

REVIEW

항생제 내성률 감소를 위한 퍼시스터 세포 박멸과 인돌의 기능

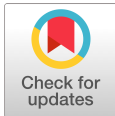
박가린 · 송수연*

전북대학교 농업생명과학대학 동물자원학과

Eradicating Bacterial Persister Cells with Substituted Indoles to Reduce Antibiotic Resistance

Garin Park and Sooyeon Song*

Department of Animal Science, Jeonbuk National University, Jeonju, Korea

Received: December 4, 2021
Revised: December 18, 2021
Accepted: December 24, 2021*Corresponding author :
Sooyeon Song
Department of Animal Science, Jeonbuk
National University, Jeonju, Korea
Tel : +82-63-270-2606
Fax : +82-63-270-2612
E-mail : songsy@jnbnu.ac.krCopyright © 2021 Korean Society of
Dairy Science and Biotechnology.
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>)
which permits unrestricted non-commercial
use, distribution, and reproduction in any
medium, provided the original work is
properly cited.

ORCID

Garin Park
<https://orcid.org/0000-0003-2802-9852>
Sooyeon Song
<https://orcid.org/0000-0003-1819-5099>

Abstract

Antibiotics are used in many sectors, including the dairy industry, to prevent bacterial infections in humans, animals, and plants. When bacterial cells are exposed to stressors, such as antibiotic exposure, a subpopulation of the cells becomes dormant. This helps the pathogen to revive and reconstitute its pathogenicity. Thus, eradicating the dormant cells may be an effective strategy to reduce the development of antibiotic resistance in bacteria caused by the abuse of antibiotics. In recent years, a large number of indole-related compounds have been reported to eradicate persister cells. In this review, we provide a summary of the mechanisms of persister cell formation and resuscitation, and the ability of indole and substituted indoles to eradicate persister cells.

Keywords

antibiotics, persisters, indole, substituted indole

서론

항생제는 사람, 동물, 식물의 세균 감염을 막기 위해 사용되는 중요한 방어 수단으로 의료, 축 농수 산업 등을 포함하여 광범위하게 사용되고 있다[1]. 낙농산업에서도 항생제의 문제점이 예외가 될 수 없는데 특히 치료목적으로 사용되는 항생제가 우유에 잔류되었을 경우 사람이 섭취할 수 있다는 문제점뿐만 아니라 스타터를 이용한 유가공품의 숙성 및 발효에 영향을 미쳐 생산량 저하 등의 경제적 손실의 문제를 초래한다. 이러한 광범위한 항생제의 오남용은 슈퍼박테리아 등의 항생제 내성의 위기를 초래하였고, 그 결과 국내외적으로 새로운 항생제의 개발과 항생제 오남용 감소를 위한 노력에 관심이 높아지고 있는 가운데 항생제 내성균에 대한 우려는 높아지는 반면, 종종 간과되는 주요 타겟에는 항생제에 내성이 있는 persister 세포가 있다[2]. 세균이 항생제에 내성을 가지게 되면 항생제로부터 살아남을 수 있는데, persister는 세균 감염을 재발시키는 등 세균박멸에 어려움을 겪도록 한다. 따라서 persister의 형성과 재개의 매커니즘을 잘 이해한다면 항생제 내성률 감소 및 지속적인 세균 감염을 근절할 수 있는 새로운 접근법이 개발될 수 있을 것이다[3]. 퍼시스터 세포는 박테리아 세포가 스트레스에 노출되었을 경우 세포의 대부분이 휴면 상태가 되고, 이 휴면 세포는 스트레스 요인이 제거되면 다시 소생한다는 특징을 가진다. 병원성 세균의 경우 이러한 휴면상태를 통해 스트레스를 극복하고 감염성을 다시 획득할 수 있다는 점을 고려하였을 때, 항생제 내성률의 감소라는 목적을 위해서 이러한 휴면 상태의 세포를 박멸하는 방법을 찾아내는 것이 매우 중요하다. 이러한 목적을 가지고 지난 몇 년 동안 여러 연구 그룹을 통해 persister를 죽이는 많은 인돌 관련 화합물이 발견되어 왔다. 따라서 이 논문은 persister의 형성과 소생에 관한 최근 연구 결과들의 요약과 함께, 병원성

및 비병원성 persister를 죽이는 인돌과 치환 인돌의 기능을 설명하고자 한다.

본 론

1. 퍼시스터 세포(Persister cells)

Persister는 유전적 변화 없이[4] 대사를 정지시켜 발생하는 스트레스 내성 세포이다[5-8]. 처음으로 Persister가 알려진 것은 휴면 상태의 *Staphylococcus aureus*가 페니실린에 내성이 있음을 보여주는 연구 결과[5,6]로 규명되었다. 세포 집단의 소그룹에서 일어나는 persistence와 달리 resistance는 항생제가 존재할 때 세포가 성장하도록 하는 유전적 돌연변이가 발생하여 일어나고, tolerance는 세포가 느리게 성장하면서 이 전체 세포 집단이 항생제에 대한 감수성이 감소된다[9,10]. Persister 세포는 영양 제한, 항생제, 산성 및 산화적 스트레스에 의해 나타날 수 있다[11,12]. 거의 대부분의 세포들은 영양이 고갈되어 있기 때문에[13], persister 세포는 세균과 고세균류에서 발생하는 보편적인 휴면 상태이다[14]. Persistence가 자연적으로 발생하기도 하지만[15], 주로 환경의 스트레스에 반응하여 발생한다[7,16-22].

2. 퍼시스터 세포의 형성과 재개 기작

ppGpp는 persister와 관련이 있는 인자로 알려져 있으며[23-26], 신호인자로서 persister를 형성하는 역할을 한다는 것은 이미 많은 연구를 통해 알려져 있다[23-26]. 하지만 최근까지도 ppGpp의 persister 형성 기작은 명확히 규명되지 않고 있다.

ppGpp와 persister 사이의 관계를 명확히 하기 위해서는 ppGpp의 박테리아 세포 대사 조절 기작을 알아야 한다. 먼저 세포는 스트레스 상태를 견디기 위해 구아노신 4인산 또는 구아노신 5인산(ppGpp)을 합성하여 복제, 전사, 번역을 감소시킨다[27]. 또한 ppGpp는 DNA primase를 억제하여 DNA 복제를 느리게 만들고[27], RpoS(σ^S , 정지기의 스트레스 반응 시그마 인자)와 RpoE(σ^E , 세포질에서 잘못 접힌 단백질에 대한 스트레스 반응 시그마 인자)를 자극하여 전사를 느리게 한다[28]. 또한 퓨린 뉴클레오타이드의 합성을 방해하고[29] 핵산 분해효소 PpnN을 활성화하여[30] 퓨린 항상성을 조절한다. 또한 ppGpp는 리보솜의 생산을 줄여 번역을 느리게 만들기도 한다[31].

특정 단백질의 활성화도 ppGpp에 의해 직접적으로 감소된다. 예를 들어, ppGpp는 GTP 가수분해 효소(GTPase)에 결합하여 GTPase의 활성을 방해한다[27]. ppGpp는 비활성화 상태의 100S 리보솜을 활성화하는 GTP 분해 효소인 HflX 단백질[32]에 결합하여 비활성 리보솜의 활성화를 억제한다[32,33](Fig. 1A). 또한 ppGpp는 30S 리보솜 소단위의 생성에 관여하는 GTPase Era(필수 GTPase)를 억제한다[34].

결정적으로 persister를 형성하기 위해 ppGpp는 (i) 70S 리보솜을 비활성화하는 리보솜 조절 인자(RMF)를 암호화하는 *rmf*, (ii) 정지 유도 인자(Hpf)를 암호화하는 *hpf*, (iii) 리보솜과 관련된 방해 인자(RaiA)를 암호화하는 *raiA*를 유도하여 리보솜을 비활성화한다.

다른 많은 연구에서 ppGpp가 Toxin/Antitoxin(TA) 시스템의 Toxin을 활성화하여 persistence를 형성하는 메커니즘을 규명하려 시도했으나 여전히 규명되지 못하고 있다[35-37]. 반면 박테리아가 스트레스에 노출되면 ppGpp가 유도되고 70S 리보솜을 비활성 100S 리보솜으로 전환하여 Persister를 형성하는 리보솜 이량체 Persister 모델(PRDP, Fig. 1A)이 제안되었다[14,22]. 이를 뒷받침하는 실험결과로 (i) persister의 리보솜은 대부분 비활성 100S 리보솜이고, (ii) RMF, Hpf, RaiA의 비활성은 persister의 형성을 감소, persister의 소생은 증가시켰으며 (iii) 단일세포 분석을 통해 persister의 소생이 ppGpp의 농도에 영향을 받지 않는다는 것을 발견했다[14]. Persister 형성

에서 TA 시스템과 persistence 사이의 관계가 충분히 증명되지 않았기 때문에 이PRDP 모델은 TA 시스템에 의존하지 않는다[8,38,39].

Persister 세포는 ppGpp의 농도와 관계없이 형성되므로[25] PRDP 모델에서는 ppGpp 없이 RMF와 Hpf를 활성화하는 데 cAMP의 역할이 포함되어 비활성 100S 리보솜이 형성된다(Fig. 1A). 특히 영양 부족(포도당 고갈)은 cAMP를 증가시키고 *rmf*[40]와 *raiA*[41]를 유도한다. 또한 cAMP는 *hflX*의 활성을 억제한다[42]. 따라서 cAMP는 persister 형성에서 ppGpp와 비슷한 역할을 하는데, 이 두 세포 신호(ppGpp와 cAMP)의 증가가 리보솜 비활성화와 세포 소집단의 persistence 형성으로 이어진다.

persister의 소생에서(Fig. 1B), 단일세포분석방법을 통하여 그들이 외부 영양소를 인식하는 다양한 방법으로 소생한다는 것을 처음으로 입증하였다. persister가 깨어나는 비율은 활성 리보솜의 수에 의존한다. 이후 persister 소생의 다양한 특성은 많은 연구에 의해 검증되었다[43,44]. Single cell 분석과 전반적인 *E. coli* 단백질에 대한 연구를 통해, persister의 소생은 외부의 영양소를 인식하며 시작되며, persistence의 소생에 특화된 단백질은 딱히 존재하지 않는다(Fig. 1B)[45]. 2차 메신저 cAMP의 농도가 감소되면서 외부 영양소의 존재(즉, 신호)가 세포질로 전파되는데, 이때 cAMP의 농도 감소는 mRNA 상에 정지된 100S 리보솜을 활성화시키고 이때, HflX이 비활성 100S 리보솜을 활성화하도록 한다[45]. 소생된 세포는 인식된 영양소를 향한 주화성 운동(chemotaxis)을 시작하는데, 이는 애초에 영양소의 고갈이 persistence를 유발했기 때문이다[45]. 따라서 Wood 그룹에서는 소생에서 특정한 신호와 이 신호가 어떻게 세포 외부에서 감지되는지, 외부의 신호가 어떻게 2차 메신저를 통해 세포 내부로 전달되는지, 그리고 세포가 persister에서 깨어나서 영양소에 반응하여 어떠한 화학 작용을 시작하는지를 규명하였다[45].

PRDP 모델(Fig. 1A)은 persister의 형성이 스트레스에 대한 세포의 조절 반응(elegantly regulated response)이라는 것을 시사한다. 이에 대한 실험적 근거로, 자연적인 persister는 많지 않지만 [15] 다양한 형태의 환경적 스트레스(항생제, 과산화수소, 산 등)가 지수기의 세포 집단 거의 대부분을 persister로 전환시킨다[7,11]. 비슷하게 PRDP 모델은 persister의 소생 또한 자연적인 현상이기 보다 고등의 환경 반응이라는 것을 시사하고, 아미노산 알라닌에 대한 persister 소생 연구결과가 이를 증명한다[45]. 거의 모든 세포가 영양 고갈을 겪고 그 스트레스 환경을 견디기 위해서 휴면 상태가 필수적이기 때문에 세포가 persister 형성과 소생에 고등의 조절을 요구하는 것은 합리적인 현상이다. 결정적으로, PRDP 모델은 persister에서 “표현형의 전환”이 비활성화된 리보솜 수에 의해 결정된다는 것을 시사한다. 따라서 스트레스 조건에서 비활성 리보솜을 일정 기준만큼 가진 일부 세포만이 persister가 된다[21,22]. 즉 모든 세포가 비활성 리보솜의 충분한 비율을 갖지는 않으므로 정지기의 세포가 모두 persister인 것이 아닌 것이다.

RMF가 (i) ampicillin[14], ciprofloxacin[14], netilmicin[46], gentamicin[47], 산[48], 삼투 스트레스[49] 및 영양 고갈[50,51] 등 수많은 스트레스 환경에서 *E. coli*의 persistence를 극도로 증가시키는 것이 관찰되었기 때문에, PRDP 모델은 다양한 스트레스 환경으로부터 persister가 형성되는 방법에 일반적으로 적용이 가능하다. RMF[41]와 HflX[52]는 거의 대부분의 세균 내에서 잘 보존되어 있고, Hpf는 여러 생물계(원핵생물 및 식물)에 널리 퍼져 있으므로[53], PRDP 모델은 아마 *E. coli* 뿐만이 아니라 많은 종의 persister의 형성에 적용할 수 있을 것이다. 예를 들어 기회 감염성 세균 *Pseudomonas aeruginosa*도 persister를 형성하기 위해 ppGpp를 요구하고[24], 영양이 제한되었을 때 리보솜을 보호하거나 *P. aeruginosa* 또한 장기간 생존하게 하기 위해 Hpf와 ppGpp (RMF 제외)가 필수적이다[54]. 또한 ppGpp는 *P. aeruginosa*에서 *hpf* 발현을 유도한다[53]. *Rhodospirillum centenum* 남포의 경우 세포가 활성화되기 위해 첫 번째로 암호화된 유전자들은 리보솜과 번역 시스템(개시, 신장, 종결)과 관련되어 있다[55]. 따라서 PRDP 모델은 많은 종의 휴면 상태를 규명 가능하다.

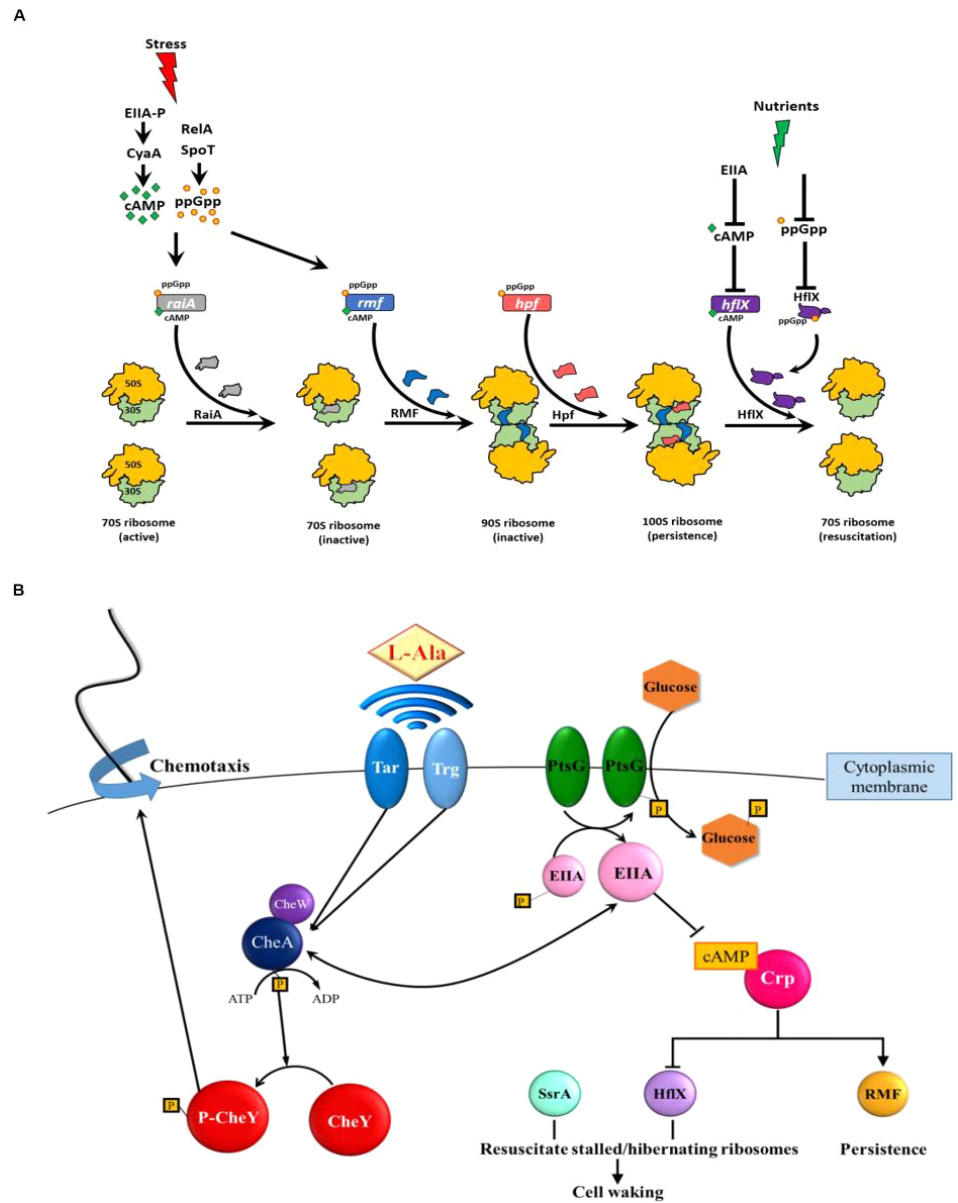


Fig. 1. Mechanism for persister formation and Resuscitation. (A) ppGpp ribosome dimerization persister (PRDP) model for persister cells formation and resuscitation. Adapted from Song and Wood [14]. (B) Mechanism for persister cell resuscitation via alanine and glucose. Adapted from Yamasaki et al. [45].

3. 신호물질로서의 인돌

트립토판의 대사 산물인 인돌은 종내, 종간, 생물계 간 신호라는 점에서 다중 계층 신호 (interkingdom signal)이다. 종내 신호로써 인돌은 특히 주로 저온에서 [56] *E. coli*의 퀴럼 센싱을 조절한다 [57]. 종간 신호로써 인돌은 병원성 인자 pyocyanin, rhamnolipid, 2-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone, pyoverdine [58]을 없애고, 이를 합성하지 못하게 된 *P. aeruginosa*의 병원성을 감소시킨다. 이는 *P. aeruginosa*와 공생하는 *E. coli*의 생존 경쟁 능력 향상으로 이어진다 [59]. 또 종간 신호로써, 인돌은 EHEC(장출혈성 대장균)를 공격하거나(음성 화학 작용) 생물막의

형성을 억제하고, EHEC의 이동성과 HeLa 세포에 대한 결합력을 감소시켜 그 병원성을 낮춘다[60]. 따라서 여러 연구들은 인돌이 항독성 물질로써 사용될 수 있을 것이라고 주장해왔고[58,61], 실제로 인돌은 기니피그의 폐결핵을 줄이고 폐 간극을 증가시킴으로써 *P. aeruginosa*의 병원성을 낮추는데 성공적으로 이용되었다[58]. 12년 후, Sperandino의 팀은 인돌이 위장관에서 EHEC의 병원성을 줄인다는 것을 확인했다[62]. 인돌은 *S. aureus*의 병원성 또한 감소시켰다[63].

놀랍게도 인돌은 생물계 간 신호이기도 하다. 위장관 내 미생물에서 생성된 인돌은 사람의 상피 세포 접합 부위를 꼭 조여 병원균의 침투를 막는다[64,65]. 또한 우리는 인돌이 훨씬 강한 신호가 되기 위해 위장관에서 산소화 효소에 의해 수산화 될 것이라는 가설을 세웠다. 예를 들어 수산화된 7-hydroxyindole은 기존의 인돌보다 *P. aeruginosa*의 병원성을 더 효과적으로 없앤다[57]. 게다가 많은 인간과 식물의 호르몬이 인돌에서 파생되었기 때문에(indole-3-acetic acid, serotonin, melatonin, epinephrine), 인돌은 세포 호르몬의 전구체가 될 수 있다[66]. 생물계 간의 신호로써의 인돌의 역할을 보여주는 증거로 일부 식물(옥수수)이 파밤나방의 애벌레와 같은 곤충에게 경고하기 위해 인돌을 방출한다는 것이 있다[67,68].

그리고 인돌은 *E. coli*의 생물막 형성을 감소시키고[57,66,69-71], 생물막 내에서의 *E. coli* 생산량을 감소시킨다[69]. 또한 인돌이 TA 시스템 YafQ/DinJ[20]와 인산분해효소 DosP[19]를 조절하여 *E. coli* persister의 형성을 감소시킨다는 사실 또한 밝혀졌다.

4. 퍼시스터 세포를 죽이는 인디고이드계 물질

Persister를 죽이기 위해 사용되는 화학물질을 (i) persister 세포의 형성을 막거나, (ii) persister 세포를 죽이거나, (iii) persister 세포를 소생시켜 항생제 감수성을 다시 획득하여 전형적인 항생제로 죽이는 세 가지 범주로 나눌 수 있다[72]. 이 중에서 indigoid는 주로 막을 손상시켜 휴면 상태의 세포를 죽임으로써 persistence를 억제한다.

*E. coli*에 2mM의 인돌이 persistence를 감소시키고 이것이 ampicillin의 52배 효과라는 연구결과가 발표되었다[19,20]. 인돌이 persistence를 감소시킨다는 확실한 증거로써 동일한 인돌이 *E. coli*의 내열성 또한 감소시킨다는 흥미로운 결과와 함께 최근 발표되었다[73]. 광범위한 persister를 죽이는 인돌의 능력은 고세균 계통 *Haloferax volcanii*를 죽이는 능력(188배에 달하는 살균능력)에서도 나타난다[74].

Persister를 박멸하는 물질의 스크리닝을 통해서 halogenated-, methoxy-, methyl-, nitro-인돌을 포함한 36개의 인돌 파생 물질의 persister 살균능력이 측정되었다. 이 검사에서, 4-fluorindole, 7-chloroindole, 7-bromoindole, 5-iodoindole과 같은 할로젠 인돌이 *E. coli* persister를 죽이는 것이 발견되었다. 특히 5-iodoindole은 기존 *E. coli* 인돌보다 1,500배 강한 가장 효과적인 indigoid이다[75]. 5-iodoindole은 *S. aureus*의 persister도 죽였지만 *P. aeruginosa*에게는 효과가 없었다[75].

최근 *P. aeruginosa*의 persister를 효과적으로 죽이는 치환 인돌 5-nitro-3-phenyl-1Hindol-2-yl-methylamine hydrochloride(NPIMA)[76]이 발견되었다. NPIMA는 rifampicin을 먼저 처리하여 전사를 멈추고 지수기의 *E. coli*를 persister로 전환한 후[77], 최초로 persister에 1만여개의 물질을 직접 처리하는 스크리닝을 통하여 발견되었다[76]. NPIMA가 5-iodoindole[75]과 cisplatin[78]보다 *E. coli*의 persister를 죽이는 데 훨씬 효과적이라는 것이 밝혀졌다. 중요한 점은 NPIMA가 *P. aeruginosa*와 *S. aureus*의 persister도 죽인다는 점이다. 결정적으로 NPIMA가 persister를 죽이는 작용이 세포막 손상으로 인한 것이라는 것이 밝혀졌다[75]. 나아가 NPIMA에 대한 *E. coli*의 내성은 일주일동안 거의 발생하지 않았으며, *P. aeruginosa*와 *S. aureus*의 감염 모델에도 NPIMA가 효과적이라는 것이 밝혀졌다[75].

더 나아가, 인돌 유래 물질은 항생제나 금속 물질에 결합해 persister의 억제능력을 증가시킨다.

예를 들어, tobramycin과 결합한 5-methylindole은 methicillin에 내성이 있는 *S. aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*의 persister를 죽인다[79]. 5-nitroindole은 *E. coli*, *P. aeruginosa*, 그리고 *Enterobacter tabaci*의 persister를 죽이며, 구리 또는 아연 나노 입자와 결합했을 때 그 효과가 더욱 증가한다[80].

결핵으로 150만 명의 사람이 매년 사망하는 만큼[81], mycobacteria의 persister 박멸 가능 물질의 발견이 필수적이며 이에 치환 인돌 N-[(6-trifluoromethyl)-1H-indol-2-ylmethyl] cyclo-octanamine(IMA6)이 *Mycobacterium*의 persister를 죽이는 것이 확인되었다[82].

5. 퍼시스터 세포의 재개에서의 인돌의 기능

Persister를 죽이는 것 이외에 인돌은 다른 특징이 있다. 인돌은 다른 세포가 휴면상태에서 소생하는 것을 억제하고, 선택적으로 *E. coli* 세포를 휴면 상태에서 깨어날 수 있도록 한다[83]. 구체적으로, 인돌은 *E. coli*의 소생에는 아무런 영향도 미치지 않았지만 *P. aeruginosa* persister가 소생하는 것을 억제하였다[83]. 더 나아가 *E. coli*가 *P. aeruginosa*와의 경쟁에서 우월하게 만든다[83]. 생리학적으로 인돌은 휴면 또는 비휴면 상태의 *P. aeruginosa* 세포에 독성이 없으므로[83], 소생 억제는 독성이나 형성된 *P. aeruginosa*의 persister 수 차이 때문이 아니다. 유감스럽게도 인돌이 persister 소생을 억제하는 기작은 아직 밝혀지지 않았다.

이러한 인돌의 특징은 *E. coli*에게 다른 경쟁자들보다 성장에 이점을 제공할 것이고, 이것이 *E. coli*에서 인돌이 0.7mM의 높은 수준으로 분비되는 주요 원인 중 하나일 수 있다[70]. 이 결과는 생리학적으로도 관련이 있는데, *E. coli*가 건강한 사람에게서 최대 12%[84], 중환자의 위장관에서 종종 발견되는 *P. aeruginosa*[85]와 함께 위장관에서 발견되기 때문이다. 인돌이 종 간 신호로써 *P. aeruginosa*의 퀴럼 센싱 관련 병원성 인자들을 감소시키기 때문에[58], 이러한 새로운 결과[83]는 *E. coli*에서 분비된 인돌이 *P. aeruginosa*의 병원성을 없애고 persister로부터의 소생을 막는다는 것을 의미한다.

결론

*E. coli*로부터 분비된 인돌의 가장 중요한 측면은 퀴럼 센싱 신호로써 유전자 발현의 조절이 아니라 종 간 또는 생물계 간의 신호로써 주변에 영향을 미친다는 것이다. 인돌은 몇 가지 유전자만을 조절하는 반면[56,86], 패혈증을 막기 위해 상피 세포 접합부를 단단하게 만들거나[64], *P. aeruginosa*의 persister의 소생을 막고[83] EHEC[57,60]와 *P. aeruginosa*의 병원성을 감소시키는 등[58] *E. coli*와 공생하는 다른 균들을 제어하여 *E. coli* 숙주에게 유익한 환경을 만든다.

인돌이 persistence를 감소시킨다는 연구 결과를 이용하여[19,20], 많은 연구에서 persister를 죽이는 새로운 indigoid가 발견되고 있다. 따라서 우리는 항생제 내성의 심각성이라는 문제를 해결하기 위해 Persister 세포의 형성과 재개의 기작을 이해할 필요가 있으며, 이러한 과정에서 효과적으로 Persister를 제어할 수 있는 인돌유래물질 중 몇 가지를 효과적으로 사용할 수 있을 것이라 기대하며 이는 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

References

1. Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, Church GM. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*. 2008;320:100-103.
2. Balaban NQ, Gerdes K, Lewis K, McKinney JD. A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:587-591.
3. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15:453-464.
4. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:357-372.
5. Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. *Exp Biol Med*. 1942;50:281-285.
6. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*. 1944;244:497-500.
7. Kwan BW, Valenta JA, Benedik MJ, Wood TK. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:1468-1473.
8. Pontes MH, Groisman EA. Slow growth determines nonheritable antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Sci Signal*. 2019;12:eaax3938.
9. Kaldalu N, Hauryliuk V, Tenson T. Persisters—as elusive as ever. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:6545-6553.
10. Kudrin P, Varik V, Oliveira SRA, Beljantseva J, Del Peso Santos T, Dzhygyr I, et al. Subinhibitory concentrations of bacteriostatic antibiotics induce *relA*-dependent and *relA*-independent tolerance to β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:e02173-16.
11. Hong SH, Wang X, O'Connor HF, Benedik MJ, Wood TK. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb Biotechnol*. 2012;5:509-522.
12. Kim JS, Chowdhury N, Yamasaki R, Wood TK. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environ Microbiol*. 2018;20:2038-2048.
13. Song S, Wood TK. Post-segregational killing and phage inhibition are not mediated by cell death through toxin/antitoxin systems. *Front Microbiol*. 2018;9:814.
14. Song S, Wood TK. ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;523:281-286.
15. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004;305:1622-1625.
16. Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000317.
17. Möker N, Dean CR, Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol*. 2010;192:1946-1955.
18. Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat Chem Biol*. 2012;8:431-433.
19. Kwan BW, Osbourne DO, Hu Y, Benedik MJ, Wood TK. Phosphodiesterase DosP increases persistence by reducing cAMP which reduces the signal indole. *Biotechnol*

- Bioeng. 2015;112:588-600.
20. Hu Y, Kwan BW, Osbourne DO, Benedik MJ, Wood TK. Toxin YafQ increases persister cell formation by reducing indole signalling. *Environ Microbiol.* 2015;17:1275-1285.
 21. Song S, Wood TK. Are we really studying persister cells? *Environ Microbiol Rep.* 2021;13:3-7.
 22. Wood TK, Song S. Forming and waking dormant cells: the ppGpp ribosome dimerization persister model. *Biofilm.* 2020;2:100018.
 23. Korch SB, Henderson TA, Hill TM. Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol.* 2003;50:1199-1213.
 24. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science.* 2011;334:982-986.
 25. Chowdhury N, Kwan BW, Wood TK. Persistence increases in the absence of the alarmone guanosine tetraphosphate by reducing cell growth. *Sci Rep.* 2016;6:20519.
 26. Svenningsen MS, Veress A, Harms A, Mitarai N, Semsey S. Birth and resuscitation of (p)ppGpp induced antibiotic tolerant persister cells. *Sci Rep.* 2019;9:6056.
 27. Gaca AO, Colomer-Winter C, Lemos JA. Many means to a common end: the intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *J Bacteriol.* 2015;197:1146-1156.
 28. Dalebroux ZD, Swanson MS. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10:203-212.
 29. Wang B, Dai P, Ding D, Del Rosario A, Grant RA, Pentelute BL, et al. Affinity-based capture and identification of protein effectors of the growth regulator ppGpp. *Nat Chem Biol.* 2019;15:141-150.
 30. Zhang YE, Bærentsen RL, Fuhrer T, Sauer U, Gerdes K, Brodersen DE. (p)ppGpp regulates a bacterial nucleosidase by an allosteric two-domain switch. *Mol Cell.* 2019;74:1239-1249.E4.
 31. Shimada T, Yoshida H, Ishihama A. Involvement of cyclic AMP receptor protein in regulation of the *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2013;195:2212-2219.
 32. Zhang Y, Zborníková E, Rejman D, Gerdes K. Novel (p)ppGpp binding and metabolizing proteins of *Escherichia coli*. *mBio.* 2018;9:e02188-17.
 33. Corrigan RM, Bellows LE, Wood A, Gründling A. ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:E1710-E1719.
 34. Wood A, Irving SE, Bennison DJ, Corrigan RM. The (p)ppGpp-binding GTPase Era promotes rRNA processing and cold adaptation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.* 2019;15:e1008346.
 35. Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K. Retraction notice to: (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell.* 2018;172:1135.
 36. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K. Retraction for Maisonneuve

- et al., bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115:E2901.
37. Germain E, Roghanian M, Gerdes K, Maisonneuve E. Retraction for Germain et al., stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116:11077.
 38. Conlon BP, Rowe SE, Gandt AB, Nuxoll AS, Donegan NP, Zalis EA, et al. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat Microbiol*. 2016;1:16051.
 39. Goormaghtigh F, Fraikin N, Putrinš M, Hallaert T, Hauryliuk V, Garcia-Pino A, et al. Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells. *mBio*. 2018;9:e00640-18.
 40. Shimada T, Yoshida H, Ishihama A. Involvement of cyclic AMP receptor protein in regulation of the *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2013;195:2212-2219.
 41. Prossliner T, Winther KS, Sørensen MA, Gerdes K. Ribosome hibernation. *Annu Rev Genet*. 2018;52:321-348.
 42. Lin HH, Hsu CC, Yang CD, Ju YW, Chen YP, Tseng CP. Negative effect of glucose on *ompA* mRNA stability: a potential role of cyclic AMP in the repression of *hfq* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2011;193:5833-5840.
 43. Goormaghtigh F, Van Melderen L. Single-cell imaging and characterization of *Escherichia coli* persister cells to ofloxacin in exponential cultures. *Sci Adv*. 2019;5: eaav9462.
 44. Pu Y, Li Y, Jin X, Tian T, Ma Q, Zhao Z, et al. ATP-dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance. *Mol Cell*. 2019;73:143-156.
 45. Yamasaki R, Song S, Benedik MJ, Wood TK. Persister cells resuscitate using membrane sensors that activate chemotaxis, lower cAMP levels, and revive ribosomes. *iScience*. 2020;23:100792.
 46. Tkachenko AG, Kashevarova NM, Tyuleneva EA, Shumkov MS. Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin. *FEMS Microbiol Lett*. 2017;364:fnx084.
 47. McKay SL, Portnoy DA. Ribosome hibernation facilitates tolerance of stationary-phase bacteria to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:6992-6999.
 48. El-Sharoud WM, Niven GW. The influence of ribosome modulation factor on the survival of stationary-phase *Escherichia coli* during acid stress. *Microbiology*. 2007; 153:247-253.
 49. Shcherbakova K, Nakayama H, Shimamoto N. Role of 100S ribosomes in bacterial decay period. *Genes Cells*. 2015;20:789-801.
 50. Yamagishi M, Matsushima H, Wada A, Sakagami M, Fujita N, Ishihama A. Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. *EMBO J*. 1993;12:625-630.
 51. Bubunencko M, Baker T, Court DL. Essentiality of ribosomal and transcription antitermination proteins analyzed by systematic gene replacement in *Escherichia*

- coli. *J Bacteriol.* 2007;189:2844-2853.
52. Basu A, Yap MNF. Disassembly of the *Staphylococcus aureus* hibernating 100S ribosome by an evolutionarily conserved GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114:E8165-E8173.
 53. Akiyama T, Williamson KS, Franklin MJ. Expression and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* hibernation promoting factor. *Mol Microbiol.* 2018;110:161-175.
 54. Akiyama T, Williamson KS, Schaefer R, Pratt S, Chang CB, Franklin MJ. Resuscitation of *Pseudomonas aeruginosa* from dormancy requires hibernation promoting factor (PA4463) for ribosome preservation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114:3204-3209.
 55. Ashok N, Bauer CE. Evidence of defined temporal expression patterns that lead a Gram-negative cell out of dormancy. *PLoS Genet.* 2020;16:e1008660.
 56. Lee J, Zhang XS, Hegde M, Bentley WE, Jayaraman A, Wood TK. Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*. *ISME J.* 2008;2:1007-1023.
 57. Lee J, Bansal T, Jayaraman A, Bentley WE, Wood TK. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:4100-4109.
 58. Lee J, Attila C, Cirillo SLG, Cirillo JD, Wood TK. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microbial Biotechnol.* 2009;2:75-90.
 59. Chu W, Zere TR, Weber MM, Wood TK, Whiteley M, Hidalgo-Romano B, et al. Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:411-419.
 60. Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, Jayaraman A. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun.* 2007;75:4597-4607.
 61. Lee JH, Wood TK, Lee J. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends Microbiol.* 2015;23:707-718.
 62. Kumar A, Sperandio V. Indole signaling at the host-microbiota-pathogen interface. *mBio.* 2019;10:e01031-19.
 63. Lee JH, Cho HS, Kim Y, Kim JA, Banskota S, Cho MH, et al. Indole and 7-benzoyloxyindole attenuate the virulence of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:4543-4552.
 64. Bansal T, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:228-233.
 65. Shimada Y, Kinoshita M, Harada K, Mizutani M, Masahata K, Kayama H, et al. Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PLOS ONE.* 2013;8:e80604.
 66. Lee J, Jayaraman A, Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol.* 2007;7:42.
 67. Frey M, Stettner C, Paré PW, Schmelz EA, Tumlinson JH, Gierl A. An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:14801-14806.

68. Erb M, Veyrat N, Robert CAM, Xu H, Frey M, Ton J, et al. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nat Commun.* 2015;6:6273.
69. Domka J, Lee J, Bansal T, Wood TK. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol.* 2007;9:332-346.
70. Domka J, Lee J, Wood TK. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2449-2459.
71. Lee J, Maeda T, Hong SH, Wood TK. Reconfiguring the quorum-sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acylhomoserine lactones. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:1703-1716.
72. Wood TK. Combatting bacterial persister cells. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113:476-483.
73. Masuda Y, Sakamoto E, Honjoh K, Miyamoto T. Role of toxin-antitoxin-regulated persister population and indole in bacterial heat tolerance. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86:e00935-20.
74. Megaw J, Gilmore BF. Archaeal persisters: persister cell formation as a stress response in *Haloferax volcanii*. *Front Microbiol.* 2017;8:1589.
75. Lee JH, Kim YG, Gwon G, Wood TK, Lee J. Halogenated indoles eradicate bacterial persister cells and biofilms. *AMB Express.* 2016;6:123.
76. Song S, Gong T, Yamasaki R, Kim JS, Wood TK. Identification of a potent indigoid persister antimicrobial by screening dormant cells. *Biotechnol Bioeng.* 2019;116:2263-2274.
77. Kim JS, Yamasaki R, Song S, Zhang W, Wood TK. Single cell observations show persister cells wake based on ribosome content. *Environ Microbiol.* 2018;20:2085-2098.
78. Chowdhury N, Wood TL, Martínez-Vázquez M, García-Contreras R, Wood TK. DNA-crosslinker cisplatin eradicates bacterial persister cells. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113:1984-1992.
79. Sun F, Bian M, Li Z, Lv B, Gao Y, Wang Y, et al. 5-Methylindole potentiates aminoglycoside against Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus* persisters under hypoionic conditions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:84.
80. Manoharan RK, Mahalingam S, Gangadaran P, Ahn YH. Antibacterial and photocatalytic activities of 5-nitroindole capped bimetal nanoparticles against multidrug resistant bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020;188:110825.
81. Yang T, Moreira W, Nyantakyi SA, Chen H, Aziz D, Go ML, et al. Amphiphilic indole derivatives as antimycobacterial agents: structure-activity relationships and membrane targeting properties. *J Med Chem.* 2017;60:2745-2763.
82. Yam YK, Alvarez N, Go ML, Dick T. Extreme drug tolerance of *Mycobacterium abscessus* "Persisters". *Front Microbiol.* 2020;11:359.
83. Zhang W, Yamasaki R, Song S, Wood TK. Interkingdom signal indole inhibits *Pseudomonas aeruginosa* persister cell waking. *J Appl Microbiol.* 2019;127:1768-1775.
84. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas*

- aeruginosa. Rev Infect Dis. 1983;5:279-313.
85. Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. The gastrointestinal tract the “undrained abscess” of multiple organ failure. Ann Surg. 1993;218:111-119.
86. Wang D, Ding X, Rather PN. Indole can act as an extracellular signal in Escherichia coli. J Bacteriol. 2001;183:4210-4216.