



Fluorescerande *Chlamydia trachomatis*-mCherry för analys av nya antimikrobiella substanser

Jalal Ali

Vårterminen 2016
Examensarbete, 15 hp
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp



Institutionen för Klinisk mikrobiologi
Biomedicinsk laboratorievetenskap
Biomedicinska analytikerprogrammet
Examensarbete, 15 hp
Kursansvarige lärare: Ylva Hedberg Fransson ylva.hedberg.fransson@umu.se

Fluorescent *Chlamydia trachomatis* mCherry for Analysis of New Antimicrobial Compounds

Handledare

Åsa Gylfe, Inst. för Klinisk mikrobiologi, Umeå universitet

Jim Silver, Inst för Molekylärbiologi, Umeå universitet.

Läroproponent: Maria Hedberg

Examinator: Mari Norgren

Datum för godkännande: 2016 - 06 - 26

Abstrakt

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) är den vanligaste orsaken till sexuellt överförda infektioner och till ögoninfektionen trakom. Lymfgranuloma venerum (LGV) omfattar de invasiva serovarerna L1, L2 och L3, vilka kan sprida sig från genitalia till det lymfatiska systemet. Klamydia har en unik livscykel som kräver levande celler för sin energiförsörjning och förökning. Bakterien förekommer i två stadier, dels som den extracellulära infektiösa formen elementarkroppar (EB) och dels som den intracellulära icke-infektiösa formen retikulärkroppar (RB). I cellkultur tillväxer *Chlamydia* mellan ett och tre dygn beroende på art och vid slutet av tillväxtfasen spricker värdcellen och tusentals nya infektiösa EB frigörs från inklusionen. Substanser som försvagar den infektiösa förmågan hos nybildade EB och har minimala cytotoxiska effekter på värdcellen är 2-pyridonamiderna. Den inhiberande effekten av 2-pyridonamider på *C. trachomatis* testades i cellkultur och immunofluorescens användes för att visualisera klamydiainklusionerna. En genmodifierad *C. trachomatis* uttrycker det fluorescerande proteinet mCherry och lyser rött i mikroskop, vilket innebär att fluorescerande antikroppar kan bli överflödiga för detektion av bakterien. Syftet med studien var att avgöra om *Chlamydia*-mCherry var lika känslig för 2-pyridonamider som *Chlamydia* av vildtyp. Konklusionen blev att mCherry var ett värdefullt analysverktyg, då 2-pyridonamiderna gav samma effekt på vildtypen som på *Chlamydia*-mCherry.

Nyckelord

Chlamydia trachomatis, elementarkroppar, retikulärkroppar, vildtyp, mCherry, HeLa-celler, 2-pyridon-amider

Introduktion

Klamydia är en obligat intracellulär, Gram-negativ bakterie. *Chlamydia trachomatis* är den vanligaste orsaken till sexuellt överförda infektioner. Det finns över 15 serovarer inom arten *C. trachomatis*. Serovarererna A, B och C orsakar ögonsjukdomen trakom, medan serovarererna D-K orsakar genitala infektioner. Serovarererna L1, L2 och L3 orsakar sjukdomen lymfogranuloma venerum (LGV) som också är en sexuellt överförd infektion, vilken kan sprida sig lokalt till lymfkörtlar och det lymfatiska systemet (1). Sexuellt överförda klamydiainfektioner är vanligast hos personer i åldern 15 till 24 år och diagnosticeras oftare hos kvinnor än hos män. Upp till 70 % av kvinnorna och 50 % av männen saknar symtom i ett tidigt stadium vid klamydiainfektioner och därmed kan icke-diagnostiserade infektioner kvarstå och överföras till sexualpartner. Obehandlade klamydiainfektioner kan hos kvinnor vandra upp i övre de könsdelarna (ca 10-15 % av fallen), vilket ofta resulterar i salpingit med kronisk smärta och infertilitet som följd (2).

Klamydia har en unik livscykel som kräver levande celler för sin energiförsörjning och förökning. Bakterien förekommer i två stadier, dels som extracellulära infektiösa elementarkroppar (EB) och dels som intracellulära icke-infektiösa retikulärkroppar (RB) (3). Vid endocytosen innesluts EB i en vakuol (inklusion) och differentieras sedan till RB (4). Syntes av RNA och DNA sker och RB delar sig. De nya RB omvandlas senare till infektiösa EB. *C. trachomatis* använder Typ III sekretionssystem (TTS) för att leverera bakteriella effektorproteiner i värdcellens cytosol under den intracellulära infektionen (4). *C. trachomatis* behandlas effektivt med bredspektrumantibiotika, men dessa preparat kan störa kroppens normalflorabakterier, vilket kan resultera i opportunistiska infektioner som följd (5, 6). *C. trachomatis* får sina näringsämnen från värdcellen och använder cellens glukos-6-fosfat (G6-P) som kolkälla. De antimikrobiella substanserna 2-pyridonamider inverkar på hur G6-P transporteras in i klamydiainklusionen, men bakterier i normalfloran påverkas inte och därför kan det vara en effektiv strategi för att selektivt angripa *C. trachomatis* utan att påverka normalflorabakterier (7). Substanserna saknar även cytotoxiska effekter på värdcellen (7). Två-pyridonamiderna AC136, KSK120 och KSK213 påverkar klamydias livscykel så att nybildade EB inte blir infektiösa. För att kunna mäta effekten av 2-pyridonamider behöver man alltså testa hur infektiösa nybildade EB är. Det görs genom att återinfektera nya celler med inaktiverade EB och efter immunfärgning kvantifiera antalet infektiösa enheter (IFU) i mikroskop. Immunfärgningen är både tids- och arbetskrävande och utförs genom att bakterierna fixeras med metanol och därefter inkuberas med primära och sekundära antikroppar för detektion av klamydiainklusioner (7). Med hjälp av fluorescerande klamydiaceller skulle immunfärgningen bli överflödigt eftersom inklusionerna då skulle kunna detekteras direkt i mikroskop utan föregående behandling. *C. trachomatis* kan transformeras med vektorer som vid antibiotikaselektion ersätter *Chlamydia*s kryptiska plasmid (8). Vektorn pBOMB-R-MCI uttrycker ett fluorescerande proteinet mCherry, som gör att bakterierna lätt kan detekteras tack vare sin röda fluorescens (8, 9).

Syftet med studien var att utvärdera om *C. trachomatis* serovar L2 av vildtyp och samma stam försedd med plasmiden pBOMB4R-MCI som uttrycker mCherry-proteinet, påverkades av 2-pyridonamider i överensstämmande omfattning.

Material och metoder

Bakterier, celler och odlingsbetingelser

I denna studie har *C. trachomatis* L2 454/Bu (ATCC VR-902B) vildtyp med och utan plasmiden pBOMB4R-MCI_{mCherry}, benämns som mCherry, använts (8). HeLa-celler (HeLa229, ATCC CCL-2.1) odlades i cellodlingsmediet RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO USA) med tillsats av 10 % kalvserum (Sigma) och 2 mM L-glutamine. HeLa-cellerna inkuberades i 5 % CO₂ vid 37 °C under 44-48 tim. Tillväxten av HeLa-celler kontrollerades två gånger under tillväxtperioden för att visuellt bedöma deras tillstånd, morfologi, konfluens och cellodlingsmediets näringsinnehåll. Den visuella bedömningen gjordes med hjälp av mikroskop (Nikon Eclipse TS100, Köpenhamn, Danmark).

Antimikrobiella substanser

De antimikrobiella 2-pyridonamiderna AC136 (F. Almqvist, Kemiska institutionen, Umeå universitet) (0,5 och 2,0 µM), KSK120 (0,5 och 1,0 µM) och KSK213 (0,1 och 0,5 µM) (8) har använts för att inhibera tillväxten av *C. trachomatis* med ändamålet att nybildade EB inte ska bli infektiösa. Olika koncentrationer har använts för att kontrollera doseringseffekten av substanserna i *C. trachomatis* (8).

Beredning av *C. trachomatis*-suspensioner

En suspension av *C. trachomatis* vildtyp bereddes genom att 5 µL (1*10⁸/ml) IFU/mL tillsattes i 6,5 mL Hanks Balanced Salt Solution (HBBS, Gibco/Invitrogen, MA, USA), vilket gav slutkoncentrationen 1×10⁵ IFU/mL. Motsvarande suspension bereddes av mCherry med slutkoncentration 1×10⁶ IFU/mL. Beredningarna användes för att infektera HeLa-celler.

Detektion av *C. trachomatis* mCherry med fluorescensmikroskopi

Ett försök utfördes med *C. trachomatis* mCherry för att fotografera de rödfärgade klamydiainklusjonerna i fluorescensmikroskop (Nikon Eclipse C1 Plus Scanning Laser Confocal Microscope, Nikon, Köpenhamn, Danmark) och parallellt jämfördes signalen mellan det fluorescerande röda proteinet (9) och klamydiainklusjoner som detekterades med hjälp av anti-EB-antikropp med grön fluorescens, i konfokalmikroskop (Nikon, Köpenhamn, Danmark).

Infektion av HeLa-celler med *C. trachomatis* och inhibition med 2-pyridonamider

I en cellodlingplatta med 96 brunnar (NUNC Life Science, Thermo Fisher, MA, USA) såddes 20 000 HeLa celler/brunn. Plattan inkuberades över natt och dagen efter infekterades cellerna med 3000 infektiösa enheter (IFU)/brunn av vildtypen, respektive mCherry. Detta utfördes genom att 30 µL av klamydiasuspensionerna *C. trachomatis* vildtyp och mCherry överfördes till 16 brunnar vardera. Plattan inkuberades under 60 min 5 % CO₂ vid 37 °C för att bakterierna skulle hinna infektera HeLa-cellerna, varpå vätskan avlägsnades och ersattes med 100 µL RPMI-medium innehållande 2-pyridonamider i tidigare angivna koncentrationer. Detta utfördes genom att varje koncentration från varje substans överfördes till två infekterade brunnar med respektive bakterie. Åtta brunnar innehöll positiv kontroll. Plattan inkuberades därefter i 44-48 tim.

Infektion av HeLa-celler med *C. trachomatis* EB som försvagats med 2-pyridonamider

Cellodlingsmediet sögs bort från plattan och de infekterade HeLa-cellerna lyserades med 80 µL kallt milliQ-vatten för att frigöra nybildade EB som inhiberats av 2-pyridonamider. Därefter tillsattes 20 µL 0,5 % SPG-buffer (0,25 M sackaros, 10 mM natriumfosfat, 5 mM L-glutaminsyra) för att normalisera det osmotiska trycket. Hundra µL HBSS sattes till de frigjorda EB och en tiofaldig spädningsserie gjordes i HBSS. Därefter infekterades nya HeLa-celler med 30 µL från varje spädningssteg av de 2-pyridonamidbehandlade bakterierna för att kontrollera förmågan hos EB att infektera nya celler (8). Plattan inkuberades i en tim och därefter sögs lösningen bort och ersattes med 100 µL RPMI-medium i varje brunn. Plattan inkuberades i 44-48.

Immunfärgning av klamydiainklusioner

De infekterade cellerna fixerades med 5 % metanol i fem minuter. Cellerna tvättades med 1 % 0,01 M fosfatbuffert, pH7,4 (PBS). PBS hälldes av och 50 µL blockningsbuffert (2 % BSA, 0,025 % Tween20) tillsattes i varje brunn och plattan inkuberades under en tim i rumstemperatur (RT). Därefter tillsattes 50 µL primär-antikroppslösning (0,1 % primär kanin-anti-klamydia-antikropp i blockningsbuffert) i varje brunn och plattan inkuberades under en timme i RT. Plattan tvättades därefter tre gånger med PBS. Inklusionerna färgades med 50 µL 0,1 % sekundär-antikroppslösning (Donkey antirabbit FITC-märkt antikropp, Jackson ImmunResearch, WG, USA) och 0,1 % 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) i blockningsbuffert. DAPI färgade alla cellkärnor blå. Plattan inkuberades med sekundärantikroppslösning under en tim i mörker i RT och därefter tvättades den tre gånger med PBS.

Konfokalmikroskopi av HeLa-celler infekterade med *C. trachomatis* mCherry

HeLa-celler såddes ut med en täthet av 100 000 celler/brunn på ett 10 mm täckglas i en 24-brunnars cellodlingsplatta (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). HeLa-cellerna infekterades med 3000 IFU av *C. trachomatis* mCherry suspenderade i HBSS. Plattan inkuberades i 44-48 tim. De infekterade cellerna fixerades, tvättades och immunfärgades som tidigare beskrivits. Därefter monterades täckglaset i anti-fade monteringsmedium (DAKO, Köpenhamn, Danmark) på ett objektglas och avlästes med hjälp konfokalmikroskop (Nikon Eclipse C1 Plus Scanning Laser Confocal Microscope), med 60x objektiv och kamera (Nikon C1-SHY, Nikon, Köpenhamn, Danmark).

Mikroskopi av klamydiainklusioner

De färgade cellerna analyserades med ett automatiskt mikroskop Arrayscan (ArrayScan VTI HCS, Thermo Scientific). Data presenterades som det relativa antalet detekterade IFU hos *C. trachomatis* som behandlats med 2-pyridonamider jämfört med den positiva kontrollen som utgjordes av HeLa-celler infekterade med obehandlade bakterier.

Statistik

Students t-test användes för att kontrollera om det fanns någon skillnad mellan vildtypen och mCherry beträffande känslighet för 2-pyridonamiderna med signifikansnivå $p < 0,05$. Statistiska analyser gjordes i Excel.

Etiska överväganden

Projektet kräver inget etiskt tillstånd eftersom det inte utgår från patientmaterial och involverar inga försökspersoner eller försöksdjur.

Resultat

***C. trachomatis* mCherry inklusioner är jämförbara med anti-EB detekterade inklusioner vid fluorescensmikroskopi analys**

C. trachomatis mCherry uttryckte det rödfluorescerande proteinet enligt förväntan. Resultatet visade att mCherry lokaliserades till klamydiainklusionerna utan ospecifik spridning i cellen och signalen var jämförbar med den hos inklusioner som detekterades med hjälp av anti-EB-antikropp.

Konfokalmikroskopi av mCherry

Resultatet av konfokalmikroskopi visade att alla cellkärnor och klamydiainklusioner färgades blå vid immunfärgning med DAPI. *C. trachomatis* mCherry uppvisade rödfärgade klamydiainklusioner. Immunfärgning av *Chlamydia* gjordes med en sekundärantikropp med grön fluorescens (FITC). Kombinationsbilden av DAPI, mCherry-proteiner samt primära antikroppar visade att alla fluoroforer lokaliserade till klamydiainklusionerna (Fig. 1).

Andel infektiösa *Chlamydia* efter 2-pyridonamidbehandling

Vid behandlingen med 2-pyridonamiden AC136 (0,5 μM) bildades 11,2 % nya infektiösa vildtyps *Chlamydia* och 12,7 % nya EB mCherry, jämfört med den obehandlade positiva kontrollen. När koncentrationen av AC136 ökades till 2 μM minskade andelen till 0,6 % för vildtypen och 0,2 % för mCherry. KSK120 (0,5 μM) gav 5,3 % infektiös vildtyps *Chlamydia* och 8,5 % mCherry *Chlamydia* och när den dubbla koncentrationen (1 μM) testades blev resultatet 2,7 % respektive 1,5 %. Av substansen KSK213 testades koncentrationerna 0,1 μM och 0,5 μM , vilket resulterade i 4,3 % EB av vildtyp och 10,9 % mCherry, respektive 0,7 % EB av vildtyp och 0,8 % av mCherry (Fig. 2).

T-test visade inte på någon signifikant skillnad i känslighet för 2-pyridonamider mellan *C. trachomatis* L2 och *C. trachomatis* mCherry, oavsett preparat och koncentration ($p > 0,05$).

Diskussion

Lymfogranuloma venereum (LGV) är en könssjukdom som är vanligast i Afrika och Asien samt central- och Sydamerika. Sjukdomen är ovanlig i Sverige och ses framförallt hos män som har sex med män (MSM). Enligt smittskyddslagen (2004:168) klassas LGV som en allmänfarlig sjukdom och alla inträffade fall ska anmälas till smittskyddsläkaren i landstinget samt till folkhälsomyndigheten. Klamydia-infektioner är smittspårningspliktiga och därför är kontaktspårning obligatorisk för att hitta andra smittade (10). Kroppens normalflorabakterier kan störas av den behandling som vanligtvis görs idag vid *C. trachomatis* infektioner med bredspektrumantibiotika, vilket kan resultera i opportunistiska infektioner som följd (5,6). Antibiotikaresistens av klinisk betydelse hos *C. trachomatis* har inte beskrivits och bakterien är känslig för flera antibiotika, t ex makrolider, tetracykliner och amoxicillin. Vid *in vitro* försök har man visat att det går att selektera fram resistentastammar mot bl a kinoloner (12). Fortsatt uppmärksamhet på att klamydiainfektioner behandlas med korrekt indikation är viktigt för att undvika resistensutveckling hos *C. trachomatis*. *C. trachomatis* är en intracellulär bakterie och den kräver vissa näringsämnen, t ex G-6-P, som upptas från värdcellen. De nya antimikrobiella substanserna 2-pyridonamider inverkar på transporten av G-6-P från värdcellen in i klamydiainklusionen. Två-pyridonamiderna påverkar därför inte normalflorabakterier eftersom dessa inte lever intracellulärt (7, 8). För att kunna kvantifiera antalet inaktiverade IFU med 2-pyridonamider i mikroskop använder man immunfärgning (8). Immunfärgningen är tids- och arbetskrävande eftersom inkuberingen av bakterierna med primära och sekundära antikroppar tar lång tid och antikropparna är dyra. Det fluorescerande proteinet hos *C. trachomatis* mCherry kan detekteras direkt i mikroskop, vilket innebär att immunfärgningen blir överflödigt och genom detta sparas både tid och pengar.

I tidigare studier har man endast undersökt den fluorescerande egenskapen hos *C. trachomatis* mCherry (11) och i det fall man har testat 2-pyridonamider i olika koncentrationer för att undersöka inhiberingseffekten hos dessa substanser i *C. trachomatis* har man bara använt sig av vildtyps *Chlamydia* (8). I vår studie presenteras för första gången ett försök att jämföra effekterna av 2-pyridonamider på den modifierade klamydian genom att samtidigt kontrollera hur vildtyps *Chlamydia* påverkas av substanserna. Man vill undersöka om den modifierade klamydian har gemensamma egenskaper med vildtypsklamydia för att, om möjligt, i fortsättningen använda *Chlamydia* mCherry i forskningen.

I denna studie varierade mängden nybildade infektiösa EB mellan behandlade vildtyps- *Chlamydia* och *Chlamydia* mCherry och detta kan ha berott att uppskattningen som gjordes av antalet vidhäftande HeLa-celler i odlingsbrunnarna inte var helt korrekt. Cellernas täthet varierade vid varje försök med mellan 60 och 80 % och det ledde till variation av antalet infekterade celler vid varje försök, vilket i sin tur kan resultera i variation av klamydiatillväxten. Upprepade försök och upptining av samma frysrör med bakterier påverkade troligen bakteriernas viabilitet och gav därmed en variation av antalet infekterade celler. Det skulle ha varit bra om ett nytt fryst rör med bakterier som inte varit tinade användes vid varje försök. Upprepade upptiningar av bakterierna skulle ha undvikits för ett mer tillförlitligt resultat. T-test användes för att upptäcka en eventuell skillnad i den infektiösa förmågan

mellan nybildade vildtyps *Chlamydia* och *Chlamydia* mCherry, som behandlats med 2-pyridonamider, men ingen signifikant skillnad kunde observeras.

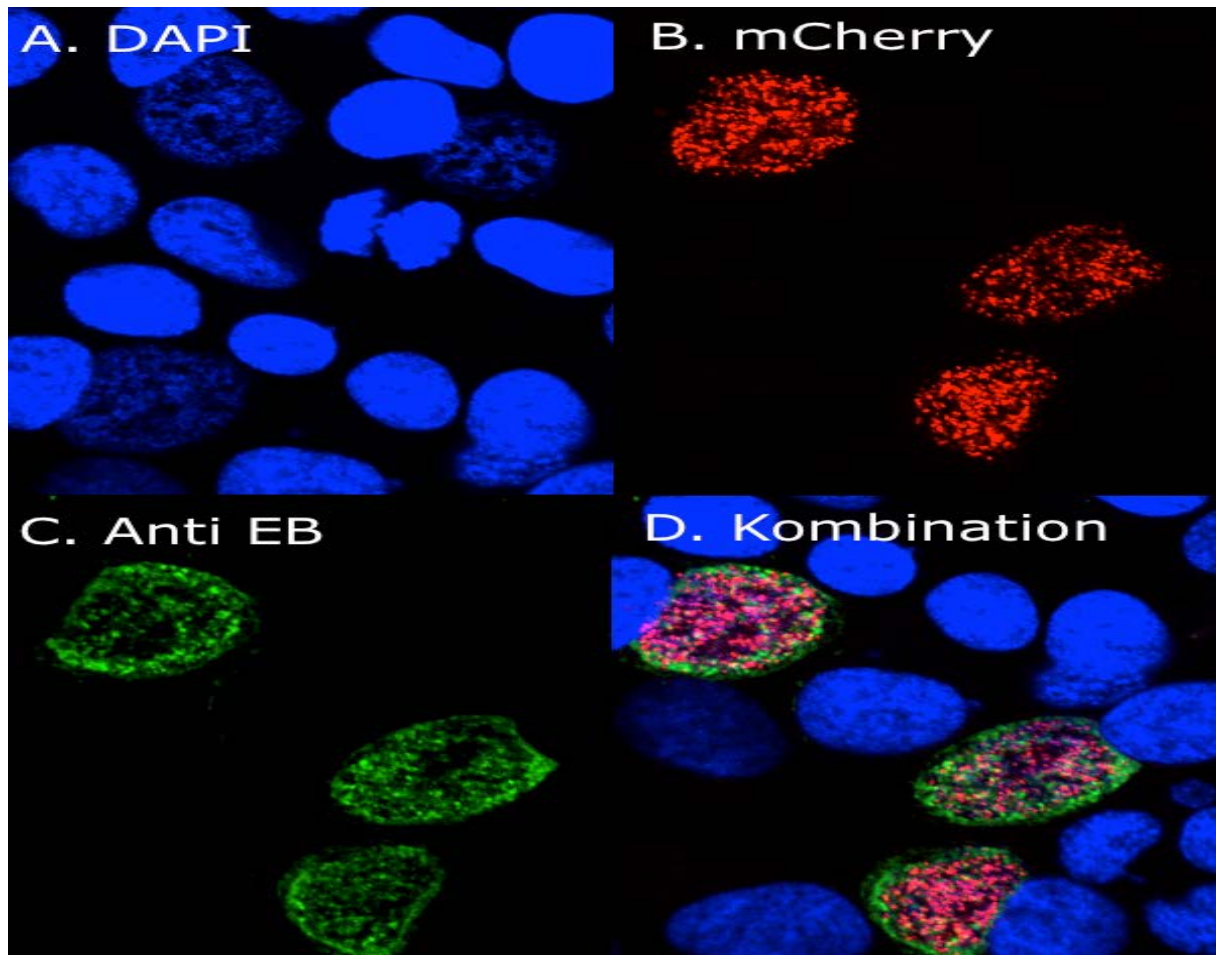
Konklusionen var att *C. trachomatis* med plasmiden pBOMB4R-MCI är lika känslig för 2-pyridonamider som vildtypsklamydia och att den röda fluorescensen går att detektera, vilket gör stammen till ett värdefullt verktyg vid testning av 2-pyridonamider och sannolikt även av andra antimikrobiella substanser. *Chlamydia* mCherry-infekterade celler behöver endast färgas med DAPI och genom detta sparas tid vid undersökningarna.

Tack tillägnas

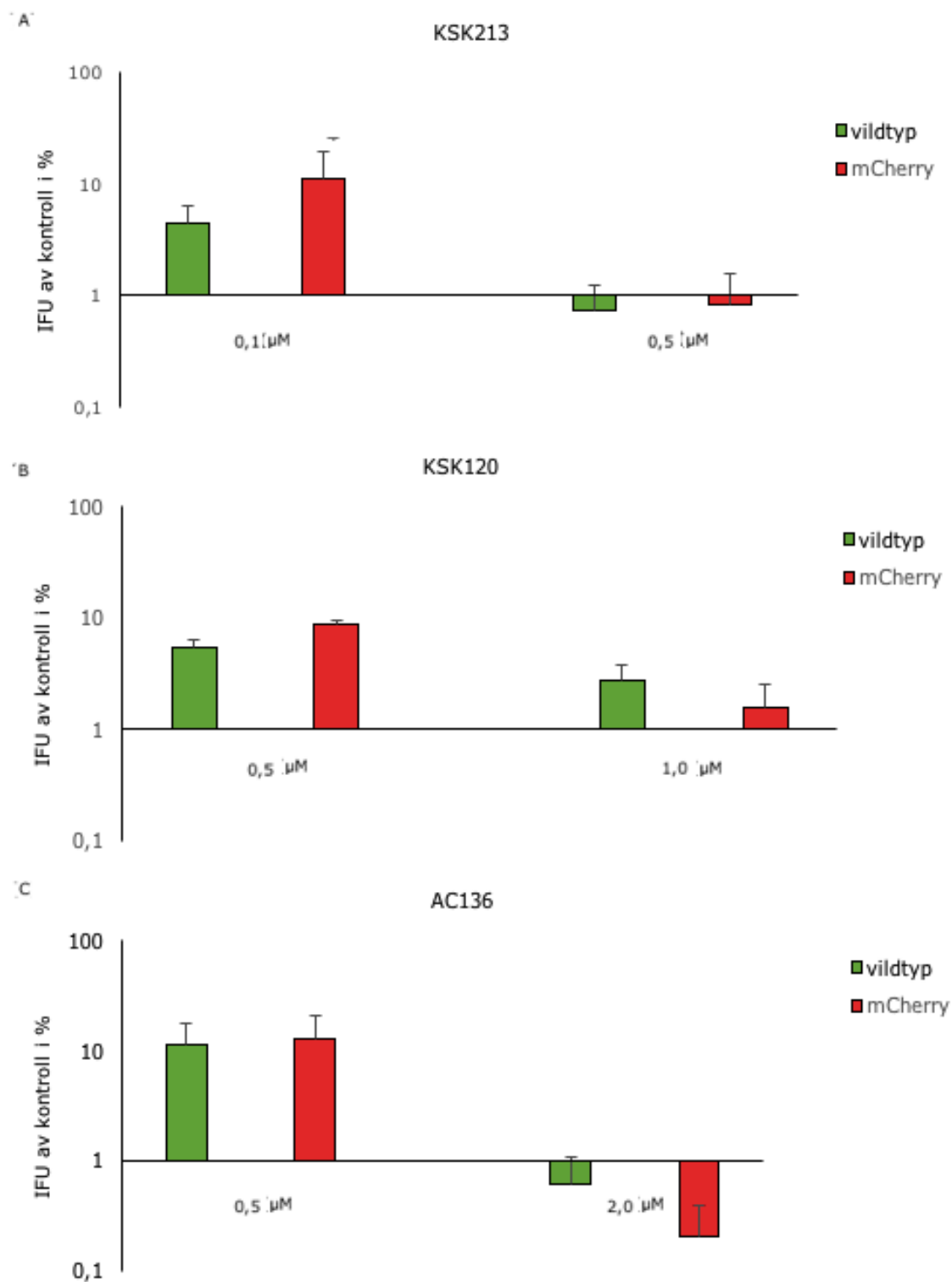
Jag vill tacka min huvudhandledaren Åsa Gylfe. Min handledare Jim Silver och Waal Bahnan för bra handledning. Ingela Nilsson och Martjn Van den Berg för teknisk assistans med de laborativa momenten i denna studie.

Referenser

1. Mueller KE, Wolf K, Fields KA. Gene deletion by fluorescence-reported allelic exchange mutagenesis in *Chlamydia trachomatis*. *mBio*. 2016; 7:e01817-01815. Doi: 10.1128/mBio.01817-01815.
2. Matteelli A, Capelli M, Sulis G, Toninelli G, Carvalho A, Pecorelli S, Caruso A, Bonfanti C, Gargiulo F, Donato F. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection in adolescents in Northern Italy: an observational school-based study. *BMC Public Health*. 2016; 16:200-212. doi:10.1186/s12889-016-2839-x.
3. Mital J, Miller NJ, Fischer ER, Hackstadt T. Specific chlamydial inclusion membrane proteins associate with active Src family kinases in microdomains that interact with the host microtubule network. *Cell Microbiol*. 2010; 19: 1235-1249.
4. Olive AJ, Haff MG, Emanuele MJ, Sack LM, Barker JR, Elledge SJ, Starnbach MN. *Chlamydia trachomatis*-induced alterations in the host cell proteome are required for intracellular growth. *Cell Host Microbe*. 2014; 15(1):113-124. doi: 10.1016/j.chom.2013.12.009.
5. Greene W, Xiao Y, Huang Y, McClarty G, Zhong G. *Chlamydia*-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis. *Infect Immun*. 2004; 72:451-460.
6. Stamm WE. *Chlamydia trachomatis* infections: progress and problems. *J Infect Dis*. 1999; 179 Suppl 2:S380-S383. Doi: 10.1086/513844.
7. Engström P, Krishnan KS, Ngyuen BD, Chorell E, Normark J, Silver J, Bastidas RJ, Welch MD, Hultgren SJ, Wolf-Watz H, Valdivia RH, Almquist F, Bergström S. A 2-pyridone-amide inhibitor targets the glucose metabolism pathway of *Chlamydia trachomatis*. *M Bio*. 2014; 6:e02304-e02314. Doi:10.1128/mBio.02304-02314.
8. Good J, Silver J, Nunez-Otero C, Bahnan W, Krishnan K, Salin O, Engström P, Svensson R, Artursson P, Gylfe Å, Bergström S, Almquist F. Thiazolino 2-pyridone amide inhibitors of *Chlamydia trachomatis* infectivity. *J Med Chem*. 2016; 59:2094-2108 doi 10.1021/acs.jmedchem.5b01759.
9. Bauler L, Ted H. Expression and targeting of secreted proteins from *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol*. 2014; 196:1325-1334.
10. Sjukdomsinformation om *lymfogranuloma venereum* (LGV)
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/smittsamma-sjukdomar/lymfogranuloma-venereum-lgv/> 2016-06-19
11. Agaisse H, Derre I. A *C. trachomatis* cloning vector and the generation of *C. trachomatis* strains expressing fluorescent proteins under the control of a *C. trachomatis* promoter. *PloS one*. 2013; 8:e57090. doi: 10.1371/journal.pone.0057090.
12. Wang SA, Papp JR, Stamm WE, Peeling RW, Martin DH, Holmes KK. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*: a meeting report. *J Infect Dis*. 2005; 191:917-923.



Figur 1. Mikroskopbild av immunfärgning vid x600 förstoring. DAPI (A), Fluorescerande mCherry-inklusioner (B), inklusioner detekterade med anti-EB-antikroppar (C), kombination av a, b och c (D).



Figur 2. Andel infektiösa EB hos vildtyps-*Chlamydia* och mCherry-*Chlamydia* efter behandling med KSK213 (A), KSK120 (B) och AC136 (C).