

The bacterial L-form switch: Molecular determinants and novel implications for persistence

Doctoral Thesis

Author(s):

Wohlfarth, Jan Christian

Publication date:

2021

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000552581>

DISS. ETH NO. 27933

The bacterial L-form switch: Molecular determinants and novel implications for persistence

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by
JAN CHRISTIAN WOHLFARTH

M.Sc. University Freiburg

born on 17.03.1989

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin J. Loessner

Prof. Dr. Martin Ackermann

PD Dr. Markus Schuppler

2021

Abstract

Virtually all bacteria are surrounded by a cell wall that is composed of a rigid peptidoglycan layer. Its main purpose is to protect the integrity of the cell in changing osmotic environments. However, under osmoprotective conditions many bacteria are capable to shed the sacculus and live in a wall-deficient state referred to as L-form. Remarkably, L-forms can proliferate in absence of a cell wall and do not require the normally essential protein-based division machinery. As a consequence, L-forms are completely resistant against cell wall targeting effectors such as β -lactams. In absence of such selective pressure many L-forms retain the ability to revert to the walled form. It has therefore been suggested that L-forms may play a role as transient persister cells. Despite its importance for the persistence model the genetic factors that are required for L-form reversion to the walled state are unknown and the biological implications of this phenotype remain controversial.

L. monocytogenes is a Gram-positive food-borne pathogen that has been employed as a model for investigating the molecular biology of L-forms in this laboratory for many years. For this work we largely relied on a genetic variant of *L. monocytogenes* EGD-e, termed Rev2. This strain was well-suited for our studies as it undergoes an efficient L-form switch and can be easily reverted to the walled state.

In the first manuscript we focus on the genetic determinants of L-form growth and reversion. We show that depletion of *mutS* results in a massive acceleration of L-form adaptation in *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Further we establish a whole genome sequencing (WGS) strategy, that allows tracing of emerging mutations during the L-form adaptation process. By linking these information to phenotypic characteristics of the respective L-form strain we identify several candidate mutations that may be involved in L-form growth and reversion. Importantly, we show that a frameshift mutation in *murG*, a gene that is essential for peptidoglycan synthesis, can act as a genetic switch which allows the bacterium to switch between the walled state and the wall-deficient L-form. Importantly, we demonstrate that site-specific genetic reversion to the wild-type gene results in phenotypic reversion of the bacterium to the walled state. This provides a possible explanation for many anecdotal descriptions of L-form reversion.

In the second manuscript we establish phage infection as a trigger for L-form formation. We show for Rev2 that L-forms can be induced by a wide range of different phages including A006, A118, P35, P40 (all *Siphoviridae*) and A511 (*Herelleviridae*). Phage induced L-form switching is not limited to *L. monocytogenes* but can also be observed in Gram-positive *E. faecalis* after infection with phage Efs7. Crucially, we show that the induced L-forms can revert to the walled state in absence of selective pressure. Using phage A006 and Efs7 as a model we provide detailed mechanistic insights on bacterial L-form switching and demonstrate that during infection phage-encoded endolysins act as the “transforming agent”

which induces L-form escape. Focussing on phage A006 we provide evidence that L-forms escape is possible only for non-infected cells. Further, we reveal that rhamnosylated WTAs serve as a receptor for A006 adsorption and show in a complementary approach reporter phage A006::*egfp_{cps}* fails to infect Rev2 L-forms. Together these data formally suggest that Rev2 L-form switching confers resistance against phage infection. Finally, we show for *E. faecalis*, a known uropathogen, that phage induced L-form switching occurs in human urine. Together, these data highlight L-form switching as a novel route for bacteria to evade phage infection and emphasize the potential of L-forms as environmental persisters.

Zusammenfassung

Praktisch alle Bakterien sind von einer Zellwand umgeben, die aus einer starren Peptidoglykanschicht besteht. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Integrität der Zelle in wechselnden osmotischen Umgebungen zu schützen. Unter osmoprotektiven Bedingungen sind jedoch viele Bakterien in der Lage, sich aus dem Zellwandsacculus zu befreien und in einem zellwandlosen Zustand zu leben, der als L-Form bezeichnet wird. Bemerkenswerterweise können sich L-Formen auch ohne Zellwand vermehren und benötigen die normalerweise notwendige Zellteilungsmaschinerie nicht. Infolgedessen sind die L-Formen völlig resistent gegen Zellwand angreifende Effektoren wie β -Lactame. In Abwesenheit eines solchen selektiven Drucks behalten viele L-Formen die Fähigkeit, in den natürlichen bewandeten Zustand zurückzukehren. Es wurde daher vorgeschlagen, dass L-Formen eine Rolle als transiente persistierende Zellen spielen könnten. Trotz ihrer Bedeutung für das Persistenzmodell sind die genetischen Faktoren, die für die Rückverwandlung der L-Form in den bewandeten Zustand erforderlich sind, unbekannt, und die biologischen Auswirkungen dieses Phänotyps bleiben umstritten.

L. monocytogenes ist ein Gram-positiver, durch Lebensmittel übertragener Krankheitserreger, der in unserem Labor seit vielen Jahren als Modell für die Untersuchung der Molekularbiologie der L-Formen verwendet wird. Für diese Arbeit haben wir uns weitgehend auf eine genetische Variante von *L. monocytogenes* EGD-e, genannt Rev2, gestützt. Dieser Stamm war für unsere Untersuchungen gut geeignet, da er einen effizienten L-Form-Switch durchläuft und leicht in den bewandeten Zustand zurückversetzt werden kann.

Im ersten Manuskript konzentrieren wir uns auf die genetischen Determinanten des Wachstums und der Reversion der L-Form. Wir zeigen, dass die Deletion von *mutS* zu einer massiven Beschleunigung der L-Form-Anpassung bei *L. monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* führt. Darüber hinaus etablieren wir eine Strategie zur Sequenzierung des gesamten Genoms, die es ermöglicht, die während des Anpassungsprozesses der L-Form auftretenden Mutationen zu verfolgen. Durch die Verknüpfung dieser Informationen mit den phänotypischen Merkmalen des jeweiligen L-Form-Stammes identifizieren wir mehrere Mutationskandidaten, die am Wachstum und der Reversion der L-Form beteiligt sein könnten. Insbesondere zeigen wir, dass eine Frameshift-Mutation in *murG*, einem Gen, das für die Peptidoglykansynthese essentiell ist, als genetischer Schalter fungieren kann, der es dem Bakterium ermöglicht, zwischen dem bewandeten Zustand und der unbewandeten L-Form zu wechseln. Wir konnten zeigen, dass eine ortsspezifische genetische Reversion des Wildtyp-Gens zu einer phänotypischen Reversion des Bakteriums in den bewandeten Zustand führt. Dies liefert eine mögliche Erklärung der L-Form-Reversion.

Im zweiten Manuskript weisen wir die Phageninfektion als Auslöser für die L-Form-Bildung nach. Wir zeigen für Rev2, dass L-Formen durch eine breite Palette verschiedener Phagen induziert werden können, darunter A006, A118, P35, P40 (alle *Siphoviridae*) und A511 (*Herelleviridae*). Der durch Phagen induzierte Wechsel in die L-Form ist nicht auf *L. monocytogenes* beschränkt, sondern kann auch beim Gram-positiven Bakterium *E. faecalis* nach Infektion mit dem Phagen Efs7 beobachtet werden. Zusätzlich können wir zeigen, dass die induzierten L-Formen bei fehlendem Selektionsdruck in den bewandeten Zustand zurückkehren können. Anhand des Phagen A006 und Efs7 liefern wir detaillierte Einblicke in die Mechanismen des bakteriellen L-Form-Switchings und zeigen, dass Phagen-kodierte Endolysine während der Infektion als "transformierendes Agenz" fungieren, der das Entweichen der L-Form auslöst. Am Beispiel des Phagen A006 zeigen wir, dass die L-Form nur bei nicht-infizierten Zellen entweichen kann. Darüber hinaus zeigen wir, dass rhamnosylierte WTAs als Rezeptor für die Adsorption von A006 dienen, und wir zeigen in einem ergänzenden Ansatz, dass der Reporter-Phage A006::*egfp_{cps}* keine Rev2 L-Formen infizieren kann. Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass Rev2 Bakterien durch das L-Form-Switching resistent gegen Phageninfektionen werden. Schließlich zeigen wir für *E. faecalis*, ein bekanntes Uropathogen, dass Phagen-induziertes L-Form-Switching im menschlichen Urin stattfindet. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass L-Form-Switching ein neuer Weg für Bakterien ist, sich einer Phageninfektion zu entziehen, und sie unterstreichen das Potenzial von L-Formen als persistierende Bakterien in der Umwelt.