403.
- 9) Wolfson JS, Hooper DC, McHugh GL, Bozza MA, Swartz MN. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1938-43.
- 10) Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:107-31.
- 11) Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004;10:S122-9.
- 12) Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, *et al.* Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8487-92.
- 13) Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, *et al.* Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* 2008;69:164-74.
- 14) Bigger JW. Treatment of Staphylococcal infections with penicillin. *Lancet* 1944;244:497-500.
- 15) Kim JS, Heo P, Yang TJ, Lee KS, Cho DH, Kim BT, *et al.* Selective killing of bacterial persisters by a single chemical compound without affecting normal antibiotic-sensitive cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5380-3.
- 16) Wu Y, Vulić M, Keren I, Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4922-6.