

Diss. ETH No. 17588

**Morphological and molecular characterization of
cell wall-deficient L-forms of *L. monocytogenes***

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Simone Dell'Era
Dipl. Microbiol. UNIZH
born May 8, 1976
citizen of Claro TI

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Loessner, examiner
Prof. Dr. Carmen Buchrieser, first co-examiner
Dr. Markus Schuppler, second co-examiner

2007

Summary

L-forms are cell wall-deficient forms of bacteria (CWDB). They represent bacterial variants which have lost the ability to maintain a rigid cell wall, and are thought to result from an induction process interfering with cell wall synthesis. Although several reports exist on morphological, serological and biochemical properties of L-forms, next to nothing is known about the molecular background for these unusual and interesting bacterial variants.

In this study several stable L-form lines were established from different *L. monocytogenes* strains. One of the L-form lines was established from strain Scott A constitutively expressing GFP. L-forms were isolated on media containing Penicillin G and foetal bovine serum, which could successively be substituted by milk serum. Stabilization of the L-forms was performed by successive reduction of the antibiotic concentration in the culture medium. Eventually, L-forms were cultured in an osmotically stabilized soft agar medium without antibiotics. The different aspects of induction, growth and survival of L-forms were also investigated with respect to their growth in milk and confirmed that the milk matrix represents a suitable medium for L-form maintenance and growth.

Complete loss of the rigid cell wall was confirmed by confocal laser scanning microscopy and electron microscopy. Further characterization of the L-forms revealed that they can actively divide, and form both small, protoplast-like vesicles as well as multi-nucleated macrocells which appear to be surrounded by a single membrane. Immunological analyses further confirmed the lack of a thick *Listeria*-type cell wall and specific cell wall-associated proteins such as Internalin A, whereas membrane-anchored proteins such as Internalin B were shown to be still present.

Based on time-lapse microscopy observations of GFP-labeled cells, a new hypothetical model for L-form growth and division is proposed. Replication by an “internal budding” process may explain their ability to multiply without a cell wall.

Transcriptome analysis and gene expression profiling was performed in order to compare global gene expression of parental *L. monocytogenes* Scott A and the respective L-forms. Whole genome macroarray analysis results indicated manifold differences in gene expression and suggested that specific genes are implicated in the different morphology and physiology of the

two distinct variants. The L-forms apparently show a down-regulated metabolism, which may result from adaptation to their increased volume and growth rate. Furthermore, the lack of a rigid cell wall results in a strong up-regulation of stress-related-genes. Although an intact cell wall is not present, the respective genes were shown to be expressed by the L-forms.

The potential pathogenicity of *L. monocytogenes* L-forms in cell invasion assays was studied *in vitro* by fluorescence microscopy and time-lapse confocal laser scanning microscopy. The results suggested that, under specific conditions, *Listeria* L-forms may intracellularly survive and persist after engulfment by macrophages. This observation supports the hypothesis that *L. monocytogenes* L-forms may represent stealth pathogens able to escape from host immune response.

The presented work provided the basis for an extensive characterization process leading to an improved understanding of the L-form cell and the significance of the transformation for the potential infection of eukaryotic cells. The occurrence of L-form cells in many bacterial species, together with the results from this study, clearly disprove the opinion that L-form cells only represent artefacts during the presence of cell-wall active antibiotics. The transformation to a cell wall deficient L-form may represent an advantageous strategy for bacteria in order to escape from environmental conditions that have a detrimental effect on cell wall-bearing bacteria, like antibiotics, bacteriophages or host immune response.

In conclusion, the here presented results from physiological, morphological and molecular investigations demonstrate that stable *L. monocytogenes* L-forms represent viable bacteria that were adapted to their novel cellular conformation. They are not only able to survive but also have the ability to replicate, grow and persist as stealth pathogens within eukaryotic cells.

Zusammenfassung

Unter L-Formen versteht man Bakterienformen (CWDB, Cell Wall Deficient Bacteria), die keine intakte Zellwand aufweisen. Obwohl die Morphologie, der Metabolismus sowie die biochemischen Charakteristika von L-Formen in der Literatur teilweise ausführlich beschrieben sind, ist bisher nichts über die molekularen Grundlagen der L-Form Entstehung und Persistenz bekannt. In dieser Arbeit konnten stabile L-Form Linien für unterschiedliche Stämme von *L. monocytogenes* etabliert werden.

Die Selektion der induzierten L-Formen erfolgte auf einem Festmedium mit Penicillin G und fötalem Kälberserum. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass fötales Kälberserum auch durch Milchserum ersetzt werden kann. Die weitere Passage der Isolate erfolgte in einem speziell entwickelten Weichagarmedium unter schrittweiser Reduktion der Antibiotikakonzentration. Schliesslich zeigten die L-Formen auch ohne Antibiotikazusatz ein stabiles Wachstum ohne zu revertieren. Induktion, Selektion und Wachstum von L-Formen wurde auch mit Milch als Kultivierungsmedium untersucht, wobei sich zeigte, dass Milch ein geeignetes Medium für *L. monocytogenes* L-Formen darstellt.

In Licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass L-Formen eine Protoplasten-ähnliche Struktur mit einer einfachen Zellmembran aufweisen und keine sichtbaren Zellwandreste besitzen. Durch immunologische Analysen konnte der Verlust der Zellwand inklusive der damit assoziierten Proteine (z. B. Internalin A) bestätigt werden, während in der Zytoplasmamembran verankerte Proteine wie z. B. Internalin B weiterhin nachweisbar waren.

Die weitere Charakterisierung der etablierten L-Formen ergab, dass diese die Fähigkeit zur Vermehrung besitzen. Das Wachstum und die Vermehrung der L-Formen wurde mittels serieller Aufnahme von Licht- und fluoreszenzmikroskopischen Bildern verfolgt. Die dabei gemachten Beobachtungen weisen auf eine alternative Vermehrungsweise hin und führten zur Postulierung eines neuen, hypothetischen Modells der L-Form Vermehrung durch eine 'Innere Abknospung' von Tochterzellen. Mit Hilfe dieses Modells liesse sich die unter dem Mikroskop beobachtete Zellwand-unabhängige Vermehrung der L-Formen erklären. Ein Vergleich der Genexpression von parentalen *L. monocytogenes* und L-Formen erfolgte mittels Makroarray-Analyse. Die

Resultate dieser vergleichenden Expressionsanalyse auf Transkriptomebene deuten auf eine deutliche Verminderung der Expression von Genen des Zellmetabolismus hin, die eine Adaption an das extrem vergrößerte Zellvolumen und Wachstumsrate darstellen könnte. Eine deutlich erhöhte Expression Zellstress-relevanter Gene war ebenfalls zu beobachten und spiegelt vermutlich die Belastung wieder, die durch den Verlust der Zellwand verursacht wird. Die durchgeführte Expressionsanalyse zeigte aber auch, dass trotz Abwesenheit einer intakten Zellwand die notwendigen Synthesegene weiterhin exprimiert werden.

Zur Beurteilung des pathogenen Potentials der L-Formen wurde die Interaktion von L-Formen mit eukaryontischen Zellen untersucht. Infektionen verschiedener eukaryontischer Zelllinien (Epithelzellen und Makrophagen) mit einer GFP-exprimierenden Variante der *L. monocytogenes* Scott A L-Formen wurden mittels Fluoreszenz-, Konfokaler- und Zeitrastermikroskopie verfolgt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die L-Formen von Makrophagen aufgenommen werden und intrazellulär persistieren, was es ihnen ermöglicht, sich der Immunabwehr des Wirts zu entziehen.

Die vorliegende Arbeit liefert einen essentiellen Beitrag zum besseren Verständnis von *L. monocytogenes* L-Formen. Die Beschreibung von L-Formen für viele bekannte Bakterienspezies in der Literatur, zusammen mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, weisen darauf hin, dass die Transformation von intakten Bakterienzellen zu zellwandlosen L-Formen eine allgemeine Überlebensstrategie der Bakterien darstellen könnte. Sie ermöglicht ihnen, sich Umweltbedingungen zu entziehen, die eine Bedrohung für konventionelle Bakterienzellen aufgrund ihrer Zellwände darstellen würden, wie beispielsweise die Anwesenheit von Antibiotika oder Bakteriophagen, oder eine Immunantwort seitens des Wirts.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass die untersuchten L-Formen von *L. monocytogenes* keine passiven, zellwandlosen Artefakte sind, die nur bei gleichzeitiger Einwirkung von Zellwand-aktiven Antibiotika darstellbar sind. Die Analyse der verschiedenen physiologischen, morphologischen und molekularbiologischen Aspekte macht deutlich, dass L-Formen nach Adaption an ihre neue Gestalt als eigenständige, zelluläre Einheiten nicht nur überlebensfähig sind, sondern auch die Fähigkeit zu Vermehrung und Wachstum besitzen und darüber hinaus unsichtbar für das Immunsystem als "heimliche Pathogene" in Wirtszellen persistieren können.