

Diss. ETH No 19445

Interactions of *Listeria* with *Acanthamoeba*

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

DOMINIK DOYSCHER

Dipl. Biol., University of Regensburg

born August 15, 1979

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin J. Loessner, examiner

Prof. Dr. Hubert Hilbi, co-examiner

2011

Abstract

Microbial life forms and interactions between them provide key knowledge for our understanding of diseases and the transmission of pathogens from the environment to the potential hosts, with important consequences for food safety. Prime examples for microorganisms relevant to our everyday life are the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* and predatory *Acanthamoeba*: both are responsible for causing life-threatening diseases. Yet, their environmental interactions are far from fully understood. A particularly intriguing question with consequences for the food industry is the existence of an environmental host reservoir for *Listeria*. In this context, the question arose whether *Acanthamoeba* might serve as a natural reservoir for the intracellular pathogen *L. monocytogenes*, as they share the same habitat, and *Acanthamoeba* is known to host many other intracellular pathogens, such as *Chlamydia* and *Legionella*.

Despite previous reports on the survival and multiplication of *L. monocytogenes* inside of *Acanthamoeba*, more recent publications and our own studies clearly demonstrated the inability of *L. monocytogenes* to survive within *Acanthamoeba*. However, during co-incubation assays of *L. monocytogenes* with *A. castellanii* or *A. polyphaga* trophocytes, we observed an interesting mode of interplay. *Listeria* cells continuously accumulated on the outer surface of amoebae, resulting in formation of large aggregates at the posterior pole of the *Acanthamoeba* cell, the uroid. These aggregates were subsequently engulfed by the *Acanthamoeba*. The investigation of the factors enabling the formation of the bacterial aggregates revealed that the attachment is not mediated by virulence-associated factors, but mainly based on the bacteria's motility. Moreover, the formation of aggregates does neither rely on the presence of the flagella per se, nor on its glycosylation pattern. Co-culture assays using other bacterial species revealed that this phenomenon is not restricted to members of the genus *Listeria*, but seems to be a general phagocytosis mechanism of *Acanthamoeba*. Because the phenomenon could not be observed for other protozoa, it seems to be unique for *Acanthamoeba*.

All six tested *Listeria* species, as well as some other bacterial species show a growth benefit in the presence of *A. castellanii*, compared to the identical conditions in the absence of amoebae. Since *Listeria* cultures also benefit from incubation in filtered supernatants of

Acanthamoeba cultures, the beneficial factor appears to be a low molecular weight substance released from amoebae.

In summary, *Acanthamoeba* prey on motile *Listeria* by collecting them on the uroid and subsequently phagocytose them. This strategy seems similar to using a backpack on a hiking tour, carrying it around and piecewise taking food out of it for lunch. Extracellular *Listeria* are benefiting from the presence of *Acanthamoeba*, thereby growing faster, and reaching the threshold of an infectious dose earlier. These findings represent novel insights into the ecology of these important pathogens in natural ecosystems as well as in food related environments.

Zusammenfassung

Mikrobielle Lebensformen und ihre Interaktionen liefern wichtige Erkenntnisse für das Verständnis von Erkrankungen, ihrer Übertragungswege und auch für die Lebensmittelsicherheit. Exemplarische Beispiele für Mikroorganismen, die für unser alltägliches Leben von Bedeutung sind, sind die fakultativ intrazellulären Bakterien der Art *Listeria monocytogenes* und die räuberischen Acanthamoeben. Beide sind verantwortlich für verschiedene lebensbedrohliche Krankheiten. Dennoch sind ihre ökologischen Wechselwirkungen bei weitem noch nicht vollständig verstanden. Eine besonders interessante Frage mit Auswirkungen auf die Lebensmittelindustrie betrifft die mögliche Existenz eines Reservoirs für Listerien in der Umwelt. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob Acanthamoeben ein natürliches Reservoir für *L. monocytogenes* darstellen könnten, da sie den gleichen Lebensraum haben und da man von Acanthamoeben weiss, dass sie von vielen andere intrazellulären Bakterien, wie Chlamydien und Legionellen befallen werden können.

Trotz früherer Studien, die Überleben und Vermehrung von *L. monocytogenes* in Acanthamoeben beschrieben haben, können neuere Publikationen und eigene experimentelle Daten dies nicht bestätigen. Doch mittels Koinkubations-Experimenten von *L. monocytogenes* mit *A. polyphaga* und auch *A. castellanii* konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. *L. monocytogenes* Zellen sammelten sich am hinteren Zellpol der Amöbe, dem Uroid und bildeten kontinuierlich grosse Aggregate, die von der Amöbe stückweise aufgenommen werden. Die Untersuchung der Voraussetzungen für die Bildung der bakteriellen Aggregate ergab, dass diese nicht durch Virulenz-assoziierte Gene vermittelt wird, sondern vor allem von der Beweglichkeit der Bakterien abhängt. Die Aggregatbildung ist auch unabhängig vom Vorhandensein der Geisseln an sich oder von deren Glykosylierungsmuster. Kokultur-Experimente mit anderen Bakterienarten ergaben, dass sich dieses Phänomen nicht auf Mitglieder der Gattung *Listeria* beschränkt, sondern ein genereller Phagozytosemechanismus von Acanthamoeben zu sein scheint. Für andere Protozoen konnte dieses Phänomen allerdings nicht beobachtet werden.

Es stellte sich ausserdem heraus, dass die sechs getesteten Listerienarten und einige andere Bakterien beim Wachstum von der Gegenwart der Amöben profitierten. Da Listerien diesen

Wachstumsvorteil auch bei einer Inkubation in einem filtrierten Acanthamöbenüberstand zeigen, könnten von den Amöben ins umgebende Medium ausgeschiedene Nährstoffe der vorteilhafte Faktor sein.

Zusammenfassend gesagt: Acanthamöben fressen und verdauen bewegliche Listerien. Dies tun sie mit einer Strategie, die an eine Rucksacktour erinnert: Auf der rückwärtigen Seite der Amöbe wird das "Bakterienbündel" geschnürt, mit sich getragen und stückweise davon phagozytiert. Extrazelluläre Listerien hingegen profitieren von den Acanthamöben, wachsen deshalb schneller und erreichen auch eher die kritische Zellzahl um Infektionen auszulösen. Diese Ergebnisse ermöglichen neue Einblicke in die Bedeutung dieser Organismen, sowohl im natürlichen Ökosystem als auch in lebensmittelrelevanter Umgebung.