



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas

C I B I C I

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas

Caracterización del fenómeno de persistencia en el patógeno humano Chlamydia trachomatis

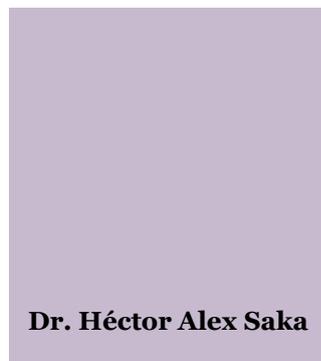
Por: Lic. María Emilia Panzetta
Director: Prof. Dr. Héctor Alex Saka

Córdoba, 2019

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología – CONICET

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Director de Tesis:



Comisión evaluadora:



Este trabajo de Tesis fue realizado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI- CONICET) gracias al apoyo económico de CONICET, FONCyT, SECyT-UNC, PEW y la Fundación Bunge&Born.

“It is paradoxical, yet true, to say, that the more we know, the more ignorant we become in the absolute sense, for it is only through enlightenment that we become conscious of our limitations. Precisely one of the most gratifying results of intellectual evolution is the continuous opening up of new and greater prospects.”

Nikola Tesla (1856 - 1943)

“Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science: désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles.”

Marie Curie (1867 - 1934)

AGRADECIMIENTOS

En el camino que culmina en la defensa de esta tesis no estuve sola. Por el contrario, fueron muchas las personas responsables de que el esfuerzo y el trabajo de estos últimos 5 años dieran frutos. Es hermoso mirar hacia atrás y acordarse los momentos compartidos, las risas y alegrías, pero también los momentos difíciles donde parecía que este día no iba a llegar nunca, y recordar a todos los que me apoyaron y me ayudaron a seguir.

Agradezco a mi director, Alex, que me aceptó para formar parte de su laboratorio “naciente”, me dio un lugar para realizar este trabajo de tesis, me enseñó a trabajar con *Chlamydia*, y me permitió formarme profesionalmente y crecer bajo su dirección. Hago extensivo el agradecimiento a los demás directores del laboratorio 119-120 por las recomendaciones en los seminarios y por los innumerables “préstamos” que hicieron posible este trabajo. Agradezco también a los investigadores que conforman el CIBICI, que siempre han estado dispuestos a ayudar, en especial Al Dr. Gustavo Chiabrandó, la Dra. Susana Genti y la Dra. Belkys Maletto con quienes hemos colaborado en distintos proyectos.

Agradezco a los integrantes de la comisión de tesis, Dra. Andrea Smania, Dra. Cecilia Cuffini y Dr. José L. Bocco, por el apoyo que me brindaron en cada una de las reuniones de tesis y por el tiempo que han dedicado a evaluar este trabajo. Agradezco también al Dr. Fernando Soncini por haber aceptado ser el evaluador externo y aportar su mirada crítica sobre esta tesis.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, transité esta tesis sin compañeros que compartieran el mismo proyecto, pero rodeada de personas que estuvieron dispuestas a darme una mano a lo largo del camino y de escucharme cuando lo necesitaba. Sin dudas que hubiera sido mucho más duro sin ustedes. Muchas gracias a todos los que pasaron por el laboratorio en estos años: Ana Lía, Danilo, Nubia, Falcón, Nadia, Mire, Jesi, Marian, Lau R., Magui, Lu K., Andre, Anita, Lu S., Pablo, Euge, Ruso, Ale, Flor P., Flor V., Cande, Lau G., Cin...a todos por sus consejos, préstamos y por cada pinta que compartimos. Gracias Lucy R., además de mi compañera de mesada fuiste como la hermana mayor que no tengo, la que “siempre sabe” que hay que hacer. Gracias a Paulo por todo lo que me enseñaste y por esos burakos interminables. Gracias también a mis compañeritos “temporales” Ignacio, Eugenia, María José y Alan por el tiempo que compartimos. Gracias a todos los integrantes del CIBICI, que de una u otra manera, han sido parte de este camino. Agradezco en especial a Coni y Maxi, mis compañeros y amigos desde la facu.

Gracias a Jesi, Dani, Vicky, y Vero con quienes compartimos experimentos en distintos proyectos. A Coti y Fede por ayudarme con los anticuerpos.

Gracias a todos los integrantes del “Valdivia lab”. Muchísimas gracias a Raphael por abrirme las puertas de su laboratorio. ¡Compartir esos meses con ustedes fue increíble! La pasión con la que trabajan es contagiosa. Saber que las dificultades del trabajo con *Chlamydia* eran compartidas por todos fue un empujón para “seguir persistiendo”. ¡Gracias Anusha, Robert, Lee, Victor, Sena, Lauren, Per, Michi! Especialmente gracias a Robert por tanta paciencia, por cada café con el que discutimos los resultados. Muchas gracias a “la vecina” Danielle, por tanto cariño y por los hermosos momentos que compartimos.

Gracias a los mendocinos. Gracias Marian por todo lo que nos reímos juntos, gracias Agus por ayudarnos con los experimentos y por recibirme en tu casa, gracias a Teresa por aceptar colaborar con nosotros.

Gracias a Gaby, Lauri G., Ale, Pili, Carlos, Ceci, Vicky J., por todo el “soporte técnico” en este tiempo. También a Adri, Martin, y Ceci por su ayuda administrativa desde la secretaría y a Betina y demás integrantes de posgrado por aceptar la burocracia.

Gracias a los que me acompañaron en mis primeros pasos en el mundo de la investigación, por contagiarme su entusiasmo y dedicación. Ellos también son partícipes de esta historia. Gracias a Guille, Tomás y Teresa con quienes comencé a trabajar en Orgánica. También gracias a José Barra por enseñarme “a hacer mutantes” y, más allá de eso, por todo el apoyo (científico y moral) que recibí trabajando en su laboratorio, donde hice mi tesis de grado.

No me quiero olvidar de mis alumnos, gracias por permitirme compartir con ustedes el desafío de aprender.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas (UNC), en particular al Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI, por brindarme el espacio físico donde llevar a cabo mi tesis. Gracias también al apoyo económico de CONICET, FONCyT, SECyT-UNC, PEW y la Fundación Bunge&Born, sin el cual no habría sido posible concretar este trabajo.

Agradezco a mis amigas, los pilares que siempre me sostienen. Solo ustedes saben cuántas veces me han escuchado y aguantado hablar de los miles de problemas que iban surgiendo...no tengo palabras para decir cuánto las quiero y necesito. A mis amigas del cole; Mily, Vale, Co R., Cande, Mari, Sofi, Coti H.; y a mis amigas de la vida; Nati, Marce, Ale, Chechu, Vicky, Sofi, Ro; gracias, ¡las adoro!

A toda mi familia. Gracias mamá, por estar siempre atrás mío y sostenerme si me caigo, siempre fuiste un gran modelo a seguir. Gracias papá por apoyarme y ayudarme. Gracias Pili por

todas esas clases que practiqué con vos, mi alumna desde pequeña, gracias Solcito por tu ternura, gracias Juampi, porque a tu manera, sé que te alegrás conmigo y me hacés reír. Gracias a mis abuelos Clides, Gloria, Pedro y Pelu por apoyarme siempre y un beso al cielo para mi abuelo Emilio y mi tío Javi, mis angelitos. En especial gracias abuelo Pedro y tía Graciela, por contagiarme su amor a la ciencia. Gracias a mis madrinas, Loli y Lili, y mi padrino Fernando por todo su amor. A mis cuñado/as, y a Carmen, gracias por estar.

Por último, pero no menos importante, gracias a Nico, primero porque fuiste un compañero de trabajo inigualable y me ayudaste siempre a lo largo de estos años en el laboratorio... y segundo por ser mi compañero en la vida, cada día, afrontando los obstáculos juntos y con mucho amor. ¡Y no me olvido, gracias por toda tu paciencia!

Sin dudas han sido muchísimas las personas que me ayudaron a llegar a la meta. Perdón si me he olvidado de mencionar a alguien y MUCHAS GRACIAS A TODOS por enseñarme que “la persistencia es el aliento de los sueños”.

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
Introducción a la microbiología de <i>Chlamydia</i>	9
<i>Chlamydia trachomatis</i> a través del tiempo: reseña histórica.....	9
<i>C. trachomatis</i> como patógeno humano	11
<i>Infecciones causadas por las serovariedades A-C</i>	11
<i>Infecciones causadas por las serovariedades D-K</i>	13
<i>Infecciones causadas por las serovariedades L1-3</i>	15
<i>Epidemiología en Argentina</i>	15
Ciclo de desarrollo	16
Persistencia	18
<i>Persistencia como respuesta al estrés</i>	18
<i>Diversos estímulos desencadenan la persistencia de Chlamydia in vitro</i>	20
<i>Persistencia inducida por penicilina</i>	20
<i>Persistencia inducida por interferón gamma</i>	22
<i>Implicancias de la persistencia in vivo</i>	28
Manipulación genética en <i>Chlamydia</i>	30
<i>Desafíos</i>	30
<i>Avances</i>	31
Intercambio de ADN en <i>Chlamydia</i>	31
Manipulación genética molecular	31
<i>Identificación de genes importantes en persistencia</i>	36
OBJETIVOS	38
RESULTADOS	40
CAPÍTULO 1: Persistencia.....	40
<i>Modelo de inducción de persistencia con interferón gamma o penicilina</i>	40
<i>Screening para identificar genes involucrados en persistencia</i>	44
CAPÍTULO 2: Rol de Ptr/CTLO175 en persistencia.	49
<i>M275 es incapaz de recuperarse normalmente de la persistencia inducida por IFNγ</i>	49
<i>Obtención y análisis de recombinantes</i>	52
<i>La proteína Ptr no se expresa en M275</i>	53
<i>Generación de una mutante knock-out en el gen ptr mediante un intrón grupo II</i>	56

<i>Complementación de la expresión de Ptr</i>	59
<i>La proteína Ptr no se expresa en L2 ptr::GII mientras que sí lo hace luego de transformar esta cepa con el vector pBOMB4R-ptrF</i>	59
<i>El defecto en la recuperación del estrés inducido por IFNγ está asociado a la falta de expresión de la proteína Ptr</i>	61
<i>La proteína Ptr se expresa a lo largo del ciclo de desarrollo de C. trachomatis</i>	64
<i>La proteína Ptr se localiza en el lumen de las inclusiones</i>	66
<i>Importancia de la actividad proteasa de la proteína Ptr en persistencia</i>	70
<i>Una mutante knock-out para el gen ptr exhibe un clearance demorado en el tracto genital murino</i>	70
CAPÍTULO 3: Rol de las proteínas Pmps en persistencia	74
<i>Introducción</i>	74
Características de las Pmps.....	74
Sistema de secreción tipo V	76
Expresión de las Pmps durante el ciclo de desarrollo	78
Proteínas Pmps en el desarrollo de una vacuna subunitaria	79
Proteínas Pmps en persistencia.....	80
<i>Resultados del Capítulo 3</i>	81
Obtención de recombinantes con mutaciones en los genes <i>pmpA</i> , <i>pmpB</i> y <i>pmpC</i>	81
Generación de una mutante nula en el gen <i>pmpC</i> por inserción de un intrón tipo II	82
Rol de <i>pmpC</i> en persistencia	83
Expresión de Pmps recombinantes	85
Aunque las mutantes $\Delta pmps$ son capaces de adherirse a las células epiteliales, presentan una menor tasa de invasión.....	86
Características ultraestructurales de cepas mutantes en los genes <i>pmpA/B/C</i>	88
La ausencia de la proteína PmpC genera agregados dentro de la inclusión	89
PmpC previene la formación de agregados dentro de la inclusión y funciona a nivel de bacterias individuales	90
DISCUSIÓN	94
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	107
Conclusiones	107
Perspectivas	107
MATERIALES Y METODOS	110
Cultivo Celular	110
Cepas de <i>C. trachomatis</i>	110
Propagación de <i>C. trachomatis</i>	111
Purificación de cuerpos elementales	111
Titulación de stocks de <i>C. trachomatis</i>	112

<i>Screening</i> en búsqueda de mutantes defectivas para la recuperación de persistencia.....	113
Ensayos de inducción de persistencia y recuperación con IFN γ y penicilina.....	114
Transformación de <i>Chlamydia</i>	115
Ensayo de placa.....	115
Generación de recombinantes de <i>C. trachomatis</i> por transferencia lateral de genes.....	115
TILLING: Genotipado de recombinantes.....	116
Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	117
Generación de una cepa nula para <i>ptr</i> y <i>pmpC</i>	118
Complementación de L2 <i>ptr::GII</i> y L2 <i>pmpC::GII</i>	119
Curva de crecimiento	120
Determinación del tamaño de la inclusión.....	120
Determinación del número de copias de genoma.....	120
Microscopía electrónica de transmisión.....	121
Infección en ratones.....	121
Cuantificación de la progenie infecciosa de <i>C. trachomatis</i> en secreciones vaginales	122
Anticuerpos	122
Inmunofluorescencia	122
Análisis de trans-complementación mediante co-infecciones.....	123
Western blots	124
Fraccionamiento crudo de <i>Chlamydia</i> para la detección de proteínas secretadas	124
Producción de anticuerpos policlonales.....	125
Ensayos de adherencia e invasión	125
Cepas de <i>E.coli</i> , plásmidos, cebadores y medios de cultivo	126
<i>Plásmidos utilizados y generados</i>	126
<i>Cebadores utilizados</i>	128
PUBLICACIONES.....	133
Revistas científicas con referato	133
Presentaciones a congresos	133
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

A2EN: *Immortalized Human Endocervical Epithelial Cells*- HPV E6/E7, Células epiteliales inmortalizadas de endocérnix humano HPV-16 E6/E7

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: *Analysis of variance*, análisis de la varianza

aRB: *aberrant Reticulate Body*, Cuerpo Reticular aberrante

ATC: Ácidos Tri-Carboxílicos

ATP: *Adenosine Triphosphate*, Adenosina trifosfato

BSA: *Bovine Serum Albumin*, Albúmina sérica bovina

CBRS: *Chlamydia Basic Research Society*, Sociedad de Investigación Básica en *Chlamydia*

CFP: *Cyan Fluorescent Protein*, Proteína Fluorescente Cian

CO₂: Dióxido de carbono

COMC: *Chlamydia Outer Membrane Complex*, Complejo clamidiano de membrana externa

CRISPi: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic repeats interference*, Interferencia basada en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

dH₂O: Agua destilada

DMS: Dimetilsulfóxido

dpi: días post infección

DTT: Ditiotreitól

EB: *Elementary Body*, Cuerpo elemental

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*, Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*, Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMS: Etilmetanosulfonato

ENU: N-etil-N-nitrosourea

FBS: *Fetal Bovine Serum*, Suero fetal bovino

FLAEM: *Floxed-Cassette Allelic Exchange Mutagenesis*, Mutagénesis de intercambio alélico de cassette rodeado de sitios lox P

FLAG: péptido hidrofílico de 8 aminoácidos (DYKDDDDK)

FRAEM: *Fluorescence-reported allelic exchange mutagenesis*, Mutagénesis de intercambio alélico reportada por fluorescencia

GBP: *Guanylate Binding Protein*, Proteína de unión a guanilato

GFP: *Green Fluorescent Protein*, Proteína Fluorescente Verde

GTPasa: *Guanosine triphosphatase*, Guanosina trifosfatasa

HA-tag: *tag derived from human influenza hemagglutinin*, epítipo derivado de los aminoácidos 98-106 de la hemaglutinina de influenza humana.

HeLa: Línea celular epitelial aislada de tejido cervical de Henrietta Lacks, estas células contienen secuencias del HPV-18

His-tag: *Histidine tag*, Péptido cuya secuencia contiene 6 histidinas (His)

HPI: Horas post infección

HPV: *Human papilloma virus*, Virus del papiloma humano

HSH: Hombres que tienen sexo con hombres

IF: Inmunofluorescencia

IFN γ : Interferón gamma

IFU: *Inclusion forming unit*, Unidad formadora de inclusión

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

IRG: GTPasa relacionada a la inmunidad

ITS: Infección de transmisión sexual

KLH: *Keyhole Limpet Hemocyanin*, Hemocianina de lapa californiana

KSFM: *Keratinocyte serum-free medium*, Medio libre de Suero para keratinocitos

LGV: Linfgranuloma venéreo

LOS: Lipooligosacárido

MOI: *Multiplicity of infection*, Multiplicidad de infección

MOMP: *Major outer membrane protein*, Proteína mayoritaria de membrana externa

MCS: *Multiple Cloning Site*, Sitio de clonado múltiple

OMS: Organización mundial de la Salud

pb: pares de bases

PBP: *Penicillin Binding Protein*, proteína de unión a la penicilina

PBS: *Phosphate Buffered Saline*, Tampón fosfato salino

PCR: *Polymerase chain reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa

PD: *Passenger Domain*, dominio pasajero

PEN: Penicilina

Pmps: *Polymorphic membrane proteins*. Proteínas polimórficas de membrana de *C. trachomatis* (PmpA a PmpI, codificadas en los genes *pmpA* a *pmpI*).

PMSF: *Phenylmethanesulfonyl fluoride*, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSF: *Point Spread Function*, función de dispersión de punto

Ptr: proteasa no caracterizada de *C. trachomatis* codificada en el *gen ptr*, correspondiente a los locus CTLO175 en *C. trachomatis* serovar L2 y al locus CT806 en *C. trachomatis* serovar D

RB: *Reticulate Body*, Cuerpo reticular

ROI: *Region of interest*, Región de interés

SDS: Dodecilsulfato sódico

Ser.: Serovariedad/Serovar

SNP: *Single nucleotide polymorphism*, Polimorfismo de nucleótido único

SNV: *Single nucleotide variant*, Variante de nucleótido único

SPF: *Specific pathogen free*, Libre de patógenos

SPG: *Sucrose Phosphate Glutamate*, Sucrosa fosfato glutamato

TBS: *Tris-buffered saline*, Tampón Tris Salino

TEM: *Transmission Electron Microscopy*, Microscopía Electrónica de Transmisión

TILLING: *Targeting-Induced Local Lesions IN Genomes*

TrpA: Triptófano sintasa, subunidad α

TrpB: Triptófano sintasa, subunidad β

UI: Unidad internacional

UT: *Untreated*, no tratado

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humano

Wt: *Wild type*, Cepa salvaje

RESUMEN

RESUMEN

Chlamydia trachomatis es el patógeno bacteriano de transmisión sexual más común en humanos y una causa frecuente de infecciones asintomáticas y persistentes que conducen a complicaciones graves, particularmente en mujeres jóvenes. *Chlamydia* presenta un estilo de vida intracelular obligado único que involucra la transición cíclica entre su forma de desarrollo infectiva o cuerpo elemental y su forma replicativa o cuerpo reticular dentro de una vacuola denominada “inclusión”. En presencia de factores estresantes como el interferón gamma (IFN γ) o los antibióticos beta-lactámicos, *C. trachomatis* sufre una interrupción en su ciclo replicativo y entra en un estado viable pero no cultivable, “persistente”, también llamado persistencia clamidial, generalmente asociado a la presencia de cuerpos reticulares aberrantes y de mayor tamaño. Al removerse los factores de estrés, estas bacterias reanudan la división celular y las transiciones entre sus formas de desarrollo. Por lo tanto, la persistencia clamidial se considera un factor clave en la capacidad de estas bacterias para evadir diferentes efectos antimicrobianos. En esta tesis, se describe un *screening* genético para identificar y caracterizar mutantes de *C. trachomatis* con defectos en la recuperación post-estrés inducido por IFN γ y/o penicilina. Utilizando una colección de aproximadamente 1000 mutantes químicas completamente secuenciadas de *C. trachomatis* LGV-L2, se encontró que la mutante M275 es defectuosa en la recuperación de estrés inducido por IFN γ pero no por penicilina. Mediante la transferencia lateral de genes y análisis de recombinantes se identificó *ptr*, que codifica una posible proteasa, como un gen probablemente requerido para la recuperación del estrés inducido por IFN γ . Para confirmar estos resultados se construyó una cepa nula para *ptr* (L2 *ptr*::GII), la cual también mostró defectos en la recuperación del estrés inducido por IFN γ , y este defecto se restableció mediante la complementación de la expresión de *Ptr*. L2 *ptr*::GII, al igual que M275, mostró una menor tasa de diferenciación de RB a EB y una replicación del genoma reducida durante la recuperación después del tratamiento con IFN γ , lo que indica que *Ptr* es necesaria para una salida rápida del estrés inducido por IFN γ . Asimismo, se desarrollaron anticuerpos contra *Ptr* que nos permitieron observar que esta proteína es secretada al lumen de la inclusión clamidial. Utilizando un modelo murino de infección vaginal se observó un *clearance* disminuido a los 14 días post-infección para L2 *ptr*::GII, sugiriendo que la anulación de *ptr* causa una demora en la eliminación de *C. trachomatis* en el tracto genital femenino durante la infección *in vivo*. Por otro lado, se caracterizó la mutante M111, que presentó defectos en la recuperación luego del estrés inducido por IFN γ o por penicilina. Dicha mutante porta una única mutación sin sentido en *pmpC*, además de mutaciones con cambio de sentido en 5 genes adicionales. El gen *pmpC* codifica para una proteína polimórfica de membrana perteneciente a una familia de proteínas exclusiva de *Chlamydia*. Mediante la inactivación sitio-dirigida de genes por inserción se identificó *pmpC* como un gen necesario para la recuperación del estrés inducido por IFN γ o penicilina. Adicionalmente, se observó que la anulación de *pmpC* causa un defecto en la adherencia e invasión en las células hospedadoras, e induce la formación de agregados bacterianos dentro de la inclusión clamidial. En conclusión, este trabajo de tesis identificó a *ptr* y *pmpC* como genes involucrados en la persistencia clamidial.

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis is the most common sexually transmitted bacterial pathogen in humans and a frequent cause of asymptomatic and persistent infections leading to serious complications, particularly in young women. *Chlamydia* presents a unique obligate intracellular lifestyle involving developmental transitions between the infective elementary body and the replicative reticular body, which occur inside a *Chlamydia*-containing vacuole or "inclusion". In the presence of stressors such as gamma interferon (IFN γ) or beta-lactam antibiotics, *C. trachomatis* undergoes an interruption in its replicative cycle and enters a viable but non-cultivable, "persistent" state also known as *Chlamydia* persistence, usually associated with the presence of enlarged aberrant reticular bodies. Upon removal of stressors, these bacteria resume cell division and transitions between developmental forms. Thus, *Chlamydia* persistence is considered a critical factor conferring these bacteria the ability to evade diverse antimicrobial effects. In this thesis, we describe a genetic screening to identify and characterize mutants of *C. trachomatis* with defects in recovery from IFN γ - and/or penicillin-induced stress. Using a fully sequenced collection of approximately 1000 chemical mutants of *C. trachomatis* LGV-L2, we found that mutant M275 is defective for recovery from IFN γ - but not penicillin-induced stress. Through lateral gene transfer and recombinant analysis we identified *ptr*, encoding a putative protease, as a gene potentially required for the recovery from IFN γ -induced stress. To confirm these results we used site-directed insertional mutagenesis and constructed a *ptr* null strain (L2 *ptr*::GII), which also showed a defective recovery from IFN γ -induced stress and this defect was restored by complementation of *Ptr* expression. The L2 *ptr*::GII mutant, like M275, showed a lower rate of RB to EB differentiation and reduced genome replication during recovery after IFN γ treatment, indicating that *Ptr* is necessary for a rapid exit from IFN γ -induced stress. We developed antibodies against *Ptr*, which allowed us to observe that this protein is secreted to the lumen of the chlamydial inclusion. We then used a murine model of intravaginal infection and found an impaired clearance at 14 days after infection for L2 *ptr*::GII, suggesting that abrogation of *ptr* causes delayed elimination of *C. trachomatis* from the female genital tract during infection *in vivo*. Additionally, we characterized mutant M111, which exhibited a defective recovery from both IFN γ - or penicillin-induced stress. Interestingly, M111 harbors a unique nonsense mutation in *pmpC* and additional miss-sense mutations in 5 other genes. Polymorphic membrane protein C gene (*pmpC*) encodes a polymorphic membrane protein belonging to a family of proteins only found in *Chlamydia*. By means of site-directed insertional inactivation we identified *pmpC* as a gene required for the recovery from IFN γ - and penicillin-induced stress. Additionally, we found that abrogation of *pmpC* impairs adhesion to and invasion of host cells and induces the formation of bacterial aggregates within the chlamydial inclusion. In conclusion, this thesis work identified *ptr* and *pmpC* as genes involved in *Chlamydia* persistence.

INTRODUCCION

Introducción a la microbiología de *Chlamydia*

El género *Chlamydia* pertenece a la familia *Chlamydiaceae*, orden *Chlamydiales*, clase *Chlamydia* y filo *Chlamydiae* dentro del reino Bacteria (Gupta et al., 2015; Ruggiero et al., 2015). *Chlamydia* es capaz de infectar una gran diversidad de hospedadores, entre ellos: gatos (*C. felis*), ratones (*C. muridarum*), cerdos (*C. suis*, *C. pecorum*), cobayos (*C. caviae*), marsupiales (*C. pecorum*), rumiantes (*C. pecorum*, *C. abortus*) y aves (*C. psittaci*, *C. avium*, *C. gallinacea*). *C. psittaci*, *C. abortus* y *C. felis* son transmitidas ocasionalmente a humanos desde los animales. *C. psittaci* es causante de psitacosis en humanos y se transmite de aves a mamíferos por inhalación, contacto o ingestión. *C. pneumoniae* es causante de neumonía atípica en humanos y también existen cepas que infectan a equinos y koalas (Solomon and Mabey, 2017). *C. trachomatis* infecta únicamente a humanos y causa infecciones oculares, genitales y sistémicas que afectan a millones de personas a nivel mundial. Esta especie es sin lugar a dudas la de mayor impacto clínico dentro del género y se subdivide en dos biovariedades: Tracoma y LGV. La primera asociada a infecciones oculares (Serovariedades A-C) y genitales (Ser. D-K). La segunda biovariedad (Ser. L1-L3), más invasiva, puede replicar en macrófagos, invadir los nódulos linfáticos y causar una infección sistémica denominada linfogranuloma venéreo. Las serovariedades de *C. trachomatis* se definen por las propiedades antigénicas de la proteína mayoritaria de membrana externa MOMP (Stephens et al., 1987; Baehr et al., 1988; Gomes et al., 2007). Un aspecto fascinante de *Chlamydia* es su éxito como patógeno intracelular de una gran diversidad de organismos teniendo uno de los genomas bacterianos más pequeños. Estos patógenos ubicuos evolucionaron parasitando células eucariotas, sufriendo un proceso de condensación genómica, que los llevó a mantener alrededor de 1.000 genes (en comparación con ~ 5.000 genes en *E. coli*) que les permiten su estilo de vida intracelular obligado. Durante su ciclo de propagación, estas bacterias Gram negativas ubicuas presentan formas de desarrollo con características estructurales y funcionales claramente diferenciadas: el cuerpo elemental es la forma infectiva, el cuerpo reticular es la forma replicativa y el cuerpo reticular aberrante es considerada la forma “persistente” (ver sección “Ciclo de desarrollo”).

Chlamydia trachomatis a través del tiempo: reseña histórica

En los inicios del siglo XX (1907), Halberstadter y von Prowazek, bajo la dirección de quien descubriera años atrás *Neisseria gonorrhoeae* (Albert Neisser) y en una expedición para estudiar la sífilis, fueron los primeros en observar inclusiones intracitoplasmáticas en raspados

conjuntivales de sujetos con tracoma (Halberstädter L, 1907). Al reconocer la existencia de un agente infeccioso y observar que las inclusiones “envolvían” al núcleo, sugirieron el nombre *Chlamydozoa* (del griego, *chlamys*: capa) (Taylor-Robinson, 2017).

Sin embargo, la historia del tracoma se remonta miles de años atrás. La primera evidencia de infecciones crónicas de *C. trachomatis* en los ojos son cicatrices en cráneos de aborígenes australianos, de alrededor del 8.000 a.C. (Webb, 1990). Este mal ya era conocido en Egipto hace 5.000 años. Se creía que allí se había originado, pero podría haber surgido entre los nómades mongoles y por sus invasiones haberse extendido por la cuenca mediterránea, China y Siberia, y con las grandes migraciones al continente americano (Al-Rifai, 1988). Los egipcios describen un tratamiento contra esta enfermedad en el *Papyrus* descubierto por el arqueólogo Ebers (Al-Rifai, 1988; JF., 2002). Luego de las Cruzadas el tracoma llegó a Europa y una víctima ilustre fue San Francisco de Asís, quien contrajo la enfermedad durante su estancia en Egipto y en Palestina (1219-1220), muriendo casi ciego algunos años más tarde a los 45 años de edad (Anónimo, 1942). Posteriormente, en 1563, Botallo fue el primero en observar que la sífilis podría ser una causa de ceguera (Al-Rifai, 1988) siendo uno de los pioneros en relacionar la ceguera a las enfermedades venéreas. Luego de la campaña napoleónica en Egipto (1798-1801) el tracoma, al que llamaban “oftalmia egipcia”, se volvió endémico en Europa (Al-Rifai, 1988).

A fines del siglo XIX, el miedo al tracoma era importante en el mundo y el gobierno de los Estados Unidos lo clasificó como una enfermedad repugnante y contagiosa, por ello examinaba a los inmigrantes y obligaba a las compañías de navegación a repatriar a los tracomatosos (Anónimo, 1942; Markel, 2000).

En nuestro país, en 1910, el Dr. E. Demaría, profesor de clínica oftalmológica en la Universidad de Buenos Aires, realizó estudios epidemiológicos y propuso un plan de lucha. En 1924, el jefe del Departamento Nacional de Salud Pública creó una sección de profilaxis del tracoma que se encargó de hacer nuevos estudios de distribución del tracoma en el país. En 1926, la Sociedad Médica de Córdoba difundió un cuestionario sobre el tema y dos años después, por iniciativa de la Cruz Roja Argentina se fundó el dispensario oftalmológico E. B. Demaría en Santiago del Estero. Su director emprendió seguidamente una campaña activa en las familias y escuelas creando dispensarios escolares, formando enfermeras especializadas y obteniendo la colaboración de los médicos y del cuerpo docente. En 1940 se nacionaliza aquel dispensario por su éxito. La Cruz Roja Argentina introdujo en su enseñanza la teoría y la práctica del examen oftalmológico, los cuidados y los vendajes oculares utilizados en los pacientes con tracoma. Ante los brillantes resultados obtenidos, la IV Conferencia Panamericana de la Cruz Roja (Chile, 1940) votó una resolución

recomendando se llevara a la práctica en todos los estados americanos el plan impulsado por la Cruz Roja Argentina (Anónimo, 1942).

Poco tiempo después del descubrimiento de Halberstaedter y Prowazek, se detectaron estos cuerpos de inclusión en recién nacidos con conjuntivitis (K., 1909) y en secreciones cervicales de sus madres, personas con enfermedades de transmisión sexual no gonocócicas (Halberstädter L, 1909; K., 1910; Fritsch, 1910), sugiriendo que existía una relación entre el tracoma, la conjuntivitis neonatal y la enfermedad genital (1977). En 1952 estos organismos se agruparon junto con los causantes de linfogranuloma venéreo y psitacosis, se los llamaba agentes PLT (Psitacosis-Linfogranuloma venéreo-Tracoma). Por microscopía electrónica se identificó que estos microorganismos eran morfológicamente distintos y se los llamó *Chlamydia* (1957). Ese mismo año se logró aislar el agente etiológico del tracoma en el saco vitelino de huevos. En los años sesenta los agentes infecciosos del tracoma y la conjuntivitis de inclusión se nombraron virus TRIC y se diferenciaron de los PLT. Una década más tarde, se consideraba que los agentes TRIC y los de psitacosis y linfogranuloma venéreo tenían características en común y se los clasificó en un nuevo orden, familia y género. Los primeros indicios de que se trataba de un agente bacteriano fueron descubrimientos de susceptibilidad a los antibióticos (sulfanilamida en 1937, penicilina en 1957 y tetraciclina en 1966) (Al-Rifai, 1988). Luego de que Stainer y Lwoff establecieron las diferencias fundamentales entre los virus y bacterias se comenzó a considerar a la clase *Chlamydia* como bacterias (Moulder, 1966). A diferencia de los virus, *Chlamydia* poseen ambos tipos de ácidos nucleicos, DNA y RNA, y se multiplican por fisión binaria en lugar de autoensamblaje (Moulder, 1966). La presencia de ácido murámico en la pared celular, su metabolismo, las propiedades serológicas y de tinción, así como la susceptibilidad a los antibióticos llevó a la conclusión, a principios de la década de los ochenta, que *Chlamydia* es una bacteria Gram negativa (Al-Rifai, 1988).

***C. trachomatis* como patógeno humano**

Infecciones causadas por las serovariedades A-C

Las serovariedades A-C son los agentes etiológicos del tracoma e infectan primariamente las células epiteliales de la conjuntiva ocular. El tracoma consiste en una querato-conjuntivitis crónica que representa la principal causa mundial de ceguera de origen infeccioso (Bennett et al., 2015). Se estima que en la actualidad 0,5 millones de personas han perdido la visión debido a este flagelo (W.H.O., 2019). La Organización Mundial de la Salud en 1993 impulsó la estrategia “SAFE” (*Surgery, Antibiotics, Facial cleanliness, Environmental improvement*) para lograr la

eliminación del tracoma como problema de salud pública. Tres años más tarde, la OMS puso en marcha la Alianza para la Eliminación Mundial del Tracoma para 2020 (GET 2020). GET 2020 apoya a los estados miembros en la aplicación de la estrategia SAFE y el fortalecimiento de la capacidad nacional mediante estudios epidemiológicos, el seguimiento, la vigilancia de la enfermedad y la movilización de recursos. En la actualidad, el tracoma es hiperendémico en zonas rurales de extrema pobreza en 37 países de África, Asia, América Central y del Sur, Australia y Medio Oriente ((W.H.O., 2019), Figura 1). Hasta abril de 2019, 12 países han alcanzado los objetivos de la eliminación: Camboya, China, Gambia, Ghana, Marruecos, México, Myanmar, Nepal, la República Democrática Popular Lao, la República Islámica de Irán, Iraq y Omán (W.H.O., 2019). Sin embargo, el tracoma todavía representa un problema importante de salud pública a nivel global (Burton and Mabey, 2009; Stocks et al., 2014). En zonas endémicas, el tracoma activo es común entre los niños de edad preescolar, con tasas de prevalencia que pueden llegar a ser del 60% al 90%. A partir de esa edad la infección se vuelve menos frecuente y más breve.

Por lo general, el tracoma se adquiere por contacto próximo con una persona que curse la enfermedad activa. El sistema inmunitario puede resolver un único episodio de infección, pero en comunidades donde el tracoma es endémico son frecuentes las reinfecciones. Después de años de infecciones reiteradas, el interior de párpado puede quedar gravemente marcado de cicatrices que lo pliegan hacia adentro, de modo que el borde del párpado haga frotar las pestañas contra el globo ocular (triquiasis), lo que puede dar lugar a molestias constantes e intolerancia a la luz; estas y otras alteraciones del ojo pueden originar cicatrices en la córnea. Si no se trata, este trastorno puede dar lugar a la formación de opacidades irreversibles que causarán discapacidad visual y ceguera. En las comunidades muy endémicas esto puede ocurrir en la infancia, aunque lo más frecuente es que la discapacidad visual se produzca entre los 30 y los 40 años, luego de años de evolución de este proceso crónico (W.H.O., 2019).

La carga de morbilidad del tracoma en las personas y comunidades afectadas es enorme. El costo económico anual por pérdida de productividad por ceguera o disfunción visual se estima entre US\$ 2900 y US\$ 5300 millones, y alcanzaría los US\$ 8000 si se incluyese la triquiasis (W.H.O., 2019).

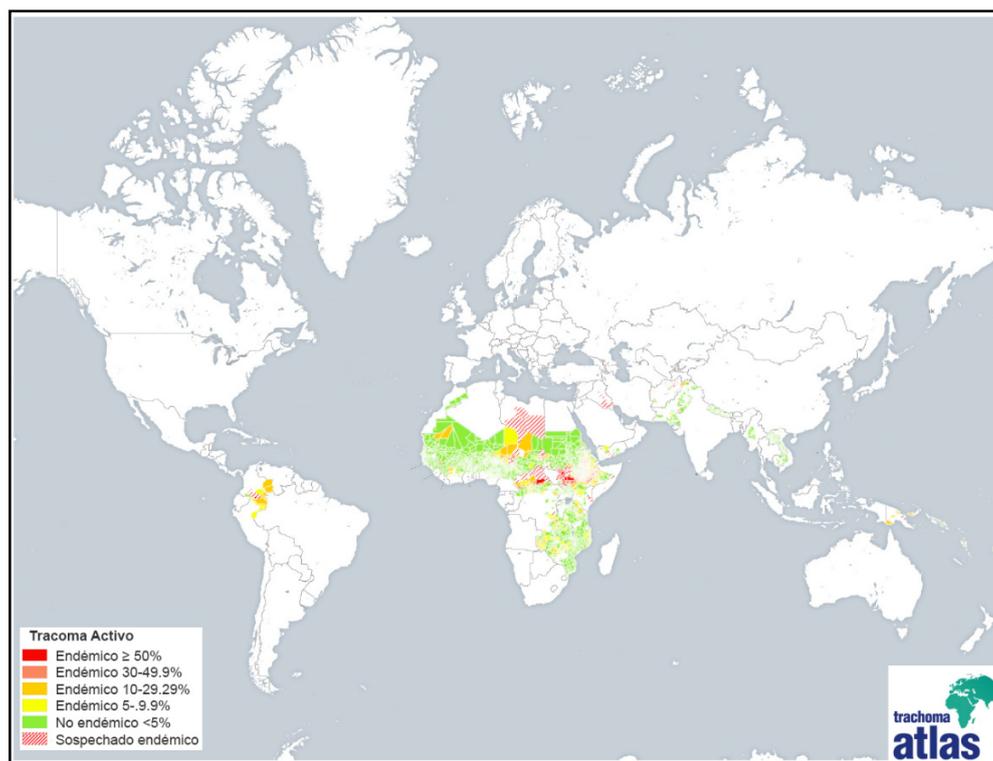


Figura 1: Prevalencia de tracoma activo en 2018. A nivel mundial, las infecciones endémicas por tracoma prevalecen en 37 países con las tasas más altas de infección en áreas rurales y con saneamiento deficiente. (Atlas del tracoma - Último acceso en junio de 2019). El mapa indica la prevalencia en niños de 1-9 años por distrito y fue desarrollado por la Iniciativa Internacional de Tracoma.

Infecciones causadas por las serovariedades D-K

Las serovariedades D-K son la principal causa bacteriana de infecciones de transmisión sexual y resultan en una morbilidad sustancial y un gran impacto en la economía. La OMS estimó 131 millones de casos nuevos de clamidia en personas de 15-49 años en 2012, con una tasa de incidencia global de 38 cada 1000 mujeres y 33 cada 1000 hombres (2016). Los hombres con síntomas usualmente presentan uretritis y menos comúnmente epididimitis (Cunningham and Beagley, 2008; Solomon and Mabey, 2017). La presentación clínica más frecuente en mujeres es la cervicitis, pudiendo también presentar bartolinitis y síndrome uretral agudo. Hasta el 70-90% de las infecciones pueden ser asintomáticas y persistentes (Stamm, 1999; Gonzales et al., 2004). En consecuencia, la mayoría de las personas con ITS por esta bacteria no concurre a la consulta médica, constituyendo un reservorio que perpetúa la transmisión. Ante la ausencia de tratamiento, las ITS causadas por *C. trachomatis* tienen la particularidad de persistir por tiempos prolongados. Se estima que la duración promedio de estas infecciones asintomáticas en mujeres

es de 15 meses (habiéndose documentado infecciones de 5 años de duración (Dean et al., 2000)) superando ampliamente otras bacterias causantes de ITS como *Neisseria gonorrhoeae* (Schoborg, 2011; WHO, 2011). En hombres, *C. trachomatis* puede persistir hasta 6 meses en la uretra (Joyner et al., 2002; Geisler et al., 2008). La infección persistente genera reiterados ciclos de inflamación crónica y cicatrización, que pueden desencadenar complicaciones severas principalmente en mujeres jóvenes, tales como la enfermedad inflamatoria pélvica, embarazos ectópicos, e infertilidad irreversible (6%-21% de los casos) (Schachter et al., 1983; Stamm and Cole, 1986; Lan et al., 1995; Westrom, 1995; Stamm, 1999; Bebear and de Barbeyrac, 2009; Haggerty et al., 2010). En hombres también pueden ocurrir complicaciones, principalmente epididimitis y artritis reactiva.

C. trachomatis D-K también pueden causar conjuntivitis de inclusión en adultos, e infecciones perinatales como la oftalmia del neonato y la neumonía por *Chlamydia* en recién nacidos (Ronnerstam et al., 1985; Schachter et al., 1986; Stenberg and Mardh, 1991; Darville, 2005; Hammerschlag, 2011). La conjuntivitis de inclusión se manifiesta como una conjuntivitis folicular generalmente unilateral que no responde a antibióticos tópicos y puede prolongarse por muchos meses en ausencia de tratamiento (Ronnerstam et al., 1985). Se estima que más de la mitad de los adultos con conjuntivitis de inclusión padecen concurrentemente una infección genital por *C. trachomatis* (Stenberg and Mardh, 1991). La oftalmia del neonato, suele resolver espontáneamente en ausencia de tratamiento luego de 3-12 meses, pudiendo persistir por años con síntomas leves o subclínicos que llevan a lesiones de córnea y secuelas (Persson et al., 1983; Bell et al., 1992). En el caso de la neumonía del recién nacido, se estima que hasta un 20% de los neonatos nacidos por parto vaginal de madres que están cursando una infección genital por *C. trachomatis* desarrollan neumonía por esta bacteria (Schachter et al., 1986), pudiendo persistir por semanas o meses y causar apnea prolongada, falla respiratoria e incluso secuelas (Weiss et al., 1986).

Las cepas urogenitales también pueden infectar el recto, de manera más usual en hombres que tienen sexo con hombres (HSH). Si bien las infecciones rectales por *C. trachomatis* D-K son más raras que las infecciones urogenitales en las mujeres, existe una creciente preocupación de que puedan surgir algunas fallas aparentes en el tratamiento urogenital debido a la autoinoculación desde el recto que funcionaría como reservorio (Rank and Yeruva, 2014; van Liere et al., 2014; Bavoil et al., 2017).

Infecciones causadas por las serovariedades L1-3

Las serovariedades más invasivas L1-L3, que de manera frecuente infectan el recto, son la causa de una forma menos frecuente de ITS por *C. trachomatis* llamada linfogranuloma venéreo, una enfermedad sistémica caracterizada por linfadenopatía inguinal y/o proctitis/proctocolitis grave (Herring and Richens, 2006; White, 2009). La posibilidad de una evolución prolongada se asocia a secuelas severas como elefantiasis y estíomeno genital (Herring and Richens, 2006; White, 2009).

Epidemiología en Argentina

Existe escasa información referida a la prevalencia y distribución de cepas de *C. trachomatis* en nuestro país. Estudios epidemiológicos en embarazadas han detectado prevalencias variables de *C. trachomatis*: 2,5% (pacientes sintomáticas, Gran Buenos Aires, 1999) (Susana Di Bartolomeo, 2001), 1,4% (38% eran sintomáticas, Buenos Aires, 2012-2013) (Mucci et al., 2016), 10,4% (sintomáticas y asintomáticas, Córdoba, 2013) (Marrama, 2013), 2% (sintomáticas y asintomáticas, Córdoba, 2016) (Zucotti et al., 2018) y 6,9% (asintomáticas, Córdoba, 2014-2015) (Kiguen et al., 2019). Estos estudios indican la necesidad de la incorporación de *C. trachomatis* al *screening* prenatal para controlar las infecciones causadas por este patógeno y disminuir los costos asociados, al mismo tiempo que se ha reportado mayor prevalencia en sectores sociales vulnerables. En un estudio en el área metropolitana de Buenos Aires (2001-2006) encontraron una frecuencia incrementada del genotipo E en conjuntivitis neonatal, y los genotipos E, D y F como predominantes en pacientes adultos sintomáticos (Gallo Vaulet et al., 2010). En Misiones, se observó una prevalencia global de *C. trachomatis* de 8,5% en mujeres, incrementada en las que presentaban sintomatología vaginal (11,3%) y en menores de 26 años (11,5%); y el genotipo circulante mayoritario detectado fue el E (Jorda et al., 2018). En una población de ingresantes universitarios (hombre y mujeres) en Bahía Blanca la prevalencia fue del 3,5% en el año 2010 (Occhionero et al., 2015). En cuanto a los hombres que tienen sexo con hombres (HSH) la prevalencia de *C. trachomatis* reportada fue de 2,9% en Buenos Aires entre 2007 y 2009 (Pando et al., 2012). Recientemente se ha detectado un brote de LGV anorectal en nuestro país; en un contexto de pesquisa sistemática de infección rectal por clamidias, el 47% del grupo de estudio (HSH, VIH positivos) estaba infectado por *C. trachomatis* y dentro de ellos el 68,8% pertenecían al biovar LGV (La Rosa et al., 2018; Lopez et al., 2019). Estos reportes muestran la importancia de una mayor vigilancia de las infecciones en el país, en donde seguramente hay muchos casos que permanecen sin diagnóstico y que permiten una continuidad en la cadena de transmisión dadas las características silenciosas y persistentes de las infecciones por *Chlamydia*.

Ciclo de desarrollo

Todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae* son patógenos intracelulares exitosos que poseen un ciclo de vida bifásico. La forma infectiva se denomina cuerpo elemental (*elementary body* o “EB”) y la forma replicativa cuerpo reticular (*reticulate body* o “RB”). Los EBs son pequeños (~0,2µm de diámetro), no son replicativos, su ADN está altamente condensado y son resistentes al ambiente. Por otra parte, los RBs son más grandes (~0,8µm de diámetro), poseen ADN relajado y son lábiles en el ambiente extracelular. Los RBs están enriquecidos en proteínas involucradas en la toma de nutrientes, la generación de ATP y la traducción, mientras que los EBs están precargados con factores de virulencia, incluidos los efectores de secreción de tipo III involucrados en la internalización en la célula hospedadora (Saka et al., 2011).

El ciclo comienza cuando el EB entra en contacto con la célula hospedadora e ingresa por endofagocitosis, pinocitosis, macropinocitosis o endocitosis mediada por receptor (Dean, 2013; Ford et al., 2018). En la adherencia del EB a la célula hospedadora se han propuesto varios ligandos involucrados, entre ellos MOMP (componente mayoritario del COMC o Complejo Clamidiario de Membrana Externa), Pmps (Becker and Hegemann, 2014), glicosaminglicanos (GAGs) (Fadel and Eley, 2008a; Di Pietro et al., 2012) con los cuales interactúa OmcB, LOS (Fadel and Eley, 2008b), glicanos de oligosacáridos con alto contenido de manosa y Ctad1 (Cocchiario and Valdivia, 2009; Hegemann J. H., 2012; Stallmann and Hegemann, 2016). Por otra parte, están involucrados en este proceso los receptores de estrógeno, de manosa, de manosa 6-P, de heparán sulfato, la proteína 96 regulada por glucosa (Gp96) (Karunakaran et al., 2015a) y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (Dautry-Varsat et al., 2005; Campbell LA, 2006; Cocchiario and Valdivia, 2009). También se han implicado en la adhesión de *C. trachomatis* a las células el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (Elwell et al., 2008), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) (Kim et al., 2011) y el receptor de efrina A2 (Subbarayal et al., 2015). Es decir, existe una diversidad de adhesinas bacterianas y de proteínas del hospedador que interactúan en la primera etapa de adhesión a la célula. Tanto Tarp (fosfoproteína reclutadora de actina) como CT694 son proteínas bacterianas que son translocadas al citosol celular durante la adherencia y tienen un rol en la remodelación de la actina y del citoesqueleto que facilita la internalización del EB dentro de la célula y la formación de una vesícula, llamada inclusión, que constituye el nicho replicativo de estas bacterias (Jewett et al., 2010). En tiempos tempranos post-infección, los EBs diferencian a RBs, que se dividen de manera polarizada (Abdelrahman et al., 2016) mientras la inclusión donde residen se expande gradualmente. Durante este proceso, *Chlamydia* manipula las vías celulares para adquirir nutrientes y evadir la interacción con organelas líticas como el lisosoma (Saka and Valdivia, 2010) al mismo tiempo que

frena la apoptosis (Sharma and Rudel, 2009). *Chlamydia* remodela activamente su nicho de crecimiento mediante proteínas efectoras que se secretan al citosol de la célula hospedadora o son insertadas en la membrana de la inclusión (Incs). A mitad del ciclo, algunos RBs comienzan a diferenciar nuevamente a EBs de manera asincrónica. En etapas tardías de la infección la inclusión contiene en su mayoría EBs, que finalmente son liberados al medio extracelular ya sea por lisis de la célula hospedadora (lo que requiere el clivaje de elementos del citoesqueleto y la ruptura nuclear), o en un proceso dependiente de actina llamado extrusión donde la inclusión intacta es transportada al exterior de la célula por exocitosis (Hybiske and Stephens, 2007). En el ambiente extracelular, los EBs pueden infectar células vecinas y continuar propagándose [revisión en (Elwell et al., 2016)]. En el caso de *C. trachomatis* LGV L1, L2 y L3 el ciclo completo en cultivo celular demora alrededor de 48h, mientras que las demás serovariedades lo completan alrededor de las 72h.

Si durante la replicación *Chlamydia* encuentra condiciones de estrés no bactericidas, como aquellas que surgen de la exposición a ciertos antibióticos, citoquinas o privación de nutrientes, la bacteria responde frenando la división de RBs y la producción de progenie infecciosa, siendo capaz de volver a la replicación normal cuando los estresores son removidos (Figura 2). Esta respuesta es llamada “persistencia” o “persistencia clamidial” o “respuesta clamidial al estrés” y le permite a la bacteria sobrevivir por largos períodos de tiempo en cultivo en presencia de condiciones desfavorables (Schoborg, 2011; Elwell et al., 2016).

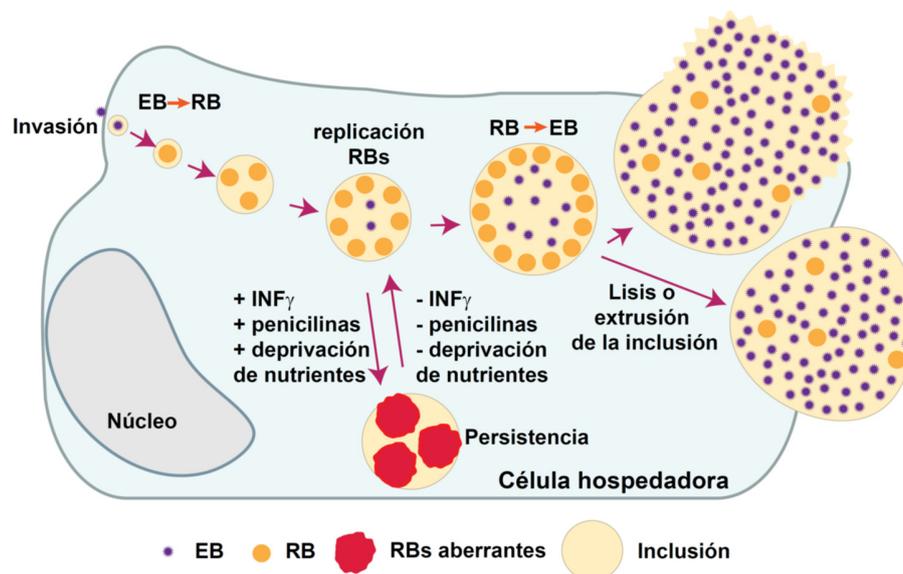


Figura 2: Ciclo de desarrollo de *Chlamydia*. Las clamidias son bacterias intracelulares obligadas que poseen un ciclo de vida bifásico. Los cuerpos elementales infecciosos (EB) se internalizan en las células hospedadoras y se ubican

dentro de una vacuola, denominada “inclusión”. Poco después de la invasión, los EB se diferencian a cuerpos reticulares replicativos (RBs), pero no infecciosos, que se dividen activamente. Alrededor de la mitad del ciclo, los RBs comienzan a diferenciarse de forma asincrónica en EBs y finalmente se liberan (mediante lisis celular o extrusión de inclusiones intactas) al entorno extracelular, donde pueden infectar las células vecinas. Si durante la replicación, la bacteria está expuesta a condiciones estresantes, como las causadas por el interferón gamma (IFN γ), las penicilinas o la privación de nutrientes esenciales, las bacterias entran en un estado viable pero no cultivable, conocido como “persistencia” que puede extenderse por largos períodos y que se asocia típicamente a la presencia de RBs agrandados y aberrantes, que también se denominan “formas persistentes”. Cuando las condiciones son nuevamente favorables, el estado de persistencia se revierte y se produce la replicación normalmente.

Persistencia

Persistencia como respuesta al estrés

La opinión de que *Chlamydia* solo alterna entre las formas de desarrollo de EB y RB es una vista simplificada de su ciclo de vida. Ya en 1950, Weiss descubrió que *C. muridarum* y *C. felis* (entonces conocidos como los virus de la neumonitis murina y felina, respectivamente), mostraban una morfología agrandada y anormal al exponerse al antibiótico penicilina (Weiss, 1950). Se reportaron observaciones similares para *C. trachomatis* LGV y *C. psittaci* (los denominados entonces virus de linfoceloma y meningoneumonitis, respectivamente) (Hurst et al., 1953; Tamura and Manire, 1968; Matsumoto and Manire, 1970). Un informe seminal de Galasso y Manire (Galasso and Manire, 1961), mostró que la penicilina era capaz de reducir la generación de progenie infecciosa de *C. psittaci* en células HeLa a valores tan bajos como el 0,1% del título original. Sorprendentemente, estos investigadores encontraron que las tasas de replicación normales se recuperaban rápidamente luego de la eliminación de la penicilina, incluso después de 3 meses y medio de presencia continua del antibiótico en cultivo celular. El análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión demostró que, en presencia de penicilina, las inclusiones de *C. psittaci* contenían RB muy agrandados, mientras que la morfología normal se recuperaba al eliminar el antibiótico (Matsumoto and Manire, 1970). Ahora se sabe que esas primeras observaciones están en línea con la presencia de RB agrandados y aberrantes (aRB), que se encuentran típicamente cuando *Chlamydia* sufre privación de nutrientes, exposición a ciertos antibióticos, interferón gamma (IFN γ) u otros compuestos/condiciones que imponen un estrés a estos microorganismos (Byron, 2012). Los aRB observados *in vitro* pueden considerarse la manifestación morfológica de la entrada de *Chlamydia* en un “estado persistente”, caracterizado por la falta de cultivabilidad mientras que las condiciones son desfavorables, y seguido por un rápido retorno a la replicación normal al eliminar el factor estresante. En este contexto, es razonable pensar que el estado persistente funciona como una vía de resiliencia activada en este microorganismo para enfrentar las condiciones de estrés provocadas por diversos estímulos

antimicrobianos. Por lo tanto, se puede plantear como hipótesis que, para ejecutar dicha respuesta, estas bacterias deben seguir una secuencia de eventos que involucran: i) detección de condiciones desfavorables, ii) entrada en un estado persistente, iii) supervivencia en condiciones adversas, iv) detección de condiciones favorables, iv) salida de la persistencia y v) reanudar la producción normal de progenie infecciosa (Figura 3). Las bases mecánísticas y moleculares que subyacen a cada uno de los eventos mencionados, siguen siendo poco conocidas. Sin embargo, sí se conoce que bajo el estado persistente *Chlamydia* ralentiza la replicación de su ADN y continúa transcribiendo los genes, pero deja de dividirse, volviéndose viable pero no cultivable (Ouellette et al., 2006; Muramatsu et al., 2016). Esto suele ir acompañado de la presencia de aRBs, que conservan su capacidad de transición a EB infecciosos una vez que las condiciones son nuevamente favorables. Es importante mencionar, sin embargo, que un enfoque funcional de la definición de la persistencia de *Chlamydia* como una interrupción reversible del ciclo productivo (Byron, 2012), es probablemente más apropiado que una definición morfológica, ya que los aRB no siempre se observan (Schoborg, 2011).

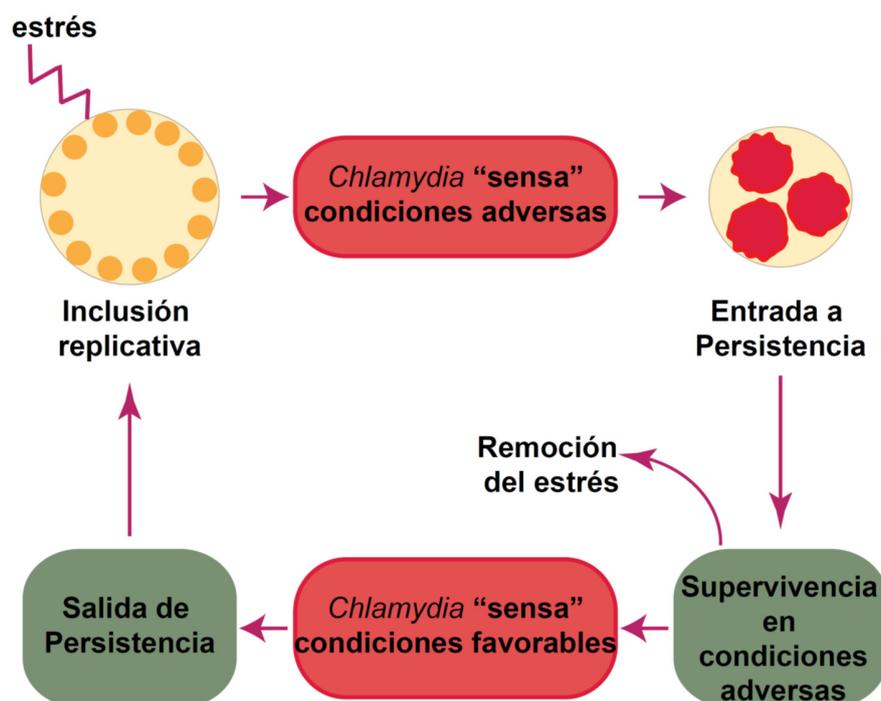


Figura 3: Persistencia en *Chlamydia*. Este esquema resume diferentes eventos que *Chlamydia* puede usar para evadir con éxito los distintos estresores durante la infección in vitro. Primero, *Chlamydia* “sensa” diferentes tipos de estrés y luego responde al entrar en una interrupción temporal reversible en el ciclo de replicación (denominada “persistencia de *Chlamydia*” o “respuesta de estrés de *Chlamydia*”). En este estado, *Chlamydia* se adapta a condiciones adversas priorizando funciones celulares requeridas para una supervivencia duradera. Cuando las bacterias detectan que la condición de estrés ha cesado, salen de la persistencia y reanudan la replicación y generación normal de la

progenie infecciosa. Los factores de *Chlamydia* y los mecanismos moleculares necesarios para la ejecución exitosa de cada uno de estos pasos permanecen poco elucidados.

Diversos estímulos desencadenan la persistencia de *Chlamydia in vitro*

Una variedad de estímulos inducen la persistencia de *Chlamydia*; incluidos varios antibióticos, por ejemplo fosmidomicina que inhibe la síntesis de peptidoglicano, o los beta-lactámicos que inhiben el *cross-linking* del mismo; interferón gamma (IFN γ);, privación de nutrientes esenciales (es decir, hierro, aminoácidos, glucosa); *shock* térmico; componentes que se encuentran en el humo del cigarrillo; exposición a la adenosina; infección por el clamidia-fago y coinfección con el virus del herpes simple o el virus de la diarrea epidémica porcina (Beatty et al., 1994b; Hsia et al., 2000; Wiedeman et al., 2005; Huston et al., 2008; Pettengill et al., 2009; Vanover et al., 2010; Schoborg, 2011; Prusty et al., 2012; Schoborg and Borel, 2014; Slade et al., 2019). La diversidad de estímulos que pueden provocar persistencia, sugiere que *Chlamydia* no responde por igual a todos ellos. Este concepto está respaldado por varios estudios que muestran que las respuestas transcripcionales desencadenadas son significativamente diferentes según el modelo de persistencia utilizado (Mathews et al., 2001; Belland et al., 2003; Gerard et al., 2004; Goellner et al., 2006; Ouellette et al., 2006; Maurer et al., 2007; Brinkworth et al., 2018). Entre los diferentes modelos de persistencia, este trabajo de tesis se centrará en los dos que se han estudiado más profundamente: el antibiótico beta-lactámico penicilina y el IFN γ , una citoquina que es fundamental para la inmunidad innata y adaptativa.

Persistencia inducida por penicilina

Como miembro de la familia de antibióticos beta-lactámicos, las penicilinas ejercen su actividad antimicrobiana al bloquear el *cross-linking* del peptidoglicano, un paso clave en la síntesis de la pared celular en las bacterias. El mecanismo general de acción de los antibióticos beta-lactámicos es la inactivación de las proteínas de unión a la penicilina (PBP) al atacar su dominio transpeptidasa. Las PBP catalizan el último paso en la síntesis de peptidoglicanos, que es el *cross-linking* de cadenas laterales de pentapéptidos por una reacción de transpeptidación. Debido a la similitud estructural de los beta-lactámicos con el D-Ala-D-Ala terminal del precursor pentapéptido, que es el sustrato natural de las PBP, estos antibióticos forman un enlace covalente acilo-enzima estable con las PBP que bloquea su actividad de *cross-linking* de peptidoglicano (Sauvage et al., 2008). Como estos enlaces cruzados son fundamentales para conferir fuerza estructural y rigidez a las paredes celulares bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas, los

beta-lactámicos generalmente conducen a la lisis de las bacterias debido a las altas presiones osmóticas internas.

La exposición a la penicilina en cultivos celulares proporcionó la primera evidencia de la persistencia clamidial y los primeros modelos *in vitro* para estudiar este fenómeno [revisado en (Beatty et al., 1994b)]. En estas condiciones, la transición de EB a RB no se bloquea, pero una vez en la etapa de RB, la división celular se frena, las inclusiones son pequeñas y están pobladas por solo unos pocos RB agrandados y se detiene la diferenciación de RB a EB hasta que el antibiótico se elimina (Galasso and Manire, 1961; Matsumoto and Manire, 1970; Skilton et al., 2009). Otra característica de la persistencia inducida por la penicilina es que la inhibición de la división de celular se acompaña de la acumulación de ARNr 16s y de una reducción parcial en la replicación de ADN genómico o plasmídico (Lambden et al., 2006; Ouellette et al., 2006; Skilton et al., 2009; Kintner et al., 2014). Sorprendentemente, un análisis detallado en video-microscopía del desarrollo de *C. trachomatis* durante la persistencia inducida por penicilina mostró que, en la fase de recuperación, a pesar de que los aRB permanecen observables dentro de la inclusión, los RB normales se generan de forma asincrónica a través de un proceso parecido a la gemación (Skilton et al., 2009).

Un estudio relativamente reciente llevó a cabo un análisis cuidadoso del efecto causado por los beta-lactámicos en la serovariedad E (Kintner et al., 2014). En este estudio, se infectaron monocapas de células HeLa con *C. trachomatis* expuestas a una variedad de antibióticos beta-lactámicos en concentraciones fisiológicamente relevantes, incluidas 6 penicilinas diferentes (penicilina G, penicilina V, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina y piperacilina). La adición de cualquiera de las penicilinas analizadas en el momento de la infección, no impidió la formación de la inclusión, aún en concentraciones 100 veces más altas que la concentración sérica fisiológica. Sin embargo, las inclusiones eran pequeñas y contenían aRBs. Además, Kintner et al. demostraron que si se agregan penicilinas 24 horas después de la infección, cuando ya están establecidas las inclusiones, se induce la formación de aRB y se reduce la producción de progenie infecciosa en un 95%. Curiosamente, los beta-lactámicos que no pertenecen al grupo de la penicilina, como el monobactámico aztreonam y las cefalosporinas ceftriaxona o cefotaxima, no parecieron afectar el tamaño de la inclusión, la morfología o la generación de progenie infecciosa, lo que indica que no todos los beta-lactámicos desencadenan la misma respuesta (Kintner et al., 2014). La relevancia de estas observaciones es que podrían imitar escenarios clínicamente importantes que se producen cuando los pacientes infectados asintóticamente con *Chlamydia*, reciben prescripciones de beta-lactámicos debido a otras infecciones concomitantes.

Chlamydia codifica dos PBP de alto peso molecular que sintetizan peptidoglicano, PBP-2 y PBP-3/FtsI, lo que significa que posee el blanco natural de los antibióticos beta-lactámicos (Barbour et al., 1982; Ouellette et al., 2012; Jacquier et al., 2014; Packiam et al., 2015). Por lo tanto, la inhibición de la producción de peptidoglicano, que conduce a una interrupción en la síntesis de la pared celular, puede ser una condición estresante que desencadena la persistencia de *Chlamydia* en presencia de estos antibióticos.

La base molecular de la respuesta de *Chlamydia* al estrés causado por la exposición a las penicilinas todavía está poco caracterizada (Figura 4 A). Un análisis transcripcional realizado en *C. pneumoniae* durante la persistencia inducida por la penicilina, mostró que los genes tardíos *euo*, *omcB* y *hctB*, implicados en la diferenciación de RB a EB, no se inducen incluso a las 48 horas de infección, lo que sugiere fuertemente que en esta condición el perfil de expresión se parece al de la etapa RB (Ouellette et al., 2006). Otro trabajo encontrado reveló que la transcripción génica tardía también disminuye durante la persistencia inducida por penicilina en *C. psittaci*, mientras que aumenta la transcripción de los genes de respuesta al estrés *grpE* y *groES* (Goellner et al., 2006). Además, se ha informado que la proteasa/chaperona de respuesta al estrés HtrA y la transcripción de su gen, conservado en todas las especies de *Chlamydia*, se incrementan durante la persistencia inducida por la penicilina (Huston et al., 2008; Di Pietro et al., 2012). En línea con ello, el tratamiento con el inhibidor de HtrA JO146 perjudica gravemente la producción de progenie infecciosa durante la recuperación de la persistencia inducida por penicilina en *C. trachomatis*, lo que sugiere que esta proteasa desempeña un papel en el proceso de reversión (Ong et al., 2013).

Persistencia inducida por interferón gamma

El IFN γ es una citoquina pleiotrópica secretada principalmente por linfocitos T y células NK, con funciones clave en la regulación de las respuestas inmunes y en la defensa del hospedador contra patógenos, incluida *Chlamydia* (McClarty et al., 2007; Billiau and Matthys, 2009). Inicialmente identificado como un factor antiviral (Wheelock, 1965), el IFN γ ejerce efectos antimicrobianos en *Chlamydia* [revisado en (Beatty et al., 1994b)]. Byrne y colaboradores encontraron que el IFN γ restringía el crecimiento de *C. psittaci* en células T24 uroepiteliales humanas y que este efecto se debía al aumento del catabolismo del aminoácido esencial triptófano dentro de la célula hospedadora (Byrne et al., 1986). Propusieron que el agotamiento de las reservas intracelulares de triptófano ocurre debido al aumento de la actividad mediada por el IFN γ de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima catabólica que degrada el triptófano en N-formilkinurenina y kinurenina. De hecho, el aumento de la actividad de IDO y el

agotamiento del triptófano son responsables de la inhibición del crecimiento inducida por IFN γ de *C. trachomatis* B en células epiteliales conjuntivales humanas (Rapoza et al., 1991). Poco después, un artículo de Beatty y colaboradores describió que en presencia de IFN γ , *C. trachomatis* desarrolla una infección persistente “caracterizada por el desarrollo de formas clamidiales atípicas no infecciosas, de las cuales la progenie infecciosa solo se puede recuperar cuando el IFN γ es eliminado del sistema de cultivo” (Beatty et al., 1993). Un estudio de seguimiento confirmó que la privación de triptófano mediada porIDO fue responsable de la inducción por IFN γ de una forma persistente de *C. trachomatis* en cultivo celular (Beatty et al., 1994a). Se han realizado observaciones similares en *C. pneumoniae* (Pantoja et al., 2001). Todos estos hallazgos son consistentes con la idea de que *Chlamydia* experimenta el estado persistente para evadir los efectos antimicrobianos causados por la privación mediada por IFN γ de un aminoácido para el cual estas bacterias son auxótrofas.

Independientemente de la privación del triptófano, los efectos antimicrobianos desencadenados por el IFN γ durante la infección por *Chlamydia* incluyen las GTPasas p47 relacionadas con la inmunidad (IRG) y las proteínas de unión a guanilato (GBP), que pueden restringir la replicación de *C. trachomatis* en células de ratón y humanas, respectivamente (Bernstein-Hanley et al., 2006; Tietzel et al., 2009). En las células de ratón, para las cuales la actividad de laIDO en respuesta a la estimulación con IFN γ es variable (Roshick et al., 2006), las proteínas IRG median la asociación de las inclusiones de *C. trachomatis* con la ubiquitina, lo que lleva al reconocimiento por GBPs y la eliminación de patógenos (Haldar et al., 2015). Por otro lado, el patógeno de ratón *C. muridarum* ha desarrollado resistencia a la ubiquitinación de la inclusión mediada por IRG en células de ratón (Coers et al., 2008; Haldar et al., 2015), pero es susceptible a la ubiquitinación y eliminación independiente de IRG en células humanas (Haldar et al., 2016). Curiosamente, en las células humanas, las GBPs se localizan en la membrana de la inclusión de *C. trachomatis* y contribuyen a los efectos microbicidas del IFN γ (Tietzel et al., 2009), pero a diferencia de *C. muridarum*, *C. trachomatis* bloquea la ubiquitinación inducida por IFN γ de inclusiones, lo que lleva a una mayor resistencia al *clearance* (Haldar et al., 2016). Estos datos resaltan que distintas vías de defensa celular autónomas mediadas por IFN γ operan en células humanas y de ratón en respuesta a la infección por *Chlamydia*.

Es de gran interés comprender las bases moleculares de la persistencia de *Chlamydia* en respuesta al IFN γ (Figura 4 B). Belland y colaboradores catalogaron los transcriptos de *C. trachomatis* serovar D que estaban aumentados o disminuídos en un modelo de persistencia inducida por IFN γ y en la reactivación en células HeLa (Belland et al., 2003). Estos investigadores demostraron que en presencia de IFN γ , los genes de *Chlamydia* implicados en la biosíntesis de

triptófano, la reparación y recombinación del ADN, el metabolismo de los fosfolípidos, la respuesta al estrés y la traducción de proteínas estaban incrementados a nivel transcripcional. Por otro lado, disminuyó la transcripción de los genes relacionados con la proteólisis, el transporte de péptidos, el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Ouellette et al., 2006), la división celular y la diferenciación de RB a EB. En particular, el transcriptoma de *C. trachomatis* durante la persistencia inducida por IFN γ está de acuerdo con las propiedades bien establecidas atribuidas a los aRB: un freno en la división celular y la generación de la progenie infecciosa. Del mismo modo, el trabajo de Byrne et al. reveló que los genes implicados en la replicación, reparación y recombinación del cromosoma se transcriben durante la persistencia inducida por IFN γ en las células HEp2 infectadas por *C. pneumoniae*, mientras que la transcripción de los genes relacionados con la citocinesis está disminuida (Byrne et al., 2001). Un estudio informó que los genes implicados en la diferenciación de RB a EB estaban aumentados a nivel transcripcional en la infección por *C. pneumoniae* en presencia de IFN γ (Ouellette et al., 2006). Aunque esto no está totalmente de acuerdo con otros reportes anteriores (Belland et al., 2003; Goellner et al., 2006), las aparentes inconsistencias pueden deberse a diferentes métodos de normalización (es decir, 16s rRNA vs. *gyrA* vs. contenido de DNA) utilizados para el análisis de datos de transcripción (Schoborg, 2011).

Debido a que los datos transcripcionales no siempre se correlacionan con los perfiles de expresión de proteínas, los estudios proteómicos pueden ser herramientas muy útiles para investigar las bases moleculares de la persistencia. Como se muestra en la Figura 4 B, el análisis proteómico realizado en *C. pneumoniae* durante la persistencia inducida por IFN γ , encontró niveles elevados de proteínas involucradas en la respuesta al estrés, biosíntesis de nucleótidos y aminoácidos, replicación del ADN, transcripción, traducción, glucólisis, secreción de tipo III y envoltura celular (Molestina et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2006). Además, Ostergaard y colaboradores utilizaron un enfoque proteómico sin marcadores (“*label-free*”) y llevaron a cabo la primera comparación completa de EBs, RBs y aRBs inducidos por IFN γ en *C. trachomatis* Ser D (Ostergaard et al., 2016). Cabe destacar que este estudio descubrió que el proteoma de los aRB era muy similar al de los RB, excepto que expresaban niveles muy altos de triptófano sintasa (subunidades TrpA y TrpB), que pueden transformar el indol en triptófano. Este hallazgo está de acuerdo con los datos transcriptómicos mencionados anteriormente (Belland et al., 2003). Se ha propuesto que la Trp sintasa, no funcional en los serovares oculares, podría proporcionar una vía de rescate contra el agotamiento del triptófano para las serovariedades genitales de *C. trachomatis*, dada su coexistencia con la microbiota productora de indol en el tracto genital femenino (Caldwell et al., 2003; Aiyar et al., 2014; Ziklo et al., 2016a; Ziklo et al., 2016b). La Trp

sintasa de serovares genitales de *C. trachomatis* es capaz de utilizar el indol para la biosíntesis de triptófano (Fehlner-Gardiner et al., 2002; Ziklo et al., 2016b) y la transformación de un aislamiento ocular con el operón funcional le confiere un fenotipo rescatable por indol (O'Neill et al., 2018). De hecho, un mutante nulo en el gen *trpB* de *C. trachomatis* serovar D puede recuperarse completamente de la persistencia inducida por IFN γ tras la adición de Trp pero no de indol (Kari et al., 2011). Un estudio reciente ha demostrado que la selección genética que se ha dado en las seroviedades oculares en contra de mantener esta enzima activa podría ser debido a la reacción de deaminación de la serina llevada a cabo por la Trp sintasa que da lugar a piruvato y amonio. Esta reacción ocurre en ausencia de indol y el amonio generado es deletéreo. Esto indica que un microbioma vaginal “normal” que no posee productores de indol favorecería el *clearance* de *Chlamydia* ya que: previene la síntesis de Trp a partir de indol para resistir al IFN γ y permite la deaminación de la serina. Por el contrario, un microbioma en disbiosis con productores de indol impediría el *clearance* favoreciendo a la bacteria (Sherchand and Aiyar, 2019). Otro hallazgo notable del estudio proteómico de Ostergaard et. al fue que los aRB expresaron niveles generales más bajos de proteínas con alto contenido de triptófano, lo que refleja a nivel de proteoma, la lucha para resistir la restricción de triptófano impuesta por el IFN γ (Ostergaard et al., 2016). Esto está de acuerdo con la observación de que las *Chlamydiaceae* se han sometido a una selección evolutiva de proteínas con un contenido de triptófano inferior al promedio, que puede operar durante el estado persistente desencadenado por la falta del triptófano (Bonner et al., 2014). Ouellette y colaboradores encontraron que durante la restricción de triptófano inducida por IFN γ , *C. pneumoniae* acumula transcritos ricos en codones de Trp, probablemente como resultado del estancamiento del ribosoma en los codones de Trp (Ouellette et al., 2016; Ouellette et al., 2018). Esto podría explicar parcialmente un reporte anterior que muestra que, en respuesta a la restricción de triptófano, *C. pneumoniae* experimenta un aumento de la transcripción pero una traducción ineficiente, lo que indica un aparente desacoplamiento de estas dos vías (Ouellette et al., 2006).

Debido a que *Chlamydia* ha sido históricamente refractaria a la manipulación genética, el papel de los genes individuales involucrados en la persistencia está pobremente definido. Desde hace relativamente poco tiempo, se encuentran disponibles algunas herramientas para el análisis genético de *Chlamydia*, aunque todavía son limitadas en comparación con otras bacterias como se discute en la siguiente sección. Hasta la fecha, solo hay un reporte de un enfoque sistemático para dilucidar las bases genéticas de la persistencia de *Chlamydia* (Muramatsu et al., 2016). Muramatsu et al. usaron una colección de ~ 2.000 cepas de LGV-L2 de *C. trachomatis*, químicamente mutagenizadas y marcadas con GFP, para detectar mutantes que exhiben una

capacidad reducida para reactivarse del estrés inducido por IFN γ . El *screening* consistió en infectar en paralelo células HeLa pretratadas o no, durante 24 h con IFN γ 10 ng/mL, con cada mutante individualmente. La condición no tratada se fijó a las 24 horas posteriores a la infección (hpi), mientras que los tratados con IFN γ fueron lavados a las 24 hpi y se incubaron durante 24 h adicionales en medios de cultivo suplementados con indol antes de la fijación. Al comparar la proporción del número de inclusiones formadas en “condición no tratada”/“recuperación” para cada mutante, se identificaron 6 mutantes sensibles a la persistencia inducida por IFN γ y, en 3 de ellas, se identificó la mutación causal. Estas fueron mutaciones sin sentido en TrpB (subunidad de triptófano sintasa), CTLO225 (probable pequeño transportador de aminoácidos neutros) y CTLO694 (hipotética oxidoreductasa). Curiosamente, todas estas mutantes pudieron entrar en un estado persistente en presencia de IFN γ y no se reactivaron al agregar triptófano o indol, pero mostraron diferentes sensibilidades a IFN γ (Muramatsu et al., 2016), destacando el impacto relativo de mutaciones en la función de las proteínas y la posible implicancia de diferentes genes de *Chlamydia* en la persistencia.

Un principio general para la relevancia biomédica de los experimentos de cultivo de células es que las condiciones deben parecerse lo más posible a la situación *in vivo*. En este contexto, un estudio investigó la influencia de los niveles de oxígeno en la persistencia inducida por IFN γ (Roth et al., 2010). Roth y sus colaboradores razonaron que, en el tracto genital femenino, *C. trachomatis* debe sobrevivir bajo hipoxia (concentraciones de oxígeno <5%), mientras que la mayoría de los experimentos *in vitro* se realizan en normoxia. Según este estudio, el cambio de los niveles de oxígeno de normoxia a hipoxia mediante el uso de células de las trompas de Falopio humanas *in vitro* y *ex vivo*, se correlacionó con una reducción de la actividad anticlamidial del IFN γ contra los serovares genitales pero no oculares de *C. trachomatis* y con niveles reducidos deIDO bajo hipoxia (Roth et al., 2010). Otros investigadores evaluaron posteriormente la actividad de los antibióticos anticlamidiales de primera línea contra *C. trachomatis* L2 en células HeLa durante la persistencia inducida por IFN γ en hipoxia versus normoxia, y observaron que la eficacia de las concentraciones subinhibitorias de azitromicina para erradicar *C. trachomatis* se redujo moderadamente bajo la hipoxia (Shima et al., 2013). Teniendo en cuenta que las concentraciones celulares de oxígeno no se midieron, la relevancia fisiológica de estas observaciones no está clara. Sin embargo, estos estudios destacan que las condiciones experimentales utilizadas para estudiar la persistencia de *Chlamydia in vitro* deben considerarse cuidadosamente, ya que pueden tener efectos profundos en los resultados, su interpretación y extrapolación para la situación *in vivo*.

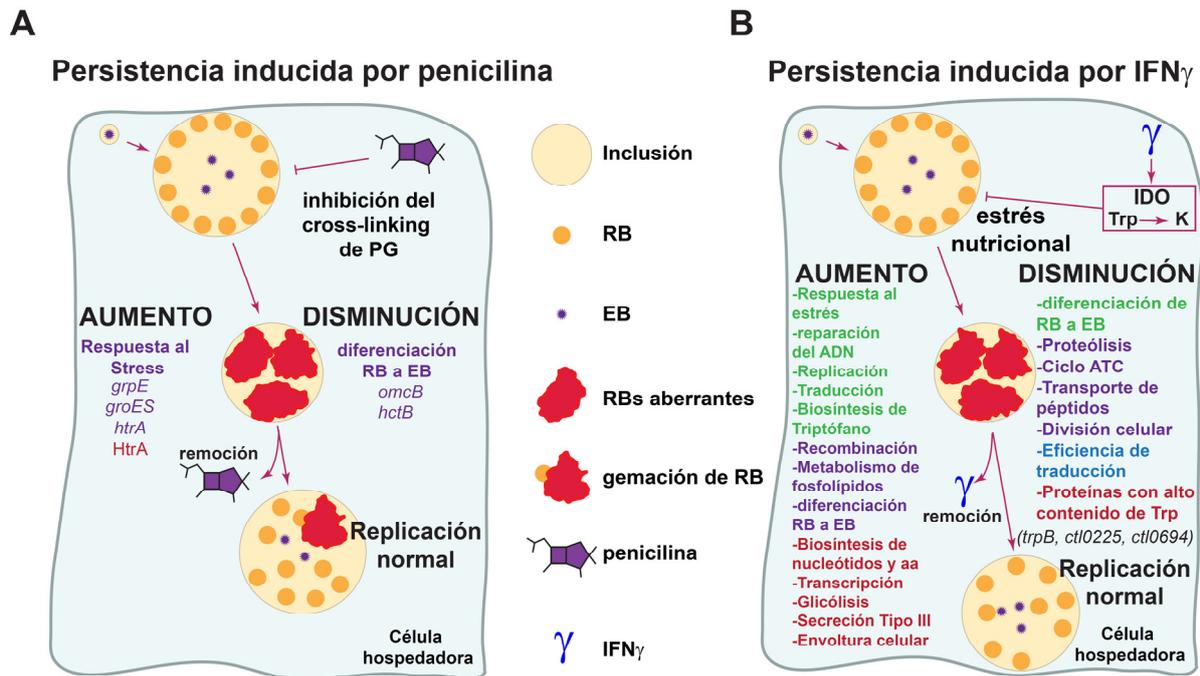


Figura 4: Modelo para las bases moleculares de la evasión clamidial de la actividad antimicrobiana provocada por penicilina e IFN γ . Las penicilinas inhiben el *cross-linking* del peptidoglicano (PG), lo que conduce a la interrupción de la síntesis de la pared celular. *Chlamydia* responde a este estrés disminuyendo la transcripción de los genes necesarios para la transición de RB a EB (*omcB*, *hctB*), interrumpiendo la división celular y adoptando una morfología aberrante y agrandada (RB aberrante) (Goellner et al., 2006; Ouellette et al., 2006). La transcripción de los genes asociados a las respuestas al estrés aumenta (*grpE*, *groES*, *htrA*) (Goellner et al., 2006; Di Pietro et al., 2012). Durante esta etapa, la bacteria es capaz de “persistir” por largos períodos de tiempo en un estado viable pero no cultivable y la generación de progenie infecciosa es abolida. Cuando se elimina la penicilina, *Chlamydia* sale de la persistencia y reanuda la generación de RB normales, que pueden originarse a partir de aRB a través de un proceso similar a la de la gemación. La proteasa/chaperona HtrA puede participar en la reversión de la persistencia inducida por penicilina (Huston et al., 2008; Ong et al., 2013). Se indican los procesos/genes/proteínas que se han reportado regulados hacia arriba y hacia abajo durante la persistencia inducida por penicilina. Los datos basados en estudios transcripcionales o de proteínas se resaltan en violeta y rojo, respectivamente. **B.** El IFN γ es una citoquina con roles clave en la defensa del hospedador contra patógenos, incluida *Chlamydia*. El IFN γ activa la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), lo que causa la degradación del triptófano (Trp) en quinurenina (K) y desencadena el estrés nutricional en esta bacteria. En respuesta a este estrés, *Chlamydia* entra en un estado persistente análogo a lo que se observa con la penicilina. En este estado, *Chlamydia* altera la transcripción y expresión de genes para modificar procesos biológicos clave y garantizar la supervivencia. Se indican los procesos/genes/proteínas que se han reportado regulados hacia arriba y hacia abajo durante la persistencia inducida por IFN γ . Los datos basados en estudios transcripcionales (Byrne et al., 2001) (Belland et al., 2003; Goellner et al., 2006; Ouellette et al., 2006) están indicados en violeta. Los datos basados en estudios de proteínas (Molestina et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2006; Ouellette et al., 2006; Ostergaard et al., 2016) se muestran en rojo. Los datos respaldados por los estudios de transcripción y proteómica se indican en verde. Los datos basados en la actividad global de la ruta de traducción se muestran en azul. Es notable que la transcripción de genes de diferenciación de RB a EB se ha encontrado aumentada y disminuida en diferentes estudios, como se explica en el manuscrito. *trpB* (triptófano sintasa), *ctl0225* (probable transportador de aminoácidos neutros) y *ctl0694* (una hipotética oxidoreductasa) desempeñan un papel en la reversión de la persistencia inducida por IFN γ en *C. trachomatis* (Muramatsu et al., 2016).

Implicancias de la persistencia *in vivo*

Durante la infección de sus hospedadores, *Chlamydia* se encuentra con el estrés impuesto por la respuesta inmune o, eventualmente, por la administración de agentes antimicrobianos. A la luz de los hallazgos experimentales discutidos anteriormente, es razonable especular que *Chlamydia* puede entrar en un estado persistente *in vivo*. Sin embargo, la evidencia es hasta ahora indirecta. Una evidencia de que la persistencia puede ocurrir *in vivo*, proviene de la observación directa de aRBs en tejidos infectados. Por ejemplo, mediante microscopía electrónica con marcación de partículas de oro, se han observado aRBs para *C. pneumoniae* en tejido aterosclerótico de pacientes humanos (Borel et al., 2008). De manera similar, los aRBs se detectaron para *C. suis* mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica con inmunomarcación con partículas de oro en el intestino de cerdos infectados naturalmente (Pospischil et al., 2009). Además, se observaron RBs aberrantes de *C. muridarum* presentes en células endocervicales utilizando un modelo de infección del tracto genital en ratones hembra (Rank et al., 2011; Phillips Campbell et al., 2012). También se identificó la presencia de aRBs en células endocervicales obtenidas de una mujer con cervicitis por *C. trachomatis* (Lewis et al., 2014). Si bien la observación de aRB en tejidos infectados no indica necesariamente una infección persistente, la capacidad ampliamente demostrada de *Chlamydia* para causar infecciones persistentes, asintomáticas, crónicas y reactivaciones aparentes, es muy sugestiva. Un estudio reciente, ha demostrado la presencia de mutaciones en el gen *trpA* en aislados de muestras urogenitales de una mujer que presentaba infecciones recurrentes en 4 años a pesar del tratamiento antibiótico. Estos aislados presentaban mutaciones idénticas y forman cuerpos aberrantes en presencia de IFN γ e indol, mostrando la incapacidad de recuperarse normalmente del estrés inducido por la citoquina. Estas mutaciones, probablemente permitieron la persistencia clamidial *in vivo*, regresando a la infección activa cuando aumentaban los niveles de triptófano (Somboonna et al., 2019). Una observación clínica que respalda aún más el caso de la persistencia *in vivo* es la uretritis post-gonocócica. Una proporción de pacientes tratados con penicilina por gonorrea en los años 60 y 70 desarrollaban uretritis post-gonocócica causada por *C. trachomatis* (Richmond et al., 1972). Se ha informado que *C. trachomatis* se recupera en 11-50% de los pacientes con uretritis gonocócica, y 75-100% de estos pacientes pueden desarrollar uretritis post-gonocócica después del tratamiento con un antibiótico ineficaz para *Chlamydia*, como la penicilina o cefalosporinas (Augenbraun, 2015). Mientras que los beta-lactámicos pueden tener éxito en la eliminación de *Neisseria gonorrhoeae*, solo pueden inducir un estado persistente en *Chlamydia*. Por lo tanto, la uretritis post-gonocócica podría concebirse como la manifestación clínica de la reactivación de *Chlamydia* después de completar el régimen de beta-lactámicos en pacientes con gonorrea coinfectados con *C.*

trachomatis. Otra evidencia indirecta de la reactivación es la observación repetida de inmigrantes aparentemente sanos procedentes de áreas endémicas que, décadas después, sufren tracoma activo en ausencia de una re-exposición identificable (Thygeson, 1963). De manera similar, basado en los modelos de infección en ratones, *C. pneumoniae* puede reactivarse en los pulmones semanas después de la inoculación inicial después del tratamiento con cortisona, pero no en animales inmunocompetentes, lo que sugiere que las respuestas inmunitarias anti-*Chlamydia* desencadenan la entrada de estas bacterias a un estado persistente en los tejidos infectados (Malinverni et al., 1995; Laitinen et al., 1996). Además, la detección de antígenos de *Chlamydia*, ADN o ARN en muestras clínicas en ausencia de cultivabilidad, es consistente con un estado persistente que ocurre *in vivo* (Hogan et al., 2004). Por ejemplo, se detectaron antígenos o ADN de *C. trachomatis* en muestras de biopsia de mujeres con infertilidad tubárica post-infecciosa, con cultivo negativo, incluso después del tratamiento con antibióticos (Patton et al., 1994). Además, el ADN y el ARN de *C. trachomatis* se han detectado semanas después de que los cultivos ya fueran negativos en un modelo de infección de tracoma basado en monos cynomolgus (Holland et al., 1992). Sin embargo, debe señalarse que la detección de ADN, ARN o antígenos no indica necesariamente la presencia de organismos viables y, por lo tanto, no es una evidencia concluyente de un fenotipo persistente *in vivo*. Es importante destacar que un reciente análisis de la secuencia del genoma completo a partir de muestras clínicas/aislamientos presentó pruebas convincentes de que la misma cepa de *C. trachomatis* puede persistir durante 3 a 5 años en el tracto genital femenino, independientemente del tratamiento antibiótico regular y sin ninguna o pocas mutaciones genómicas acumuladas (Suchland et al., 2017). Esto indica que la estrategia de *Chlamydia* para persistir en la célula hospedadora no es mutacional, sino que dependería de la orquestación de una respuesta específica orientada a evitar la eliminación de estos patógenos.

Si la persistencia ocurre *in vivo*, un escenario probable es que una fracción de la bacteria *Chlamydia* entra en un estado persistente en el hospedador en respuesta a condiciones de crecimiento desfavorables, como las que surgen del tratamiento con antibióticos o en presencia del IFN γ producido por las células inmunitarias en respuesta a la infección. La persistencia clamidial podría entonces contribuir al establecimiento de infecciones crónicas y mínimamente sintomáticas que se consideran críticas para el daño tisular a largo plazo y la patogénesis de las enfermedades por *Chlamydia*.

Existe un único modelo animal disponible actualmente para estudiar la persistencia de *Chlamydia in vivo* (Phillips Campbell et al., 2012). Al infectar con *C. muridarum* el tracto genital de ratones BALB/c hembra tratados con amoxicilina estos investigadores hicieron varios hallazgos significativos: i) *C. muridarum* entra en un estado no infeccioso viable en el tracto

genital; ii) la acumulación de ARNr pre-16s de *Chlamydia* no se ve afectada; iii) se observan aRB en el tejido infectado y iv) se da un pico de generación de partículas infecciosas luego de finalizado el tratamiento con amoxicilina. Estos hallazgos indican que la persistencia de *Chlamydia*, como se define en el cultivo de células, puede ocurrir *in vivo* durante el tratamiento con amoxicilina. Otra observación relevante es que la persistencia inducida por amoxicilina en ratones infectados intravaginalmente con *C. muridarum*, resulta en un mayor fracaso del tratamiento posterior con el antibiótico anti-clamidal de primera elección, azitromicina (Phillips-Campbell et al., 2014). Estas observaciones concuerdan con los resultados anteriores obtenidos en los modelos de infección de cultivos celulares (Wyrick and Knight, 2004). Entonces, parece una consideración clínica razonable que la persistencia de *Chlamydia* inducida por penicilina puede conferir una mayor resistencia a otros antibióticos, incluidos los medicamentos de primera elección contra la *Chlamydia*.

Manipulación genética en *Chlamydia*

Desafíos

La falta de herramientas para la manipulación genética molecular de *Chlamydia* ha sido un gran impedimento para los investigadores que debían confiar en sistemas sustitutos e inferencias basadas en similitudes entre las proteínas de *Chlamydia* y factores de virulencia previamente caracterizados en otras bacterias patógenas (lo que es de ayuda limitada en una bacteria evolutivamente distante de todas las demás). El panorama ha cambiado en los últimos años, con una expansión de la caja de herramientas de genética molecular, ahora disponible para la investigación de un patógeno que se consideraba genéticamente “intratable” [revisado en (Julie A. Brothwell, 2018), (Sixt and Valdivia, 2016), (Bastidas and Valdivia, 2016), (Valdivia and Bastidas, 2018)]. El estilo de vida intracelular obligado y el nicho intracelular “protegido” limitan las oportunidades para que *Chlamydia* intercambie material genético con otros microorganismos y plantea barreras para su manipulación genética en el laboratorio. La introducción de ADN exógeno mediante transformación podría apuntar a la etapa EB o RB. Dentro de la célula hospedadora, los RBs no son fácilmente accesibles al ADN exógeno, que necesitaría traspasar cuatro membranas (membrana plasmática, membrana de la inclusión y membrana externa e interna bacteriana) para alcanzar el citosol bacteriano. Si bien puede parecer más factible apuntar a la etapa EB para la transformación, esta forma estable desde el punto de vista ambiental tiene una pared celular gruesa y rígida, un nucleoide altamente condensado y una actividad metabólica reducida. Por lo tanto, los EBs pueden ser naturalmente menos propensos a captar e integrar el ADN extraño. Probablemente el impedimento más importante en la disección genética de la

patogénesis clamidial es que estos organismos deben propagarse en las células hospedadoras y no se han encontrado aún medios de cultivo axénicos útiles para *Chlamydia*. Para avanzar en los sistemas de manipulación genética también se requiere una mejora en la eficiencia de transformación, que podría alcanzarse al comprender mejor los mecanismos de captación y recombinación del ADN en *Chlamydia*. Otro impedimento son las restricciones en el uso de antibióticos como marcadores de selección debido a su uso clínico. De acuerdo con las pautas de tratamiento de enfermedades de transmisión sexual de 2010 establecidas por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU. (Workowski et al., 2010), la tetraciclina, azitromicina, doxiciclina, eritromicina, levofloxacina, ofloxacina y amoxicilina deben usarse exclusivamente para regímenes de tratamiento clínico y están prohibidos en la generación de recombinantes. Además, la introducción de β -lactamasas en serovariedades urogenitales también está restringido debido al potencial uso de β -lactámicos para el tratamiento de mujeres infectadas que están embarazadas. Nuevos desafíos que quedan por abordar tienen que ver, por ejemplo, con mejorar el éxito de las complementaciones y el desarrollo de nuevos reactivos y/o herramientas. Muchos genes de *Chlamydia* se expresan diferencialmente a lo largo del ciclo regulados por factores de transcripción, factores sigma, y cambios en la topología del ADN; por ende las fallas en intentos de complementación génica podrían estar asociadas a la falta de una correcta regulación de los niveles de expresión del gen de interés (Sixt and Valdivia, 2016).

Avances

Intercambio de ADN en *Chlamydia*

A pesar de los desafíos técnicos mencionados *Chlamydia* es capaz de intercambiar ADN naturalmente lo que permite aislar recombinantes resistentes a dos o más antibióticos a partir de coinfecciones con cepas resistentes a cada uno de ellos. El mecanismo por el cual ocurre este evento todavía no ha sido dilucidado (Bastidas and Valdivia, 2016; Sixt and Valdivia, 2016).

Manipulación genética molecular

Generación de mutaciones aleatorias

Es posible introducir alteraciones genéticas aleatorias en los genomas microbianos mediante diversos métodos, como las transposiciones por inserción, la radiación UV y la exposición a sustancias químicas que dañan el ADN. La mutagénesis química fue la primera herramienta utilizada para generar librerías de mutantes que permiten un enfoque de genética directa y/o reversa (Kari et al., 2011; Kokes et al., 2015; Muramatsu et al., 2016) (Figura 5). La mutagénesis se realiza mediante la exposición de células infectadas a cualquiera de los compuestos alquilantes de ADN: metanosulfonato de etilo (EMS) o N-etil-N-nitrosourea (ENU), seguido de aislamiento

por ensayo de placa. Las lesiones genéticas causadas por el EMS (o ENU) son en su mayoría mutaciones puntuales (Sega, 1984), que es poco probable que tengan efectos polares significativos en la expresión de los genes circundantes. El acople de un *screening* fenotípico en una colección de mutantes químicas junto con la obtención de recombinantes entre las cepas mutantes de interés y una cepa Wt, el genotipo de las mismas por TILLING o secuenciamiento, y el análisis de las mutaciones presentes en las recombinantes permite realizar una asociación genotipo-fenotipo y determinar la/s mutación/es causantes del fenotipo. Por otra parte, recién en 2017, se publicó el primer trabajo con una mutante obtenida por inserción de un transposón en el gen *cdu-1* (Fischer et al., 2017).

Transformación

Las primeras transformaciones exitosas, pero transientes y poco eficientes, se llevaron a cabo mediante electroporación de EBs en 1994 (Tam et al., 1994). Sin embargo, actualmente el método elegido es aquel que publicó Wang en 2011 y que se basa en una transformación de EBs en presencia de CaCl₂ (Wang et al., 2011). Luego se reportó, como método de transformación de RBs, un método basado en dendrímeros, polímeros altamente ramificados que pueden introducir biomoléculas a las células. Aunque la eficiencia fue mayor, probablemente debido a una competencia natural en el estado RB, su uso no se ha extendido (Kannan et al., 2013).

La presencia de plásmidos naturales en *Chlamydia* complica la transformación con un plásmido foráneo. El plásmido original en *C. trachomatis* es altamente conservado, presenta 7.5 kb, es no conjugativo, no integrativo y mantiene hasta 8 copias por célula (Pickett et al., 2005; Ferreira et al., 2013). El número de copias de plásmidos introducidos en *C. trachomatis* es similar al del plásmido original (Wang et al., 2011; Wang et al., 2013), aunque los estudios con *C. muridarum* muestran un aumento en el número de copias (Liu et al., 2014a; Liu et al., 2014b). Todos los plásmidos que se han utilizado para transformar exitosamente *C. trachomatis* derivan del plásmido original y una vez dentro de la bacteria lo reemplazan por incompatibilidad plasmídica. Un compendio de los vectores disponibles para *C. trachomatis* LGV L2 se puede encontrar en una publicación relativamente reciente (Bastidas and Valdivia, 2016).

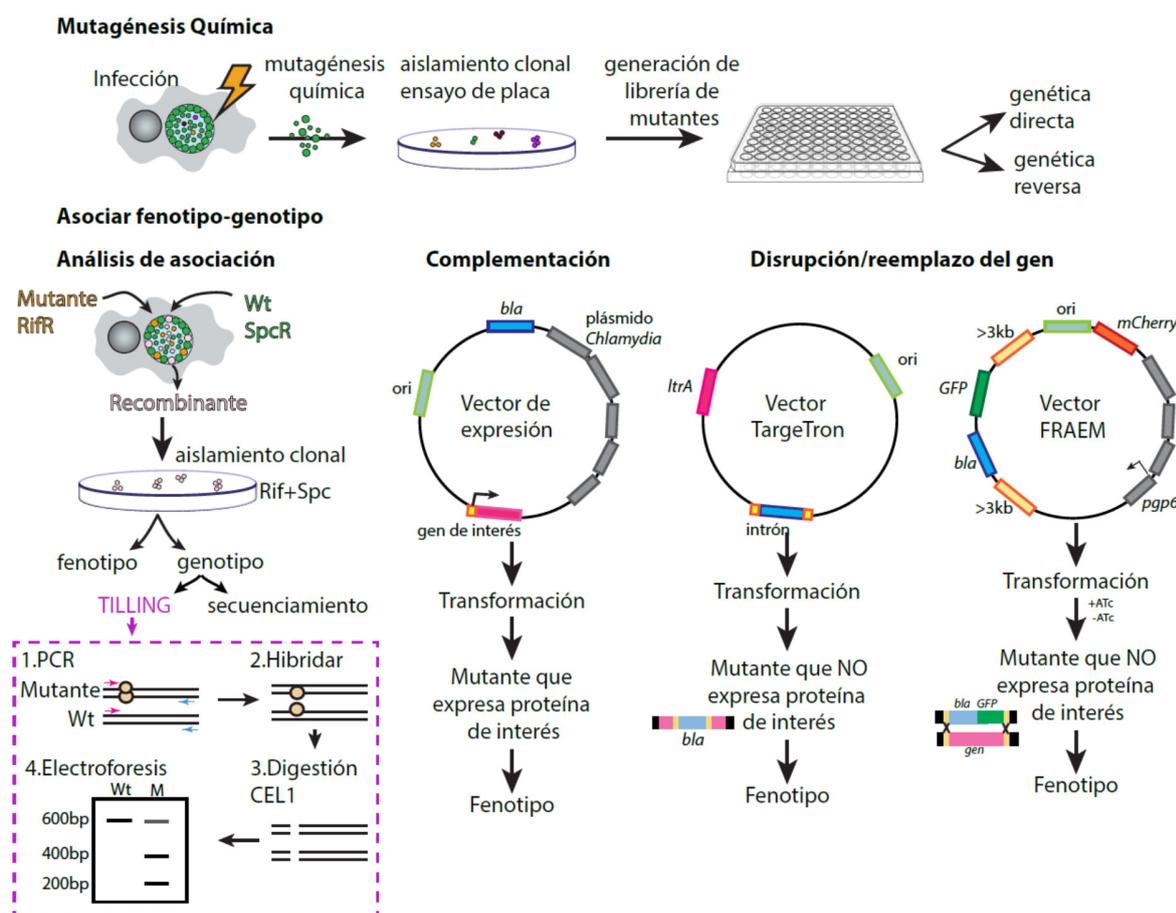


Figura 5: La caja de herramientas genéticas para *Chlamydia* spp. Adaptado de Sixt et al. (Sixt and Valdivia, 2016). **Panel superior:** Construcción de bibliotecas mutantes para aplicaciones genéticas directas e inversas: las células infectadas con *Chlamydia* se exponen a un químico mutagénico, seguido de un aislamiento clonal de la progenie. **Panel inferior:** Enfoques para vincular los fenotipos con una alteración genética específica. **(Izquierda)** El análisis de asociación explota la competencia natural de *Chlamydia* spp. (es decir, la formación de cepas recombinantes durante la coinfección con bacterias mutantes y Wt). Las recombinantes clonales se analizan para identificar mutaciones, por TILLING y/o secuenciamiento, que se heredan conjuntamente con un fenotipo de interés. TILLING permite un monitoreo de heteroduplex de ADN que se forman en el gen de interés salvaje y una copia mutante amplificadas por PCR. La nucleasa CEL1 escinde los sitios de apareamiento incorrecto y los fragmentos generados por la digestión son detectables en un gel de agarosa permitiendo identificar las mutaciones presentes en la recombinante de interés. **(Centro)** Los vectores permiten la complementación de mutantes en trans con el gen de tipo salvaje, y **(derecha)** el uso de intrones del grupo II o la disrupción con un *cassette* basada en homología permite la inactivación por inserción o el reemplazo alélico de genes, respectivamente, en bacterias Wt.

Manipulación genética sitio-dirigida: TargeTron/ FRAEM/ FLAEM/ CRISPi

La primera disrupción sitio-dirigida de un gen en el cromosoma clamidial se realizó en 2013 mediante la inserción de un intrón tipo II que puede dirigirse, mediante una modificación en su secuencia, a un sitio específico en el cromosoma (Figura 5). Los autores del trabajo adaptaron el sistema TargeTron (Sigma Aldrich) para generar mutantes que podían ser seleccionadas con

ampicilina (Johnson and Fisher, 2013) y posteriormente también con espectinomicina (Lowden et al., 2015) (Figura 36). Este sistema permite la obtención de mutantes que son estables a través de los pasajes en cultivo celular y en el tracto genital de ratones. La principal limitación del uso de este sistema es que solo ciertos sitios en el genoma pueden ser seleccionados para la inserción del intrón. Las inserciones pueden tener efectos polares en genes vecinos y el costo y tiempo para la generación de cada mutante es elevado. El plásmido utilizado es suicida.

Más recientemente, Mueller et al. desarrollaron un sistema para mutagénesis de intercambio alélico reportada por fluorescencia (FRAEM) (McKuen et al., 2017). Esta tecnología permite reemplazar en el cromosoma el gen de interés completo con un *cassette* que contiene una resistencia antibiótica y un marcador fluorescente. Este grupo desarrolló un plásmido que se replica condicionalmente en *C. trachomatis*, colocando CDS (*pgp6*), y por lo tanto la mantención del plásmido, bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina. Al remover el inductor, mientras que se selecciona con el antibiótico presente en el *cassette* flanqueado por la secuencia de *Chlamydia* en el plásmido, permite aislar cepas donde ocurra intercambio alélico. El *cassette* de selección contiene *bla* para la selección de recombinantes con penicilina, y GFP para monitorear la transformación e integración del *cassette* de selección en el cromosoma. La detección visual de eventos de cruce simple y doble (intercambio alélico) se facilita mediante un gen *mCherry* ubicado fuera del *cassette* de selección y las regiones de homología cromosómica flanqueantes. Las limitaciones incluyen su complejidad relativa, el riesgo de deleccionar secuencias no conocidas que actúen en cis y efectos polares. Con el objetivo de minimizar esos efectos *off-target* estos autores desarrollaron una nueva tecnología a la que llamaron FLAEM (*Floxed-Cassette Allelic Exchange Mutagenesis*, Mutagénesis de intercambio alélico de *cassette* flanqueado por sitios *lox P*) (Keb et al., 2018). La expresión condicional de la recombinasa Cre en una mutante con un *cassette* flanqueado por sitios *lox P* resulta en la eliminación del marcador y los efectos polares. Esta es la primera herramienta desarrollada que permite una disrupción génica limpia en *Chlamydia*. Esto abre la puerta para generar cepas de *Chlamydia* con múltiples eliminaciones de genes. Esto es especialmente ventajoso para *C. trachomatis* dado el pequeño número de marcadores seleccionables que están disponibles actualmente. Las cepas sin marcadores también tienen el beneficio adicional de limitar cualquier impacto que la expresión del marcador seleccionable pueda tener en el *fitness* de *Chlamydia* (Valdivia and Bastidas, 2018).

Mientras que TargeTron ya ha sido utilizado en varios laboratorios para contribuir al entendimiento de la patogénesis clamidial (Johnson and Fisher, 2013; Lowden et al., 2015; Weber et al., 2016; Sixt et al., 2017; Shaw et al., 2018), las estrategias más recientes FRAEM y FLAEM aún no han sido utilizados por otros grupos, quizás por la dificultad en el manejo del plásmido

que no es totalmente estable en *E.coli* (*Raphael Valdivia y Robert Bastidas, comunicación personal*).

Por último, muy recientemente ha sido demostrado que un sistema de interferencia CRISP (CRISPi) es factible en *C. trachomatis*. Este sistema está basado en la variante catalíticamente inactiva Cas9 de *Staphylococcus aureus* y permite de manera inducible y reversible reprimir la expresión génica (Ouellette, 2018). Representa un sistema útil para estudios basados en microscopía, pero no compatible con análisis a nivel poblacional. Las principales limitaciones son la inestabilidad del plásmido, efectos *off-target*, y niveles de expresión basal del promotor Tet.

Expresión ectópica de genes y complementación

Actualmente existe un repertorio de vectores con diferentes sitios de clonado (MCS), reporteros fluorescentes, promotores constitutivos o inducibles y marcadores de selección. Se puede acceder a tablas con resumen de vectores disponibles en publicaciones recientes (Bastidas and Valdivia, 2016; Cortina et al., 2019). Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron los plásmidos p2TK2-SW2 que permiten la expresión de mCherry, GFP o CFP (Agaisse and Derre, 2013) y vectores de la familia pBOMB (Bauler and Hackstadt, 2014) para complementar la expresión de las proteínas de interés en las mutantes nulas. Recientemente ha sido publicada una nueva familia de vectores “p2TK2Spec-SW2 mCh(GroL2)” que ventajosamente permiten la selección con espectinomicina en lugar de la tradicional penicilina y la expresión bajo un promotor nativo o inducible por tetraciclina en sus diferentes versiones (Cortina et al., 2019).

La expresión de proteínas fluorescentes es una herramienta útil para conocer el éxito de las transformaciones, la estabilidad del plásmido, realizar ensayos de adhesión e invasión, monitorear la infección en tiempo real por microscopía y hacer recuentos de bacterias por citometría (Wang et al., 2011; Agaisse and Derre, 2013; Ding et al., 2013; Gerard et al., 2013; Kannan et al., 2013; Wickstrum et al., 2013; Xu et al., 2013; Vromman et al., 2014).

La complementación de fenotipos mutantes con plásmidos fue aplicada por primera vez para el análisis de las proteínas efectoras TepP e InaC, confirmando su rol en el reclutamiento de proteínas del hospedador durante la infección y estableciendo un rol en la fragmentación del Golgi para InaC (Chen et al., 2014; Kokes et al., 2015). Es importante mencionar que la expresión de una proteína poco caracterizada unida a un tag permite, además, estudiar su localización intracelular por microscopía.

Identificación de genes importantes en persistencia

Muchas preguntas críticas con respecto a este fenómeno permanecen aún sin dilucidar: ¿Cómo es censado el daño? ¿Cómo se regula la persistencia? ¿Cómo entra y sale *Chlamydia* de la persistencia? ¿Cuáles son las bases genéticas para la persistencia en el contexto de diferentes estímulos e interacciones con el hospedador? ¿Qué genes de *Chlamydia* se requieren para la persistencia y cómo participan? ¿Se puede intervenir para evitar que esta bacteria entre o salga de la persistencia? ¿Cuáles son las consecuencias de tales intervenciones para la patogénesis *in vivo*? Las herramientas emergentes para las manipulaciones genéticas en *Chlamydia* han dado paso a un nuevo y emocionante tiempo para la investigación en este campo, lo que abre la posibilidad de abordar esas y otras preguntas relevantes sobre la persistencia. Es por ello que este trabajo de tesis hace uso de nuevas herramientas disponibles intentando contestar algunos de estos interrogantes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Desde el punto de vista clínico, las infecciones clamidiales son mayoritariamente asintomáticas, es por ello que los pacientes no buscan un tratamiento. Ello, sumado a una respuesta inmune del hospedador que no es eficaz llevan a una prolongada duración de las infecciones, tiempo durante el cual continúa el contagio. Finalmente, las secuelas tardías pueden ser graves como la enfermedad inflamatoria pélvica, la infertilidad irreversible, embarazos ectópicos y abortos. Estas características clínicas de una infección persistente hacen a la relevancia de estudiar este fenómeno de persistencia a nivel molecular.

En ese contexto, el objetivo general del presente trabajo de tesis es caracterizar el fenómeno de persistencia en el patógeno humano *C. trachomatis* utilizando un enfoque genómico.

Los objetivos específicos propuestos son:

1. Identificar y caracterizar los genes involucrados en la regulación/ modulación de la persistencia clamidial, inducida por interferón gamma y penicilina, utilizando un enfoque genómico.
 - 1a. Detectar mutantes químicas con defectos en el fenotipo de persistencia y validarlas.
 - 1b. Identificar las mutaciones presentes en las mutantes con defectos en persistencia.
 - 1c. Establecer el *linkage* genotipo-fenotipo mediante diferentes estrategias orientadas a identificar la asociación entre mutación en un gen de interés y defecto: transferencia horizontal de genes seguido de selección y análisis de recombinantes, inactivación de genes de interés por inserción sitio-dirigida.
 - 1d. Confirmar el *linkage* genotipo-fenotipo mediante ensayos de complementación.
 - 1e. Evaluar la expresión y función de los genes identificados a lo largo del ciclo de desarrollo.
2. Evaluar cuáles son las consecuencias de la anulación de genes relevantes para la persistencia *in vitro* en un modelo murino de infección intravaginal.
 - 2a. Cuantificar la progenie infecciosa en descargas vaginales a los días 10 y 14 post-infección en ratones hembra C57/BL6 infectados con la cepa Wt o la mutante de interés.
 - 2b. Determinar la carga bacteriana en el tejido uterino al día 14 post-infección en ratones hembra C57/ BL6 infectados con la cepa Wt o la mutante de interés.

RESULTADOS

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Persistencia**Modelo de inducción de persistencia con interferón gamma o penicilina**

Con el objetivo de identificar los genes de *C. trachomatis* relevantes para la persistencia se utilizó un modelo de inducción y remoción del estrés (recuperación) en cultivo celular. Para ello se establecieron las condiciones para *C. trachomatis* LGV-L2 (L2 Wt) en células HeLa utilizando los factores de estrés más relevantes y mejor caracterizados: IFN γ y penicilina.

En el caso del IFN γ se ha observado que es necesario un pre-tratamiento con la citoquina para depletar el triptófano previo a la infección con *C. trachomatis* LGV-L2 (Morrison, 2000). Mediante una curva con distintas concentraciones del mismo, con un pre-tratamiento de 40h, se observó que la concentración de 15 ng/mL era suficiente para inducir una reducción en el tamaño de las inclusiones medido a las 30hpi (Figura 6 A). Sin embargo, 40h de pre-tratamiento generaba cierta toxicidad celular y debido a ello se ensayaron diferentes tiempos de pre-tratamiento (24, 30 ó 40h). Se observó que, a todos los tiempos analizados, con la concentración elegida, se generaba una disminución en el tamaño de las inclusiones y se seleccionó un tratamiento de 24h previo a la infección para minimizar los efectos tóxicos del IFN γ . Entonces, en todos los ensayos de persistencia posteriores las células HeLa se trataron previamente durante 24h con 15 ng/mL de IFN γ , luego se infectaron en presencia del mismo, a las 24 h post-infección se removió el medio y se dejaron recuperar durante 24h adicionales en medio libre de IFN γ suplementado con triptófano (Figura 6 A).

Por otro lado, con el objetivo de seleccionar una concentración de penicilina de trabajo se realizó una curva con diferentes concentraciones del antibiótico agregado al momento de la infección. En el caso de este beta-lactámico no se observa una disminución en el tamaño de la inclusión al incrementar la concentración, pero sí los típicos cuerpos aberrantes de gran tamaño (Figura 6 B). La concentración 0,06 UI/mL fue suficiente para observarlos y en esta tesis se trabajó en un rango de 0,1 a 1 UI/mL de penicilina. Entonces, para el estrés inducido por penicilina, las células HeLa se infectaron durante 24h en presencia de 0,1 a 1 UI/mL de penicilina y luego se dejaron recuperar durante 24h en medio libre de penicilina (Figura 7 A).

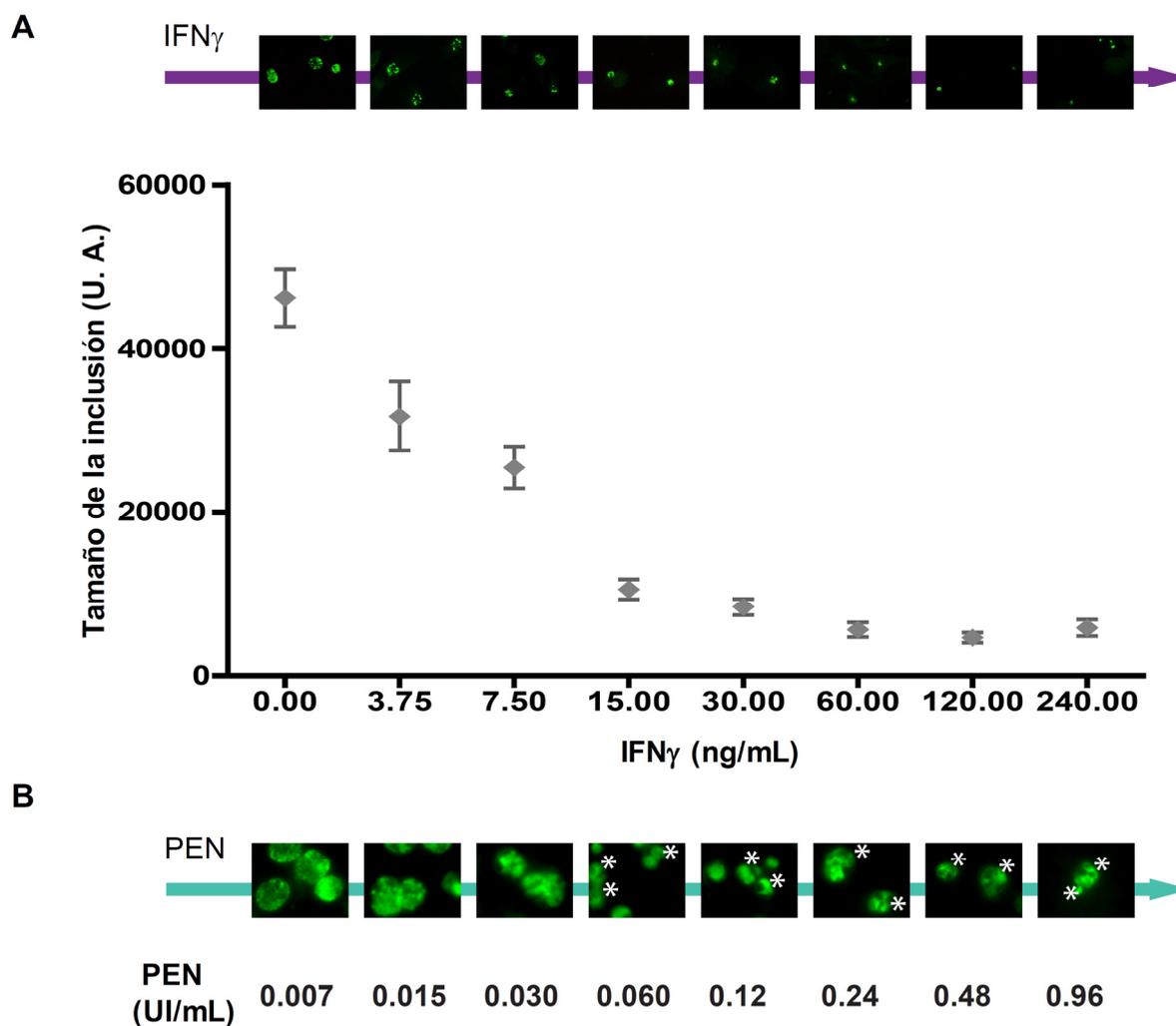


Figura 6: Efecto de concentraciones crecientes de interferón gamma y penicilina en la infección de *C. trachomatis* L2. **A.** Se evaluó un rango de concentraciones de IFN γ (0 a 240 ng/mL) pretratando células HeLa por 40h hasta el momento de la infección con *C. trachomatis* L2 y se midió el tamaño de las inclusiones 30 hpi en presencia continua del estresor en la concentración indicada. Al aumentar la concentración de la citoquina hay una pronunciada disminución del tamaño de las inclusiones. **B.** Se evaluó un rango de concentraciones de penicilina (0,007 a 0,96 UI/mL) en células HeLa infectadas con *C. trachomatis* L2 por 48h. Al incrementar la concentración del beta-lactámico se observó la aparición de cuerpos reticulares aberrantes (aRBs) que se indican con un asterisco. **A y B.** Para la detección mediante inmunofluorescencia de *Chlamydia* (verde) se utilizó un anticuerpo anti-Slc1 y un anticuerpo secundario anti-rabbit marcado con Alexa Fluor 488. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia.

Como se ha reportado anteriormente (Tamura and Manire, 1968; Beatty et al., 1993), en este trabajo se observó que en presencia continua de los factores estresantes, la generación de progenie infecciosa (IFU/mL) se redujo drásticamente en comparación con el control no tratado (Figura 7 B). A las 24h posteriores a quitar los factores estresantes, la producción de progenie infecciosa

(IFU/mL) aumentó (hasta 4 y 3 órdenes de magnitud en el caso de IFN γ y penicilina, respectivamente) en comparación con la condición de estrés (Figura 7 B). Esto indica que las bacterias fueron capaces de volver a su ciclo de desarrollo productivo una vez que desapareció el estrés, cumpliendo con la definición funcional de persistencia. Es notable que, si bien aumenta con respecto al tratamiento continuo, la generación de progenie después de la recuperación fue significativamente menor (1 y 2 órdenes de magnitud en el caso de IFN γ y penicilina, respectivamente) en comparación con el control no tratado a un mismo tiempo post-infección (Figura 7 B). En presencia de penicilina, la microscopía de fluorescencia muestra inclusiones que presentan formas de *Chlamydia* compatibles con los aRB típicos agrandados (Figura 7 C). En presencia de IFN γ , las inclusiones fueron más pequeñas pero la observación de los aRB típicos, si bien se observaron RBs de mayor tamaño, no fue un efecto tan evidente como el causado por el tratamiento con penicilina (Figuras 7C-E). Esto es consistente con la observación de que *C. trachomatis* LGV-L2 es menos sensible al IFN γ en comparación con otros serovares (Morrison, 2000) y puede explicar por qué la formación de aRB inducida por IFN γ fue más difícil de observar (revisada en Bavoil, 2014). En las condiciones de cultivo utilizadas en esta tesis, la adición de 15 ng/mL de IFN γ evitó claramente la generación de progenie infecciosa, pero la formación de aRB no se observó con tanta claridad en comparación con el estrés inducido por penicilina. Debido a que las concentraciones más altas de IFN γ fueron tóxicas para las monocapas celulares (datos no mostrados), se mantuvieron los niveles de esta citoquina en 15 ng/mL durante el *screening*. Después de 24h de recuperación post IFN γ , las inclusiones fueron morfológicamente indistinguibles del control no tratado. En contraste, la eliminación de la penicilina no revirtió completamente la morfología anormal de algunos RB (Figura 7 C) como se ha reportado anteriormente (Skilton et al., 2009).

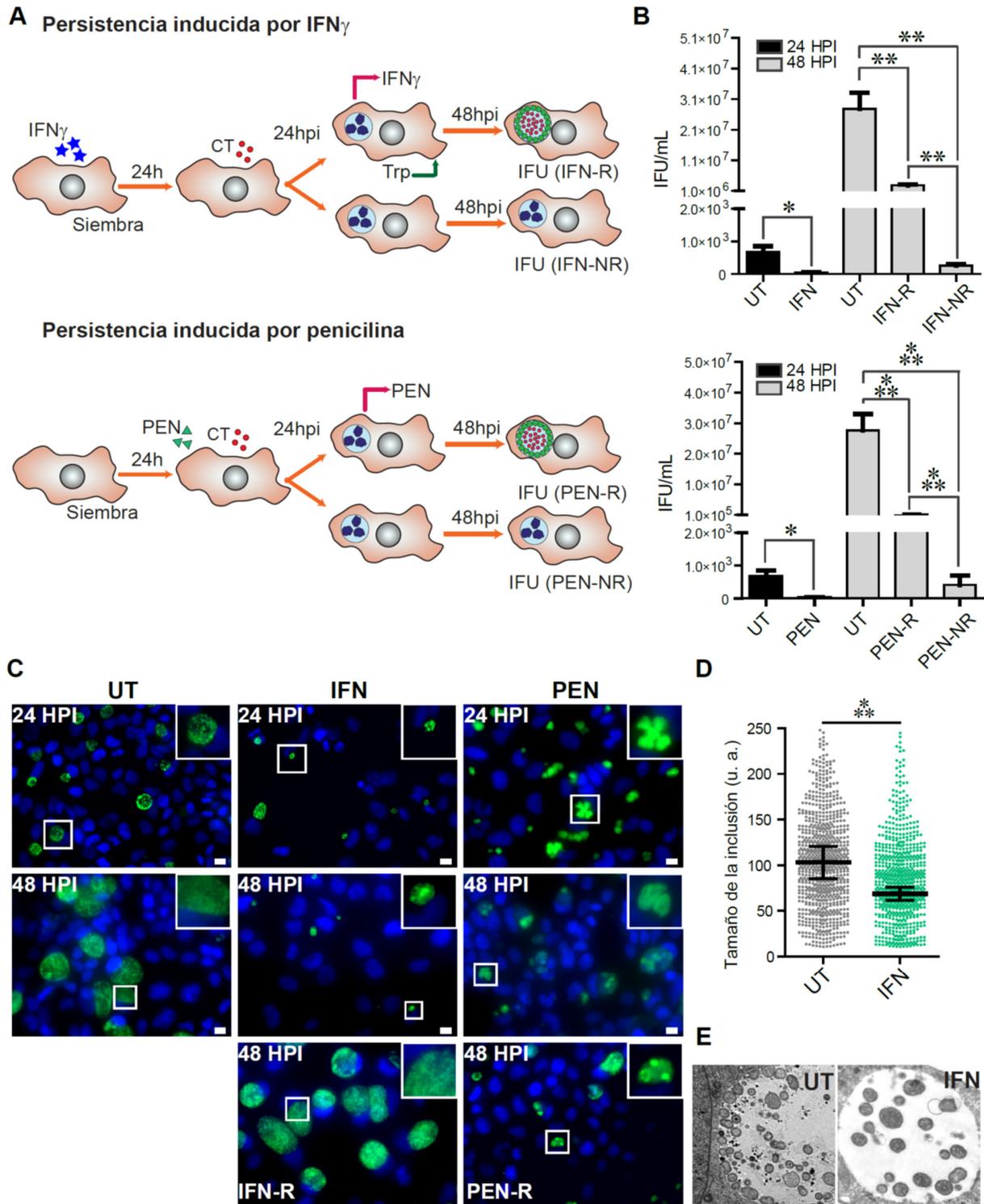


Figura 7: Inducción de estrés por medio de interferón gamma y penicilina en la infección de *C. trachomatis* LGV-L2. A. Representación esquemática de los tratamientos realizados. Panel superior: Las células HeLa se trataron previamente con IFN γ (15 ng/mL) durante 24 horas (IFN) o se dejaron sin tratar (UT, *untreated*) antes de infectarlas con *C. trachomatis* LGV-L2. Para la condición de recuperación de interferón (IFN-R), las células

se enjuagaron con PBS a 24 hpi y se agregó DMEM, FBS al 10%, triptófano (100 mg/L) y se dejaron recuperar durante 24 h adicionales. Panel inferior: Las células HeLa se infectaron con *C. trachomatis* LGV-L2 en presencia (PEN) o ausencia (UT) de penicilina. Para la condición de recuperación de penicilina (PEN-R), las células se enjuagaron con PBS a las 24 hpi y se agregó DMEM, FBS al 10%, y se dejaron recuperar durante 24 h adicionales. **B.** Panel superior: la generación de progenie infecciosa de *C. trachomatis* LGV-L2 se reduce cuando las células se exponen a IFN, mientras que la adición de medio fresco suplementado con triptófano a 24 hpi permite la recuperación. Panel inferior: la generación de la progenie infecciosa de *C. trachomatis* LGV-L2 disminuye cuando las células se exponen a la penicilina (1 UI/mL) y la reposición de medio fresco a 24 hpi permite la recuperación. Ambos paneles: a 24 hpi (barras negras) o 48 hpi (barras grises) se recolectó la progenie infecciosa mediante lisis osmótica y estos lisados se usaron para infectar células HeLa frescas. Las inclusiones se fijaron con metanol a 30 hpi, se tiñeron con anticuerpo anti-Slc1 y se contaron para determinar las unidades formadoras de inclusión (IFU/mL). Los valores representan la media \pm SEM de al menos tres repeticiones. La significancia estadística se calculó mediante la prueba de t-Student. Las diferencias se consideraron significativas para * $P < 0.05$, * $P < 0.01$ y * $P < 0.001$. **C.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de las condiciones UT, IFN y PEN en diferentes hpi. El ADN fue teñido con Hoechst (azul) y para la detección de *C. trachomatis* (verde) se utilizó un anticuerpo anti-Slc1 y un anticuerpo secundario anti-rabbit marcado con Alexa Fluor 488. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Las barras de escala representan 10 μm . **D.** El tratamiento con IFN γ reduce el tamaño de inclusión. El tamaño de la inclusión en células HeLa infectadas con *C. trachomatis* LGV-L2 a 24 hpi, sin tratamiento o durante el tratamiento con IFN se midió con ImageJ en al menos 800 inclusiones por condición y se expresó en unidades arbitrarias (U. A.). Las barras horizontales y de error representan la media \pm 95% CI (n = 7). La significancia estadística se evaluó mediante la prueba t-Student (* $p < 0,001$). **E.** Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las condiciones UT (24 hpi) e IFN (24 hpi) para *C. trachomatis* LGV-L2. Las barras de escala representan 2 μm .

Screening para identificar genes involucrados en persistencia

Para identificar los genes de *C. trachomatis* relevantes para la recuperación del estrés inducido por IFN γ y penicilina, se utilizó una colección previamente descrita de 934 cepas de *C. trachomatis* L2 químicamente mutagenizadas (Kokes et al., 2015). Se consideró que las mutantes de *C. trachomatis* que exhibían niveles reducidos de progenie infecciosa tras la eliminación de los factores estresantes, eran defectuosas en su capacidad para sobrevivir durante el estrés o para reanudar el crecimiento/la generación de la progenie y por ende los genes mutados en esas cepas representan genes putativamente implicados en persistencia. Para identificar dichas mutantes, se infectaron células HeLa con cada una de las cepas en presencia de IFN γ o penicilina, se eliminaron los factores de estrés a las 24 hpi y se permitió que las bacterias se recuperaran durante 24 h adicionales (Figura 8 A). Luego se midió la generación de progenie infecciosa para cada mutante contando las unidades formadoras de inclusión (IFU) en condiciones no tratadas a las 30 hpi (UT), o a las 24 h de recuperación del estrés inducido por IFN γ o penicilina (IFN-R y PEN-R, respectivamente). Para tener en cuenta las variaciones en la infectividad entre las cepas mutantes, las IFU de salida se normalizaron por las IFU de entrada, es decir el inóculo o input (IFU/Input). Una mutante defectuosa se definió como la que produce un 10% y/o un 20% de IFU/Input tras la recuperación del estrés inducido por IFN γ y penicilina, respectivamente, en comparación con la cepa parental salvaje *C. trachomatis* LGV-L2. Se identificaron 8 mutantes que mostraron una generación reducida de IFU tras la recuperación del estrés inducido por IFN γ , 3 de las cuales

también fueron defectuosas para la reactivación luego del estrés inducido por penicilina (Figura 8 B).

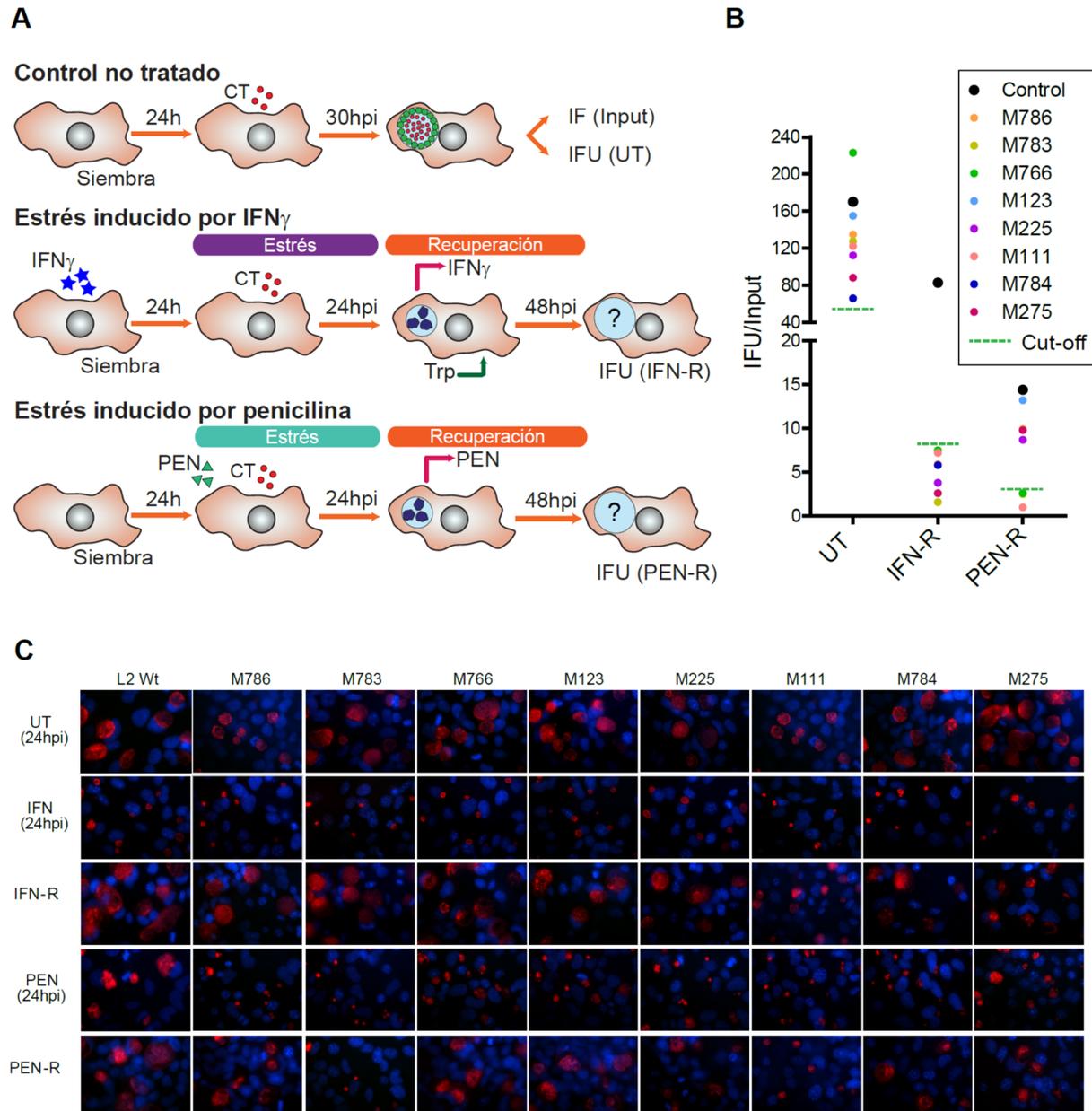


Figura 8: Un *screening* genético permitió identificar mutantes de *C. trachomatis* con defectos de recuperación post-persistencia inducida por IFN γ o penicilina. A. Representación esquemática del *screening* utilizado para identificar mutantes que presentaban defectos en la recuperación de la persistencia inducida por IFN γ o penicilina. Se utilizaron 4 arreglos idénticos de las mutantes en placas de 96 pocillos; uno fue utilizado para determinar el *input* de las unidades formadoras de inclusión (Input), mientras que los otros tres fueron utilizados para determinar las IFUs Output a las horas post infección (hpi) indicadas en la condición no tratada (UT, panel superior), IFN-recuperación (IFN-R, panel medio) o PEN-recuperación (PEN-R, panel inferior). En el caso del estrés inducido por IFN γ , las células se pre-trataron por 24h con 15ng/mL de IFN γ antes de la infección. A las 24hpi, se removió el estresor

y se agregó Trp al medio de cultivo para evaluar la recuperación de IFUs a las 48 hpi (IFN-R). Para el estrés inducido por penicilina, este antibiótico se agregó en el momento de la infección y fue removido 24 hpi para evaluar la recuperación de progenie infecciosa a las 48 hpi (PEN-R). La cepa parental salvaje *C. trachomatis* LGV-L2 (L2 Wt) fue incluida como control. **B.** Mutantes con menor producción de progenie infecciosa (IFU/Input) en la recuperación de la persistencia inducida por IFN γ o penicilina (puntos de color) comparadas con la cepa WT L2 (punto negro). **C.** Imágenes de inmunofluorescencia representativas para cada una de las cepas resultantes del *screening* y L2 Wt en todas las condiciones analizadas. Se observa disminución del tamaño de las inclusiones en el tratamiento con IFN γ y presencia de cuerpos aberrantes frente a la penicilina. El ADN fue teñido con Hoechst (azul) y las bacterias con un anticuerpo anti-Slc1 y un anticuerpo secundario anti-*rabbit* AlexaFluor 594 (rojo). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia.

El genoma de las mutantes que poseían el fenotipo de interés (defecto en la recuperación) fue secuenciado para identificar las mutaciones presentes (Tabla 1). El promedio de SNPs presentes en este grupo de mutantes, al igual que en el resto de la colección, es de 8 por genoma. Un hallazgo sorprendente fue que 5 de los 8 hits (M786, M783, M766, M123 y M111) presentaban mutaciones en la familia de proteínas pleomórficas de membrana o Pmps. Posteriormente además se sumó otra mutante con una mutación sin sentido en *pmpB* (M891). En *C. trachomatis*, esta familia abarca 9 proteínas que son autotransportadores del sistema de secreción tipo V y se ha propuesto que poseen un rol en adherencia y variación antigénica (Becker and Hegemann, 2014). En la presencia de penicilina, se inhibe el clivaje y secreción del dominio pasajero de PmpD (Kiselev et al., 2007). De interés, PmpE, PmpF, PmpG y PmpH son inmunodominantes y antígenos candidatos para el desarrollo de una vacuna (Nunes et al., 2015). Las mutantes mencionadas presentan mutaciones en 4 genes *pmp*: *pmpA*, *pmpB*, *pmpC* y *pmpG*; de manera simultánea con otras mutaciones. Cabe destacar, M111 presentó una mutación con pérdida de sentido o *nonsense* (aparición de un codón *stop* prematuro) en *pmpC*.

Por otra parte, también resulta interesante la presencia de mutaciones en diferentes proteasas en 3 de las mutantes (M891, M275 y M225). De estas mutantes únicamente M275 presentó una mutación *nonsense* (aparición de un codón *stop* prematuro) en el gen codificante de la probable proteasa Ptr. Esta proteasa putativa no ha sido caracterizada en *Chlamydia*. Una vez obtenidos los genomas completos de estas mutantes se continuó trabajando para obtener una asociación (*linkage*) genotipo-fenotipo que permitiera identificar genes importantes en persistencia.

Mutante	Coordenada en el genoma	Aminoácido en Referencia	Aminoácido en Mutante	Codón	Gen	Descripción	Locus	
M786 (P1)	105,979	H	Y	296	<i>gpsA</i>	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	CTL0083	
	152,880	S	F	853	<i>alaS</i>	alanyl-tRNA synthetase	CTL0118	
	169,229	A	T	362	<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D- alanine ligase	CTL0125	
	730,137	P	S	116		hypothetical protein	CTL0614	
	742,561			148		hypothetical protein	CTL0625	
	792,576	R	*	906	<i>pmpA</i>	polymorphic outer membrane protein	CTL0669	
	830,622			533	<i>omcB</i>	60kD cysteine-rich outer membrane protein	CTL0702	
	1,014,167	D	N	50	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	CTL0879	
	M783 (P2)	190,790			413	<i>aas</i>	long chain fatty acid--[acyl-carrier-protein] ligase	CTL0145
236,517				66		hypothetical protein	CTL0186	
421,985				62	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	CTL0341	
958,162				292	<i>gspF</i>	general secretion pathway protein F	CTL0833	
128,454		V	I	335		Na(+)-linked D-alanine glycine permease	CTL0104	
311,696		G	R	52	<i>pmpG</i>	polymorphic outer membrane protein	CTL0250	
375,994		R	K	150		hypothetical protein	CTL0304	
389,969		G	S	300		hypothetical protein	CTL0314	
439,867		R	C	95		hypothetical protein	CTL0356	
554,447		G	D	739	<i>leuS</i>	leucyl-tRNA synthetase	CTL0461	
663,081		G	D	58	<i>atpB</i>	V-type ATP synthase subunit B	CTL0559	
667,704		A	V	38		hypothetical protein	CTL0564	
872,252		V	I	113	<i>oppC2</i>	oligopeptide ABC transporter permease	CTL0739	
289,524							Intergénica	
M766 (P3)		327,336						Intergénica
		329,456						Intergénica
	419,533			113		phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D (PLD) protein	CTL0339	
	505,611						Intergénica	
	570,600						Intergénica	
	723,272						Intergénica	
	795,625	S	L	900	<i>pmpB</i>	polymorphic outer membrane protein	CTL0670	
M123 (P4)	82,465			188	<i>psdD</i>	phosphatidylserine decarboxylase	CTL0068	
	336,012			51	<i>cydA</i>	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	CTL0268	
	377,367			340		hypothetical protein	CTL0305	
	616,977			55		hypothetical protein	CTL0518	
	678,123	S	N	37	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	CTL0569	
	732,033			259	<i>lysC</i>	aspartate kinase	CTL0616	
	765,887	T	I	175		hypothetical protein	CTL0648	
	798,768	D	N	140	<i>pmpC</i>	polymorphic outer membrane protein	CTL0671	
	862,938			111		hypothetical protein	CTL0729	
	871643	D	N	316	<i>oppC2</i>	oligopeptide ABC transporter permease	CTL0739	

Tabla 1. (Parte 1) Variantes de un nucleótido (SNVs) presentes en las cepas resultantes del screening que no estaban presentes en la cepa parental *C. trachomatis* LGV-L2 resistente a rifampicina (RifR).

Mutante	Coordenada en el genoma	Aminoácido en Referencia	Aminoácido en Mutante	Codón	Gen	Descripción	Locus
M225 (P5)	91737	P	S	141	<i>clpX</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	CTL0074
	140053	P	S	234	<i>dmpP</i>	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit F	CTL0109
	355318	S	F	116	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	CTL0283
	609944	G	E	39		protein phosphatase 2C	CTL0511
	638353	F	L	642	<i>clpC</i>	ATP-dependent Clp protease	CTL0538
	648652	D	N	133		hypothetical protein	CTL0548
	771256			353	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	CTL0652
	1032800						Intergénica
M111 (P7)	59991						Intergénica
	94181			31	<i>tig</i>	trigger factor	CTL0076
	119658	A	V	52		cation transporting ATPase	CTL0096
	208194						Intergénica
	364375			40		hypothetical protein	CTL0291
	414928	P	S	64	<i>folD</i>	bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase	CTL0334
	419583	P	S	97		phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D (PLD) protein	CTL0339
	537830						Intergénica
	801411	Q	*	1021	<i>pmpC</i>	polymorphic outer membrane protein	CTL0671
	M784 (P8)	183714			99		hypothetical protein
350350		S	L	33	<i>prfA</i>	peptide chain release factor 1	CTL0278
584275		P	S	52	<i>fabD</i>	malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase	CTL0490
M275 (P9)		12648	V	I	335	<i>recC</i>	exodeoxyribonuclease V gamma chain
	191773	G	E	189	<i>bioF</i>	8-amino-7-oxononanoate synthase	CTL0146
	222833	W	*	801	<i>ptr</i>	exported insulinase/protease	CTL0175
	324164			42	<i>gatC</i>	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit C	CTL0257
	544104	A	T	181	<i>oppC</i>	oligopeptide transport system membrane permease	CTL0452
	925215			68		SpoU family rRNA methylase	CTL0802
M891	26704	S	F	94		putative exported lipoprotein	CTL0019
	68310	D	N	335		conserved hypothetical protein	CTL0055
	117483	L	F	87		cell cycle protein	CTL0095
	210004			570	<i>dnaG</i>	DNA primase	CTL0162
	239613	V	I	424	<i>glmS</i>	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	CTL0188
	249267	P	S	256		metalloprotease-insulinase	CTL0196
	290266	P	S	212	<i>cpa</i>	putative exported protease	CTL0233
	333292	L	F	39	<i>htrB</i>	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	CTL0265
	404263			148		ABC transport protein, membrane permease	CTL0325
	449515	I	T	294	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL	CTL0365
	463556	G	D	412	<i>accC</i>	biotin carboxylase	CTL0379
	488132	P	S	7		putative integral membrane protein	CTL0402
	628151	M	I	212	<i>nqrB</i>	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B	CTL0530
	672151			332	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase beta-prime chain	CTL0566
	697349	R	K	1026	<i>uvrA</i>	excinuclease ABC subunit A	CTL0587
	744454						Intergénica
	761991	A	V	85		putative exported protein	CTL0645
795772	S	*	949	<i>pmpB</i>	polymorphic outer membrane protein B	CTL0670	
808919	V	I	39		putative inner membrane protein	CTL0678	
918089	A	V	44	<i>lpxA</i>	acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase	CTL0793	
1010302			36		conserved hypothetical protein	CTL0875	
1014167	D	N	50	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	CTL0879	
1035397	S	F	70	<i>glmU</i>	glucosamine-1-phosphate acetyltransferase	CTL0893	

Tabla 1. (Parte 2) Variantes de un nucleótido (SNVs) presentes en las cepas resultantes del screening que no estaban presentes en la cepa parental *C. trachomatis* LGV-L2 resistente a rifampicina (RifR).

CAPÍTULO 2: Rol de Ptr/CTLo175 en persistencia.

M275 es incapaz de recuperarse normalmente de la persistencia inducida por IFN γ

En primer lugar, se centró el análisis en la mutante M275, una cepa que presenta una recuperación defectuosa post-IFN γ , mientras que se recupera normalmente luego del estrés inducido por penicilina (Figura 8 B). Para determinar el efecto del tratamiento con IFN γ en el desarrollo de la inclusión, se midió el tamaño de la inclusión para las cepas L2 Wt y M275. En ausencia de factores estresantes o en presencia continua de los mismos, L2 Wt y M275 desarrollaron inclusiones de tamaño similar. Curiosamente, después de la eliminación de IFN γ , M275 mostró inclusiones significativamente más pequeñas en comparación con la cepa parental (IFN-R) (Figura 9 A y B).

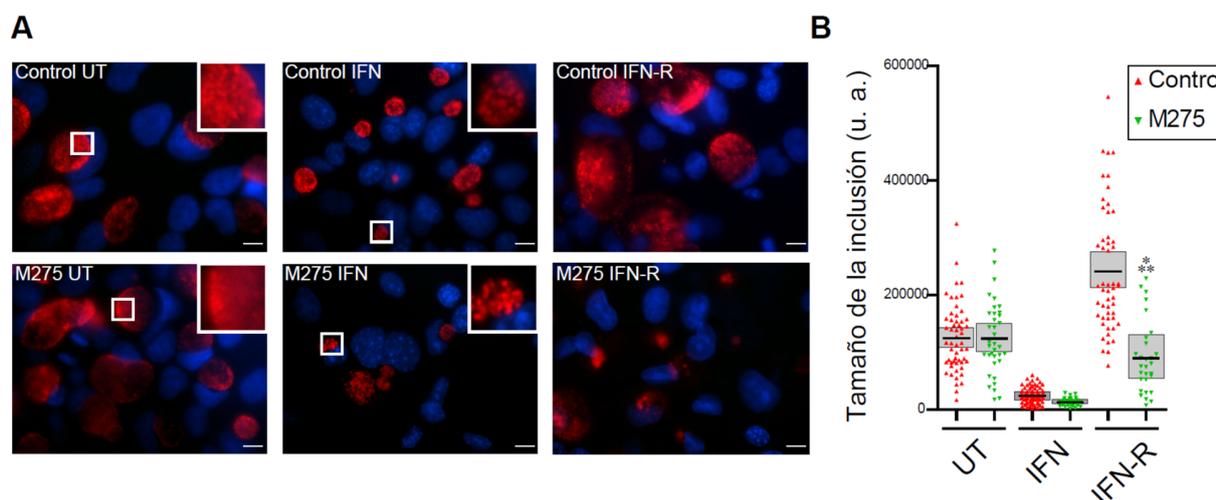


Figura 9. Inclusiones de la cepa M275 durante el tratamiento y la recuperación del estrés inducido por IFN γ . **A.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa infectadas con LGV-L2 (L2 wt, paneles superiores) o M275 (paneles inferiores) sin tratar (UT, 30 hpi), tratadas con IFN γ (IFN, 24 hpi), o en la recuperación de IFN γ (IFN-R, 48 hpi, 24 h post-adición de triptófano). Los inset resaltan las inclusiones representativas en condiciones UT e IFN. Las inclusiones de *C. trachomatis* se marcaron con anti-Slc1 y un anticuerpo secundario anti-rabbit AlexaFluor 594 (rojo) y el ADN se tiñó con Hoechst (azul). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia. La barra de escala representa 10 μ m. **B.** Comparación de tamaños de la inclusión (expresados en unidades arbitrarias, u. a.) entre L2 (Workowski et al.) y M275 en diferentes condiciones según se indica (UT, IFN o IFN-R). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (***, $P < 0,001$) entre M275 y L2 Wt según lo determinado por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni (barra, media; área sombreada, SEM, $n = 3$).

Luego se decidió extender el análisis de la producción de IFUs tras la recuperación del estrés inducido por IFN γ y penicilina a tres puntos de tiempo diferentes: 48, 56 y 72 hpi, correspondientes a 24, 32 y 48 h de recuperación, respectivamente. En las condiciones sin

tratamiento (UT) y recuperación del estrés inducido por penicilina (PEN-R), M275 y la cepa parental Rif^R generaron IFU/Input similares (Figura 10 A y C). Por el contrario, en la condición IFN R, M275 mostró una reducción significativa en la generación de IFUs en los tres tiempos analizados (Figura 10B). Estos resultados confirman que M275 exhibe un defecto de recuperación específicamente en la persistencia inducida por IFN γ , pero no por penicilina, indicando que *C. trachomatis* emplea mecanismos diferentes para recuperarse de ambos estresores.

El defecto que se observó en la generación de progenie infecciosa puede deberse a una falla en la producción de EBs por un problema en la diferenciación de RB a EB y/o a un desperfecto en la replicación de ADN. A fin de analizar la producción de EBs de manera directa se realizaron experimentos de microscopía electrónica, lo cual permitió evaluar las características ultraestructurales de las formas de desarrollo que presenta *C. trachomatis* Wt y mutante en las diferentes condiciones experimentales (UT y IFN-R). En la condición no tratada, M275 no mostró anomalías aparentes en comparación con la cepa control (Figura 10 D). Sin embargo, esta mutante presentó una reducción significativa tanto en el número absoluto de EB por inclusión como en la relación EB/RB al recuperarse del estrés inducido por IFN γ (Figura 10 D y E). Para determinar si la reducción en las IFU y la relación EB/RB observadas se asociaba a un defecto en la replicación del genoma durante la recuperación del estrés, se utilizó PCR cuantitativa en tiempo real y se evaluó la tasa de acumulación del genoma. En comparación con la cepa parental, M275 exhibió una acumulación reducida de genomas durante la recuperación del estrés inducido por IFN γ (Figura 10 F).

En conjunto, la cepa M275 posee un defecto en la recuperación de la persistencia inducida por IFN γ . En esta condición se observó un menor tamaño de las inclusiones (Figura 9), acompañado por una disminución en la generación de progenie infecciosa (Figuras 8 B y 10 B), una menor transición RB a EB (Figura 10 D y E), y una menor tasa de replicación del genoma (Figura 10 F). Estos resultados indican que alguna/s mutaciones presentes en la cepa M275 afecta a un/varios gen/es que están implicados en persistencia.

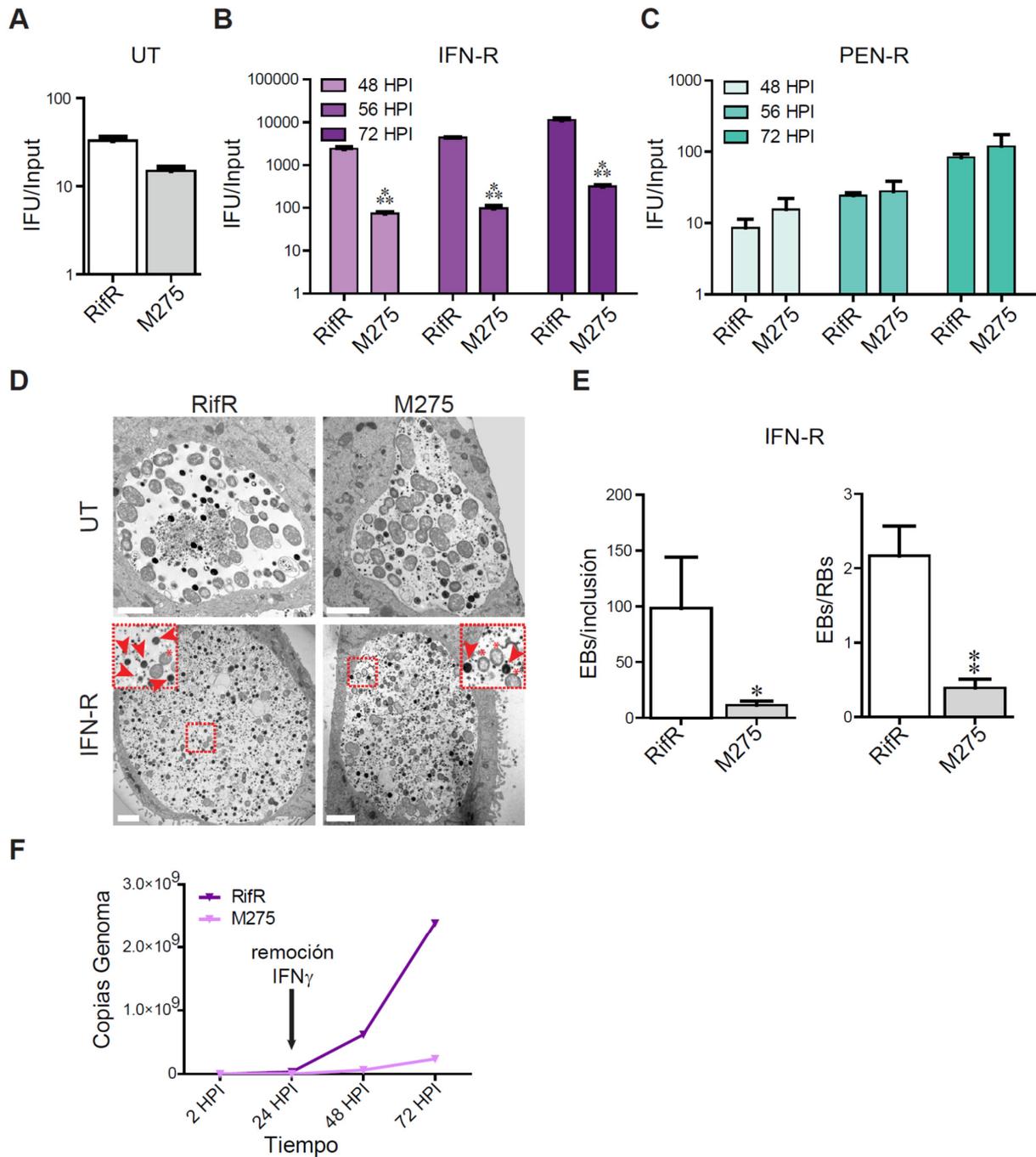


Figura 10. Recuperación defectuosa de M275 luego del estrés inducido por IFN γ pero no por penicilina.

A. M275 no muestra diferencias significativas en la generación de IFU/Input en comparación con la cepa control (RifR) en la condición no tratada a 30 hpi (UT). **B.** M275 exhibe una generación de IFUs disminuida después del estrés inducido por IFN γ (condición IFN-R). Las células HeLa se trataron previamente con IFN γ (15 ng/mL) durante 24 horas y se infectaron con la cepa control o con M275. A las 24 hpi, se eliminó el IFN γ , el medio se complementó con triptófano (100 mg/L) y se incubaron hasta 48, 56 o 72 hpi para permitir la recuperación. **C.** M275 genera progenie infecciosa a niveles similares a la cepa control tras la recuperación del estrés inducido por penicilina (PEN-R). Las células HeLa se infectaron con la cepa M275 o RifR en presencia de penicilina (1 UI/mL). A las 24 hpi se eliminó la penicilina, se agregó

medio completo y se incubó hasta 48, 56 o 72 hpi para la recuperación. **D.** Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las condiciones UT e IFN-R para M275 y la cepa control RifR. Los inset resaltan imágenes representativas de partículas de *C. trachomatis* que muestran características ultraestructurales típicas de EB (puntas de flecha) y RB (asteriscos). Las barras de escala representan 2 μ m. **E.** Cuantificación de EBs/inclusión y EBs/RB visualizados por TEM para la condición IFN-R. Los valores representan la media \pm SEM de al menos tres repeticiones. La significancia estadística (**A-E**) se calculó mediante la prueba de t-Student. Las diferencias se consideraron no significativas para $P > 0.05$ y significativas para * $P < 0.05$, $P < 0.01$, y ** $P < 0.001$. **F.** Las células HeLa se trataron con IFN γ durante 24 h y se infectaron RifR o con M275. A las 24 hpi, se eliminó el IFN γ y las células se rellenaron con medio completo suplementado con triptófano. El número de copias del genoma se evaluó mediante PCR en tiempo real durante el tratamiento con IFN γ y tras la recuperación en los momentos indicados después de la infección utilizando cebadores específicos para *ompA* (que codifica para la proteína mayor de membrana externa, MOMP). Los puntos de datos representan la media de tres repeticiones.

Obtención y análisis de recombinantes

La secuenciación del genoma completo de M275 reveló 6 variantes de nucleótido único (SNV) en comparación con la cepa parental RifR (Tabla 1, parte 2). Dos de ellas (G126A y C204T) conducen a mutaciones sinónimas. Se predice que los SNV en los genes *recC* (C1003T), *oppC* (G541A) y *bioF* (G566A) causan sustituciones de aminoácidos individuales y que el SNV ubicado en el gen *ptr* (C2403T) causa un codón *stop* prematuro (W801 *) y, por lo tanto, es el que más probablemente altere la función de la proteína resultante. Con el fin de determinar qué mutación/es está/n vinculadas al defecto de recuperación de estrés observado para M275, se generaron cepas recombinantes mediante la realización de coinfecciones entre M275 resistente a rifampicina y una cepa L2 Wt resistente a la espectinomicina, seguida de la selección de recombinantes resistentes a ambos antibióticos por medio de un ensayo de placa (Figura 11 A). Un total de ~ 50 recombinantes fueron genotipificados mediante el ensayo TILLING (Till et al., 2006; Kari et al., 2011) (Figura 5). Dos cepas recombinantes, rs9 y rs17, albergaban un único SNV en *oppC*, y SNVs en *oppC* y *recC*, respectivamente, lo que lleva a sustituciones puntuales de aminoácidos (Tabla 1, parte 2). Ambas recombinantes fueron utilizadas en ensayos de persistencia y recuperación y se compararon con M275 y RifR. En la condición UT, la generación de IFU para ambas recombinantes fue similar a RifR, como se esperaba (Figura 11 B). A diferencia de M275, que mostró consistentemente una reducción significativa en la generación de IFU en los tres puntos de tiempo analizados luego de la recuperación del estrés inducido por IFN γ , rs9 y rs17 produjeron niveles más altos de IFU, similares a los observados para RifR (Figura 11 C). Estos resultados sugieren que las mutaciones presentes en *recC* u *oppC* no influyen en la recuperación del estrés inducido por IFN γ , dejando como genes candidatos a *bioF* y *ptr*.

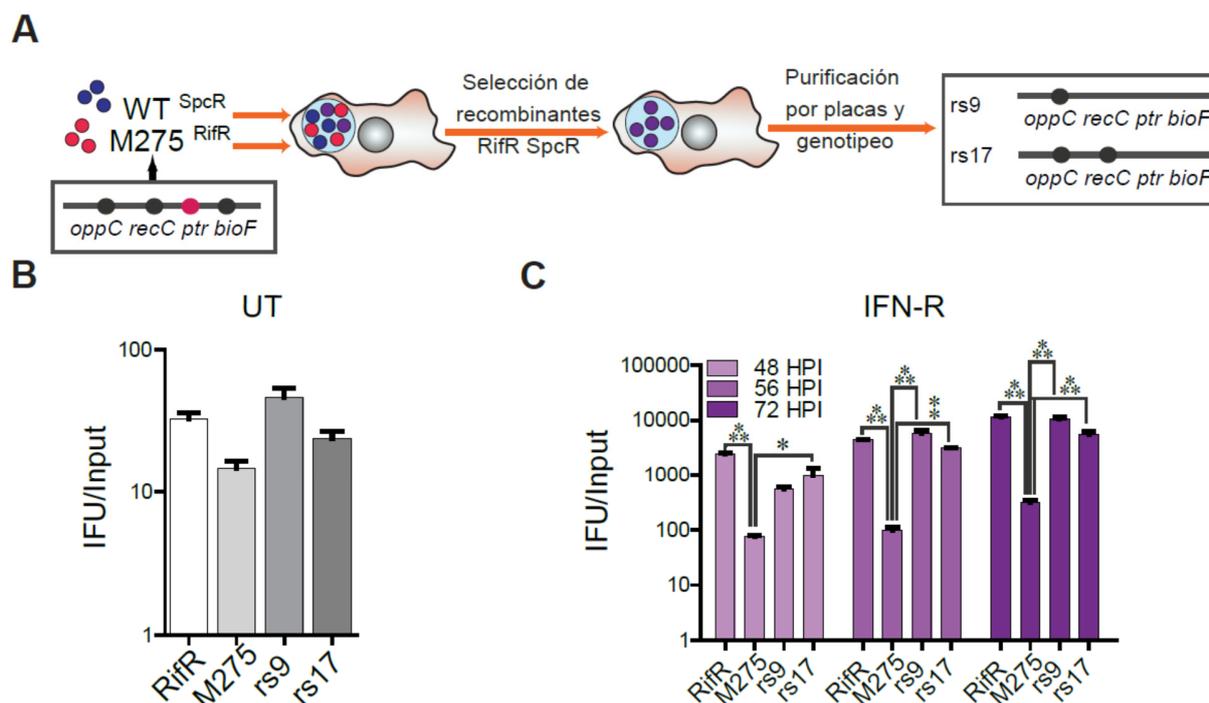


Figura 11. El análisis de recombinantes permite descartar los SNVs en *oppC* y *recC* como mutaciones causales. **A.** Células HeLa fueron coinfectadas con una cepa Wt resistente a espectinomicina y la cepa M275 resistente a rifampicina, cada una con una MOI de 3 o 6 para aumentar las probabilidades de recombinación. Se aislaron las recombinantes doble-resistentes por ensayo de placa y se analizaron por TILLING para identificar la presencia/ausencia de SNVs en *ptr*, *bioF*, *oppC* y *recC*. Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciamiento de Sanger. **B.** Las recombinantes analizadas no presentan diferencias en la generación de progenie infecciosa comparadas con la cepa parental en la condición no tratada a las 30 hpi (UT). **C.** Las recombinantes que presentan SNVs solo en *oppC* (rs9) o en *oppC* y *recC* (rs17) producen niveles más altos de IFUs cuando se remueve el IFN γ comparadas con M275. Las células HeLa fueron pre-tratadas con IFN γ por 24 h e infectadas con las cepas indicadas. A las 24 hpi, el IFN fue removido, el nuevo medio fue suplementado con Trp y las células incubadas hasta las 48, 56 o 72 hpi. La progenie infecciosa se expresa en IFUs por Input (media \pm SEM, n=3). El análisis estadístico fue llevado a cabo por ANOVA de 2 vías y post-test Bonferroni (* P < 0.05, ** P < 0.001, ns P > 0.05).

La proteína Ptr no se expresa en M275

El análisis se centró, luego de descartar *oppC* y *recC*, en las mutaciones candidatas restantes presentes en M275: *bioF* y *ptr*. Se predice que *bioF* codifica una 7-ceto-8-aminoperlargonato (KAPA) sintasa, que participaría en el primer paso de la ruta biosintética de la biotina al convertir pimeloyl-CoA en KAPA (Fisher et al., 2012). El gen *ptr* corresponde al locus CTL0175 en *C. trachomatis* LGV-L2 y codifica una putativa metaloproteasa dependiente de Zn²⁺ aún no caracterizada, con dominios peptidasa de la superfamilia M16 (Figura 12). El análisis de la secuencia de aminoácidos predice que en el extremo N-terminal se localiza el dominio con actividad proteasa, mientras que la región C-terminal es inactiva. Se postula que estos dominios sostienen el sustrato como una abrazadera. Dado que el SNV presente en el gen *ptr* conduce a un

codón *stop* prematuro, se consideró como el candidato probablemente responsable de la recuperación alterada de M275 del estrés inducido por IFN γ . Con el objetivo de evaluar la expresión de la proteína Ptr en M275 y a lo largo del ciclo en L2 Wt se decidió obtener anticuerpos contra esta proteasa.

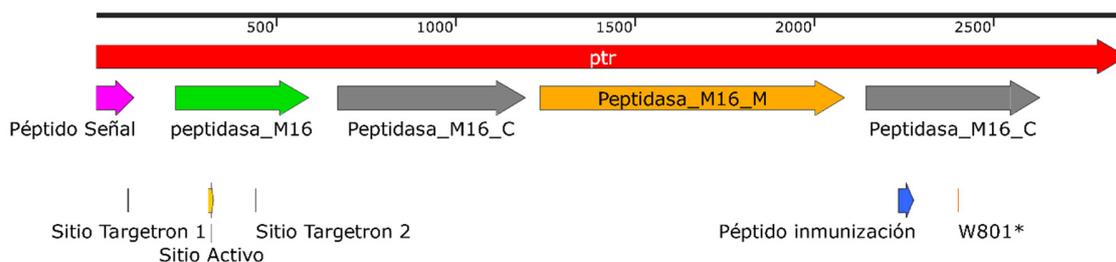


Figura 12. Representación esquemática del gen *ptr/CTLO175*. Se indican los sitios de inserción Targetron 1 y 2, los distintos dominios codificados de la familia de peptidasas M16, la mutación presente en M275 (W801*) y la región codificante del péptido empleado para inmunización.

En primer lugar, se realizó el clonado de la secuencia completa del gen *ptr* unida, en el extremo 5', a la secuencia del péptido His-tag en el vector pHis-parallel para expresar la proteína Ptr y posteriormente utilizarla para inmunizar. Se ensayaron diferentes condiciones de inducción, entre ellas: toda la noche a 18°C, IPTG 0,5 mM, o 3h a 37°C con concentraciones crecientes de IPTG (datos no mostrados). En ninguna condición se pudo obtener una buena inducción de expresión de la proteína Ptr. Cuando se realizó un *western blot* con anticuerpos anti-HIS se observó un perfil chorreado indicando que probablemente esta proteína se puede estar auto-degradando (datos no mostrados). De igual manera, al intentar purificar Ptr en una columna de níquel-agarosa eluyendo con concentraciones crecientes de imidazol no se pudo obtener una fracción enriquecida en la proteína de interés (109 kDa). El hecho de tratarse de una proteína de alto peso molecular con actividad proteasa y que posiblemente esté localizada en el periplasma (por su péptido señal) hacen que no sea sencillo purificarla. Posteriormente, se intentó expresar una porción de Ptr desde la treonina 413 a la serina 952 excluyendo el péptido señal y el sitio activo para evitar su posible localización periplasmática y su degradación. Luego de transformar la cepa *E. coli* BL21 con el vector que contenía el segmento correspondiente del gen *ptr* se ensayó la inducción de la expresión de la proteína y se obtuvo una banda débil por *western blot* con un anticuerpo anti-HIS; sin embargo, no fue posible observar una buena inducción en ninguna de las condiciones testeadas, y no se detectó un aumento de la banda de interés ni en la fracción soluble ni en la insoluble de la muestra inducida. Es decir, se clonó el gen *ptr* completo o un fragmento del mismo en un vector de expresión, pero en las condiciones testeadas no se pudo

generar la cantidad de proteína necesaria para llevar a cabo la inmunización de animales para la obtención de antisueros.

Si bien es un objetivo que queda pendiente mejorar la expresión de Ptr para poder estudiar esta proteasa *in vitro*, se decidió seleccionar un péptido dentro de su secuencia para poder generar anticuerpos. El primer paso fue el diseño del péptido para ser utilizado en las inmunizaciones. Se tuvo en cuenta que el mismo se ubicara antes del codón *stop* para poder detectar si se producía una proteína trunca. Existen múltiples aspectos a considerar en el diseño, entre ellos, si un péptido es insoluble no es ideal para ser utilizado para la producción de anticuerpos. Para seleccionar un péptido cuya solubilidad en agua fuera buena se utilizó la herramienta PepCalc (<http://pepcalc.com>). En general, los péptidos de ~4kDa son lo suficientemente largos como para generar una respuesta inmune por sí mismos, pero los más pequeños necesitan ser conjugados a una molécula más grande como la hemocianina de *Megathura crenulata*, también conocida como hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina o tiroglobulina para generar una buena inmunización. La estrategia utilizada fue agregar una cisteína en el N-terminal del péptido y utilizar su grupo tiol para conjugar el péptido a KLH. Además, se evaluaron positivamente los parámetros de antigenicidad de Kolaskar, hidrofobicidad de Parker, predicción de giros beta, accesibilidad a la superficie de Emini, flexibilidad de Karplus y posibilidad de epítope lineal Bepipred mediante la herramienta “IEDB analysis resource” (<http://tools.iedb.org/bcell/>). En cuanto al largo del péptido, se considera típico un largo de 10-25 aminoácidos. Un péptido largo aumentaría la inmunogenicidad, pero también las chances de reactividad cruzada. En base al análisis realizado, se seleccionó un péptido de 15 aa. Idealmente, los anticuerpos generados deben ser específicos para la proteína blanco y no presentar reactividad cruzada con otras proteínas. Sin embargo, a partir de secuencias pequeñas aleatorias es muy probable obtener *hits* en una búsqueda BLAST. En este caso, se intentó minimizar la similitud del péptido seleccionado con secuencias de la clase *Chlamydia*, de ratones y de humanos para evitar la reactividad cruzada. Entonces, se obtuvo un anticuerpo policlonal contra un péptido sintético (GeneScript) correspondiente a las posiciones de aminoácidos 746-760 en la secuencia de la proteína Ptr, que se encuentra a 5' del codón *stop* predicho en M275 (Figura 12). Utilizando dicho anticuerpo en ensayos de microscopía por inmunofluorescencia (Figura 13 A), se detectó la marcación de Ptr en la cepa Rif^R, pero no en M275. La especificidad del anticuerpo anti-Ptr se confirmó por incubación con un exceso del péptido Ptr utilizado para las inmunizaciones, lo que condujo a una reducción marcada de la señal de fluorescencia anti-Ptr (Figura 13 B).

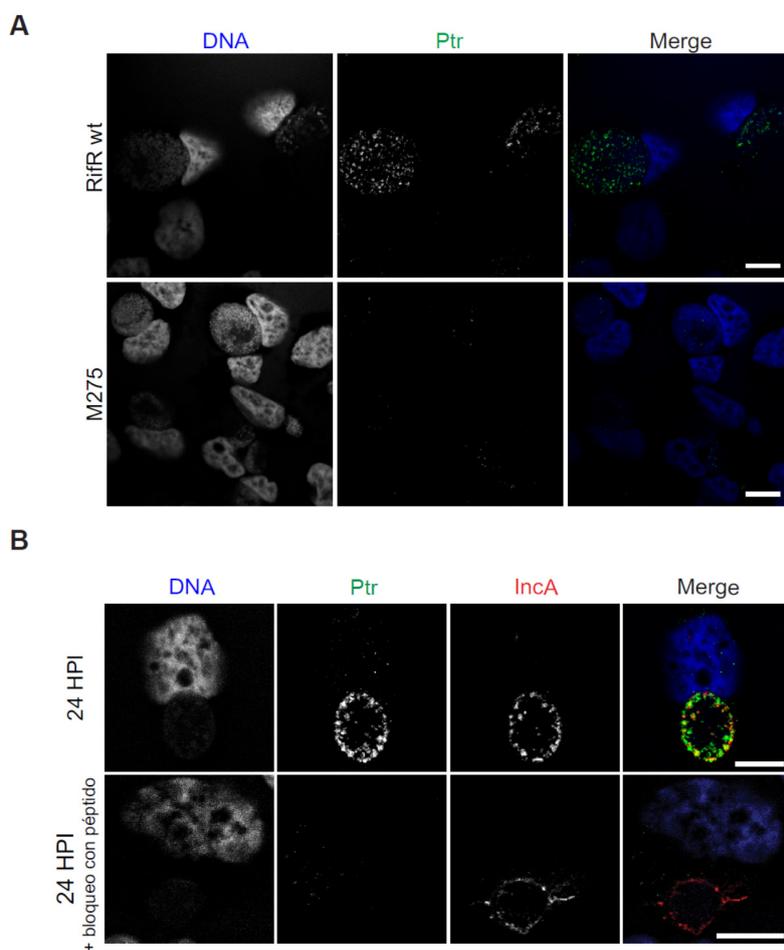


Figura 13. A. La proteasa putativa Ptr se expresa en la cepa RifR pero no en la mutante M275. Células HeLa fueron infectadas con la cepa parental RifR o con la mutante M275 y a las 30 hpi fueron procesadas para inmunofluorescencia. **B.** Para analizar la especificidad de la detección de la proteína Ptr, el suero anti-Ptr fue incubado con el péptido utilizado para las inmunizaciones antes de la inmunofluorescencia. Se muestran imágenes representativas de células HeLa infectadas con L2 Wt (24hpi) obtenidas por microscopía de fluorescencia confocal. Se utilizaron anticuerpos anti-IncA y anticuerpos secundarios anti-*rabbit* marcados con Alexa Fluor 594 (rojo) para marcar la membrana de la inclusión. La pre-incubación de anti-Ptr con el péptido reduce marcadamente la detección de Ptr en el lumen de la inclusión. **A y B.** El ADN fue tenido con Hoechst (azul). Ptr fue immuno-marcado con suero anti-Ptr seguido de un anticuerpo secundario anti-*mouse* marcado con Alexa Fluor 488 (verde). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal. Barras de escala: 10 μ m.

Generación de una mutante *knock-out* en el gen *ptr* mediante un intrón grupo II

El análisis de recombinantes indicó que los genes *ptr* y/o *bioF* podrían estar relacionados al fenotipo defectivo para persistencia observado en la mutante M275. Considerando que en dicha cepa la mutación detectada en *ptr* produce un codón *stop* prematuro que anula su expresión,

mientras que la mutación en *bioF* solo produce la sustitución de un aminoácido, se decidió en primer lugar obtener una mutante nula en *ptr* en un contexto génico Wt. Esto nos permitiría evaluar el rol de *ptr* en la recuperación de la persistencia inducida por IFN γ de manera independiente de *bioF*. Para llevar a cabo esta tarea se utilizó la única herramienta genética disponible en ese momento, la mutagénesis sitio-dirigida por inserción de un intrón grupo II (TargeTron, Sigma Aldrich) (Figura 36). En primer lugar, se seleccionaron los sitios posibles de inserción mediante un algoritmo, considerando de manera positiva la cercanía al extremo 5' y un alto *score* de efectividad. Con ese criterio fueron elegidos dos sitios putativos de inserción en *ptr*: 1) luego de la base 89 (3% del gen, *score* 6,83); 2) luego de la base 444 (15% del gen, *score* 7,78) (Figura 12). Una vez elegidos esos sitios, el vector TargeTron adaptado para *Chlamydia* pDFTT3-*aadA* (Lowden et al., 2015) fue modificado para dirigir el intrón a uno u otro sitio. Luego, *C. trachomatis* L2 fue transformada con cada uno de los plásmidos y solamente se obtuvieron transformantes que habían integrado el intrón en el sitio 2. Este intrón del grupo II presenta un *cassette* de resistencia a espectinomicina que permitió la selección de las transformantes. La interrupción de la copia cromosómica de *ptr* en *C. trachomatis* LGV-L2 *ptr*::GII (*L2 ptr*::GII) se confirmó mediante reacciones de PCR y secuenciamiento (Figuras 14, 15).

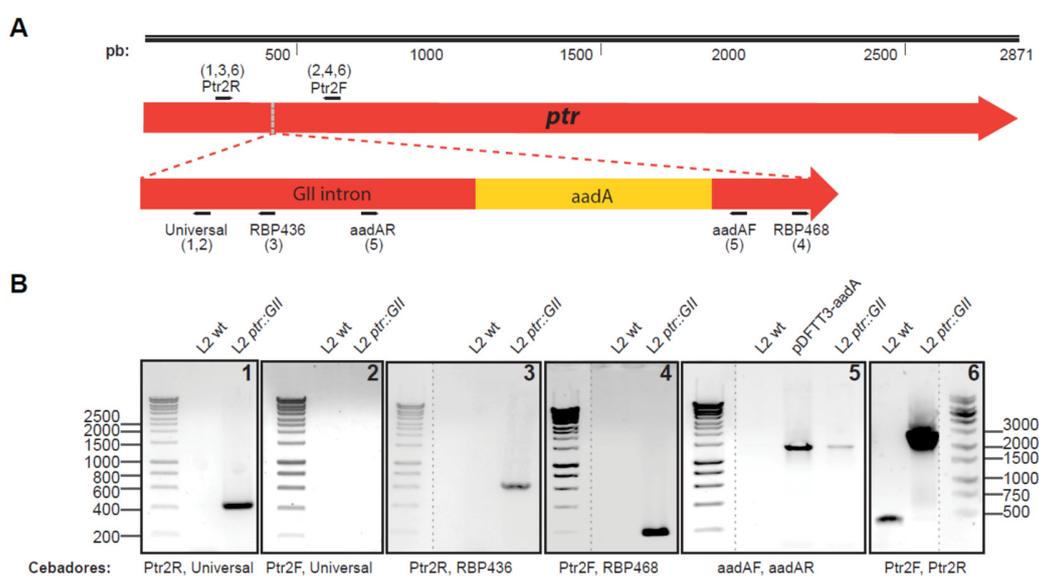
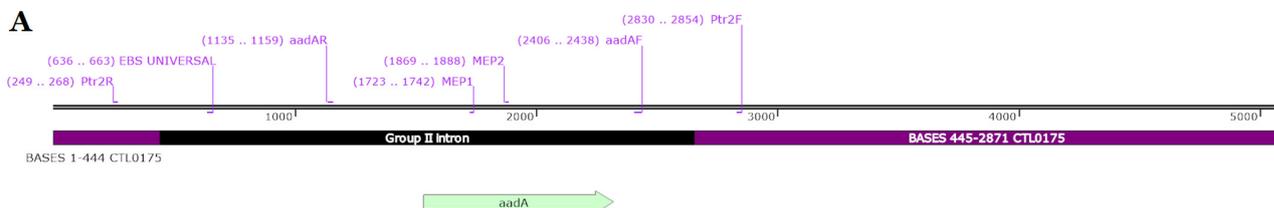


Figura 14. Confirmación de la disrupción de *ptr* mediante PCR. **A.** Representación esquemática de las reacciones de PCR llevadas a cabo utilizando los pares de cebadores indicados. Las combinaciones se indican mediante números entre paréntesis. Las secuencias de los primers se indican en la sección Materiales y Métodos. **B.** Las bandas amplificadas obtenidas son: PCR 1, 366 pb que indican una inserción *sense*; PCR 2, un producto de 400 pb indicaría inserción *anti-sense*; PCR 3, 600 pb indican inserción *sense*; PCR 4, 251 pb indican inserción *sense*; PCR 5, 1200 pb que amplifican el *cassette* de resistencia indicando la detección del intrón sin importar la orientación del mismo; PCR 6, 394 pb para la copia Wt del gen y 2600 pb si ocurrió la inserción. Los números de cada PCR están indicados en la parte superior derecha del gel. El ADN utilizado como templado se indica en la parte superior de cada carril. Las

combinaciones de cebadores utilizadas en cada PCR se detallan debajo de cada gel. Las bandas correspondientes al marcador de peso molecular se indican a la izquierda (1, 2, 3, 4 y 5) y derecha (6).



B

CGGAGCCGCTTTAGTTGTCAAAACAGGAAATAATGCAGATCCTGTCTCGAATCCCCAGGCTTAGCCCATTTTACAGAACACTGTGTGTTCTT
 CCGGAATGAAAAATATCCCGAGCCCTCAGGATTTCCCTGCCTTCCCTAAGCACACATGGGGGTATCTATAACGCATTTACTTACCCAGATAAA
 AACCTGCTTCCTATTCTGTGCGCCAGATAGGGTGTAAAGTCAAGTAGTTAAAGGTACTACTCTGTAAGATAACACAGAAAACAGCCAACC
 TAACCGAAAAGCGAAAGCTGATACGGGAACAGAGCACGGTTGAAAGCGATGAGTTACCTAAAGACAATCGGGTACGACTGAGTCGCAAT
 GTTAATCAGATATAAGGTATAAGTTGTCTTTACTGAACGCAAGTTTCTAATTTCCGTTAAGCATCGATAGAGGAAAAGTGTCTGAAACCTC
 TAGTACAAAGAAAGGTAAGTTAGAGAATAGGACTTATCTGTTATCACCACATTTGTACAATCTGTAGGAGAACCTATGGGAACGAAACGA
 AAGCGATGCCGAGAATCTGAATTTACCAAGACTTAACACTAACTGGGGATACCTTAAACAAGAATGCCTAATAGAAAAGGAGGAAAAAGGC
 TATAGCACTAGAGCTTGAAAATCTTGCAAGGGTACGGAGTACTCGTAGTAGTCTGAGAAGGGTAACGCCCTTTACATGGCAAAGGGGTAC
 AGTTATGTGTACTAAAATTAATAATTTAGTTAGGGAGGAAAACCTCAAAATGAAACCAACAATGGCAATTTTAGAAAAGAAATCAGTAAAAA
 TTCACAAGAAAATATAGACGAAGTTTTTACAAGACTTTATCGTTATCTTTTACGTCAGATATTTATTACGTGGCGACGCGTTGCCTGAC
 GATGCGTGGAGACCGGAAACCTTGCGCTCGTTGCGCCAGCCAGGACAGAAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCA
 CACCGTGGAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCA
 ACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTATGACTGTTTTTTTTGGGGTACAGT
 CTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGGTTACGCCGTGGGTGATGTTTGTATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCA
 GTCGCCCTAAAACAAAGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGC
 GCCATCTCGAACCAGCAGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTATGATTTGCTGG
 TTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACCGCGGAGCTTTGATCAACGACCCTTTTGAAACTTCGGCTTCCCTGGAGAGAGCGAGA
 TTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTTGTTGTGCACGACGACATCATTCGGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAAT
 GGCAGCGCAATGACATTTCTGCAGGTATCTCGAGCCAGCCAGATCGACATTTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACATA
 GCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGC
 TATGGAACCTCGCCCGGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAA
 TCGCGCCGAAGGATGTGCTGCGGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATC
 TTGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATACCAAGGTAGTCG
 GCAAATAATGTCTAAACAATTCGTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAACTCAAGCGTTAGATGCACATAAGCACATAATTGCTC
 ACAGCCAAACTATCAGGCCCGGGACGCGTTGGGAAATGGCAATGATAGCGAAACAACGTAAACTCTTGTGTATGCTTTCATTGTATC
 GTCACGTGATTCATAAACACAAGTGAATGTGCACAGTGAATTTTTACGAACGAACAATAACAGAGCCGTATACTCCGAGAGGGGTACGTA
 CGGTTCCCGAAGAGGGTGGTCAAACAGTACAGTAATGTGAACAAGGCGGTACCTCCCTACTTCACCCGTAACAATGCGAGATTTAG
 ATAATGCTCTGGATCAGTTTGTACATCTCTTTATCCAACCTCTCTCCGCCAAGAAGATTTAAACAAAGAAGTTTCATGCTGTTGAGCAAG
 AATTTGCGATGCATCCAACATAAGATTCTCGTCGTATGCATCGTATTCACAACCTTATAGCTCCTAAAAATCACCCATTAAACCGC

Figura 15. Confirmación del sitio de inserción del intrón tipo II por secuenciamiento. **A.** Representación esquemática del sitio de inserción en el gen *ptr* (también denominado *ctlo175* en *C. trachomatis* LGV-L2) indicando los cebadores utilizados para secuenciar. **B.** Secuencia del sitio de inserción del intrón en la cepa L2 *ptr::GII*. Los primers utilizados están resaltados: Ptr2F, negro; Ptr2R, amarillo; *aadA_R*, rosado; *aadA_F*, gris oscuro; EBS Universal, verde; MEP1, celeste; MEP2, rojo. El *cassette* de resistencia a espectinomicina y la secuencia de *ptr* están escritos en rojo y azul respectivamente. La secuencia del intrón grupo II está indicada en negrita.

Complementación de la expresión de Ptr

Para poder llevar a cabo estudios de complementación génica el gen *ptr* fue clonado en dos vectores de expresión en *C. trachomatis*: pBOMB4R-MCI, bajo el promotor de la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*) que se expresa durante todo el ciclo de desarrollo y pBOMB4-MCI incluyendo 192 pares de bases previos al gen para permitir su expresión bajo el promotor nativo. Las transformantes aisladas en el primer caso fueron capaces de llevar a cabo un ciclo normal en presencia o ausencia de penicilina, que es el antibiótico de selección para estos vectores. Sin embargo, L2 *ptr::GII* transformada con pBOMB4-MCI-192ptr presentó un defecto de crecimiento frente a la penicilina luego de numerosos pasos de purificación mediante ensayos de placa y diluciones limitantes. Constantemente se observaba la presencia de cuerpos aberrantes en algunas inclusiones indicando que probablemente estas bacterias perdían el plásmido (datos no mostrados). Por ende, al no obtener una población homogénea no se pudo analizar la expresión de *ptr* bajo su propio promotor. Se logró la complementación de la expresión de Ptr al transformar la cepa L2 *ptr::GII* con el vector pBOMB4R-*ptrF* (L2 *ptr::GII* PTR-F). La cepa obtenida expresa Ptr fusionada a un epítipo FLAG bajo el promotor de *rpoB*. Como control de sobre-expresión de Ptr, se transformó L2 Wt con el mismo plásmido obteniendo la cepa L2 PTR-F.

La proteína Ptr no se expresa en L2 *ptr::GII* mientras que sí lo hace luego de transformar esta cepa con el vector pBOMB4R-*ptrF*

Se analizó la expresión de la proteína Ptr en las diferentes cepas mediante microscopía de inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-Ptr producidos como se describió. La marcación de Ptr fue detectada en la inclusión de L2 Wt, L2 PTR-F y L2 *ptr::GII* PTR-F, pero no en L2 *ptr::GII*, como era esperable (Figura 16 A). También se verificó que las cepas transformadas con pBOMB4R-*ptrF* expresan Ptr fusionada al epítipo FLAG, tanto por inmunofluorescencia como por *western blot* con anticuerpos anti-FLAG (Figura 16 B). A pesar de múltiples intentos, los anticuerpos anti-Ptr no fueron útiles en ensayos de *western blot*.

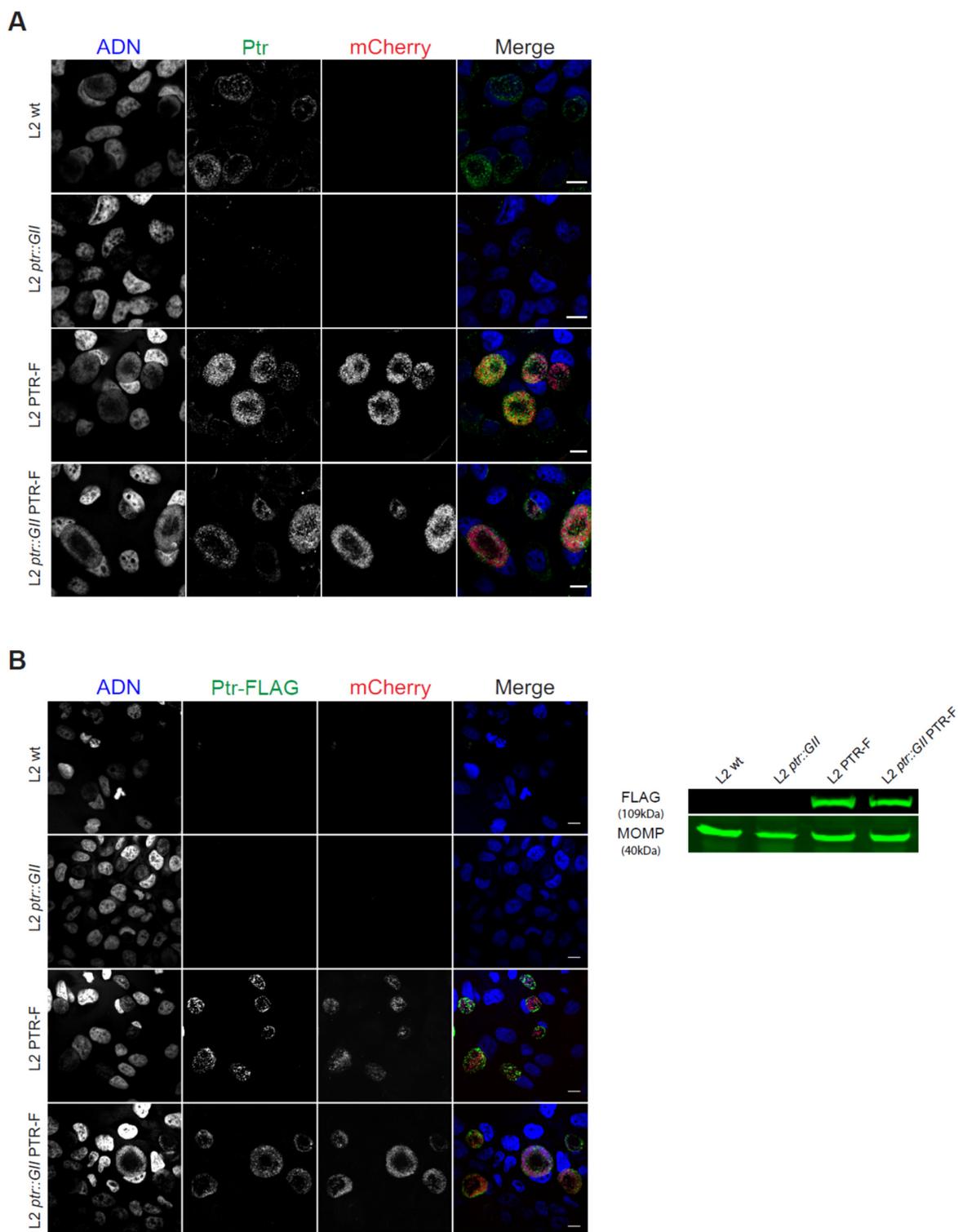


Figura 16. La inactivación por inserción del gen *ptr* anula la expresión de la proteína *Ptr* mientras que las cepas transformadas con pBOMB-*ptrF* expresan *Ptr-FLAG*. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de células HeLa infectadas con las cepas indicadas a 30 hpi. La expresión de *Ptr* (verde) se observó en la cepa

salvaje (L2 Wt, niveles endógenos), L2 que sobre-expresa Ptr unido al epítipo FLAG (L2 PTR-F) y L2 *ptr knock-out* que expresa Ptr unido al epítipo FLAG (L2 ptr::GII PTR-F) pero no en L2 *ptr knock-out* (L2 ptr::GII). Para la detección de Ptr se utilizaron anticuerpos anti-Ptr y anticuerpos secundarios anti-*mouse* marcados con Alexa Fluor 488. Las bacterias transformadas con el plásmido pBOMB-*ptrF* expresan mCherry (rojo). El ADN se tiñó con Hoechst (azul). Barras de escala, 10 μm . **B. Panel izquierdo:** imágenes representativas de microscopía confocal de células HeLa infectadas con las cepas indicadas a 30 hpi. Ptr unido al epítipo FLAG (verde) y mCherry (rojo) resaltan las inclusiones solo en células infectadas con las cepas L2 PTR-F y L2 ptr::GII PTR-F. Para la detección de Ptr-FLAG se utilizaron anticuerpos anti-FLAG M2 y anticuerpos secundarios anti-*mouse* marcados con Alexa Fluor 488. Las bacterias transformadas con el plásmido pBOMB-*ptrF* expresan mCherry (rojo). El ADN se tiñó con Hoechst (azul). Barras de escala, 10 μm . **Panel derecho:** un *western blot* con anticuerpos anti-FLAG M2 (FLAG) confirma la expresión de Ptr marcado con el epítipo FLAG de un tamaño de ~ 109 kDa en extractos de proteínas totales obtenidos de células HeLa infectadas con L2 PTR-F o L2 ptr::GII PTR-F. Para el control de carga, se usaron anticuerpos anti-MOMP (MOMP).

El defecto en la recuperación del estrés inducido por IFN γ está asociado a la falta de expresión de la proteína Ptr

En ausencia de factores estresantes, las cepas que expresaban o no la proteína Ptr generaron niveles similares de IFU (Figura 18 A) y mostraron una cinética de crecimiento análoga en una curva de crecimiento (Figura 17) en comparación con la cepa Wt. Esto indica que el gen *ptr* es prescindible para el desarrollo del ciclo productivo *in vitro* y que la sobre-expresión de Ptr unida a un epítipo FLAG no es perjudicial para el desarrollo de *C. trachomatis*.

La cepa mutante L2 ptr::GII se vio afectada en la recuperación del estrés inducido por IFN γ pero no por penicilina (Figura 18 B y C), reproduciendo el fenotipo observado para M275 (Figura 10). Es importante destacar que durante la condición de recuperación del estrés inducido por IFN γ , L2 ptr::GII transformada con el plásmido pBOMB-*ptrF* produjo significativamente más progenie infecciosa (IFUs) que L2 ptr::GII y niveles similares de IFUs en comparación con las cepas control L2 Wt y L2 PTR-F (Figura 18 B), lo que indica que la expresión ectópica de Ptr rescató la capacidad de reactivarse después de la persistencia inducida por IFN γ en la cepa *knockout* para *ptr*. No se pudo realizar una evaluación similar de la recuperación del estrés inducido por la penicilina para cepas transformadas con el vector pBOMB-*ptrF*, porque este plásmido confiere resistencia a penicilina y, por lo tanto, las cepas transformadas no se vieron afectadas por ese beta-lactámico (Figura 18 C).

El análisis ultraestructural por microscopía electrónica indicó que en la condición no tratada, L2 ptr::GII no presenta alteraciones aparentes en comparación con la cepa complementada (L2 ptr::GII PTR-F) y L2 Wt (Figura 18 D). Sin embargo, durante la recuperación del estrés inducido por IFN γ , las inclusiones L2 ptr::GII contenían significativamente menos EBs y una relación EB/RB reducida (Figura 18 E), reproduciendo el fenotipo de la cepa mutante M275 original

(Figura 10 E). Es importante destacar que esta disminución en los números de EB totales y en la relación EB/RB fue rescatada en la cepa complementada (Figura 18 D y E).

A continuación, se determinó si la reducción en la generación de IFU y la relación EB/RB observada en L2 ptr::GII se asociaba con defectos en la replicación del genoma durante la recuperación del estrés inducido por IFN γ . Se evaluó la tasa de acumulación del genoma (Figura 18 F) y se encontró que, en presencia de IFN γ , todas las cepas mostraron una reducción marcada en la replicación del genoma. Tras la eliminación de IFN γ , L2 ptr::GII mostró una acumulación reducida de genoma en comparación con L2 Wt. Es destacable que la cepa complementada (L2 ptr::GII PTR-F) restableció las tasas de acumulación del genoma a los niveles observados para el control L2. En conjunto, estos hallazgos proporcionan una confirmación genética de que la pérdida de la expresión de Ptr se asocia con una recuperación deteriorada del estrés inducido por el IFN γ .

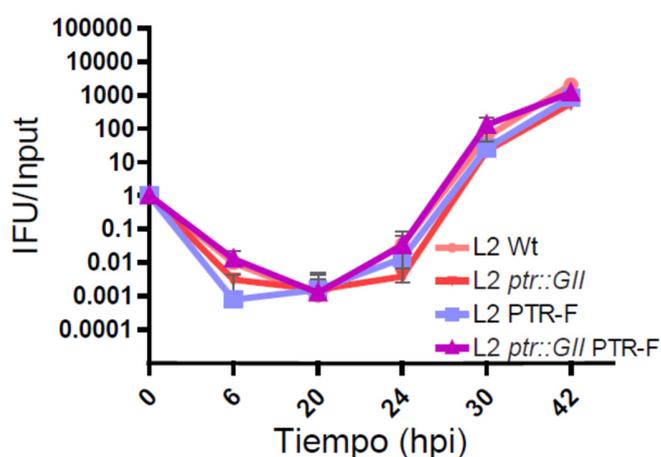


Figura 17. Curva de crecimiento que muestra que las cepas L2 PTR-F, L2 ptr::GII y L2 ptr::GII PTR-F presentan una cinética de crecimiento similar a la cepa parental L2 Wt. Células HeLa fueron infectadas con las cepas indicadas. A las 6, 20, 24, 30 y 42 hpi se colectaron las bacterias por lisis osmótica y se infectó una monocapa fresca de células HeLa para contar el número de inclusiones. Las inclusiones fueron marcadas con anticuerpos anti-Slc1 y enumeradas para determinar IFUs/Input. Los valores representan la media \pm 95% IC.

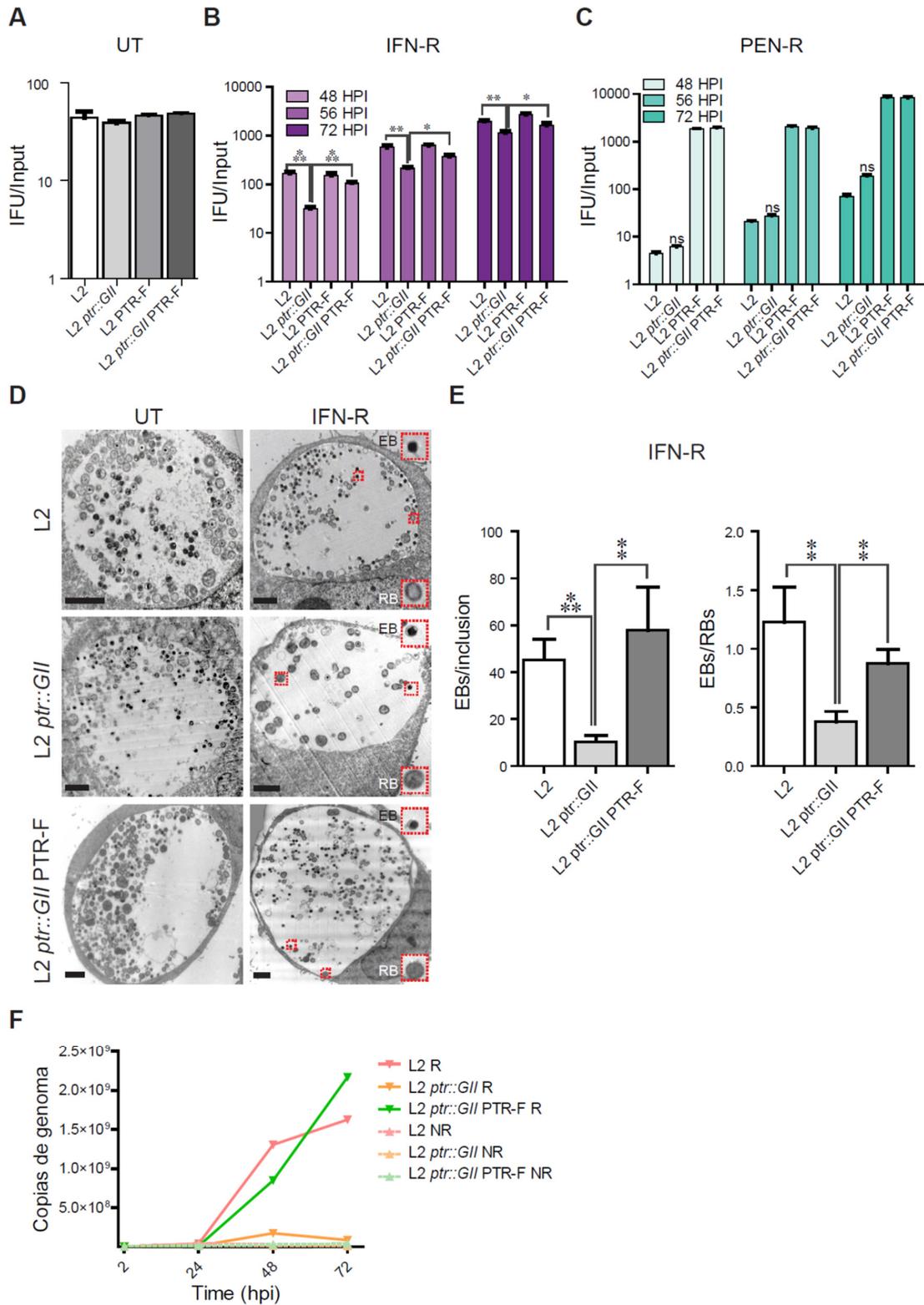


Figura 18. La inactivación por inserción del gen *ptr* conduce a una recuperación deteriorada del estrés inducido por IFN γ . **A.** Las cepas *knock-out* para *ptr* (L2 *ptr*::GII), L2 transformada con el vector pBOMB-*ptrF*, que expresa los niveles endógenos de *Ptr* sumados a la expresión de *Ptr* marcada con un epítipo FLAG, (L2 PTR-F), y L2 *ptr*::GII transformada con el plásmido pBOMB-*ptrF* que expresa *Ptr* marcada con un epítipo FLAG (L2 *ptr*::GII PTR-F), muestran niveles similares de generación de progenie infecciosa en comparación con *C. trachomatis* L2 de tipo salvaje (L2 Wt) en la condición no tratada (UT). El número de bacterias infecciosas se cuantificó a las 30 hpi y se normalizó por el Input (media \pm SEM, n = 3, t-Student). **B.** La cepa L2 *ptr*::GII exhibe una generación disminuida de progenie infecciosa al recuperarse del estrés inducido por IFN γ (IFN-R), mientras que este fenotipo se rescata mediante la expresión de *Ptr* desde un vector plasmídico (cepa L2 *ptr*::GII PTR-F). Las células HeLa se trataron previamente con IFN γ (15 ng/mL) durante 24 horas y se infectaron con las cepas indicadas. A las 24 hpi, se eliminó el IFN γ , las células se complementaron con triptófano (100 mg/L) y se evaluó la recuperación. La progenie infecciosa se cuantificó a las 48, 56 y 72 hpi y se normalizó por Input (media \pm SEM). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-Student (n = 3; * P < 0.05, ** P < 0.01, P < 0.001). **C.** La cepa mutante L2 *ptr*::GII produce progenie infecciosa a niveles similares a L2 Wt al recuperarse del estrés inducido por penicilina (PEN-R). Las células HeLa se infectaron con las cepas indicadas y se suplementaron con penicilina (1 UI/mL) en el momento de la infección. A las 24 hpi se eliminó la penicilina, se adicionó medio completo y se incubaron hasta 48, 56 o 72 hpi para analizar la recuperación. Dado que el vector pBOMB-*ptrF* confiere resistencia a penicilina, la adición de esta droga no afecta a las cepas L2 PTR-F y L2 *ptr*::GII PTR-F. En todos los casos, la progenie infecciosa se normalizó por Input (media \pm SEM, n = 3). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-Student (no significativa (ns), p > 0,05). **D.** Imágenes de microscopía electrónica (TEM) representativas de las condiciones no tratadas (UT, 30 hpi) y de IFN-R (48 hpi) para las células HeLa infectadas con las cepas L2 Wt, L2 *ptr*::GII y L2 *ptr*::GII PTR-F. Los insets resaltan las partículas de *C. trachomatis* que muestran características ultraestructurales típicas de EB y RB. Las barras de escala representan 2 μ m. **E.** Cuantificación de EB/inclusión y EB/RB visualizados por TEM durante la condición IFN-R. Los valores representan la media \pm SEM de al menos tres repeticiones. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t-Student (* P < 0.01 y ** P < 0.001). **F.** Las células HeLa se trataron con IFN γ durante 24 h y se infectaron con las cepas L2 Wt, L2 *ptr*::GII o L2 *ptr*::GII PTR-F. Para la condición de recuperación, se eliminó el IFN γ a las 24 hpi y se adicionó medio completo suplementado con triptófano. Para la condición de no recuperación (NR), el IFN γ estuvo presente continuamente durante la infección. El número de copias del genoma se evaluó mediante PCR en tiempo real durante el tratamiento con IFN γ y tras la recuperación en los momentos indicados post-infección utilizando cebadores específicos para *ompA*. Los puntos de datos representan la media de tres repeticiones.

La proteína *Ptr* se expresa a lo largo del ciclo de desarrollo de *C. trachomatis*

Se evaluó la expresión de la proteína *Ptr* por inmunofluorescencia en diferentes etapas durante el ciclo de desarrollo en células HeLa infectadas con *C. trachomatis* LGV-L2. El ciclo completo en esta serovariedad demora 48 h. La expresión de *Ptr* endógena se detectó a las 18, 24 y 30 hpi, y apenas se detectó a las 48 hpi, lo que sugiere que en las últimas etapas del ciclo de desarrollo la expresión de esta proteína disminuye (Figura 19 A). Además, se determinó que *Ptr* se expresa durante el estrés inducido por IFN γ y en la recuperación (Figura 19 B). No fue posible realizar una cuantificación de los niveles proteicos a lo largo del tiempo debido a que el anticuerpo anti-*Ptr* obtenido no funcionó en ensayos de *western blot*. Análogamente, *Ptr* se expresa a lo largo del ciclo y durante la persistencia inducida por IFN γ y la reactivación en *C. trachomatis* serovar E (Figura 20). En esta cepa las etapas de desarrollo ocurren a tiempos más tardíos que en la cepa de referencia L2 (Miyairi et al., 2006). Sin embargo, en los tiempos analizados se encontró un patrón

similar de expresión, lo que sugiere que Ptr podría tener un rol similar en persistencia en esta serovariedad urogenital.

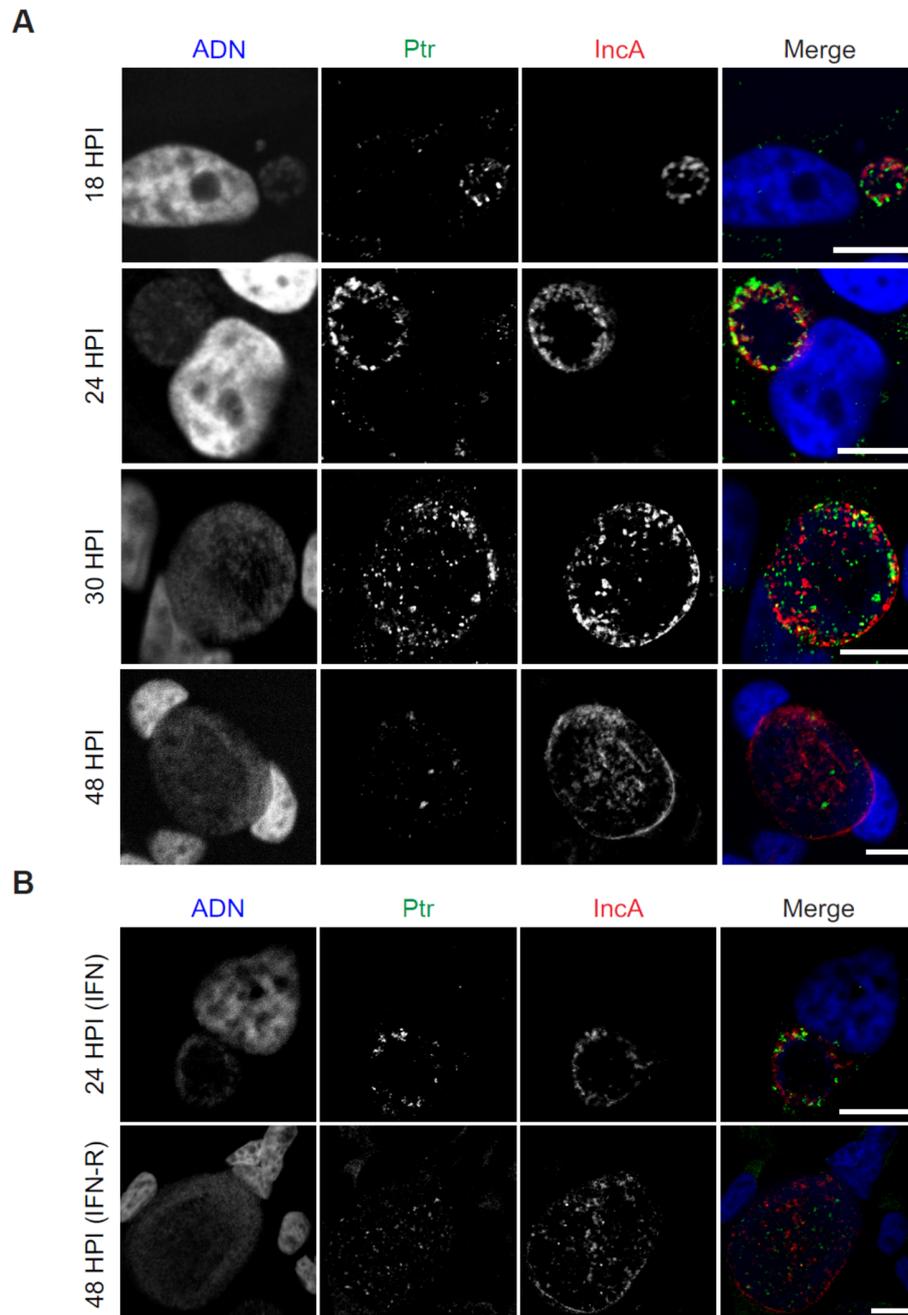


Figura 19. Expresión de la proteína Ptr en *C. trachomatis* LGV-L2. **A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con L2 Wt a 18-24-30-48 hpi. **B.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con L2 Wt 24 hpi durante el tratamiento con IFN γ y en la recuperación de la persistencia inducida por esta citoquina (48 hpi, IFN-R). **A y B.** Para la detección de Ptr (verde) se utilizaron anticuerpos anti-Ptr y anticuerpos secundarios anti-mouse marcados con Alexa Fluor 488; mientras que para la detección de IncA (rojo) se utilizaron anticuerpos anti-IncA y anticuerpos secundarios anti-rabbit marcados con Alexa

Fluor 594. El ADN fue teñido con Hoechst (azul). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Barras de escala, 10µm.

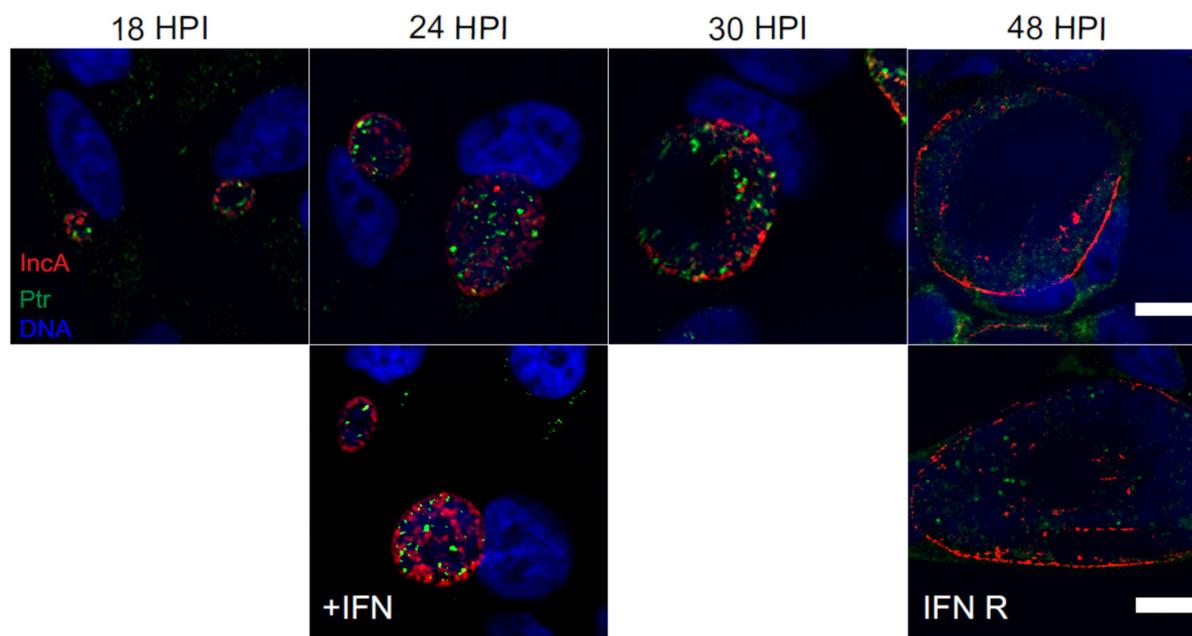


Figura 20. Expresión de la proteína Ptr en *C. trachomatis* serovar E. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con *C. trachomatis* serovar E Wt a las 18-24-30-48 hpi sin tratamiento, 24 hpi durante el tratamiento con IFN γ (+ IFN) y en la recuperación de la persistencia (48 hpi, IFN R). Para la detección de Ptr (verde) se utilizaron anticuerpos anti-Ptr y anticuerpos secundarios anti-mouse marcados con Alexa Fluor 488; mientras que para la detección de IncA (rojo) se utilizaron anticuerpos anti-IncA y anticuerpos secundarios anti-rabbit marcados con Alexa Fluor 594. El ADN fue teñido con Hoechst (azul). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Barras de escala, 10µm.

La proteína Ptr se localiza en el lumen de las inclusiones

Por microscopía de inmunofluorescencia, las células HeLa infectadas con la cepa complementada L2 ptr::GII PTR-F presentan una localización de la proteína Ptr, marcada con anticuerpos anti-FLAG, en las bacterias y en el espacio intraluminal dentro de las inclusiones (Figura 21 A). La inmuno-tinción de Ptr con anticuerpos anti-Ptr reflejó el patrón de localización observado con el anticuerpo anti-FLAG, tanto a nivel de expresión ectópica como endógena (Figura 21 B y 21 C), enfatizando la especificidad de los anticuerpos anti-Ptr. En general, la inmuno-tinción sugiere que Ptr está presente dentro de las inclusiones tanto dentro como fuera de las células bacterianas. La proteína Ptr contiene un péptido señal putativo para la secreción dependiente de Sec, lo que indica que esta proteína podría ser secretada al lumen de inclusión.

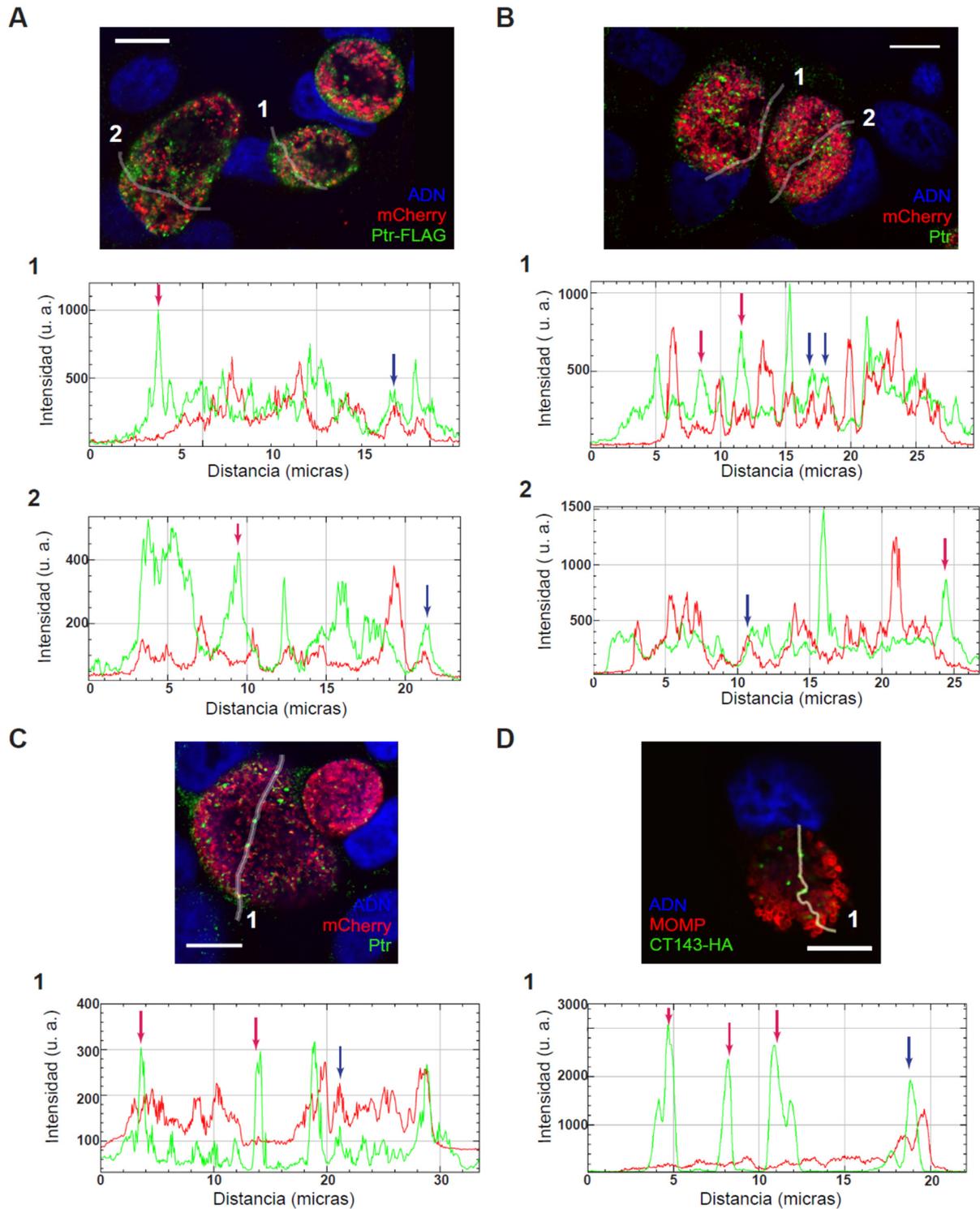


Figura 21. El patrón de localización de la proteína Ptr en la inclusión sugiere que la misma es secretada.
A. Panel superior: imagen representativa de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con la cepa complementada L2 ptr::GII PTR-F a 30 hpi. Las líneas a mano alzada que cruzan la inclusión fueron seleccionadas, de manera arbitraria, como áreas de interés (ROIs 1 y 2). Para la detección de Ptr-FLAG (verde) se utilizaron anticuerpos

anti-FLAG M2 y anticuerpos secundarios anti-*mouse* marcados con Alexa Fluor 488. La cepa L2 ptr::GII PTR-F expresa constitutivamente mCherry (rojo). **Panel inferior:** Perfiles de intensidad multicanal que corresponden a las ROIs indicadas muestran la fluorescencia en unidades arbitrarias (u. a.) correspondiente al canal verde (Ptr unida al epítotope FLAG) y al rojo (bacteria que expresa mCherry). **B. Panel superior:** imagen representativa de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con la cepa L2 PTR-F a 30 hpi. Se indican ROIs 1 y 2. Para la detección de Ptr (verde) se utilizaron anticuerpos anti-Ptr y anticuerpos secundarios anti-*mouse* marcados con Alexa Fluor 488. La cepa L2 PTR-F expresa constitutivamente mCherry (rojo). **Panel inferior:** Perfiles de intensidad multicanal que corresponden a las ROIs indicadas muestran la fluorescencia correspondiente al canal verde (Ptr unida al epítotope FLAG y Ptr endógena) y al rojo (bacteria que expresa mCherry). **C. Panel superior:** imagen representativa de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con la cepa L2 mCherry a 30 hpi. Se indica ROI 1. Para la detección de Ptr (verde) se utilizaron anticuerpos anti-Ptr y anticuerpos secundarios anti-*mouse* marcados con Alexa Fluor 488. La cepa L2 mCherry expresa constitutivamente mCherry (rojo). **Panel inferior:** Perfiles de intensidad multicanal que corresponden a la ROI indicada muestran la fluorescencia del canal verde (Ptr endógena) y rojo (bacteria que expresa mCherry). Las bacterias expresan constitutivamente mCherry debido a los plásmidos pBOMB-ptrF (**A, B**) o p2TK2-SW2-mCherry (**C**). **A-C.** La fluorescencia debida tanto a Ptr-FLAG como a Ptr endógena marca la bacteria (flechas azules) pero también áreas del espacio intraluminal de la inclusión fuera de las clamidias (flechas rojas). **D. Panel superior:** Como control de secreción al lumen de la inclusión, células HeLa fueron infectadas con la cepa L2 transformada con un plásmido que permite la expresión de CT143-HA, fijadas a las 30 hpi y marcadas con anti-HA y anti-MOMP seguidos de anti-*rabbit* Alexa Fluor 488 y anti-*mouse* Alexa Fluor 594, respectivamente. La proteína CT143 muestra el patrón intra-inclusión reportado previamente (da Cunha et al., 2017). Se indica la ROI 1. **Panel inferior:** Perfiles de intensidad multicanal que corresponden a la ROI indicada muestran la fluorescencia del canal verde (CT143-HA) y rojo (MOMP). Las flechas rojas indican la localización de CT143 fuera de las bacterias, las flechas azules indican tinción para CT143-HA rodeada de señal de MOMP. **A-D.** El ADN fue teñido con Hoechst. Se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal, las barras de escala representan 10µm.

Se ha informado anteriormente que otras proteasas de *Chlamydia* como HtrA, Tsp y CPAF se secretan y se localizan en vesículas libres de bacteria dentro del lumen de las inclusiones (Zhong, 2011). Además, también se ha informado que otras proteínas de *Chlamydia* como Pls1 y Pls2 (Jorgensen and Valdivia, 2008) y los sustratos del sistema de secreción tipo III CT142, CT143 y CT144 (da Cunha et al., 2017) se localizan fuera de las células bacterianas pero dentro del lumen de inclusión. Para determinar si Ptr co-localizaba con alguna de las proteínas secretadas intra-inclusión descritas previamente, se transformó un plásmido que expresaba CT143 fusionado al epítotope HA (pCT143-2HA) (da Cunha et al., 2017) en *C. trachomatis* L2 y se evaluó la localización subcelular de las proteínas CT143 y Ptr mediante microscopía de inmunofluorescencia. La localización de CT143 en *C. trachomatis* L2 transformada con pCT143-2HA reprodujo el patrón de localización intraluminal informado previamente (Figura 21 D) (da Cunha et al., 2017). Curiosamente, CT143-2HA y Ptr co-localizan parcialmente en partículas extra bacterianas dentro de la inclusión (Figura 22 A). El procesamiento de las imágenes de microscopía confocal para visualizar la distribución de la proteína de interés en tres dimensiones (renderizado) apoya la observación de que se puede encontrar Ptr estrechamente asociado a las estructuras positivas de CT143 en el lumen de inclusión. Se puede visualizar el renderizado correspondiente a la inclusión

de la figura 22 A en <https://drive.google.com/drive/folders/1UYoObdQtiCBxOUgujFYyjQHfPsl aXoSU?usp=sharing> o utilizando el siguiente código QR:



Para confirmar de forma independiente la secreción de Ptr, se realizó el fraccionamiento de células HeLa infectadas con cepas que expresan Ptr-FLAG para separar células bacterianas (sedimento) del lisado de la célula hospedadora (sobrenadante). Como se observa en la Figura 22 B, mediante análisis de *western blot*, la proteína mayor de membrana externa de *Chlamydia*, MOMP, solo se detectó en los sedimentos bacterianos, mientras que Ptr-FLAG se detectó tanto en los sedimentos bacterianos como en los sobrenadantes (Figura 22 B).

En general, estos resultados nos llevan a postular que una parte significativa de Ptr se libera de las células de *Chlamydia* y se localiza en partículas extra bacterianas dentro del lumen de inclusión.

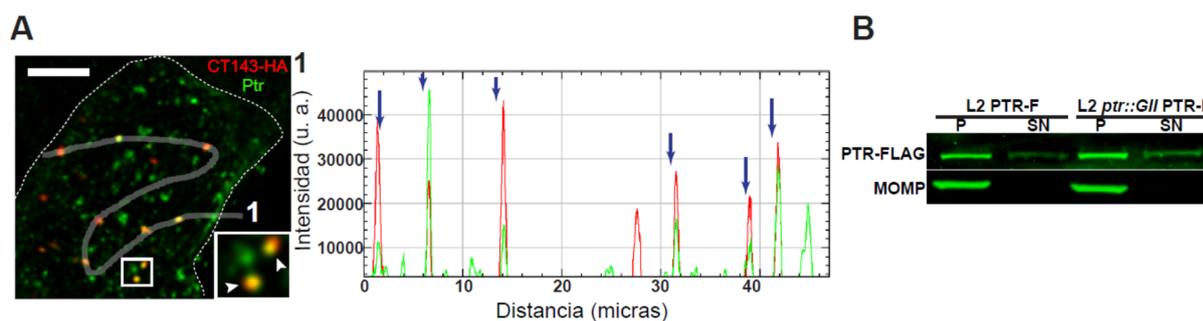


Figura 22. A. Las proteínas Ptr y CT143 co-localizan en estructuras globulares dentro del lumen de la inclusión. Panel izquierdo: Imagen de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas por 30 horas con la cepa L2 CT143-HA. Para la detección de Ptr (verde) se utilizaron anticuerpos anti-Ptr y anticuerpos secundarios anti-*mouse* marcados con Alexa Fluor 488 y para la detección de CT143-HA (rojo) se utilizaron anticuerpos anti-HA y anticuerpos secundarios anti-*rabbit* marcados con Alexa Fluor 594. Se muestra una sección del plano z. El inset resalta estructuras globulares donde estas proteínas co-localizan (puntas de flecha). **Panel derecho:** Perfiles de intensidad multicanal que corresponden a la ROI indicada muestran la fluorescencia en unidades arbitrarias del canal rojo (CT143-HA) y verde (Ptr). Las flechas azules indican estructuras de co-localización. La barra de escala representa 5µm. **B. La proteína Ptr es secretada.** Fraccionamiento crudo del precipitado bacteriano (P) y el sobrenadante del lisado de las células hospedadoras (SN). Las células HeLa fueron infectadas con las cepas L2 PTR-F o L2 ptr::GII PTR-F y lisadas por lisis osmótica 30 hpi. Se realizó un *western blot* con el precipitado bacteriano y el sobrenadante con anticuerpos anti-FLAG (PTR-FLAG) y anti-MOMP (MOMP).

Importancia de la actividad proteasa de la proteína Ptr en persistencia

El gen *ptr* codifica una proteasa secretada no caracterizada, que comparte una identidad del 23% con la proteasa III dependiente de zinc de *E. coli* K-12 (Pitrilisina, una enzima periplásmica que degrada péptidos pequeños). La proteína Ptr pertenece a la familia de las peptidasas M16 e incluye un motivo conservado entre los aminoácidos 105-109 (H-X-X-E-H) en la sección N-terminal involucrado en la actividad enzimática en Pitrilisina. Las histidinas coordinan el zinc y el glutamato está involucrado en la actividad catalítica (Becker and Roth, 1992). Será interesante a continuación determinar la relevancia de cada uno de estos residuos en el papel de Ptr frente a la persistencia para confirmar la importancia de su actividad proteasa. Como un primer abordaje se investigó si el sitio activo predicho estaba mutado en alguna de las mutantes de la colección que se utilizó en el *screening*. En la colección están presentes, además de la mutación con pérdida de sentido en M275, 26 mutaciones en *ptr*: 9 mutaciones sinónimas que no generan cambios en el aminoácido codificado, 6 que generan un cambio de aminoácido por otro con características químicas similares y 11 que cambian el aminoácido por otro distinto (Figura 23). Se planteó la como hipótesis que todas estas mutaciones presentes en la colección no afectan la función de Ptr involucrada en la recuperación de la persistencia, ya que las mutantes que las poseen fueron capaces de recuperarse a niveles similares a la cepa Wt, excepto por M275. Es relevante resaltar que no se encuentra ninguna mutación en el sitio activo predicho. Este análisis sugiere que la actividad proteasa de Ptr podría ser importante para la recuperación del estrés inducido por IFN γ .

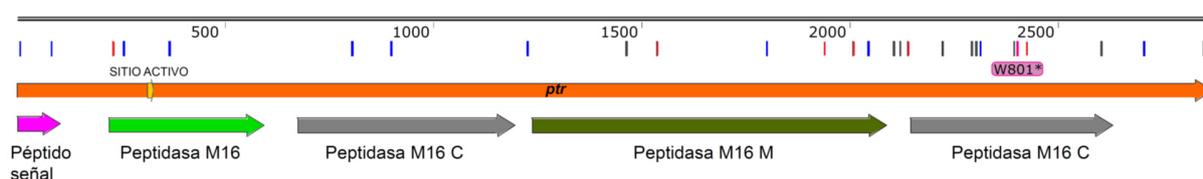


Figura 23: Mutaciones presentes en *ptr* en la colección de mutantes utilizada en el *screening*. Se indica la ubicación de cada mutación con un código de color: fucsia (mutación con pérdida de sentido o “nonsense”), gris (mutaciones que no generan cambios en el aminoácido codificado o “sinónimas”), rojo (mutaciones que generan un cambio de aminoácido por otro con características químicas similares o “silenciosas”) y azul (mutaciones que cambian el aminoácido codificado o “no sinónimas”).

Una mutante *knock-out* para el gen *ptr* exhibe un *clearance* demorado en el tracto genital murino

Finalmente, se centraron los esfuerzos en analizar qué rol cumple la proteína Ptr durante la infección del tracto genital y para ello se utilizó un modelo previamente descrito de infecciones

urogenitales en ratón (Lujan et al., 2018). El protocolo utilizado se esquematiza en la Figura 24 A y se muestra la evidencia de una infección exitosa por microscopía directamente del tejido o en monocapas infectadas con exudados, por efectos en la anatomía del útero infectado como estenosis y dilataciones, y por amplificación del gen de la proteína de *shock* térmico 60 clamidial (*hsp60*) (Figura 24). Estos estudios fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Damiani en el IMBECU-CONICET.

En particular, se intentó determinar si *ptr* presentaba algún rol *in vivo* más allá de la función que tuviera en la recuperación de la persistencia inducida por IFN γ , ya que este fenotipo es difícil de recapitular en ratones para *C. trachomatis* debido a que se trata de una especie adaptada a infectar humanos. Futuros estudios con *C. muridarum* portando mutaciones en el gen de interés, o mejor aún, en un modelo *in vivo* de persistencia inducida por interferón gamma serían útiles para seguir estudiando la función de *Ptr* *in vivo*. Entonces, en primer lugar se evaluó el desempeño de esta mutante *in vivo*, ya que este representa el primer estudio con una cepa nula en *ptr*. Ejemplares hembra de ratones C57/BL6 fueron inoculados intravaginalmente con *C. trachomatis* L2 Wt o L2 *ptr::GII* y se evaluó: (i): la progenie infecciosa en descargas vaginales a los 10 y 14 días post-infección (dpi) y (ii): carga de *Chlamydia* en útero a los 14 dpi. A los 10 dpi, se encontraron niveles similares de progenie infecciosa en el exudado vaginal para ambas cepas. Sorprendentemente, a los 14 dpi, la cantidad de progenie infecciosa fue mayor para la cepa L2 *ptr::GII* comparada con la Wt (Figura 25 A). De acuerdo con ello, se detectó un incremento del 44% en la carga bacteriana por *western blot* para la cepa mutante L2 *ptr::GII* en tejidos uterinos obtenidos 14 dpi (Figura 25 B-C). Estos resultados sugieren que la falta de *Ptr* le permite a *C. trachomatis* evadir el *clearance* en el tracto genital ratones hembra C57/BL6.

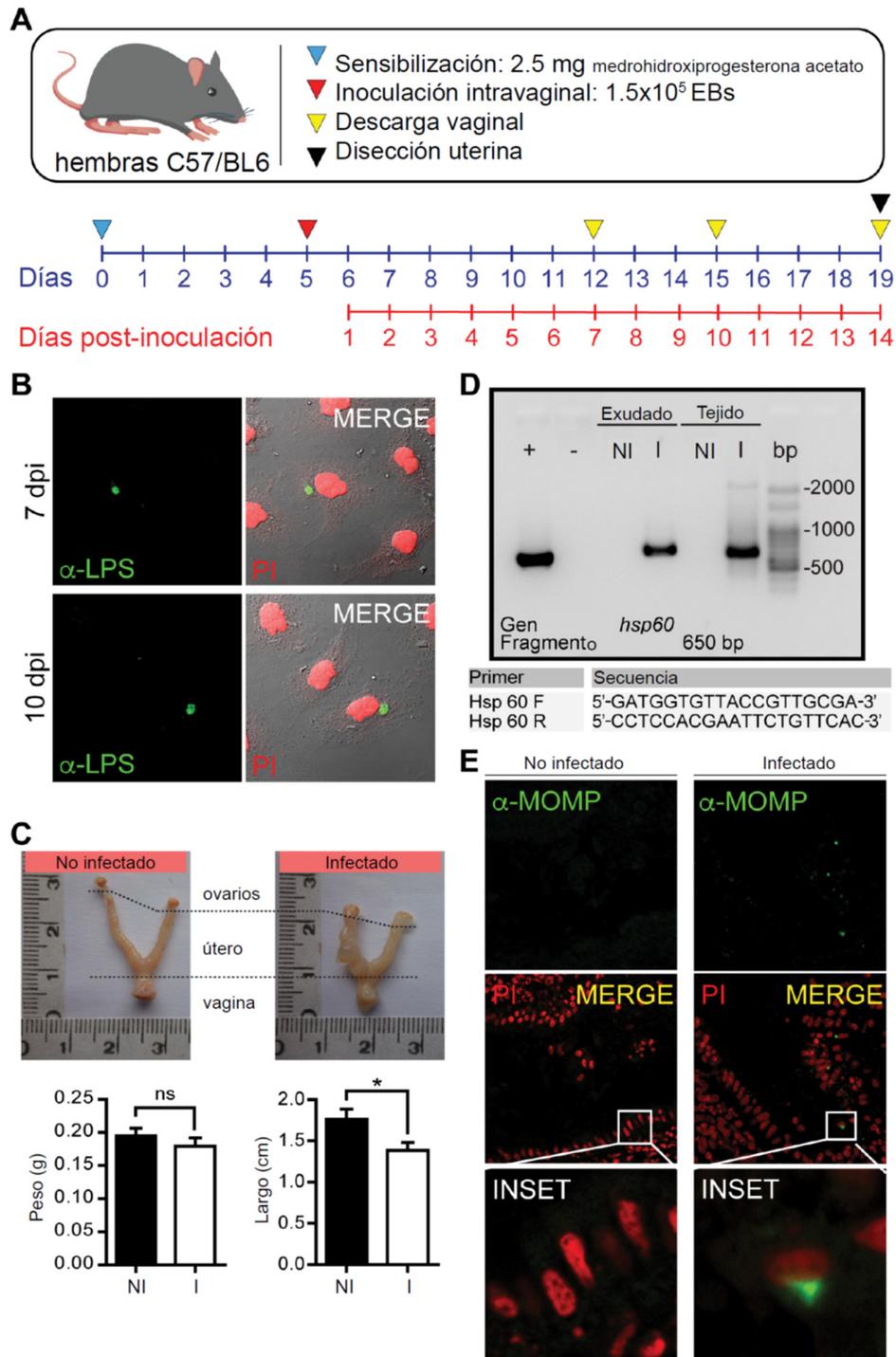


Figura 24. Representación esquemática del modelo de infección en roedores utilizado en este estudio y evidencia de una infección uterina exitosa con *C. trachomatis* LGV-L2. A. Protocolo de sensibilización, inoculación, y muestreo. B. Se colectaron descargas vaginales de cada animal con una torunda desechable y se utilizaron para infectar células HeLa para analizar la presencia de *Chlamydia* a los distintos dpi. Las inclusiones se detectaron con un anticuerpo anti-LPS acoplado a FITC (verde). El ADN se tiñó con ioduro de propidio (PI, rojo). C. Examinación anatómica del tracto genital de ratones hembra no infectados o infectados (paneles superiores). Se midió peso y largo

de cada útero, 14 dpi. Los valores son la media \pm SEM. La significancia estadística se testeó con el test t-Student ($*p < 0.05$), (paneles inferiores). **D.** Detección de *C. trachomatis* mediante amplificación del gen *hsp60* en descargas vaginales (exudado) o en homogenatos de útero (tejido). Gel de electroforesis indica muestras: control positivo (+), control negativo (-), no infectado (NI) e infectado (I). En el último carril se muestra un marcador de peso molecular 100pb (panel superior). El nombre de los *primers* y la secuencia también se detallan (panel inferior). **E.** Inmunofluorescencia de las inclusiones utilizando un anticuerpo anti-MOMP acoplado a FITC (verde) en tejido uterino murino de los grupos no infectados (izquierda) e infectados (derecha). El ADN está marcado con yoduro de propidio (PI, rojo).

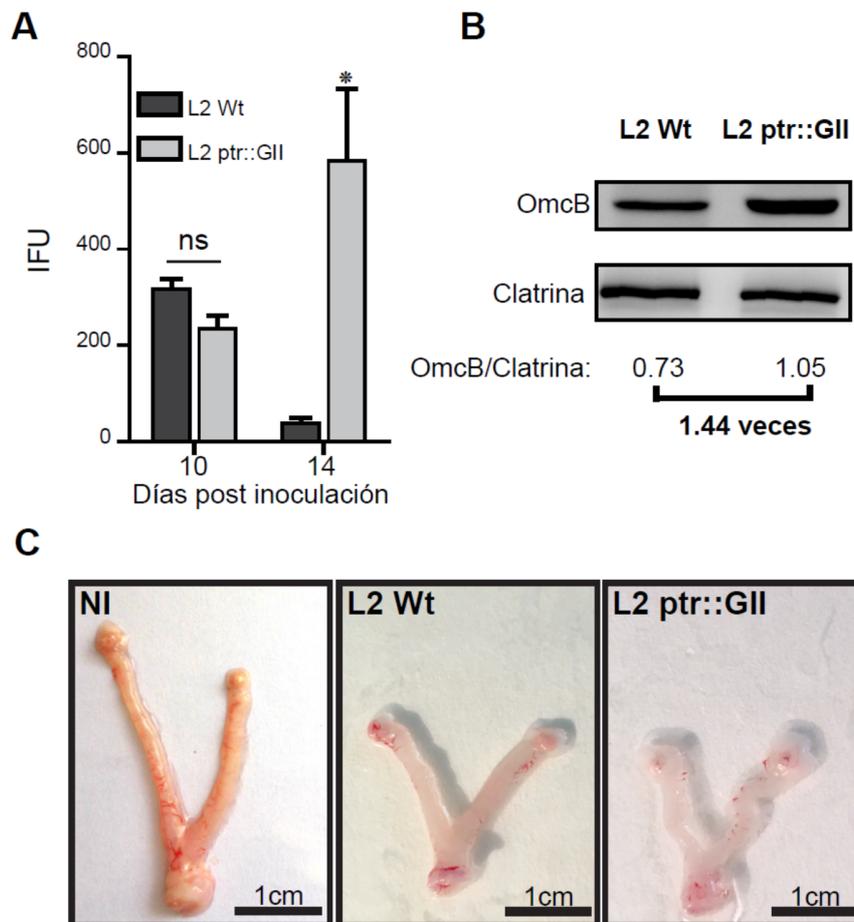


Figura 25. Una mutante nula en el gen *ptr* presenta un *clearance* demorado en el tracto genital murino.

A. Cuantificación de IFUs totales en secreciones vaginales cuantificados por inmunofluorescencia a los días 10 y 14 post inoculación (dpi). Los valores se expresan como la media \pm SEM. La significancia estadística fue calculada por el test de ANOVA seguido de Bonferroni ($n=3$, $*P < 0.05$; $ns > 0.05$). **B.** A los 14 dpi, los úteros de los ratones infectados fueron homogeneizados y analizados por *western blot* para OmcB (carga clamidial) y clatrina (carga células del hospedador). **C.** Imágenes representativas de los úteros de cada grupo: control no infectado (NI), infectado con *C. trachomatis* L2 (L2 Wt), e infectado con *C. trachomatis* L2 ptr::GII (L2 ptr::GII) a 14 dpi.

CAPÍTULO 3: Rol de las proteínas Pmps en persistencia

Introducción

Características de las Pmps

Junto con las “*inclusion membrane proteins*” o Incs, las proteínas pleomórficas de membrana o Pmps son únicas de la clase *Chlamydia* (Rockey et al., 2000). La primera Pmp fue identificada en 1996 como una proteína de 90 kDa inmunogénica en una cepa causante de abortos ovinos, posteriormente identificada como *C. abortus* (Longbottom et al., 1996; Longbottom et al., 1998). El análisis comparativo entre los genomas de *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* reveló la presencia de genes homólogos al identificado en *C. abortus* (Kalman et al., 1999). En *C. pneumoniae* se observa una expansión de la familia Pmp, representando un 22% de la capacidad codificante aumentada comparada con *C. trachomatis*. El genoma de *C. trachomatis* presenta 9 genes *pmp* (PmpA-I), mientras que *C. pneumoniae* contiene 21 genes *pmp* (Pmp 1-21). Debido a la pequeñez del genoma clamidial, la conservación de un alto número de proteínas relacionadas debe implicar un rol crítico (Grimwood and Stephens, 1999). Estas proteínas representan el 13,6% y 17,5% de la capacidad codificante específica de clamidia en *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*, respectivamente (Rockey et al., 2000). El factor común en la superfamilia Pmp son repeticiones de GGA(I,L,V) y FXXN ubicadas en la mitad N-terminal. En el motivo FXXN, la primera X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina; la segunda puede ser cualquiera menos metionina, triptófano o cisteína (Grimwood and Stephens, 1999). Datos del laboratorio del Dr. Hegeman han demostrado que se requiere un mínimo de 2 FXXN o 1 FXXN y 1 GGA(I,L,V) para la adherencia de Pmp21 a las células humanas (Molleken et al., 2010). La parte central del dominio pasajero (PD) de las 9 Pmps de *C. trachomatis* serovar E, con una alta densidad de motivos (PmpC 10 a PmpD 34), mostró adhesión similar a células humanas en un ensayo con levaduras, pero una capacidad de adherencia diferenciada en un ensayo con *beads* recubiertas de proteína, donde PmpD tuvo la unión más fuerte y PmpH la menor (14 motivos) (Becker and Hegemann, 2014). Sin embargo, todas las versiones recombinantes del PD bloquean la infección subsiguiente con la misma especie (*C. trachomatis*) pero no con *C. pneumoniae*, y viceversa (Becker and Hegemann, 2014). Esto indica que las Pmps de una especie reconocen los mismos receptores celulares. El número promedio de FXXN por Pmp es 13,6 (*C. trachomatis*) u 11,3 (*C. pneumoniae*) mientras que el promedio predicho por proteína en estas especies es 0,73 y 0,84; respectivamente (Grimwood and Stephens, 1999). El número promedio en *Chlamydia* de GGA(L,V,I) es 7 por Pmp (Rockey et al., 2000). Proteínas no clamidiales que contienen estos motivos están involucradas en adherencia a los tejidos (Rockey et al., 2000).

De acuerdo a comparaciones genómicas, las Pmp se han dividido en 6 subgrupos filogenéticos: subgrupo A (PmpA y Pmp19), B (PmpB/C y Pmp20), D (PmpD y Pmp21), E (PmpE/F y Pmp 15-18), G (PmpG/I y Pmp1-13) y H (PmpH y Pmp14) (Grimwood and Stephens, 1999; Rockey et al., 2000). Los genes de esta familia se localizan en distintas áreas del cromosoma. Las de *C. trachomatis* en dos *clusters* (Figura 26C) y las de *C. pneumoniae* en 3 *clusters*, mientras que *pmpD/pmp21* se encuentra como un gen aislado. Todas las *pmps* de *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* se transcriben, pero mientras que todas las de *C. trachomatis* se traducen, *C. pneumoniae pmp3/4/5/12/17* presentan una mutación con cambio de marco de lectura o un codón *stop* prematuro que hacen que no se traduzcan (Grimwood et al., 2001; Tan et al., 2010). El número, la organización y el tamaño de las secuencias codificantes de las Pmps, así como la Pmp más conservada difieren de manera intra- e interespecífica (Van Lent et al., 2016). Un análisis bioinformático reveló que PmpB, PmpA, PmpH y PmpD son las más conservadas entre las 4 especies: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. abortus* y *C. psittacci* (21-25% de conservación de la secuencia) (Van Lent et al., 2016). Mientras que dentro de *C. trachomatis*, PmpD/A/I/C/B/G presentan un nivel de conservación de la secuencia aminoacídica mayor al 95%. Al analizar varias secuencias de cada especie se encontró que la única que presentaba un número constante de estas proteínas (9) era *C. trachomatis* (Van Lent et al., 2016). El hecho de que la organización en el genoma dentro de la misma especie varíe (por ej. en *C. pneumoniae*) indica que las CDS de *pmps* están localizadas en regiones del genoma donde ocurrieron altos niveles de recombinación (Van Lent et al., 2016). El nivel de heterogeneidad entre las Pmps sugiere una correlación de las diferentes especies y serovariedades con distintos tropismos de tejido, adaptación al nicho y causa de diferentes cuadros clínicos (Gomes et al., 2006; Becker and Hegemann, 2014; Vasilevsky et al., 2016).

El primer estudio con una cepa mutante (obtenida por mutagénesis química) en el gen *pmpD* (*C. trachomatis*) fue publicado en 2014 (Kari et al., 2014) y demostró que PmpD no es esencial para el crecimiento de *Chlamydia*, pero podría tener un rol en el contacto RB-membrana de la inclusión. La ausencia de PmpD no impidió la adhesión a células murinas *in vitro* o la infección murina *in vivo*, pero sí disminuyó la adhesión a células humanas *in vitro* y causó menor infección ocular en la fase inicial en un modelo *in vivo* en macacos, sugiriendo especificidad de especie (Kari et al., 2014). Recientemente han sido obtenidas mutantes por inserción de transposones en PmpA, D e I de *C. muridarum*. En PmpI::Tn la inserción ocurrió en el barril beta y se observa una morfología aberrante, siendo un fenotipo mixto que los investigadores atribuyen a la expresión variable de las Pmps. Esta cepa presenta menor producción de IFUs *in vitro* y en ratones, pero no presenta problemas de adhesión. Al complementar su expresión se recupera el número de IFUs.

Este grupo ha observado que ninguna Pmp analizada es esencial para la adhesión, aunque la que presenta una disminución en la adhesión con respecto al control es *pmpA::Tn* (Wang, La Brie, Hybiske, Hefty; no publicado, presentado en CBRS 2019).

El receptor EGFR (de factor de crecimiento epidérmico) fue identificado como el receptor del hospedador responsable de interactuar con Pmp21 y mediar la internalización de *C. pneumoniae* (Molleken et al., 2013). Sin embargo, PmpD no se une a EGFR, aunque comparte un 33% de identidad con Pmp21 (Favaroni, 2017). Todavía no se ha identificado un receptor celular para las Pmps de *C. trachomatis*.

Sistema de secreción tipo V

El sistema de secreción tipo V es un mecanismo de dos pasos mediante el cual las bacterias pueden secretar factores de virulencia al espacio extracelular. Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de una secuencia Sec en el N-terminal, que permite el transporte proteico dependiente de Sec a través de la membrana interna y un dominio pasajero, que es secretado al espacio extracelular a través de un barril beta en el C-terminal, responsable de crear un poro en la membrana externa (Gawarzewski et al., 2013). Se conocen 5 tipos de T5SS, el más sencillo es el TVa, descrito como un polipéptido con una señal Sec N-terminal, un PD central y un barril beta en el C-terminal. Todavía no se conoce el mecanismo de traslocación a la membrana externa desde el periplasma, aunque se han propuesto modelos como el *hairpin* formado por secuencias *linker* o el modelo Omp85 en donde chaperonas en el periplasma asisten el proceso (Gawarzewski et al., 2013). El PD puede ser clivado en fragmentos funcionales por un proceso auto catalítico o por proteasas específicas. En algunos casos, como la proteína AIDA en *E. coli*, los fragmentos clivados se pueden encontrar asociados con la membrana externa (Charbonneau et al., 2006).

Todas las Pmp se predicen autotransportadores del sistema de secreción tipo V (T5SS) pertenecientes a TVa (Figura 26). Estas proteínas presentan una secuencia líder dependiente de Sec en el N-terminal; un dominio C-terminal rico en triptófano que presenta características de barril beta y termina en fenilalanina sugiriendo una localización en membrana externa; y un dominio central pasajero (PD), que es expuesto en la superficie del EB y puede ser clivado (Grimwood and Stephens, 1999) (Henderson and Lam, 2001). Esta predicción es avalada por evidencia experimental para varias Pmps (Longbottom et al., 1998; Vandahl et al., 2002; Wehrl et al., 2004; Kiselev et al., 2007; Kiselev et al., 2009; Molleken et al., 2010; Tan et al., 2010; Saka et al., 2011). En un análisis proteómico llevado a cabo por Saka et al., se identificaron péptidos semitripticos por espectrometría de masa para 7 Pmps de *C. trachomatis* LGV-L2, exceptuando

PmpA y PmpC, indicando la generación de numerosas formas procesadas de estas proteínas, cuyas funciones todavía no fueron elucidadas (Saka et al., 2011). También se han identificado formas clivadas de Pmp6/20/21 en *C. pneumoniae* (Vandahl et al., 2002). No se conoce si las Pmps son encargadas de auto-clivarse o si hay proteasas clamidiales o del hospedador involucradas. Además de generar variados péptidos se ha demostrado que Pmps recombinantes con menor o mayor número de motivos pueden formar homo- y hetero-oligómeros similares a protofibrillas (Swanson et al., 2009; Favaroni, 2017). Estos oligómeros podrían adherirse a un receptor celular y actuar como un señuelo evadiendo la respuesta del hospedador (Favaroni, 2017).

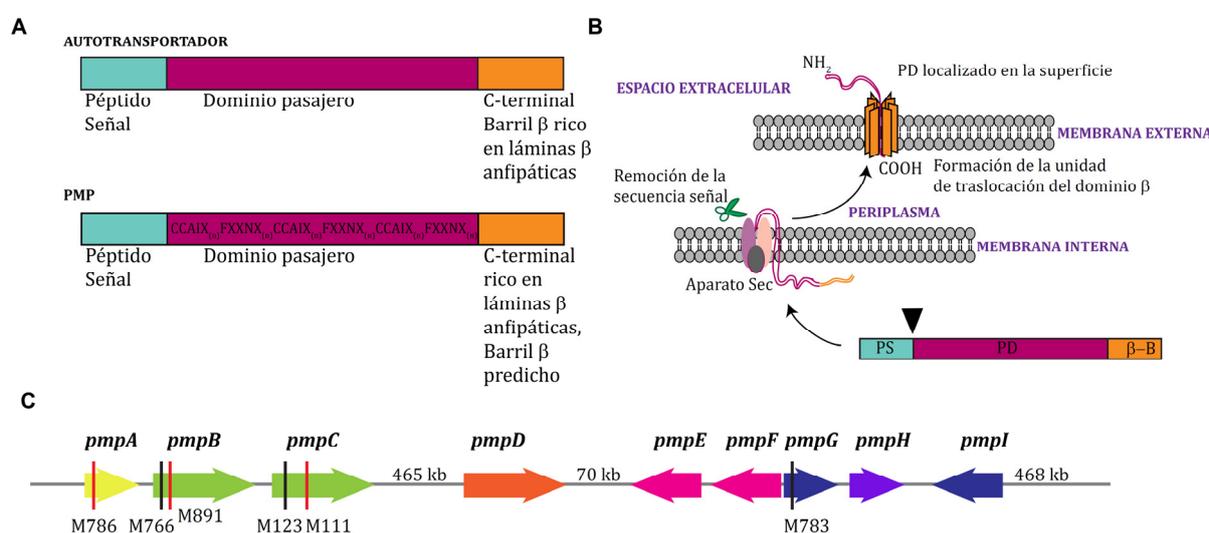


Figura 26. A. Anatomía de un autotransportador. Los tres dominios funcionales de las proteínas se indican: la secuencia señal (verde), el dominio pasajero (morado) y el dominio β (naranja). Se muestra un mapa lineal de las proteínas autotransportadoras comparado con el mapa de una Pmp clamidial. El dominio pasajero contiene los motivos funcionales y las regiones repetitivas. **B. Representación esquemática de un Sistema de secreción tipo V o autotransportador.** Las proteínas autotransportadoras son sintetizadas y generalmente exportadas a través de la membrana citoplasmática vía la maquinaria Sec. Una vez dentro de la membrana interna la secuencia señal es clivada, el dominio β es insertado en la membrana externa en una estructura de barril β favorecida biofísicamente formando un poro en la membrana externa y el dominio pasajero se inserta en el poro y es traslocado a la superficie bacteriana. **A y B. Adaptado de Henderson et al.** (Henderson and Lam, 2001). **C. Arreglo de los genes de la familia Pmp en *C. trachomatis*.** El tamaño del genoma es de 1,04 Mb. Las familias de genes están identificadas con diferentes colores, como las designaron Grimwood y Stephens (Grimwood and Stephens, 1999). La distancia cromosomal entre los cluster de genes se indica en kilobases (kb). Con líneas rojas y negras se indican las mutaciones *nonsense* y *missense*, respectivamente, encontradas en las cepas resultantes del *screening*, cuya identificación se encuentra por debajo de cada mutación. Cada cluster se transcribe como un operón (Carrasco et al., 2011).

Expresión de las Pmps durante el ciclo de desarrollo

Las Pmps muestran diferentes niveles de expresión entre ellas y entre distintas cepas. PmpA presenta un menor nivel de expresión comparada con las demás, tiene un pico 12 hpi (Nunes et al., 2007) y algunos estudios proteómicos muestran que PmpA solo es detectada en los RBs (Skipp et al., 2005; Saka et al., 2011). Los autores sugieren una mayor importancia de PmpA durante las etapas tempranas de desarrollo (Nunes et al., 2007). El trabajo posterior de Skipp y colaboradores detectó pmpA en EBs aunque en menor cantidad que en el RB (Skipp et al., 2016); y en el estudio proteómico de Oostergaard et al., también de 2016 pero en serovar D, no fue detectada en ninguno de los dos (Oostergaard et al., 2016). PmpB, por el contrario, se encuentra en mayor proporción en el estadio EB (Skipp et al., 2005; Saka et al., 2011; Oostergaard et al., 2016; Skipp et al., 2016). Solo en uno de los reportes PmpB se encuentra en menor cantidad en el EB que en el RB, sin embargo, es la que presenta la mayor relación EB/RB (Skipp et al., 2016). En el proteoma del estado persistente inducido por IFN γ , PmpA no fue detectada, mientras que PmpB se encontró en menor cantidad en los aRBs que en los EBs (Oostergaard et al., 2016). En cuanto a PmpC, es detectada tanto en EB como RB (Skipp et al., 2005; Saka et al., 2011; Oostergaard et al., 2016; Skipp et al., 2016), generalmente en menor proporción en los cuerpos elementales (Saka et al., 2011; Skipp et al., 2016). PmpD es una de las proteínas mayoritarias del RB en serovar L2 (Skipp et al., 2016), y también es detectada en EBs (Skipp et al., 2005; Saka et al., 2011; Oostergaard et al., 2016; Skipp et al., 2016). De interés, hay estudios que reportan un mayor nivel de transcritos de PmpD tanto en *C. trachomatis* como en *C. pneumoniae* en el momento de la conversión RB a EB (Vandahl et al., 2002; Kiselev et al., 2007) y en este tiempo también observan el clivaje del dominio pasajero, hecho que no ocurre en presencia de penicilina (Kiselev et al., 2007), pero sí durante el estrés a 28°C (Kiselev et al., 2009). Los autores concluyen que la penicilina inhibe específicamente serin-proteasas incluyendo la peptidasa señal 1 que estaría involucrada en el procesamiento de PmpD (Kiselev et al., 2009). La relación EB/RB de PmpG varía en los distintos estudios, siendo a veces más prevalente en el EB (Saka et al., 2011; Oostergaard et al., 2016), o una de las proteínas más abundantes del RB (Skipp et al., 2016). Mientras que en el estrés inducido por IFN γ presenta al igual que la mayoría de las demás Pmps, niveles similares al RB (Tabla 2)(Oostergaard et al., 2016).

	EB	RB	AB
PmpA	ND	ND	ND
PmpB	100	10	12
PmpC	100	10	28
PmpD	25	100	69
PmpE	100	8.1	11
PmpF	100	9.7	8.3
PmpG	100	12	23
PmpH	100	8.2	8.3
PmpI	50	100	34

Tabla 2: Expresión relativa de cada Pmp en los estadios EB, RB o AB (IFN γ) (Ostergaard et al., 2016). Se observa en general una mayor expresión en los EBs, salvo para PmpD y PmpI. La expresión de esta familia en el estado aberrante es similar al RB, excepto PmpI que disminuye significativamente con respecto al RB.

En condiciones normales de cultivo, cada una de las Pmps de *C. trachomatis* Ser. E se expresa variablemente en la superficie de las inclusiones (Tan et al., 2010), se observan patrones “fully-on”, “fully-off” o intermedios. También en Ser. E, la transcripción de todos los genes *pmps*, excepto *pmpA/D/I*, es alta en tiempos tardíos (24-48 hpi) con un pico característico a 32 hpi. La transcripción de *pmpA* y *pmpI* es máxima a 18hpi, mientras que *pmpD* continúa aumentando hasta las 48hpi (Carrasco et al., 2011). El estrés inducido por penicilina puede influenciar la expresión de las Pmps en distintos grados (Carrasco et al., 2011). La exposición al beta-lactámico lleva a la disminución de la transcripción de todos los genes *pmp* excepto *pmpA*, *pmpD* y *pmpI* (Carrasco et al., 2011). De acuerdo con ello, no se detecta PmpB o PmpC por IF en los cultivos estresados, y la tinción de PmpA no depende de la presencia o ausencia del estresor (Carrasco et al., 2011). Sin embargo, durante el estrés PmpA muestra un patrón de distribución en toda la inclusión, sugiriendo que se vuelve difusible. La producción de PmpD y PmpI, aunque se predecía estable por qRT-PCR, disminuye en el estrés y se observan variaciones inclusión a inclusión (Carrasco et al., 2011). Todos estos estudios en conjunto indican que existen múltiples y complejos niveles de regulación transcripcional y post-transcripcional de las Pmps. Estas observaciones junto con perfiles de anticuerpos variables contra las Pmps en pacientes infectados con *C. trachomatis* son consistentes con la idea de las Pmps como la base de un mecanismo de variación antigénica similar a uno de cambio de fase, con el rol dual de evadir el sistema inmune y adaptarse a diversos nichos (Tan et al., 2009; Tan et al., 2010).

Proteínas Pmps en el desarrollo de una vacuna subunitaria

Debido a que estas proteínas están expuestas en la superficie (Vandahl et al., 2002; Molleken et al., 2010; Tan et al., 2010) son candidatas a ser utilizadas en el desarrollo de una vacuna, que

se considera prioritaria debido a las características “silenciosas” de las infecciones por *Chlamydia*. Además de las Pmps, también han sido detectados fragmentos del PD procesados en la superficie clamidial (Wehrl et al., 2004; Swanson et al., 2009; Molleken et al., 2010). Anticuerpos anti-PmpD neutralizan la infección de 15 serovariedades, demostrando que PmpD es un antígeno pan-neutralizante (Crane et al., 2006). Cuando se testeó la reactividad humoral de suero de pacientes infectados contra Pmps recombinantes se encontró que todas fueron reconocidas, pero de manera variable. Las más reconocidas fueron PmpD/B/C/I (Tan et al., 2009). Un hallazgo interesante es que se observa un sesgo según el género del paciente, las mujeres reaccionan más contra PmpB y los hombres contra PmpD (Tan et al., 2009). También se observan diferentes respuestas en el suero tratándose de diversos serovares (Nunes et al., 2007).

La respuesta inmune contra *Chlamydia* esta polarizada en la dirección Th1 y reclutamiento de células T CD4+ y CD8+ al sitio de la infección (Schautteet et al., 2011). En una reinfección, se reclutan células específicas del sistema inmune que secretan citoquinas y quimiocinas, induciendo mayor inflamación y creando un daño tisular, lo que genera el comienzo de la enfermedad inflamatoria pélvica (Darville and Hiltke, 2010). Es decir, las células T tienen un rol dual: proteger al hospedador y limpiar la infección, pero también generar daño luego de una inflamación extensiva (Ziklo et al., 2016a). Sin entrar en detalle, hasta el momento los mayores esfuerzos en obtener una vacuna efectiva se han centrado en MOMP pero con resultados sub-óptimos (Kari et al., 2009; Tifrea et al., 2014). Existen numerosos trabajos intentando utilizar una; por ejemplo PmpC (Inic-Kanada et al., 2015; Inic-Kanada et al., 2016), PmpA (Muller et al., 2017), PmpG (Zhu et al., 2015), o una combinación de Pmps en el desarrollo de una vacuna subunitaria efectiva (Karunakaran et al., 2015b; Nunes et al., 2015; Pal et al., 2017). Colectivamente, las Pmps son candidatos prometedores para una vacuna ya que son proteínas de la membrana externa reconocidas por las células presentadoras de antígeno, degradadas, procesadas y presentadas a las células T CD4+. Adicionalmente, se ha demostrado que activan las células T e inducen la producción de citoquinas y anticuerpos que son importantes en la resolución de la infección (Vasilevsky et al., 2016).

Proteínas Pmps en persistencia

Como se mencionó en la primera sección de resultados, un hallazgo sorprendente del *screening* fue que 5 de las 8 mutantes de interés (P1, P2, P3, P4 y P7) presentaban mutaciones en la familia de proteínas pleomórficas de membrana o Pmps. Posteriormente se sumó otra mutante con una mutación sin sentido en *pmpB* (M891) (Figura 26). Como se señaló anteriormente, en presencia de penicilina, disminuye la transcripción de varias *pmps* (Carrasco et al., 2011), se inhibe el clivaje y secreción del dominio pasajero de PmpD (Kiselev et al., 2007) y cambia el patrón de distribución

de PmpA dentro de la inclusión (Carrasco et al., 2011), indicando que el estrés afecta a esta familia de proteínas en mayor o menor medida. Mientras que un estudio proteómico comparativo entre los aRBs (de IFN γ) y los RB mostró niveles de expresión proteica similares entre ambos, excepto para PmpI que disminuye significativamente (Tabla 3) (Ostergaard et al., 2016). Las mutantes resultantes del *screening* presentan mutaciones en 4 *pmps*: *pmpA*, *pmpB*, *pmpC* y *pmpG* de manera simultánea con otras mutaciones y presentan dificultades para recuperarse de la persistencia inducida por penicilina y/o IFN γ (Figura 26 C, Tabla 3).

Mutante	Gen <i>pmp</i> afectado	Recuperación IFN γ	Recuperación Penicilina
M786	<i>pmpA</i> (nonsense)	-	+
M783	<i>pmpG</i> (missense)	-	-
M766	<i>pmpB</i> (missense)	-	-
M123	<i>pmpC</i> (missense)	-	+
M111	<i>pmpC</i> (nonsense)	-	-
M891	<i>pmpB</i> (nonsense)	-	+

Tabla 3: Genes pertenecientes a la familia *pmp* afectados en las mutantes resultantes del *screening* y su fenotipo asociado.

Resultados del Capítulo 3

Obtención de recombinantes con mutaciones en los genes *pmpA*, *pmpB* y *pmpC*

Con el objetivo de estudiar el efecto de mutantes nulas en la síntesis de Pmps ubicadas en el primer *cluster* de *C. trachomatis*: *pmpA*, *pmpB* y *pmpC*, se decidió obtener recombinantes a partir de las cepas M786, M111 y M891 (Figura 27). En colaboración con el laboratorio del Dr. Valdivia en la Universidad de Duke, se lograron obtener recombinantes “limpias” para *pmpA* y *pmpC*, mientras que para *pmpB* se obtuvo una recombinante que posee la mutación con pérdida de sentido en ese gen acompañada de 2 SNVs en otros genes.

Sorpresivamente, al analizar el comportamiento de las cepas obtenidas (Figura 27) se observó que las recombinantes nulas para *pmpA*, *pmpB* o *pmpC* presentan una disminución significativa en la generación de progenie infecciosa a 30 hpi en condiciones no tratadas en comparación a la cepa Wt (datos no mostrados). Esto implica que dichas recombinantes no sean ideales para analizar el comportamiento frente al estrés, ya que de por sí la recuperación de IFUs sería menor aún en ausencia de estímulos antimicrobianos.

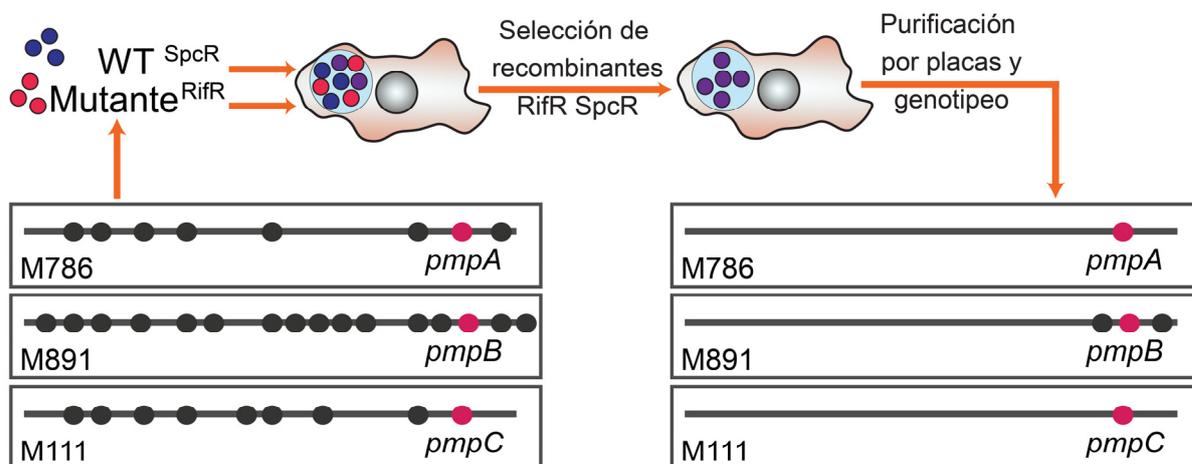


Figura 27: Obtención de recombinantes con mutaciones *nonsense* en los genes *pmpA/B/C*. Células HeLa fueron coinfectadas con una cepa L2 Wt resistente a espectinomicina y las cepas M786, M891 o M111 resistentes a rifampicina. Se aislaron las recombinantes doble-resistentes por ensayo de placa y se analizaron por TILLING para identificar la presencia/ausencia de SNVs. Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciamiento de Sanger.

Generación de una mutante nula en el gen *pmpC* por inserción de un intrón tipo II

Debido a que el defecto de crecimiento de las recombinantes no permite su uso para estudiar el posible rol de las Pmps en persistencia, se decidió obtener mutantes nulas en *pmpA*, *B* y *C* utilizando el sistema TargeTron (Sigma Aldrich) de la misma manera que se obtuvo la cepa L2 ptr::GII mencionada en el segundo capítulo. Dos sitios de inserción putativos fueron seleccionados en cada uno de los 3 genes, y se obtuvieron los 6 plásmidos correspondientes para transformar *C. trachomatis* (ver esquema de trabajo en Materiales y Métodos). Sin embargo, y a pesar de múltiples intentos, solo se lograron transformantes que habían integrado el intrón tipo II en el sitio 1 de *pmpC* (Figura 28).

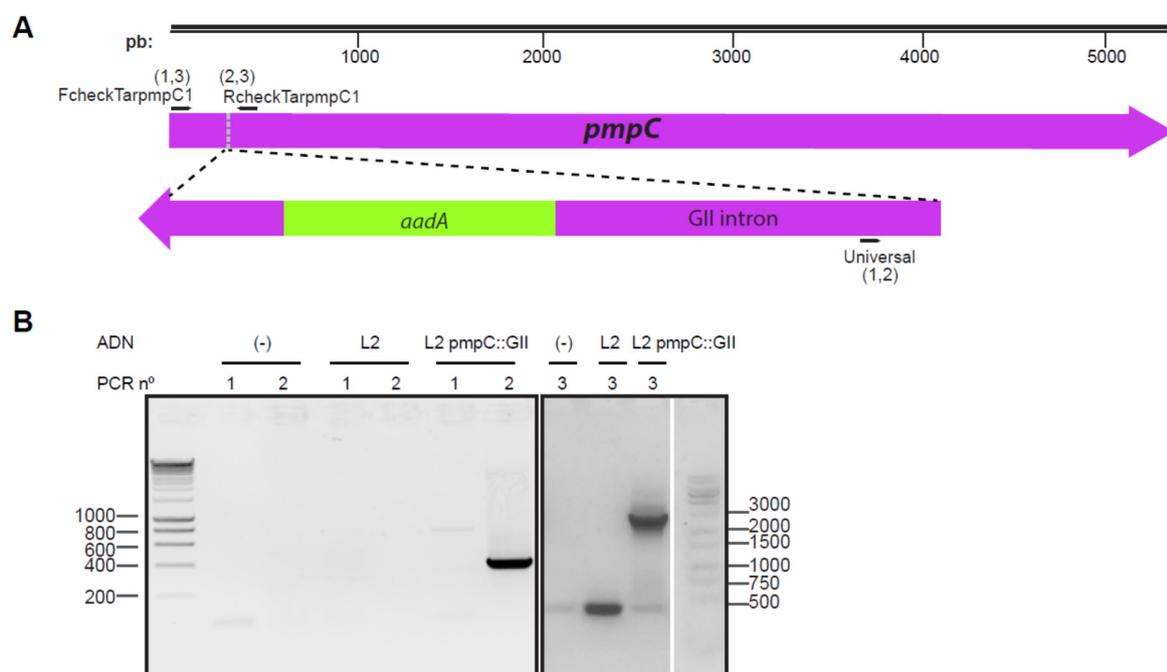


Figura 28. Confirmación de la disrupción del gen *pmpC* mediante PCR. **A.** Representación esquemática de las reacciones de PCR llevadas a cabo. Los números entre paréntesis contiguos al nombre de cada cebador indican en qué PCR fueron utilizados. PCR 1: FcheckTarpmpC1 y Universal; PCR 2: RcheckTarpmpC1 y Universal; PCR 3: FcheckTarpmpC1 y RcheckTarpmpC1. Las secuencias de los cebadores se indican en la sección Materiales y Métodos. **B.** Las bandas amplificadas obtenidas son: PCR 1, 428 pb que indicaría una inserción *sense*; PCR 2, un producto de 437 pb indica inserción *anti-sense*; PCR 3, 367 pb para la copia Wt del gen y 2579 pb si ocurrió la inserción. Los números de cada PCR están indicados en la parte superior del gel en cada carril. El ADN utilizado como templado se indica en la parte superior de cada carril. Las bandas correspondientes al marcador de peso molecular se indican a la izquierda y derecha, respectivamente.

Rol de *pmpC* en persistencia

Una vez que se obtuvo la cepa L2 *pmpC*::GII, isogénica con L2 pero con la inserción del intrón en el gen *pmpC*, se llevaron a cabo los distintos ensayos de generación de IFUs: 1) en la condición “sin tratamiento” (UT), 2) en la recuperación de la persistencia inducida por penicilina, y 3) en la recuperación de la persistencia inducida por IFN γ . En primer lugar, esta cepa no presenta problemas de crecimiento (Figura 29 A). Con respecto a la participación de *pmpC* en la recuperación del estrés, se observó que la mutante nula en *pmpC* (L2 *pmpC*::GII) es incapaz de recuperarse y generar niveles de IFU comparables a la cepa Wt tanto de la persistencia inducida por IFN γ como por penicilina (Figura 29 B y C). Estos resultados, en conjunto con el fenotipo de la cepa M111, indican que *pmpC* es importante durante la recuperación del estrés inducido por IFN γ y penicilina. Es curioso que la cepa M123, con una mutación *missense* en *pmpC* (D140N) ubicada en el dominio pasajero, presentó un fenotipo intermedio en la validación inicial, siendo

solo defectuosa en la recuperación del IFN γ . Esto podría indicar la importancia de ese dominio cumpliendo una función hasta ahora desconocida en la recuperación del estrés inducido por IFN γ . Sin embargo, no se ha determinado aún el papel de cada uno de los SNVs presentes en esa cepa.

Una vez que se obtuvo la cepa L2 *pmpC*::GII, el gen *pmpC* seguido de la secuencia de un epítipo FLAG fue clonado en el vector de expresión pBOMB4R para complementar su expresión. Este vector permite el seguimiento de las bacterias transformadas mediante la expresión constitutiva de la proteína mCherry además de la expresión de la proteína de interés bajo el promotor *rpoB*. Si bien las cepas transformantes expresan mCherry, no fue posible detectar la expresión de PmpC-FLAG con anticuerpos anti-FLAG por inmunofluorescencia o *western blot*. La secuencia de *pmpC* en el vector de clonado fue confirmada por secuenciamiento previo a la transformación de *C. trachomatis*. Sin embargo, cuando se intentó amplificar por PCR a partir de la cepa transformada aislada utilizando cebadores que amplifican desde el esqueleto del vector (Seq_pBOMB4R_F) hasta distintos sitios del gen *pmpC* (RcheckTargpmpC1, RcheckTargpmpC2 o RHispmpC1) no se obtuvo amplificación. Asimismo, mientras que utilizando cebadores en otra región del genoma (recC_gene_F y recC_gene_R) se obtuvo el producto esperado; cuando se utilizaron los cebadores que rodean el sitio de inserción del intrón en L2 *pmpC*::GII (FcheckTargpmpC1 y RcheckTargpmpC1) no hay amplificación. Estos resultados indican que el vector presente en la cepa L2 *pmpC*::GII *pmpC*-F ha perdido el inserto o parte del mismo al ser transformado en *C. trachomatis* L2 *pmpC*::GII. Además, como no se obtiene el producto esperado de la inserción en el genoma es posible que hayan ocurrido re-arreglos entre el genoma y el vector. En conclusión, no fue factible evaluar el efecto de la complementación de la expresión de PmpC en persistencia. Se considera que parte de las dificultades encontradas para la generación de una cepa nula para *pmpC* establemente transformada con un plásmido que permita complementar su expresión (L2 *pmpC*::GII *pmpC*-F), pueden deberse al gran tamaño de dicho gen, mayor a 5 kilobases y la presencia de secuencias repetitivas en el mismo.

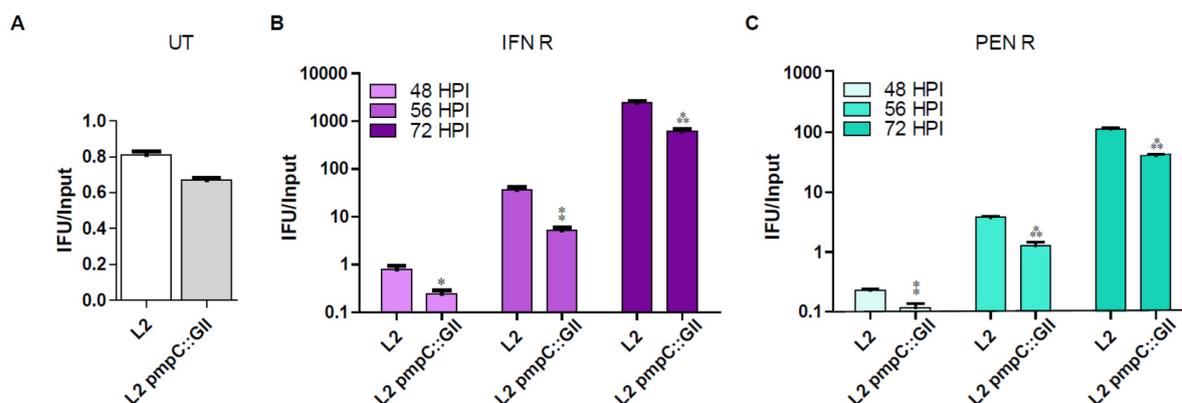


Figura 29. Recuperación defectuosa de la cepa L2 pmpC::GII luego del estrés inducido por IFN γ o penicilina. **A.** L2 pmpC::GII no muestra diferencias significativas en la generación de IFU/Input en comparación con la cepa control (L2) en la condición no tratada a 30 hpi (UT). **B.** L2 pmpC::GII exhibe una generación de IFUs disminuida después del estrés inducido por IFN γ (condición IFN R). Las células HeLa se trataron previamente con IFN γ (15 ng/mL) durante 24 horas y se infectaron con la cepa control o con L2 pmpC::GII. A las 24 hpi, se eliminó el IFN γ , el medio se complementó con triptófano (100 mg/L) y se incubaron hasta 48, 56 o 72 hpi para permitir la recuperación. **C.** L2 pmpC::GII exhibe una generación de IFUs disminuida después del estrés inducido por penicilina (PEN R). Las células HeLa se infectaron con la cepa L2 pmpC::GII o L2 Wt en presencia de penicilina (1 UI/mL). A las 24 hpi se eliminó la penicilina, se agregó medio completo y se incubó hasta 48, 56 o 72 hpi para la recuperación. **A, B y C.** Se muestra un ensayo representativo de 3 réplicas biológicas, indicando la media de 3 réplicas técnicas. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t-Student. Las diferencias se consideraron significativas para * $P < 0.05$, * $P < 0.01$ y * $P < 0.001$.

Expresión de Pmps recombinantes

Con el objetivo de analizar la expresión de las Pmps durante el ciclo de desarrollo se planteó expresar Pmps recombinantes (rPmps) truncas para obtener luego anticuerpos. Al tratarse de grandes proteínas de membrana no es una tarea trivial. Se seleccionaron regiones comprendidas en el dominio pasajero (PD) para intentar evitar la posible localización trans-membrana en *E. coli*. Para ello fueron clonadas las siguientes versiones en el vector de expresión pHis-parallel, unidas a His-tag en el N-terminal:

- I. rPmpA: Serina 49 a Asparragina 474, péptido de 426 aa, ~51 kDa. *Codon optimization index* (Gen Script): 0,66 (ideal 1).
- II. rPmpB1: Serina 31 a Glicina 394, péptido de 364 aa, ~43,7 kDa. *Codon optimization index* (Gen Script): 0,62 (ideal 1).
- III. rPmpB2: Treonina 592 a Leucina 886, péptido de 295 aa, ~35,4 kDa. *Codon optimization index* (Gen Script): 0,62 (ideal 1).
- IV. rPmpC1: Alanina 20 a Serina 564, péptido de 545 aa, ~65,4 kDa. *Codon optimization index* (Gen Script): 0,63 (ideal 1).

- V. rPmpC2: Glicina 596 a Prolina 977, péptido de 382 aa, ~45,84 kDa. *Codon optimization index* (Gen Script): 0,61 (ideal 1).

Todas las versiones fueron confirmadas por digestión liberando el inserto completo (NcoI y StuI) y por secuenciamiento de los vectores. Los valores de *codon usage* no eran óptimos, por lo que podrían llegar a sintetizarse proteínas más cortas o no expresarse directamente en *E. coli*. El His-tag sumado a un sitio de clivaje TEV añaden ~ 2,8 kDa a la proteína. Con estos vectores se transformaron *E. coli* BL21 pLysS y se indujo la expresión con IPTG a distintas concentraciones (entre 0,5mM y 2mM) por entre 2 y 5h. El plásmido pLysS está presente para reducir la expresión basal y minimizar los posibles efectos tóxicos de la proteína a expresar antes de la inducción. pLysS codifica para la lisozima T7 que cliva la ARN polimerasa T7 necesaria para la expresión. En las condiciones testeadas no se pudo detectar una inducción potente, aun cuando se intentó disolver la fracción insoluble en urea 8M. Ya que fue no posible obtener la cantidad de proteína necesaria para realizar inmunizaciones se decidió seleccionar pequeños péptidos dentro de estas proteínas y utilizarlos para inmunizar ratones, unidos a *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) para generar una respuesta más robusta. Con el criterio de maximizar la respuesta antigénica se seleccionaron los siguientes péptidos: PmpA: PLRLSGSPSIHDPEGL (16 aa), PmpB TSTPESDPVASTALS (15 aa) y PmpC PVSNSSGSDVTA (12 aa). Se optó por comenzar las inmunizaciones con el péptido correspondiente a PmpC, pero hasta el momento, los antisueros obtenidos no han mostrado una respuesta específica robusta como para permitir ensayos posteriores.

Aunque las mutantes Δ pmps son capaces de adherirse a las células epiteliales, presentan una menor tasa de invasión

Existen estudios que han reportado la capacidad de adherencia de las Pmps, tal como se ha mencionado al comenzar este capítulo. Sin embargo, la mayoría de ellos fueron realizados a través de proteínas recombinantes y ensayos en levaduras debido a la histórica intratabilidad genética clamidial. El reporte de Kari y colaboradores fue pionero en utilizar una mutante química en *pmpD* para estudiar el rol de esta proteína. Ellos señalaron que efectivamente PmpD está involucrada en la adhesión a células de origen humano, pero no murino, demostrando un tropismo en la actividad de esta proteína (Kari et al., 2014). En este trabajo de tesis se planteó el estudio de la capacidad de adherencia e invasión (ingreso a las células hospedadoras) de las mutantes nulas que se mencionaron: *pmpA(-)*, *pmpB(-)*, *pmpC(-)* y L2 *pmpC::GII*. En primer lugar, cada una de las cepas mutantes y la cepa control L2 Wt fueron transformadas con un plásmido que permite la expresión de una proteína fluorescente roja (mCherry). En un ensayo de invasión, las bacterias que están en el exterior celular y no ingresaron son marcadas, luego de fijar

sin permeabilizar la membrana, con un anticuerpo primario (anti-MOMP) seguido de un anticuerpo secundario anti-*mouse* Alexa Fluor 488 y poseen de esta manera doble marcación (rojo y verde). Por el contrario, las bacterias que ingresaron a la célula se ven rojas por la expresión de mCherry. Esto nos permite obtener una tasa de invasión. El análisis de la tasa de invasión de las cepas mutantes en *pmpA/B/C* permite demostrar la importancia de cada una de estas Pmps en la invasión; ya que mutantes nulas en cada una de ellas disminuyen significativamente el porcentaje de bacterias que son capaces de ingresar a la célula. Se observó un defecto más pronunciado frente a la falta de PmpA o PmpC (Figura 30).

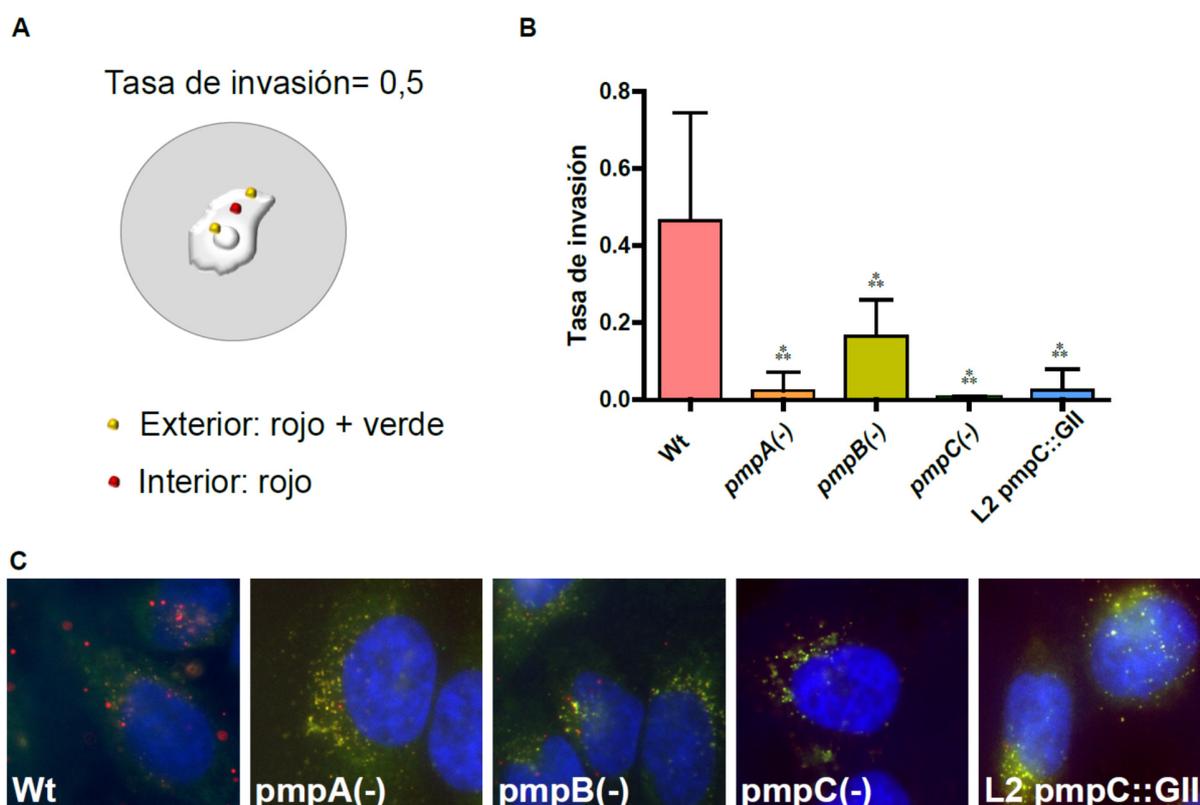


Figura 30. Las proteínas PmpA, B y C participan en la invasión en células epiteliales. **A.** Esquema del ensayo de invasión. Todas las cepas expresan constitutivamente mCherry (rojo), pero únicamente las que están en el exterior celular son marcadas con un anticuerpo anti-MOMP y un anticuerpo secundario anti-*mouse* Alexa Fluor 488 (verde). Cuerpos elementales de *C. trachomatis* (MOI 50) se incubaron con una monocapa de células HeLa por 30 m a 4°C. Los cultivos se lavaron con PBS en frío y la temperatura se cambió a 37°C por la adición de medio completo. Los cultivos se incubaron luego por 1h, se fijaron con PFA 4% 15 m y se lavaron con PBS. Las células no fueron permeabilizadas. **B.** Tanto las cepas obtenidas por mutagénesis química, como la mutante en *pmpC* obtenida por TargeTron muestran una menor tasa de invasión. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido del post-test Tukey. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **C.** Imágenes de inmunofluorescencia representativas de cada cepa utilizada en el ensayo, obtenidas en un microscopio Leica DMI8.

A continuación, se evaluó si cada una de estas proteínas Pmps era necesaria para la adherencia inicial a las células epiteliales. Se observó que todas las mutantes se adhieren de manera similar a la cepa Wt (Figura 31). El título, obtenido a las 30 hpi, es el mismo en cada uno de los casos, indicando que finalmente todas las diferentes cepas ingresan a la célula. Aunque todas se adhieren de manera similar, se planteó como hipótesis que estas mutantes presentan un retraso en la invasión. El hecho de que estas mutantes individuales no se vean afectadas en la capacidad de adherencia demuestra que existen mecanismos redundantes para llevar a cabo ese primer paso en la infección.

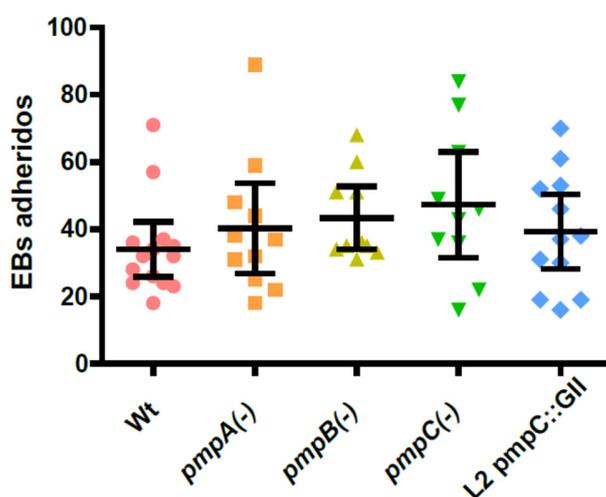


Figura 31. Las proteínas PmpA, B y C no son esenciales para la adherencia a células epiteliales. Se cuantificó el número de EBs adheridos por célula. Para ello EBs de *C. trachomatis* (MOI 50) fueron incubados con una monocapa de células HeLa por 30 m a 4°C. Los cultivos se lavaron con PBS en frío y la temperatura se cambió a 37°C por la adición de medio completo. Los cultivos se incubaron luego por 1h, se fijaron con PFA 4% 15 m y se lavaron con PBS. Las células no fueron permeabilizadas. Los EBs extracelulares fueron marcados con anticuerpos anti-MOMP y anticuerpo secundarios anti-*mouse* Alexa Fluor 488. Todas las cepas analizadas expresan de manera constitutiva la proteína mCherry. Luego se contabilizaron los EBs en el interior y exterior celular, el número de EBs en el interior sumado a EBs en el exterior se consideró como el número total de EBs adheridos. Se muestra la media \pm el intervalo con 95% de confianza. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido del post-test Tukey, no se encontraron diferencias significativas.

Características ultraestructurales de cepas mutantes en los genes *pmpA/B/C*

Siendo las Pmps proteínas presentes en la membrana de *C. trachomatis*, se analizó si la falta de una de ellas implicaba cambios a nivel ultraestructural. En imágenes de microscopía electrónica tomadas a 30 hpi, no se observaron cambios notorios en la morfología de los EB o RBs presentes en cada una de las cepas nulas para *pmpA*, *B* o *C* (Figura 32).

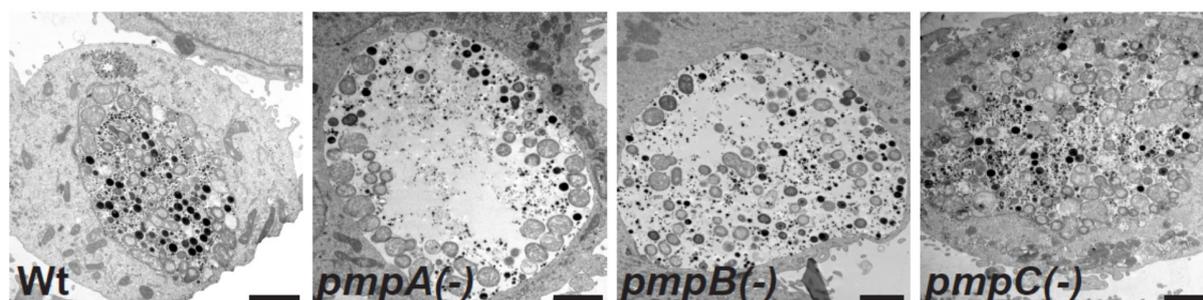


Figura 32. Las formas de desarrollo de mutantes nulas en los genes *pmpA/B* o *C* presentan características ultraestructurales similares a la cepa parental. Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión de infecciones en células HeLa fijadas 30 hpi. Se observa una menor cantidad de EBs, de acuerdo con la menor generación de progenie infecciosa (IFUs) en estas mutantes. La escala representa 2 μ m.

La ausencia de la proteína PmpC genera agregados dentro de la inclusión

La cepa mutante M111 (P7) presenta consistentemente un fenotipo “agregado” dentro de la inclusión (datos no mostrados). Ese fenotipo se asemeja al reportado por Kari y colaboradores para la mutante nula en PmpD (Kari et al., 2014). Ellos reportaron una distribución atípica de las bacterias, incluyendo áreas dentro de la inclusión sin organismos. Es curioso que la falta de PmpC o PmpD ocasione estos cambios. Esta distribución se observa también en la cepa recombinante *pmpC(-)* derivada de M111 y en la cepa obtenida mediante TargeTron L2 *pmpC::GII* (Figura 33). Las cepas nulas para el gen *pmpC* se comportan de igual manera tanto en células Vero, células epiteliales de riñón de un mono verde africano, como en células A2EN, provenientes de endocervix humano, y células HeLa, derivadas de una muestra de cáncer cervico-uterino (Figura 33). La presencia de agregados se hace más notoria en etapas tardías del ciclo de desarrollo (Figura 33 D y F). Por el contrario, a las 26-30 hpi no se encuentran diferencias notorias entre la cepa Wt o una mutante nula en *pmpC* (Figura 32 y 33). Es difícil especular de qué manera, pero estos resultados sugieren que PmpC estaría actuando como un efecto “repelente” entre las bacterias. Por lo que se observó por microscopía electrónica, estos agregados estarían mayormente formados por RBs (Figura 33 C).

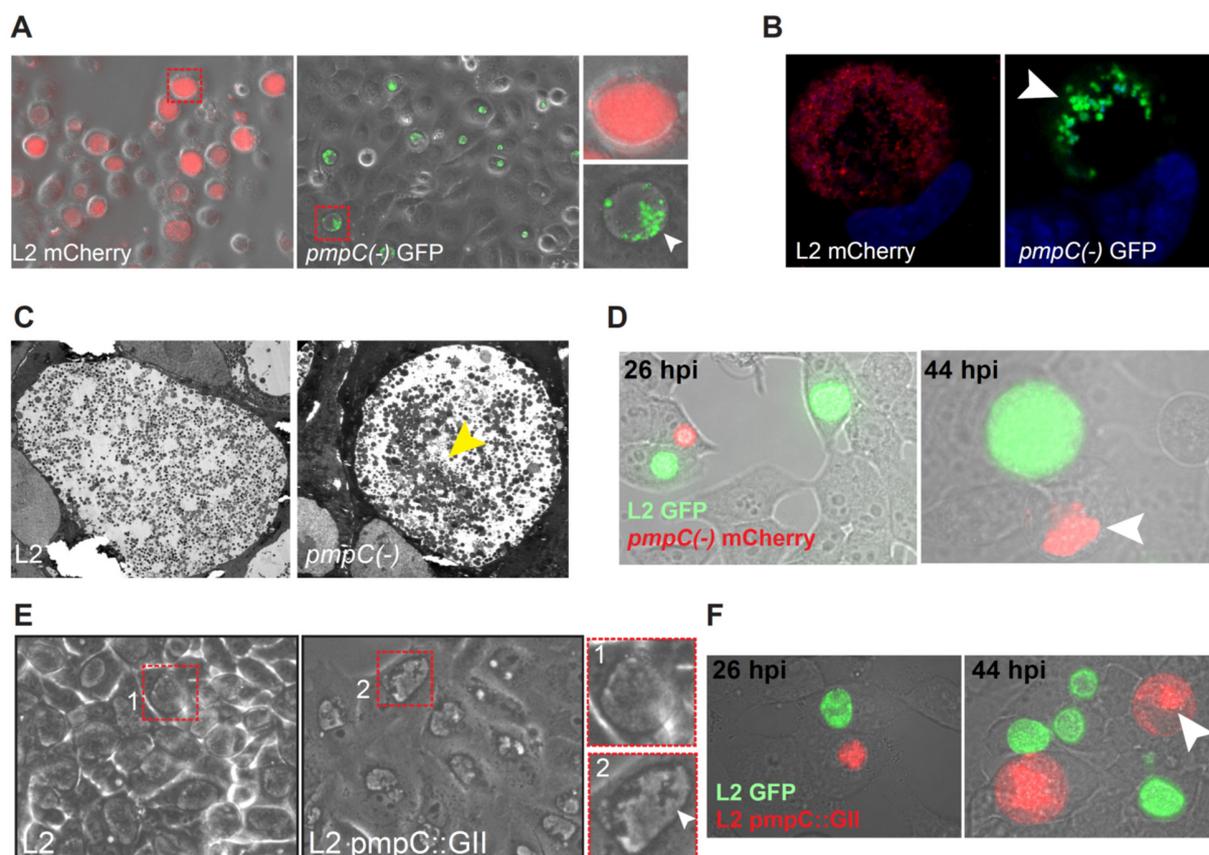


Figura 33. La ausencia de la proteína PmpC genera agregados dentro de la inclusión de manera independiente del origen de la célula hospedadora. **A.** Las cepas L2 Wt y *pmpC(-)* fueron transformadas con vectores para permitir la expresión de las proteínas mCherry o GFP respectivamente. Luego, estas cepas fueron utilizadas para infectar células A2EN y se tomaron imágenes representativas a las 40 hpi con un microscopio digital invertido de fluorescencia EVOS. **B.** Imágenes representativas de las infecciones mencionadas en A obtenidas con un microscopio confocal ZEISS AiryScan. El ADN se tiñó con Hoechst. **C.** Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión de infecciones, con la cepa indicada en cada imagen, en células Vero fijadas a las 44 hpi. **D.** Las cepas L2 Wt y *pmpC(-)* fueron transformadas con vectores para permitir la expresión de GFP o mCherry respectivamente. Luego, estas cepas fueron utilizadas para infectar células HeLa y se tomaron imágenes de fluorescencia representativas a las 26 y 44 hpi con un microscopio Leica DMI8. **E.** Imágenes representativas de células Vero infectadas con L2 o L2 *pmpC::GII* a las 44 hpi obtenidas con un microscopio invertido EVOS. **F.** Las cepas L2 Wt y L2 *pmpC::GII* fueron transformadas con vectores para permitir la expresión de las proteínas GFP o mCherry respectivamente. Luego, estas cepas fueron utilizadas para infectar células HeLa y se tomaron imágenes representativas a las 26 y 44 hpi con un microscopio de epifluorescencia Leica DMI8. **A, B, C, D, E y F.** Obsérvese la formación de agregados (cabeza de flecha).

PmpC previene la formación de agregados dentro de la inclusión y funciona a nivel de bacterias individuales

El siguiente paso fue preguntarnos qué sucedería en una inclusión formada por bacterias que expresan PmpC y bacterias que no lo hacen. Los posibles escenarios serían:

- i. Distribución normal de todas las bacterias; indicando que la expresión de la proteína PmpC en la cepa Wt es suficiente para evitar la formación de agregados aún en coexistencia con la cepa nula para PmpC dentro de la inclusión.
- ii. Agregado que incluye ambas bacterias; indicando que la ausencia de expresión de PmpC en las mutantes dispara la formación de agregados aún en coexistencia con la cepa parental que sí expresa PmpC dentro de la inclusión.
- iii. Los fenotipos agregados son propiedad individual de cada genotipo particular.

El análisis de células co-infectadas con la cepa Wt y las cepas $\Delta pmpC$ (*pmpC(-)*) o L2 *pmpC::GII*, cada una expresando una proteína fluorescente verde o roja, permitió determinar que la formación de agregados es una propiedad de las bacterias individualmente, ya que cada una conservó su distribución en comparación con una inclusión formada únicamente por esa cepa (Figura 34).

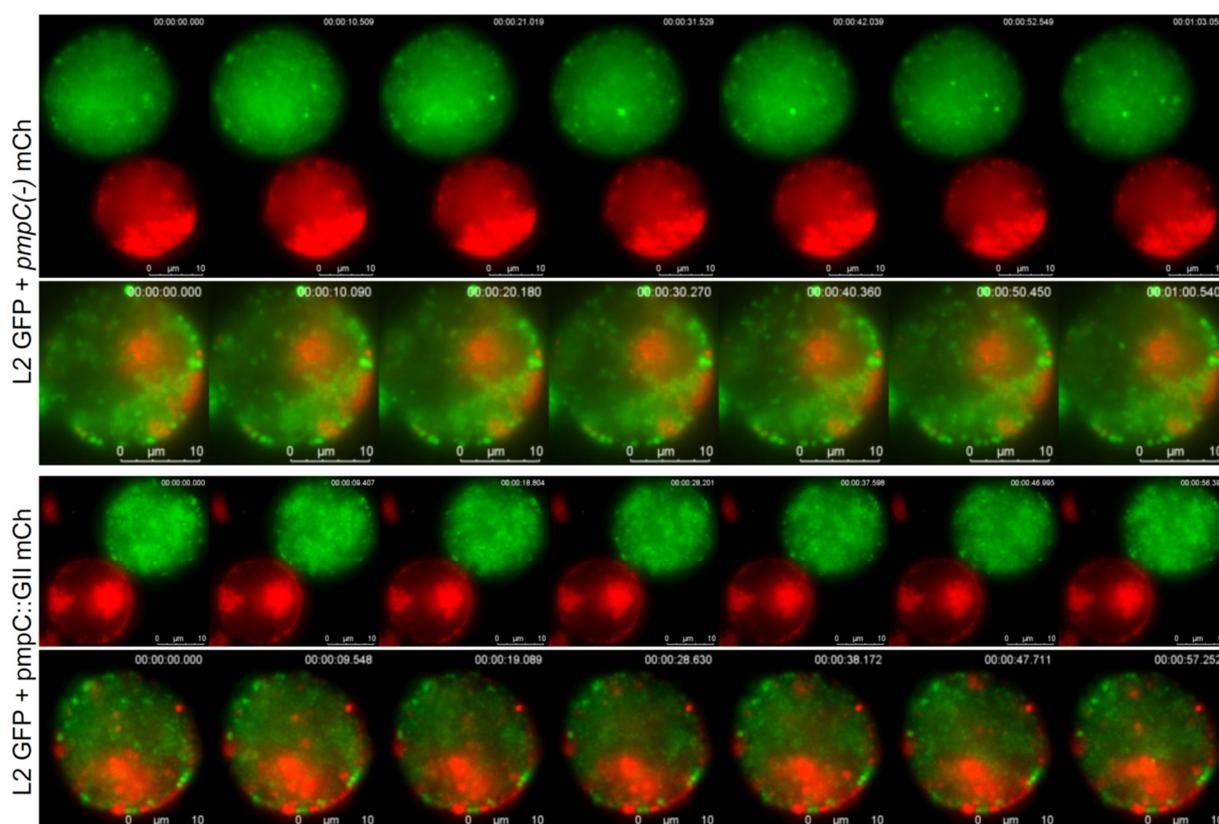


Figura 34. La proteína PmpC impide la formación de agregados dentro de la inclusión y funciona a nivel de bacterias individuales. Las cepas L2 Wt y *pmpC(-)*/L2 *pmpC::GII* fueron transformadas con vectores para permitir la expresión de GFP (verde) o mCherry (rojo), respectivamente. Estas imágenes fueron tomadas cada 10 segundos, en un lapso de 1 minuto en total. En los dos paneles superiores se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa infectadas con la cepa Wt y *pmpC(-)* a las 44hpi. El panel superior muestra dos

inclusiones cercanas cada una infectada con una cepa y el panel siguiente muestra una inclusión que contiene ambas cepas. De manera similar, los dos paneles inferiores presentan imágenes de células HeLa infectadas con la cepa L2 Wt y L2 pmpC::GII a las 44hpi. El tercer panel muestra dos inclusiones cercanas cada una infectada con una cepa y el panel siguiente muestra una inclusión que contiene ambas cepas. Todas las imágenes fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Leica DMI8. La barra de escala equivale a 10 μ m. Se puede acceder a los videos correspondientes a estas imágenes en <https://drive.google.com/drive/folders/1UYoObdQtiCBxOUgujFYyjQHEpSlaXoSU?usp=sharing> o utilizando el siguiente código QR:



Además, en ensayos de video microscopía de células vivas se observó mayor movimiento browniano en la cepa Wt (GFP), mientras que los agregados permanecen estáticos en el tiempo y solo hay unas pocas bacterias moviéndose libremente en las cepas Δ pmpC (mCherry) (Figura 34).

DISCUSSION

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se llevó a cabo un *screening* genómico en una colección de mutantes completamente secuenciada para identificar los genes de *C. trachomatis* importantes para la recuperación del estrés inducido por IFN γ y/o penicilina. Mediante transferencia horizontal de genes, análisis del fenotipo de cepas recombinantes, mutagénesis sitio-dirigida por TargeTron y complementación se encontró que el gen *ptr*, que codifica una proteasa secretada pobremente caracterizada, es necesario para una rápida recuperación de la persistencia inducida por IFN γ , pero no del estrés inducido por la penicilina. Por otra parte, mediante un abordaje similar, se reveló que el gen *pmpC*, perteneciente a una familia de proteínas única de los *Chlamydiales*, es necesario para una correcta recuperación del estrés inducido tanto por IFN γ como por penicilina.

En el primer capítulo de la sección Resultados se utilizó una librería de cepas de *C. trachomatis* químicamente mutagenizadas (Kokes et al., 2015) como herramienta para identificar genes de *C. trachomatis* potencialmente involucrados en la persistencia, específicamente para mutantes con problemas en la generación de progenie infecciosa tras la recuperación del estrés inducido por IFN γ y/o penicilina. El hecho de que las mutantes generaran menor progenie infecciosa luego de uno/otro o ambos estresores muestra claramente que los mecanismos implicados en la persistencia son dependientes del estresor en cuestión. Este abordaje simultáneo permitió estudiar de manera concreta factores involucrados en más de un tipo de estrés, como *pmpC*, o factores que son importantes específicamente para un estresor, como fue el caso de *ptr*. Cabe destacar que la colección de mutantes químicas que fue utilizada no representaría una condición saturada, es decir que podría haber un mayor número de genes involucrados en persistencia que no formen parte de los resultados del *screening*. Para aumentar la saturación podría generarse una librería de mutantes aumentando la concentración del agente mutagénico (EMS/ENU) y/o el número de mutantes.

Como resultado del *screening* se obtuvieron 8 mutantes de interés, con un promedio de 8 mutaciones por genoma (Tabla 1). Debido a cuestiones de tiempo y de la complejidad involucrada en el seguimiento de estas mutantes, este trabajo de tesis se enfocó en M275 (P9) y M111 (P7). El resto de las mutantes no fueron completamente caracterizadas; sin embargo, son oportunas algunas observaciones.

El rol de la proteasa Ptr en persistencia indica que su papel como proveedora de aminoácidos podría ser crucial como se discutirá más adelante (Figura 35). La cepa M783 (P2) presenta 14 mutaciones que la diferencian de la cepa parental, siendo una de ellas la mutación en *pmpG*

(G52S) a la que se hizo referencia en el capítulo 3. De manera interesante en cuanto a la importancia de la disponibilidad de aminoácidos, M783 también presenta una mutación no sinónima en *leuS* (G739D). LeuS es una leucina-tARN sintetasa, encargada de unir covalentemente la leucina con su ARN de transferencia específico. Esta mutación podría ser responsable de la falla en la recuperación del estrés inducido por IFN γ ya que se ha observado que inhibidores de los tARN tanto de leucina como de triptófano generan un estado persistente similar al inducido por el IFN γ (Hatch & Ouellette, presentado en CBRS 2019, no publicado). Al mismo tiempo, M783 presenta una sustitución en *oppC2* (V113I). *oppC2* es una permeasa tipo ABC que permite el transporte de oligopéptidos cuya actividad también podría ser importante frente a la privación de nutrientes. Cabe destacar, no solo estas mutaciones por separado podrían estar involucradas en la recuperación deficiente de la persistencia, sino que podría existir un sinergismo entre ellas. Además, en la mutante M123 (P4) también se encuentra una mutación en *oppC2* (D316N). Sería interesante entonces, analizar el fenotipo de mutantes nulas en los genes *pmpG* /*leuS* /*oppC2* isogénicas con la cepa Wt para confirmar el rol putativo de cada uno de ellos en persistencia.

Por otra parte, en M225 (P5) se encuentran mutaciones en *clpX* (P141S) y en *clpC* (F642L). Ambos genes codifican proteínas involucradas en el sistema de proteasas caseinolíticas “ClpP” conservado en la mayoría de las especies bacterianas. Además de la homeostasis proteica y la degradación de proteínas mal plegadas, ClpP tiene un rol clave en regular la división celular, la tolerancia al estrés, virulencia, diferenciación morfológica, motilidad, secreción y resistencia antibiótica en otras bacterias (Ingmer and Brondsted, 2009; Culp and Wright, 2017). Las proteasas Clp son estructuras formadas por dos anillos de subunidades ClpP flanqueados por anillos de una de varias posibles ATPasas Clp, entre ellas ClpX y ClpC. Independientemente de ClpP, las ATPasas Clp tienen actividad chaperona y cuando se unen a ClpP determinan la especificidad de sustrato (Ingmer and Brondsted, 2009). *Chlamydia* spp. presenta 5 genes *clp*: *clpX*, *clpC*, *clpB* y dos parálogos *clpP* (Wood et al., 2019). Este sistema podría tener un rol en el *turnover* del proteoma degradando proteínas específicas de cada estadio, incluyendo en los aRBs. Sin embargo, el sistema Clp todavía no ha sido bien caracterizado en *Chlamydia* y resta explorar su papel en persistencia.

Asimismo, resulta llamativa la presencia de una mutación en el gen *ctlo196* que codifica para una metaloendopeptidasa perteneciente a la familia M16 (al igual que *ptr*) en la mutante M891. CTLO196 posee dominios peptidasa M16 (aa 54-175), M16C (aa 201-385), M16C_assoc (aa 459-707) y M16C (aa 718-884) de acuerdo con Pfam. La mutación P256S ocurre en uno de los dominios M16C. En el caso de que esta sustitución afectara la actividad proteica, podría indicar que

CTLo196 cumple una función similar a Ptr. Además, M891 presenta una mutación en *cpa* (*ctlo233*), que codifica para una proteasa perteneciente a la familia S41 de peptidasas C-terminal.

En conjunto, el hecho de haber confirmado la participación de la proteasa Ptr en el estrés inducido por IFN γ (Capítulo 2) sugiere que otras proteasas, que presentaban mutaciones en las cepas que no se recuperaron apropiadamente de la persistencia, podrían cumplir roles similares. La posible función de cada una de ellas deberá ser confirmada en futuros estudios.

En el segundo capítulo, se caracterizó la cepa mutante M275, que mostró una recuperación deteriorada del IFN γ , pero no el estrés inducido por la penicilina. Este mutante albergaba 6 SNV, uno de ellos conducía a una mutación *nonsense* en *ptr*. El gen *ptr* fue interrumpido con un intrón de tipo II generando una cepa nula para *ptr* (L2 *ptr* :: GII) que reprodujo el defecto observado para M275. Además, la complementación de la expresión de Ptr a partir de un vector plasmídico restauró la generación de progenie infecciosa después del estrés inducido por IFN γ , lo que indica que Ptr participa en la persistencia inducida por IFN γ en *C. trachomatis*.

El gen *ptr* codifica una proteasa secretada no caracterizada, que comparte una identidad del 23% con la proteasa III dependiente de zinc de *E. coli* K-12 (Pitrilisina, una enzima periplásmica que degrada péptidos pequeños). Ptr pertenece a la familia de las peptidasas M16 e incluye un motivo conservado entre los aminoácidos 105-109 (H-X-X-E-H) en la sección N-terminal involucrado en la actividad enzimática en Pitrilisina. Las histidinas coordinan el zinc y el glutamato está involucrado en la actividad catalítica (Becker and Roth, 1992). Será interesante determinar la importancia de cada uno de estos residuos en el papel de Ptr frente a la persistencia para confirmar la relevancia de su actividad proteasa. En las mutantes de la colección que fueron capaces de recuperarse del estrés de manera similar a la cepa Wt no se encontraron mutaciones en el sitio activo predicho, pero sí en otros dominios de *ptr*. Esto indica que la actividad proteasa de Ptr podría estar involucrada en la recuperación del estrés inducido por IFN γ .

Un análisis de la base de datos InterPro de la secuencia aminoacídica de Ptr muestra que la arquitectura de los dominios de esta proteína es compartida por otras peptidasas de especies relacionadas y distantes. Por ejemplo, un ortólogo en *Saccharomyces cerevisiae* es un determinante morfológico del patrón de gemación (Fujita et al., 1994) y la enzima degradadora de insulina de *Vibrio vulnificus* (26% similitud) es un factor de virulencia (Ryu et al., 2012). También hay un ortólogo en humanos, la enzima que degrada insulina, que presenta un 23% de similitud con Ptr de *C. trachomatis* LGV-L2. Estos datos muestran que Ptr es una proteasa conservada con funciones especie-específicas, probablemente debido a sus diferentes *targets*. La proteína Ptr se encuentra altamente conservada en los serovares de *C. trachomatis* (> 99% de

identidad), mientras que el nivel de identidad con los ortólogos de Ptr varía considerablemente entre las especies de *Chlamydia* (*C. muridarum* 82%, *C. pneumoniae* 47% y *C. psittaci* 46%). Por ende, esta proteína podría no cumplir las mismas funciones en las diferentes especies de *Chlamydia*.

Un *screening* que fue publicado durante el desarrollo de esta tesis utilizó también una librería de mutantes químicas, obtenida a partir de *C. trachomatis* LGV-L2 que expresaba constitutivamente GFP, para buscar genes de *C. trachomatis* involucrados en la persistencia inducida solamente por IFN γ . Sin embargo, su lectura primaria fue el número de inclusiones formado en condiciones de recuperación de IFN γ (Muramatsu et al., 2016). En el *screening* mencionado, el estrés inducido por IFN γ se logró mediante el tratamiento previo de las células HeLa durante 24 h con 10 ng/mL de IFN γ seguido de una infección durante 24 h en presencia del factor estresante, mientras que la recuperación se evaluó 24 h después de la eliminación del estresor y el agregado de indol. El *screening* llevado a cabo en este trabajo de tesis, fue diferente debido a que se utilizó una biblioteca de mutantes L2 resistentes a la rifampicina y la lectura se basó en la cuantificación de la generación de la progenie infecciosa tras la recuperación de la condición de estrés (penicilina o IFN γ). Otra diferencia es que se utilizó 15 ng/mL de IFN γ para la inducción de estrés y se evaluó la recuperación 24 h después de que las células se lavaron y se repusieron con medios suplementados con un exceso de triptófano. Al haber evaluado la recuperación luego del agregado de indol (precursor del triptófano), Muramatsu y colaboradores encontraron una mutante en *trpB* defectuosa en la recuperación, como es predecible. Cabe destacar que en ese trabajo identificaron una mutante defectuosa para la recuperación de la persistencia inducida por IFN γ , Sip5 (Sip: sensible a la persistencia inducida por IFN γ), que albergaba una sustitución en Ptr/CTLO175 (P831S) y en CTLO641 (H37Y) (Muramatsu et al., 2016). Sin embargo, esta mutante no fue caracterizada en profundidad, por lo que sigue siendo desconocido si la sustitución de aminoácidos en el segundo dominio M16C de Ptr estaba involucrada en el defecto de persistencia en esta cepa. Por otro lado, la mutante Sip2 del mismo estudio presenta una sustitución en *ctlo225*, un transportador de aminoácidos neutros (Muramatsu et al., 2016). Además, estos investigadores observaron que el IFN γ genera una depleción general de aminoácidos en células HeLa, que podría deberse a un aumento en la síntesis de proteínas y el cargado de tARNs (Muramatsu, 2017). Cabe destacar que la concentración libre de triptófano es mucho menor al resto de aminoácidos a cada tiempo del tratamiento con IFN γ analizado tanto en células infectadas o no, lo que sugiere queIDO es el único factor del hospedador que está activamente degradando un aminoácido (Muramatsu, 2017). Es probable que la proteína Ptr sea responsable de contrarrestar el efecto de esta citoquina en las células al

aumentar la disponibilidad de aminoácidos. Quizás sería útil para responder esta pregunta un abordaje experimental similar al utilizado por Nelson y colaboradores para determinar la cantidad de aminoácidos libres disponibles en una cepa nula para *ptr* versus una cepa Wt frente al tratamiento con IFN γ . Por otra parte, podría hipotetizarse que Ptr posee *targets* específicos cuyo clivaje podría desencadenar una respuesta necesaria frente al estrés. Ambas hipótesis deberán ser exploradas en un futuro, aunque es tentador especular con un modelo donde Ptr genera la disponibilidad de aminoácidos necesaria para una correcta recuperación a través de su actividad proteasa (Figura 35).

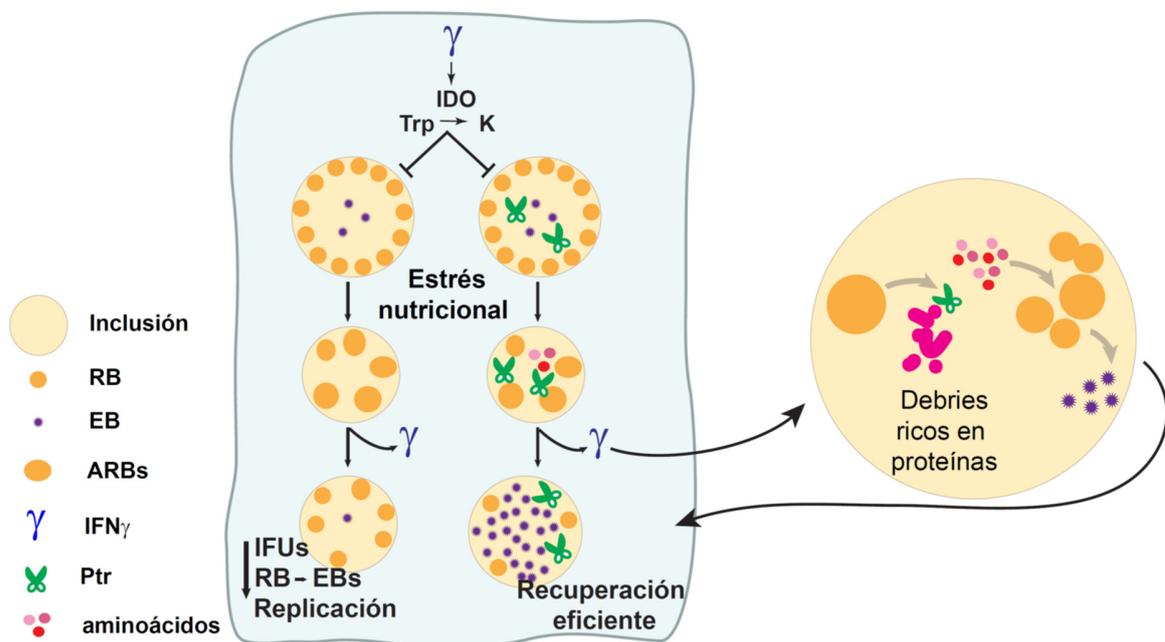


Figura 35: Modelo propuesto para la acción de la proteína Ptr frente a la persistencia inducida por IFN γ . En base a resultados publicados por otros investigadores y a resultados propios, se esquematizan escenarios probables frente al estrés inducido por IFN γ y la recuperación. El interferón gamma desencadena una cascada de señalización que genera el aumento de la expresión de *indo1*, gen que codifica para la enzima IDO1 que degrada el triptófano libre (Trp) a N-formilquinurenina (K). Esto genera un estrés nutricional para *C. trachomatis* que ingresa a persistencia. En el caso de una cepa Δptr , aún luego de remover el estresor, no es capaz de recuperarse del estrés y se observó menor generación de unidades formadoras de inclusión (IFUs), menor diferenciación de RB a EB y menor tasa de replicación. Por otra parte, en una cepa que expresa Ptr (Wt), esta proteasa es capaz de proveerle aminoácidos que son útiles para enfrentar el estrés al degradar proteínas presentes dentro de la inclusión clamidial. De manera análoga, al remover el estresor, la actividad proteasa podría degradar *debries* remanentes ricos en proteínas y generar los nutrientes necesarios para que *C. trachomatis* retome rápidamente su ciclo replicativo.

Los resultados obtenidos indican que la anulación de la expresión de Ptr genera un defecto en la recuperación luego del estrés inducido por IFN γ debido a una diferenciación de RB a EB

deteriorada y una acumulación de genoma reducida. Muramatsu y colaboradores también encontraron tasas alteradas de acumulación de genoma y generación de EBs durante la reactivación de mutantes Sip (Muramatsu et al., 2016). Por ejemplo, Sip6 (CTLO694^{P105L}) presentó replicación del genoma desacoplada de la producción de EBs, mientras que Sip2 (CTLO225^{G77E}) mostró una acumulación de genoma disminuida y retardada. Estos hallazgos sugieren que la alteración en la acumulación del genoma y en la transición de RB a EB pueden ser una causa de fallo en la recuperación del estrés inducido por IFN γ .

Se encontró previamente que la expresión del gen *ptr* en *C. trachomatis* L2 era relativamente constante a nivel transcripcional entre 9 y 18 hpi en una condición no tratada y no se observaron cambios significativos en condiciones de falta de hierro (Brinkworth et al., 2018). Un estudio transcripcional centrado en la persistencia y reactivación inducidas por IFN γ en *C. trachomatis* serovar D informó que los niveles de transcripción *ptr* se redujeron aproximadamente 2 veces durante el tratamiento y la eliminación de IFN γ (Belland et al., 2003). Los estudios de proteómica informaron que la proteína Ptr se expresa en todas las formas de desarrollo de *C. trachomatis* (Saka et al., 2011; Ostergaard et al., 2016; Skipp et al., 2016). La proteómica llevada a cabo por Saka et al. y Skipp et al. encontró que Ptr se expresa en niveles más altos en los RB en comparación con los EB, y se encuentra en las 30 proteínas más abundantes en los RB de *C. trachomatis* L2 (Saka et al., 2011; Skipp et al., 2016). El estudio proteómico realizado por Ostergaard et al. se llevó a cabo en *C. trachomatis* serovar D y reportó que los niveles de Ptr no cambiaron significativamente en EB, RB o aRB (Ostergaard et al., 2016). Curiosamente, este estudio encontró que bajo el estrés inducido por IFN γ , el proteoma de *C. trachomatis* acumula niveles más bajos de proteínas con alto contenido de triptófano. Dado que la secuencia aminoacídica de Ptr de *C. trachomatis* posee un contenido de triptófano relativamente bajo en comparación con su homólogo de *E. coli*, se ha sugerido que esta proteasa ha evolucionado para expresarse bajo la privación de triptófano inducida por IFN γ (Lo et al., 2012). En este trabajo, no se logró medir de manera confiable los niveles de expresión de la proteína Ptr por *western blot*, ya que el anticuerpo que fue generado solo funcionó para inmunofluorescencia. La observación realizada mediante microscopía de fluorescencia sugiriendo que los niveles de Ptr parecen mayores a 24 hpi en comparación con 48 hpi está de acuerdo con los datos proteómicos anteriores que muestran que Ptr está enriquecida en RBs en comparación con los EBs (Saka et al., 2011; Skipp et al., 2016). En un futuro, sería interesante evaluar la implicancia de *ptr* frente a otros estresores no explorados en este estudio, por ejemplo, ante la privación de hierro. Ha sido demostrado recientemente que la falta de hierro en las células hospedadoras, que puede ser desencadenada por la respuesta inmune, lleva a la activación del operón triptófano en *C. trachomatis* mediada

por la liberación de YtgR desde una región intergénica presente en este operón (Pokorzynski et al., 2019). La proteína YtgR funciona como un represor transcripcional dependiente de hierro para autoregular la expresión de su operón representando el único regulador transcripcional dependiente de hierro en *C. trachomatis* (Pokorzynski et al., 2019). Este estudio muestra que frente a la falta de hierro *C. trachomatis* se prepara para la falta de triptófano, y abre nuevos interrogantes en cuanto a mecanismos compartidos en la respuesta al estrés. ¿Podría ser importante la función de Ptr en el estrés inducido por la falta de hierro? En un estudio transcripcional previo del mismo laboratorio encontraron niveles incrementados del gen *ptr* en la condición estresada pero las diferencias no fueron significativas (Brinkworth et al., 2018).

Los estudios de inmuno-localización y fraccionamiento celular realizados indican que Ptr se libera en el espacio luminal dentro de la inclusión, donde se puede encontrar fuera de las células bacterianas. Curiosamente, se encontró un subconjunto de moléculas de Ptr estrechamente asociado a la proteína CT143 secretada por el sistema de secreción tipo III, que también se ha demostrado que se localiza dentro de la inclusión pero fuera de las partículas clamidiales (da Cunha et al., 2017). Esta asociación, sin embargo, no indica necesariamente que estas dos proteínas interactúen y si hay una implicación funcional para esta asociación, aún no ha sido dilucidado.

Con el objetivo de evaluar el impacto más amplio de *ptr* durante la infección, se utilizó un modelo murino de infecciones del tracto genital de *C. trachomatis*. Los modelos animales constituyen una herramienta valiosa para evaluar los resultados de la infección y la virulencia bacteriana en el contexto complejo de un organismo completo. Schoborg y sus colegas desarrollaron el primer modelo animal para estudiar la persistencia de *Chlamydia*, al infectar el tracto genital femenino de ratones tratados con amoxicilina con *Chlamydia muridarum* (Phillips Campbell et al., 2012). Este modelo representa una herramienta valiosa para estudiar la persistencia inducida por la penicilina. Sin embargo, en la actualidad no se han desarrollado modelos animales para caracterizar el estrés inducido por IFN γ y su reactivación. Esto podría deberse en parte a las dificultades para controlar la adición y eliminación del estresor, dado que el IFN γ es producido naturalmente por las células inmunes en el animal infectado. Otra barrera es el hecho de que el IFN γ desencadena diferentes respuestas anticlamidiales en células murinas frente a células humanas (Schoborg, 2011).

Se observó que, a 14 dpi, la cepa *ptr knock-out* permaneció en los tejidos con aumentos moderados en la carga bacteriana tanto en las secreciones vaginales como en los tejidos uterinos en comparación con la cepa de tipo salvaje. La razón por la que *ptr knock-out* produce un

clearance deficiente en el tracto genital de los ratones no está clara, pero no se obtuvieron pruebas de que se deba a la recuperación defectuosa del estrés inducido por IFN γ observado *in vitro*. Se podría hipotetizar que un menor *clearance* se asocia con una mejor capacidad de la cepa KO para evadir el sistema inmune o permanecer “oculta”. En ese sentido, Ptr es un antígeno inmunodominante en mujeres infectadas con *C. trachomatis* genotipo D (Murthy et al., 2006; Murthy et al., 2007; Wang et al., 2010). Además, como anticuerpos anti-Ptr han sido detectados en ratones infectados, pero no en ratones inmunizados con organismos inactivados, Ptr se considera un antígeno dependiente de la infección (Murthy et al., 2006; Murthy et al., 2007; Wang et al., 2010). La proteína Ptr también ha sido descrita como un antígeno inmunodominante en la triquiasis tracomatosa (Lu et al., 2012). Por un lado, una cepa Δptr podría generar una respuesta inmune distinta a la cepa Wt y por ello permanecer durante más tiempo en el tracto genital murino. Por otra parte, un trabajo reciente de Somboonna y colaboradores reporta que una cepa con mutaciones en el operón triptófano, ergo incapaz de utilizar el indol de la microbiota para salir de la persistencia inducida por el IFN γ , es capaz de persistir en el tracto genital de una paciente a lo largo de 4 años representando un caso de persistencia *in vivo* en humanos (Somboonna et al., 2019). El hecho de que una cepa que continúa en persistencia más tiempo (hasta que disminuye el IFN γ y vuelve a aumentar el triptófano disponible) es capaz de persistir más tiempo en el tracto genital femenino apoya los resultados obtenidos en el modelo murino para L2 ptr::GII.

Como conclusión del segundo capítulo, se proporcionó evidencia de que Ptr, una proteasa putativa poco caracterizada y secretada, participa en la salida de *C. trachomatis* del estrés inducido por IFN γ , pero no del estrés inducido por penicilina *in vitro* debido a una transición de RB a EB disminuida y una tasa reducida de replicación del genoma. El mecanismo molecular preciso mediante el cual Ptr media estos efectos queda por determinarse. Dado que el estrés inducido por IFN γ en células humanas en *C. trachomatis* está mediado principalmente por la privación de triptófano y genera disminución a nivel general del *pool* de aminoácidos disponible, es tentador especular que la proteasa Ptr puede ser útil como proveedor de aminoácidos durante la recuperación. Esto podría explicar por qué la pérdida de la proteína Ptr está asociada a una recuperación deteriorada frente al estrés inducido por IFN γ , pero no por la penicilina. Otros estudios con cepas que alberguen mutaciones en el sitio activo de la proteasa podrían ser útiles para descubrir el papel potencial de la actividad peptidasa durante el estrés y la recuperación inducidos por IFN γ .

En relación al tercer capítulo, se enfocó en la participación de las proteínas Pmps en persistencia clamidial, ya que 4 de las 9 Pmps presentes en *C. trachomatis* presentaron

mutaciones en el *screening*. No se ha reportado hasta el momento la participación de esta familia de proteínas en persistencia. En el caso del estresor IFN γ un estudio de proteómica indica que, excepto PmpI, la expresión de las Pmps es similar en los RBs y los RBs aberrantes (Ostergaard et al., 2016). En cuanto a penicilina como estresor, se ha observado disminución en la transcripción de varios de los genes *pmps* (Carrasco et al., 2011), inhibición en el clivaje y secreción del dominio pasajero (PD) de PmpD (Kiselev et al., 2007) y cambios en el patrón de distribución de PmpA (Carrasco et al., 2011). Esto indica que es probable que las Pmps cumplan un rol en la respuesta clamidial al estrés que todavía no ha sido caracterizado. Quedan muchos interrogantes por responder. ¿Todas las Pmps son importantes en persistencia? ¿Su papel depende del estresor en cuestión? ¿Cada una cumple un rol específico? ¿La formación de hetero-oligómeros y/o el clivaje y secreción de PDs generan un señalamiento involucrado en la recuperación de la persistencia?

En el seguimiento de las mutantes en Pmps se encontraron dificultades para trabajar con las recombinantes aisladas (cepas *pmpA* (-), *pmpB*(-), *pmpC*(-)). Estas recombinantes son resistentes a rifampicina, al igual que la cepa parental Rif^R, y a espectinomicina. Se ha observado que ciertas mutaciones que confieren resistencia a espectinomicina son perjudiciales para el *fitness* en *C. psittaci* (Binet and Maurelli, 2005). Podría hipotetizarse que ambas resistencias antibióticas perjudican la cinética de crecimiento de estas cepas, como se ha observado previamente al intentar realizar recombinantes (Muramatsu et al., 2016; Muramatsu, 2017). Debido a la imposibilidad de trabajar con estas cepas que presentaban una menor producción de progenie infecciosa en condiciones no tratadas, el próximo paso fue obtener mutantes nulas en cada uno de los genes mediante inserción de intrones tipo II. A pesar de que se obtuvieron los plásmidos necesarios para transformar *C. trachomatis* y obtener mutantes nulas en *pmpA/B/C*; solo fue factible aislar cepas nulas para *pmpC* (L2 *pmpC*::GII). Debido a que no se consiguió una inserción exitosa luego de múltiples intentos de transformación en *C. trachomatis* con estos vectores, es probable que una inserción en *pmpA* o *pmpB* no sea factible ya que estos genes forman parte de un operón en el genoma clamidial (Figura 26), y la inserción podría ocasionar efectos polares. Por otro lado, cabe mencionar que el sistema TargeTron de anulación sitio dirigida de genes, si bien es probablemente el que mejor funciona para *Chlamydia*, nuestra experiencia y la de otros grupos sugiere que no todos los genes pueden inactivarse con la misma eficiencia. De hecho, algunos genes pueden inactivarse en el primer o segundo intento mientras que otros no, a pesar de múltiples intentos. Queda pendiente obtener mutantes limpias que no ocasionan efectos polares mediante FLAEM (detallado en la introducción) (Keb et al., 2018), técnica descrita muy recientemente y bajo el dominio de un solo laboratorio hasta el momento.

Luego de obtener la cepa nula para *pmpC*, L2 *pmpC::GII*, se intentó complementarla. El gen *pmpC* fue clonado exitosamente en el vector pBOMB4R-MCI pero las cepas transformantes aisladas por ensayo de placa no expresan PmpC-FLAG como era esperable, ni complementan los fenotipos analizados. Debido a la presencia de secuencias repetitivas en este gen y al gran tamaño del mismo es posible que hayan ocurrido eventos de recombinación que no permitan la expresión del mismo o que en el ensayo de placa se hayan aislado cepas que habían perdido el inserto (o parte de él). Otra posibilidad es que no sea posible expresar *pmpC* bajo el promotor de *rpoB*, ya que se trata de una expresión alta de manera constitutiva. Se plantea intentar la complementación en un vector de expresión inducible. Idealmente la complementación debería realizarse en una nueva generación de vectores (Cortina et al., 2019) que no presenten resistencia a beta-lactámicos, como la familia pBOMB, para poder evaluar el comportamiento de la cepa complementada frente al estrés inducido por penicilina además de por IFN γ . Hasta el momento, no fue posible evaluar el efecto de la complementación de la expresión de PmpC en persistencia. Del mismo modo, los intentos de expresión de 5 fragmentos de Pmps recombinantes no fueron exitosos. Una posibilidad es que los vectores de expresión, que poseen secuencias repetitivas, no sean estables y ocurran re-arreglos que ocasionen cambios en el tamaño de la proteína producida. En un futuro, las distintas variantes de los genes *pmps* obtenidas pueden ser utilizadas para re-intentar la expresión en nuevos vectores de expresión o en otras cepas y/o condiciones, aunque cabe mencionar, se han intentado varias condiciones de inducción con iguales resultados negativos. Una de las opciones a explorar es utilizar una cepa de *E. coli* que exprese tARNs no convencionales, por ejemplo, BL21 CodonPlus (ThermoFisher). Sin embargo, es importante considerar que se han reportado intentos fallidos de la sobre-expresión de estas proteínas complejas de membrana (PmpA, PmD y PmpI de *C. trachomatis* Ser. E) en varias cepas de *E. coli*, por ende, esta no sería la mejor plataforma de expresión. En ese trabajo de tesis, solo pudieron expresar algunos de los dominios barril beta, pero estos se agregaban en cuerpos de inclusión insolubles aún en urea 8M (Vickers, 2013). Únicamente obtuvieron resultados positivos, aunque con bajo rendimiento, utilizando un sistema de expresión libre de células MembraneMax (ThermoFisher) mediante el cual pudo expresarse el dominio pasajero (PD) de PmpA que no había podido ser expresado en *E. coli* (Vickers, 2013). Otra posibilidad, con el objetivo de expresión de las Pmps, es adaptar la secuencia al uso de codones en *E. coli* para lograr una traducción más eficiente. Ya que no fue posible obtener la cantidad de proteína necesaria para realizar inmunizaciones se decidió seleccionar pequeños péptidos dentro de estas proteínas y utilizarlos para inmunizar, unidos a hemocianina de lapa californiana (KLH) para generar una respuesta más robusta. Estamos aún abocados a la obtención de anticuerpos contra estos

péptidos, ya que nos permitirá continuar con el estudio de las Pmps y evaluar su expresión a lo largo del ciclo, su localización y demás. Un ensayo de neutralización incubando EBs con cantidades crecientes de este anticuerpo también permitirá estudiar el rol de PmpC en invasión, como se ha reportado para PmpD (Wehrl et al., 2004).

A pesar de las dificultades encontradas en el estudio de las Pmps, se obtuvo evidencia por primera vez de la participación de PmpC en persistencia como un factor importante compartido entre el IFN γ y la penicilina. Tanto la mutante química M111 como L2 pmpC::GII (cepas Δ pmpC) presentaron un defecto en la generación de IFUs luego del estrés inducido por IFN γ o penicilina. Aunque, como se mencionó anteriormente, los esfuerzos por complementar este fenotipo no fueron exitosos hasta el momento. El desarrollo de anticuerpos contra esta proteína y la complementación de su expresión permitirán confirmar su rol en persistencia. Es difícil hipotetizar cual es el rol que esta proteína cumple en persistencia, ya que poco se sabe acerca de las funciones de esta familia de proteínas clamidiales.

Las Pmps forman complejos hetero-oligoméricos en la superficie bacteriana (Swanson et al., 2009; Favaroni, 2017). Esto podría explicar que, a pesar de una redundancia aparente entre las Pmps adhesivas, interferir con las propiedades de adhesión de una Pmp, por ejemplo incubando con esa Pmp recombinante o utilizando suero contra esa proteína, disminuye significativamente la infección bacteriana (Becker and Hegemann, 2014). Notablemente, hay Pmps que se expresan en mayor medida en el RB, indicando que su rol en la infección no estaría restringido a la adhesión de los cuerpos elementales. Por ejemplo, PmpC es detectada en ambas formas de desarrollo (Skipp et al., 2005; Saka et al., 2011; Ostergaard et al., 2016; Skipp et al., 2016), generalmente en mayor proporción en los cuerpos reticulares (Saka et al., 2011; Skipp et al., 2016). La mayoría de las Pmps presentan cisteínas en el barril beta que participan de la formación de puentes disulfuro que le otorgan estabilidad y rigidez a la membrana del EB, y muchas de ellas forman parte minoritaria del COMC; mayormente constituido por MOMP, OmcA y OmcB (Liu et al., 2010). Es decir, las proteínas Pmps son importantes también para la estructura de la membrana clamidial. Por mucho tiempo se consideró la falta de detección de peptidoglicano como la “anomalía clamidial”. En la actualidad, se conoce que *C. trachomatis* presenta un anillo de peptidoglicano en ciertos momentos para facilitar la división y controlar la modulación inmune de manera apropiada (Liechti et al., 2016). Bajo el tratamiento con beta-lactámicos se observa la incorporación de precursores de peptidoglicano pero no se logra una morfología apropiada en los aRBs (Liechti et al., 2014), lo que indica que el *cross-linking* llevado a cabo por las PBPs es necesario para construir el anillo y mantener una división celular funcional. Teniendo en cuenta el rol estructural de las Pmps y el hecho de que la penicilina interfiere en la división celular de

estas bacterias es esperable que el rol de PmpC y de otras Pmps potencialmente involucradas esté relacionado a su presencia en la membrana del aRB que debe transicionar a RB y dividirse para retomar el ciclo. Queda por determinarse si este papel es meramente estructural o estarán involucrados otros factores.

En relación a otro objetivo logrado en este trabajo, con las primeras mutantes de *C. trachomatis* en *pmpA/B/C* se pudo demostrar que estas Pmps participan del proceso de invasión celular, aunque no son esenciales frente a la adherencia a las células epiteliales. Como se señaló con anterioridad el hecho de que posean funciones redundantes en adherencia, pero la falta de cada una de ellas genere menor invasión, podría relacionarse a la formación de homo- y hetero-oligómeros con diferente composición.

Curiosamente, la falta de *pmpC* y no de *pmpA* o *pmpB* genera agregados dentro de la inclusión. Este fenotipo no se recupera cuando están presentes bacterias Wt en la misma inclusión indicando que se trata de un fenotipo dependiente del genotipo de cada bacteria y no de un factor soluble que se libera y puede actuar en forma paracrina. Resta evaluar el comportamiento de las cepas $\Delta pmpC$ en co-infecciones con mutantes nulas en otras Pmps. A la luz de los resultados obtenidos, la presencia de PmpC en la membrana es importante para garantizar la libertad de movimiento dentro de la inclusión, pero no afecta la capacidad de generar progenie infecciosa, al menos bajo condiciones de cultivo celular no estresantes para la bacteria.

En un futuro, será interesante explorar el comportamiento de las cepas mutantes en los genes *pmps in vivo*. Considerando que el gen *pmpC* ha resultado un factor importante en el estrés inducido por penicilina, debería compararse la actuación de una cepa $\Delta pmpC$ frente a la cepa Wt en el modelo de persistencia reportado por el laboratorio del Dr. Schoborg (Phillips Campbell et al., 2012). Para poder llevar a cabo ese experimento, es necesario obtener previamente mutantes nulas para *pmpC* en *C. muridarum*, lo que no representa una tarea trivial ya que la manipulación genética en esa especie no ha sido tan desarrollada como en *C. trachomatis*. También se propone estudiar el posible rol de las demás proteínas Pmps en persistencia por lo que se plantea obtener mutantes nulas en cada una de los respectivos genes y analizar su fenotipo. Esto permitirá determinar si exclusivamente PmpC es importante o es una función compartida por la familia Pmp como lo es la adherencia a las células del hospedador.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

De manera resumida, el *screening* llevado a cabo permitió identificar genes involucrados en la persistencia inducida por IFN γ y/o penicilina. Se ahondó en la validación y el seguimiento de las mutantes M275 y M111. Sin embargo, hay múltiples mutantes/genes resultantes del *screening* cuyo estudio queda pendiente y permitirá continuar contribuyendo al estudio de la persistencia en trabajos posteriores. Como principales conclusiones se identificaron dos factores involucrados en persistencia: Ptr y PmpC.

Se postula una actividad proteasa para Ptr, y en este trabajo de tesis se demostró que participa en la recuperación de *C. trachomatis* de la persistencia inducida por IFN γ pero no por penicilina *in vitro*. La falta de Ptr genera una reducción en la generación de IFUs post-estrés inducido por IFN γ debido a una falla en la diferenciación de RB a EB y a una menor tasa de acumulación del genoma. Mientras que la expresión de Ptr rescata el defecto en la producción de IFUs post-estrés. La proteína Ptr es secretada al lumen de las inclusiones clamidiales y la falta de Ptr resulta en un menor *clearance* en el tracto genital de ratones hembra.

Por otra parte, la proteína PmpC participa en la recuperación de *C. trachomatis* de la persistencia inducida por IFN γ y por penicilina *in vitro*. Se observa una menor tasa de invasión en cepas nulas para PmpA, PmpB o PmpC pero la adherencia no se ve afectada. Además, PmpC posee un “efecto repelente” evitando la formación de agregados dentro de la inclusión.

Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se abre un abanico de posibilidades para continuar con el estudio de la persistencia clamidial. Una de ellas es extender el estudio de los genes identificados con los estresores más caracterizados, IFN γ y penicilina, a otros estresores, por ejemplo, la deprivación de hierro, para identificar factores globales de la respuesta al estrés clamidial y diferenciarlos de factores involucrados en un tipo de estrés específico. Así también, es necesario realizar la validación de la participación de genes resultantes del *screening* no abordados en esta tesis, como el caso de *leuS*, que se mencionó en la discusión.

En cuanto al caso particular de la proteína Ptr, al haber confirmado su importancia en la persistencia inducida por IFN γ , se plantea estudiar si esa función está asociada a su actividad proteasa. En ese sentido, será útil lograr la expresión de Ptr recombinante y evaluar su actividad frente a diferentes blancos como así también expresar Ptr recombinante con el sitio activo

putativo mutado en cepas Δptr y evaluar su capacidad para sobrellevar el estrés. Es esperable que estas cepas no sean capaces de complementar el defecto en la recuperación si la actividad proteasa está involucrada. Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación y/o *pull down* se podrán identificar proteínas que interactúen con Ptr, siendo posibles blancos de esta proteasa, o proteínas que se encuentran formando parte de las pequeñas estructuras extra-bacterianas en el lumen de la inclusión donde se detectaron Ptr y CT143 y de las cuáles no se conoce la función y composición. Asimismo, será interesante evaluar si Ptr tiene influencia en el transcriptoma y el proteoma mediante ensayos de secuenciación de ARN y proteómica, lo que podría llevarse a cabo comparando una cepa Δptr con una cepa Wt sin tratamiento, bajo el estrés inducido por IFN γ , y durante la recuperación. El análisis del proteoma durante la recuperación también podría aclarar si Ptr actúa sobre un blanco específico o no. Se está desarrollando un modelo de ratones humanizados (Irgm1/m3 -/-) que expresanIDO humana (Dr. Starnbach, comunicación personal). En estos ratones observan un menor *clearance* de *C. trachomatis* y hasta el momento representan un modelo prometedor para la persistencia clamidial inducida por IFN γ *in vivo*. Será necesario este modelo o uno similar para estudiar la importancia de Ptr en la persistencia *in vivo*. También resta realizar los ensayos *in vivo* con la cepa complementada para confirmar con mayor certeza que la falta de *ptr* per se ocasiona un *clearance* demorado de la bacteria en el modelo de infección en animales.

En relación a la proteína PmpC, se plantea intentar otra estrategia, por ejemplo un vector inducible, para complementar su expresión. De manera similar a la validación realizada con Ptr, se propone estudiar la implicancia de Pmps resultantes del *screening* y demás miembros de la familia en persistencia. Para ello, obtener mutantes puntuales, idealmente mediante la novedosa técnica FLAEM que permite una delección limpia (Keb et al., 2018). Luego complementarlas con un plásmido de expresión resistente a espectinomicina para evaluar la recuperación del estrés, incluida la penicilina (Cortina et al., 2019). Finalmente, evaluar el comportamiento de mutantes nulas en Pmps *in vivo*, para lo cual se podrían utilizar los modelos de persistencia que se están desarrollando (Phillips Campbell et al., 2012) (Starnbach, presentado en CBRS 2019). Por otra parte, estudiar el mecanismo por el cual PmpC se opone a la formación de agregados bacterianos dentro de la inclusión. Con ese objetivo será útil identificar con qué proteínas interactúa.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo Celular

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se cultivaron células HeLa (CCL-2, ATCC) y Vero (CCL-81, ATCC) en *high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Natocor) y piruvato de sodio (Gibco), sin antibióticos, en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ a una temperatura constante de 37°C. Para el cultivo de la línea celular inmortalizada A2EN, derivada de células epiteliales humanas de cultivo primario de un explanto de tejido endocervical, se utilizó el medio KSFM (Gibco). Las células fueron repicadas por tripsinización a una confluencia aproximada del 80-90% en placas de 10cm. Con tal fin, se realizaron dos lavados con 3mL de PBS, posteriormente se agregó 1mL de tripsina 0,25%, se incubó a 37°C por 3-5 minutos, dependiendo de la línea celular. La reacción fue detenida agregando 2mL de medio completo y se homogenizó la suspensión celular por pipeteo. Por último, la suspensión celular fue repartida en el número de placas deseado junto con medio fresco en un volumen final de 10mL. El congelamiento de las líneas celulares fue realizado a -80°C (freezer) o a ~ -196°C (nitrógeno líquido). Para ello, se resuspendieron aproximadamente 1E6 células en medio completo (FBS 10%) con 5% de DMSO en un volumen final de 1mL y se colocaron en crioviales (Greiner). Para asegurar una correcta preservación los crioviales se ubicaron en un “Mr. Frosty” (Thermo Scientific) que permite una velocidad de enfriamiento de -1°C/minuto. Al momento de descongelar los crioviales se colocaron en un baño de agua a 37°C hasta observar la fusión completa de la suspensión celular que luego fue colocada en una placa con medio fresco. Al día siguiente, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco. Para determinar el número de células se colocaron 10µL de suspensión celular en una cámara de Neubauer y se efectuó el recuento celular en los cuatro cuadrantes de la misma (N). El número de células por mililitro fue calculado con la siguiente fórmula: $Células/mL = N/4 * 10.000$. Las células fueron rutinariamente chequeadas para la contaminación con *Mycoplasma* utilizando PCR como se ha descripto previamente (van Kuppeveld et al., 1992).

Cepas de *C. trachomatis*

En este trabajo de tesis se utilizaron las cepas: *C. trachomatis* L2 434/Bu (ATCC VR-902B), una variante resistente a rifampicina “RifR” (Nguyen and Valdivia, 2012) y *C. trachomatis* serovar E (ATCC VR-348BD) gentilmente cedida por el Dr. Rubén Motrich. Se trabajó con una colección de mutantes obtenidas por mutagénesis química con etil-metano sulfonato (EMS) a partir de la cepa RifR (Kokes et al., 2015). El genoma de M275 y otras mutantes de la colección fue

secuenciado como ha sido previamente descrito (Snavelly et al., 2014). Las cepas recombinantes fueron generadas por transferencia lateral y genotipeadas por TILLING (Till et al., 2006; Kari et al., 2011; Nguyen and Valdivia, 2012). *C. trachomatis* L2 ptr::GII fue generada por la inserción de un cassette de resistencia a espectinomicina (*aadA*) en *ptr*. Esta cepa fue complementada con un derivado de pBOMB4R-MCI (GenBank accession no. KF790909) (Bauler and Hackstadt, 2014) que permitió la expresión constitutiva de Ptr-FLAG. La cepa L2 control también fue transformada con pBOMB4R-MCI expresando Ptr-FLAG. *C. trachomatis* L2 *pmpC*::GII fue generada por la inserción de un intrón tipo II en *pmpC*. Esta cepa fue luego transformada con un derivado de pBOMB4R-MCI (GenBank accession no. KF790909) (Bauler and Hackstadt, 2014) pero este no permitió la expresión constitutiva de PmpC. *C. trachomatis* L2 fue transformada con pMC71 (pCT143-HA) (da Cunha et al., 2017) para permitir la expresión de CT143 fusionada a un epítopo de HA. Las cepas *C. trachomatis* L2, *pmpA*(-), *pmpB*(-), *pmpC*(-) y L2 *pmpC*::GII fueron transformadas con p2TK2-SW2-IncDpromoter-mcherry o p2TK2-SW2 IncDProm-RSGFP-IncDTerm (Agaisse and Derre, 2013) para realizar los ensayos de invasión y formación de agregados. La construcción de los vectores y el protocolo de transformación se detallan a continuación.

Propagación de *C. trachomatis*

Las infecciones se realizaron agregando una suspensión previamente titulada de cuerpos elementales en medio de cultivo a una monocapa celular con la multiplicidad de infección (MOI) especificada en cada caso, seguido de una centrifugación a 2.000xg, 10°C, 30 minutos. Posteriormente las células infectadas fueron transferidas al incubador hasta los distintos tiempos post infección (hpi). Para obtener stocks bacterianos crudos las monocapas infectadas fueron lavadas con PBS y luego se agregó agua para ocasionar la lisis celular (en volúmenes diversos correspondiendo al multi-well utilizado), se llevaron las placas al incubador por ~ 15 minutos y se obtuvo una suspensión homogénea por pipeteo vigoroso, se agregó suficiente cantidad de SPG 5x para obtener una concentración final de 1x [1xSPG Buffer: KH₂PO₄ 0,0038 M; K₂HPO₄ 0,0072 M; L-ácido glutámico 0,0049 M; sucrosa 0,218 M]. Las suspensiones de *Chlamydia* fueron sonicadas en hielo (40% amplitud, pulso on 5", pulso off 5"; tiempo: 3x15") y guardadas en buffer SPG a -80°C.

Purificación de cuerpos elementales

En primer lugar, se infectaron monocapas de células HeLa o Vero crecidas en placas de 6 pocillos (3 placas por cepa) con una MOI de 3 para asegurar un porcentaje de células infectadas de 100%. A las 44-48 hpi se aspiró el medio, se lavó con PBS, y se lisaron las células infectadas

por lisis osmótica a 37°C con agua (800 µL por pocillo). Los lisados fueron centrifugados a 500xg por 5 minutos en tubos falcon y el sobrenadante fue trasvasado a nuevos tubos eppendorf de 1,5mL. Posteriormente se los centrifugó a 25.000xg por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300µL de SPG. La muestra fue sonicada (2 veces, punta fina, 40% amplitud, on 5”, off 1”, 15”). Se volvió a centrifugar (25.000xg, 10 min, 4°C) y luego de descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 200µL de SPG y se volvió a sonicar en iguales condiciones. Con cuidado, se agregó la suspensión sobre un gradiente de Omnipaque en tubo de ultracentrífuga de 2mL consistiendo de (desde arriba hacia abajo): 250µL 30%; 750µL 44% y 250µL 54%. Se centrifugó en ultracentrífuga a 40.000xg por 1,5h a 4°C. La aceleración se seteó en media y la desaceleración en “roller coaster” (suave). Finalmente, se colectó la banda de cuerpos elementales (EBs) en la interfase 54%. Se mezclaron los EBs con 10 volúmenes de SPG, se centrifugó a 25.000xg por 10 minutos, y el pellet se resuspendió en 200µL de SPG. La suspensión de cuerpos elementales fue alicuotada en tubos eppendorf de 1,5mL y guardada a -80°C.

Materiales del protocolo:

Solución Omnipaque (90%)

- 9,5 mL Omnipaque 350
- 0,272 mL 5M NaCl
- 0,228 mL H₂O

Total: 10 mL Soluciones gradiente:

	30%	44%	54%
Solución Omnipaque (90%)	4,5 mL	6,6 mL	8,1 mL
SPG	10,5 mL	8,4 mL	6,9 mL
total	15,0mL	15,0mL	15,0mL

Titulación de stocks de *C. trachomatis*

Los stocks de *Chlamydia* fueron titulados como número de unidades formadoras de inclusión por microlitro (IFU/µL). Para ello, diluciones seriadas de la suspensión bacteriana fueron agregados a células Vero o HeLa sembradas en placas de 96 pocillos. A las 24-30 hpi, las células fueron fijados con metanol frío por 15 minutos y las inclusiones se marcaron con anticuerpos *rabbit* anti-Slc1 1:150 (Saka et al., 2011). Para el recuento de las inclusiones se tomaron imágenes

con un objetivo 20x, con un microscopio de epifluorescencia Leica DMI8 (Leica Microsystems), y se contaron con una macro de ImageJ desarrollada como parte de esta tesis.

Screening en búsqueda de mutantes defectivas para la recuperación de persistencia

Se prepararon 4 arreglos idénticos de las cepas mutantes para determinar: 1º) input (30hpi), 2º) generación de IFUs en el control no tratado (UT), 3º) generación de IFUs luego de la recuperación de la persistencia inducida por interferón gamma (24h de recuperación, 48hpi), y 4º) generación de IFUs luego de la recuperación de la persistencia inducida por penicilina (24 h de recuperación, 48hpi). Para el estrés inducido por interferón gamma, se sembraron células HeLa en placas de 96 pocillos y se pre-trataron con interferón (15 ng/mL, Peprotech) por 24h, luego de las cuales las células se lavaron una vez con PBS y se infectaron con 5 µL de lisados crudos celulares derivados de cada mutante en la librería en un volumen final de 100 µL de DMEM, 10% FBS, IFN γ (15 ng/mL) por pocillo. En el momento de la infección la confluencia celular era ~80%. A las 24hpi, las células se lavaron con PBS, se agregó medio fresco (DMEM, 10% FBS, triptófano (100mg/mL, Sigma-Aldrich)) y se las dejó recuperar por 24h adicionales. A las 48hpi, las células fueron lisadas con agua para liberar las partículas infecciosas y se agregó un volumen apropiado de SPG 5x para obtener una suspensión final de los lisados en SPG 1x. Luego, estos lisados fueron utilizados para llevar a cabo ensayos de generación de IFUs y determinar la generación de progenie infecciosa normalizada por input (inóculo inicial). Para la persistencia inducida por penicilina, un procedimiento similar fue llevado a cabo excepto que se agregó penicilina G (1 UI/mL, Sigma-Aldrich) a células HeLa en el momento de la infección y a las 24hpi las células se lavaron una vez con PBS, se agregó medio fresco (DMEM, 10% FBS) y se dejaron recuperar por 24h con el objetivo de evaluar la generación de progenie infecciosa a las 48hpi. Como control, se incluyeron réplicas múltiples de la cepa parental *C. trachomatis* L2 434/Bu con varias MOIs (0,5; 2 y 4) y fueron utilizadas para determinar los valores de corte para una recuperación defectuosa (seteados como 10% y 20% de IFU/input de la cepa parental para el interferón y la penicilina respectivamente). Se consideró que todas las mutantes que mostraban una reducción mayor a 3 veces en IFU/Input comparadas con la cepa L2 control en la condición no tratada (UT) presentaban un defecto de crecimiento y por ende fueron excluidas del análisis, dado que estas mutantes generaban normalmente un menor número de IFUs incluso en ausencia de un estresor. Las inclusiones se marcaron con anticuerpos *rabbit* anti-Slc1 seguido de Alexa Fluor 594 anti-*rabbit* IgG (Life Technologies) y se utilizó Hoechst 33258 (Life Technologies) para teñir el ADN de *Chlamydia* y de sus células hospedadoras. La obtención de imágenes y el recuento fueron

realizados con Cellomics HTC Arrayscan (Thermo Fisher Scientific) y las imágenes fueron analizadas con Cellomics vHCS: View Software v1.6 (Thermo Fisher Scientific) para calcular los valores de IFU.

Ensayos de inducción de persistencia y recuperación con IFN γ y penicilina

Para el ensayo con interferón gamma, las células fueron sembradas y pre-tratadas con IFN γ (15 ng/mL) por 24h (Ver Capítulo 1, “Modelo de inducción de persistencia con interferón gamma o penicilina”). Luego, se removió el medio de cultivo y se infectaron las células con una MOI de 0,8 para cada cepa en presencia de IFN γ (15 ng/mL). Luego de 24h, se removió el medio, las células fueron lavadas con PBS, se adicionó medio fresco con un exceso de triptófano (DMEM, 10% FBS, Trp 100 mg/L) y se dejó recuperar a las células a distintos tiempos. A las 48, 56 y 72 hpi (correspondientes a 24, 32 y 48 h de recuperación, respectivamente) se removió el medio, las células se lisaron con agua y se resuspendieron en SPG 1x. Estos lisados fueron utilizados para realizar ensayos de progenie infecciosa (IFUs). En resumen, se infectaron células HeLa crecidas en placas de 96 pocillos, con diluciones seriadas de estos lisados por 30h hasta que estas células fueron fijadas con metanol.

En el caso de la penicilina, se infectaron células HeLa con una MOI de 0,8 para cada cepa y en el momento de la infección se adicionó penicilina (1 UI/mL). Después de 24h las células se lavaron con PBS, se agregó medio libre de antibióticos (DMEM 10% FBS) y se permitió la recuperación de las células a distintos tiempos. A 48, 56 y 72 hpi (correspondientes a 24, 32 y 48h de recuperación, respectivamente) se removió el medio de cultivo, se lisaron las células con agua para liberar las partículas infecciosas y se agregó un volumen apropiado de SPG 5x para obtener una suspensión final de los lisados en SPG 1x. Estos lisados fueron utilizados para enumerar la cantidad de IFUs y determinar la progenie infecciosa como se describió arriba.

Las inclusiones fueron identificadas con un anticuerpo anti-Slc1 y un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-*rabbit*. Las inclusiones fueron observadas con un objetivo 20x en un microscopio Leica DMI8. El número de inclusiones fue determinado con una macro de ImageJ desarrollada para este trabajo. Siempre se incluyó un control de “no recuperación”, estos pocillos fueron tratados por 48, 56 y 72 hpi con penicilina o IFN γ . En todos los tiempos, la progenie fue normalizada por el input. Para calcular el input, células HeLa infectadas con una MOI de 0,8 con cada cepa fueron fijadas con metanol a las 30 hpi y las inclusiones fueron teñidas y cuantificadas como ya se ha descrito.

Transformación de *Chlamydia*

Las transformaciones de *Chlamydia* se realizaron como se ha descrito previamente (Wang et al., 2011) con algunas modificaciones. En resumen, se mezclaron 10E8 IFUs con 10-20 µg del plásmido de interés en buffer CaCl₂ (Buffer 5x CaCl₂: 50 mM Tris pH 7.4 en 250 mM CaCl₂) y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, homogeneizando por inversión del tubo cada 5 minutos. Luego, la mezcla se agregó a una monocapa confluyente de células Vero sembradas en todos los pocillos de una placa de 6 pocillos. A las 12 hpi, se adicionó espectinomicina (Sigma-Aldrich) 200 µg/mL o penicilina (Sigma-Aldrich) 1 UI/mL dependiendo del marcador de selección que se estuviese utilizando. A las 40-48 hpi se obtuvieron lisados de las células infectadas por lisis osmótica (Pasaje 0, P0) e inmediatamente se utilizaron para infectar una placa de 6 pocillos con células Vero. Los pasajes se repitieron cada 40-48 h hasta la aparición de transformantes (P2-Px), lo que normalmente ocurrió antes de P6. En todos los pasajes se agregó antibiótico para la selección. Después de ello, las transformantes fueron purificadas por ensayo de placa para obtener poblaciones clonales como se ha descrito previamente (Matsumoto et al., 1998; Nguyen and Valdivia, 2012).

Ensayo de placa

El ensayo de placa fue el método utilizado para el aislamiento de poblaciones clonales de *Chlamydia*. Monocapas confluentes de células Vero sembradas en placas de 6 pocillos fueron infectadas con diluciones del lisado de interés. A las 2 hpi se removió el medio de infección, se reemplazó por un agar semi-blando de DMEM/agarosa [0,5% LE agarosa (INBIO Highway), 1 × DMEM (Gibco), 10% FBS (Natocor), 50 µg/mL gentamicina (Sigma-Aldrich), 1 × aminoácidos no esenciales (STEMCELL), 200 ng/mL cicloheximida, 200 µg/mL espectinomicina (Sigma-Aldrich) o 1 UI/mL penicilina (Sigma-Aldrich)] y se incubó a 37 °C y 5% CO₂ por 8-14 días hasta que se visualizaban las placas de lisis. Estas placas fueron repicadas utilizando un tip y utilizadas para infectar células Vero en placas de 96 pocillos. Luego de 48 horas de crecimiento, las células fueron lisadas con agua para expandir las cepas infectando pocillos de mayor capacidad.

Generación de recombinantes de *C. trachomatis* por transferencia lateral de genes

Las cepas recombinantes se generaron como se ha descrito previamente (Nguyen and Valdivia, 2012). En resumen, células confluentes sembradas en placas de 6 pocillos fueron coinfectadas con la cepa resistente a rifampicina M275 y una cepa wild type resistente a espectinomicina (SpCR) con una MOI de 3 (un set de 3 wells) y una MOI de 6 (un set de 3 wells),

siempre con una relación 1:1 mutante:*wild type*. A las 44 hpi las bacterias fueron recolectadas y resuspendidas en 400 μ L SPG 1x por pocillo. Luego, monocapas confluentes de células Vero sembradas en placas de 6 pocillos fueron infectadas con diluciones seriadas de las recombinantes (100 μ L por pocillo, desde no diluido a 10^{-5}) para realizar un ensayo de placa. A las 2hpi, se agregó una cobertura de DMEM/agarosa [0.5% LE agarosa (INBIO Highway), 1 \times DMEM (Gibco), 10% FBS (Natocor), 50 μ g/mL gentamicina (Sigma-Aldrich), 1 \times aminoácidos no esenciales (STEMCELL), 200 ng/mL cicloheximida, 200 μ g/mL spectinomicina (Sigma-Aldrich) y 200 ng/mL rifampicina (Sigma-Aldrich)] y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ por 8 a 14 días hasta que se visualizaron placas. La progenie recombinante fue seleccionada a partir de ~50 placas que se formaron en la presencia de 200 ng/mL Rif and 200 μ g/mL Spc. Las recombinantes purificadas por ensayo de placa fueron luego expandidas en células Vero y genotipeadas por TILLING (Till et al., 2006; Kari et al., 2011) para monitorear la segregación de mutaciones en *bioF*, *recC*, *oppC* y *ptr* que estaban presentes en M275. Excepto por una cepa que era isogénica con M275, todas las demás recombinantes eran wild type para *ptr*. Las mutaciones presentes en rs9 y rs17 fueron confirmadas por secuenciamiento de Sanger.

TILLING: Genotipo de recombinantes

Con el objetivo de llevar a cabo un genotipo que permitiera un mayor *throughput* con menores costos al momento de analizar el genotipo de las recombinantes se decidió llevar a cabo esta técnica. En primer lugar, se obtuvo un extracto de *Apium graveolens* con actividad de clivaje en los sitios de *mismatch* del ADN. Para ello se siguió el protocolo publicado por Till y sus colaboradores (Till et al., 2006). Una vez obtenido el extracto se realizó una curva de calibración con diferentes cantidades de extracto enzimático (0 μ L; 0,1 μ L; 0,3 μ L; 1 μ L). Debido a que no se obtiene un alto grado de pureza de la enzima CEL1 también co-purifican otras endonucleasas y se observó que 0,1 μ L mostraba la actividad deseada, mientras que a mayores concentraciones ocurría una degradación acentuada del ADN. Por ello se decidió utilizar 0,1 μ L de extracto por reacción. El procedimiento de TILLING fue el siguiente:

1. Amplificar la región target de la cepa recombinante y de la cepa wild type (L2) utilizando cebadores que generen un producto de 600 pb. La mutación de interés debe encontrarse a 400 pb de un extremo y a 200 pb del otro extremo del producto. Utilizar como templado un extracto crudo de *Chlamydia* diluido 1:100 en agua. Para la PCR se utilizó “Choice Taq blue master mix” (Denville Scientific) lo que permite un ensamblado más simple y rápido de la reacción:

Reactivos	Por reacción
dH ₂ O	9,5 µL
Choice Taq blue Master Mix	12,5 µL
Templado (ADN)	2 µL
Cebador 1 (10 µM)	0,5 µL
Cebador 2 (10 µM)	0,5 µL
Volumen final	25 µL

Condiciones de ciclado:

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	10 minutos
33	94	30 segundos
	55	30 segundos
	72	1,5 minutos
	4	Espera

2. Correr en un gel de agarosa 5 µL de cada reacción para confirmar la amplificación.
3. Mezclar 5 µL de un amplicón de la cepa mutante con 5 µL de un amplicón de la cepa *wild type* en un pocillo de una placa de 96 pocillos para PCR. En el termociclador, generar hetero dúplex de estos amplicones utilizando las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo
95	2 minutos
Enfriamiento lento a 85	2°C/segundo
85	30 segundos
Enfriamiento muy lento a 25	0.1°C/segundo
25	2 minutos
4	Pausa corta

4. Agregar 5 µL conteniendo 0,1 µL de extracto de CEL1 en buffer CEL1 3x a cada pocillo.
5. Incubar a 45°C por 30 minutos.
6. Frenar la digestión inmediatamente con “loading dye” 5x.
7. Correr todo el contenido del pocillo en un gel de agarosa 2% y teñir con bromuro de etidio. Syber Safe no es lo suficientemente sensible.
8. La digestión del hetero dúplex en el sitio de interés genera dos productos de 200 pb y 400 pb que permiten identificar la presencia de la mutación de interés en la recombinante testada.

Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

Se clonó la secuencia completa de *ptr* unida a His-tag en el N-terminal, en el vector pHis-parallel (sitios NcoI/StuI) para expresar esta proteína. La secuencia fue verificada por corte con

enzimas de restricción y secuenciamiento. Se utilizaron los cebadores FHisp-Ptr (NcoI) y RHisp-Ptr (StuI) (Tabla 5). Con el plásmido obtenido se transformó *E. coli* BL21-Codon Plus (Agilent) y se ensayó la inducción de la expresión con IPTG 0,5 mM/1 mM/2 mM en 3 transformantes, siguiendo el protocolo de inducción de BL21 del vendedor, a 37°C 3h. Las muestras inducidas (I) y no inducidas (UI) se corrieron en un gel de acrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie. De manera similar, fue clonada una porción de *ptr* desde la treonina 413 a la serina 952 excluyendo el péptido señal y el sitio activo (primers F_HIS_ptr1 y R_HIS_ptr1, Tabla 5), la secuencia del plásmido resultante fue chequeada por secuenciamiento, y luego se ensayó la inducción de la expresión en BL21 pLys 2-5 h 37° C con concentraciones crecientes de IPTG.

Por otra parte, se clonaron las siguientes versiones de las Pmps en el vector de expresión pHis-parallel, unidas a His-tag en el N-terminal: rPmpA: Serina 49 a Asparragina 474, rPmpB1: Serina 31 a Glicina 394, rPmpB2: Treonina 592 a Leucina 886, PmpC1: Alanina 20 a Serina 564 y rPmpC2: Glicina 596 a Prolina 977. Todas las versiones fueron confirmadas por digestión liberando el inserto completo (NcoI y StuI) y por secuenciamiento de los vectores. Con estos vectores se transformaron *E. coli* BL21 pLysS y se indujo la expresión con IPTG a distintas concentraciones (entre 0,5mM y 2mM) por entre 2 y 5h. Siguiendo el manual “The QIAexpressionist” (Qiagen) se intentó determinar la solubilidad de la proteína target, disolviendo el pellet de la fracción insoluble en clorhidrato de guanidina 6M; pero no se observó inducción en el extracto total inducido, ni en la fracción soluble ni en la insoluble.

Generación de una cepa nula para *ptr* y *pmpC*

Todos los pasos de clonado se realizaron en *E. coli* DH5α (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EEUU). Se utilizó el algoritmo TargetTron® (Sigma-Aldrich) de selección de sitios de inserción en *ptr* o en *pmpC* para un intrón tipo II. Para la elección del sitio de inserción se consideraron positivamente la proximidad al extremo 5' del gen y un alto score predicho por el algoritmo. Los cebadores utilizados para re-dirigir el vector pDFTT3aadA en los casos exitosos fueron: Ptr_2_EBS2, Ptr_2_EBS1/delta, Ptr_2_IBS1/2 y Universal; y PmpC_1_EBS2, PmpC_1_EBS1/delta, PmpC_1_IBS1/2 y Universal. Su secuencia se indica en la Tabla 5.

El producto de PCR obtenido fue clonado, en cada caso, en el sitio BsrGI/HindIII del plásmido pDFTT3aadA (Lowden et al., 2015) que permite la selección con espectinomycin de las cepas transformadas. Los plásmidos resultantes fueron verificados por análisis de restricción y secuenciamiento de Sanger. Los plásmidos se utilizaron luego para transformar *C. trachomatis* L2 como ya se describió. La disrupción del gen *ptr* fue confirmada por PCR y por secuenciamiento

del producto de PCR obtenido con los primers Ptr2F y Ptr2R. La disrupción de *pmpC* fue chequeada por PCR con los primers FcheckTargpmpC1 y RcheckTargpmpC1.

Se obtuvieron plásmidos derivados de pDFTT3 para generar inserciones en otros sitios de *ptr* y *pmpC*; y en 2 sitios de *pmpA* y *pmpB*. Ninguna de las transformaciones con estos plásmidos fue exitosa en *C. trachomatis*. Los plásmidos obtenidos se detallan en la tabla de plásmidos (Tabla 4).

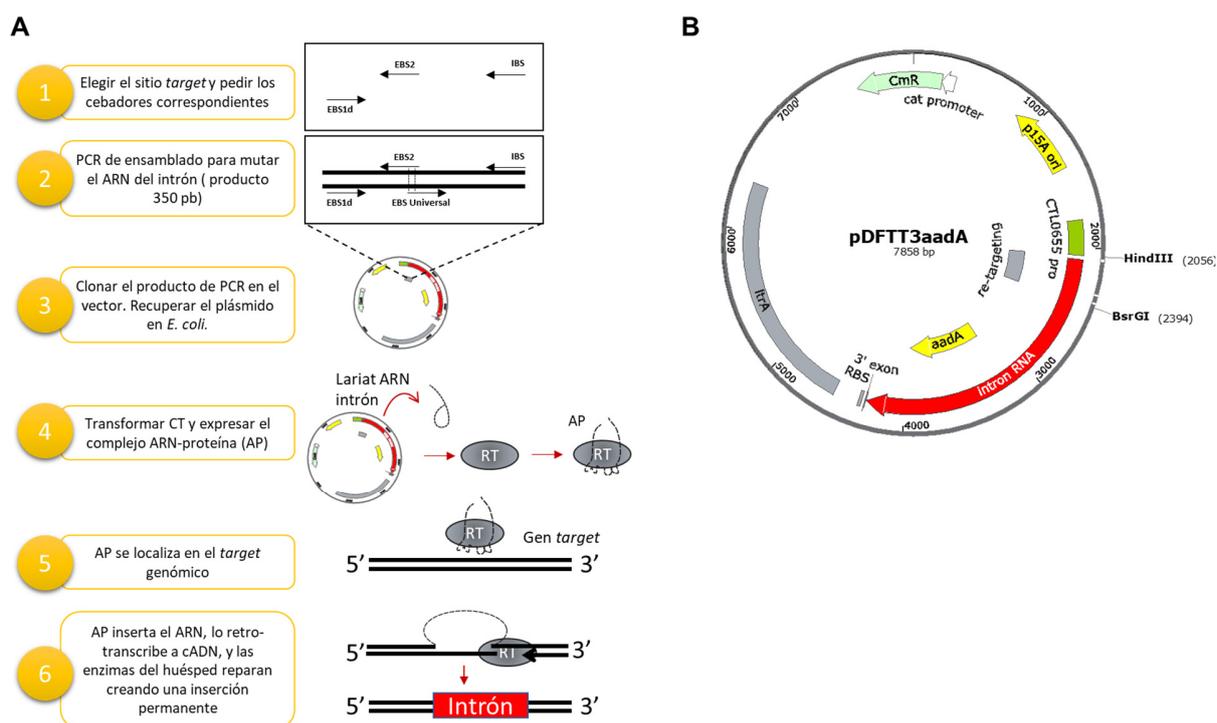


Figura 36: **A.** Abordaje llevado a cabo para obtener una mutante TargeTron. **B.** Representación esquemática del vector pDFTT3aadA (Lowden et al., 2015) utilizado como base para la mutagénesis por inserción de un intrón tipo II.

Complementación de L2 *ptr*::GII y L2 *pmpC*::GII

Para complementar la cepa *knock-out* L2 *ptr*::GII, *ctl0175* fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de *C. trachomatis* L2 purificado siguiendo las instrucciones del fabricante (DNeasy kit, Qiagen) utilizando los cebadores FPtr192 y RrpoB-Ptr o F-rpoBPtr y R-PtrFLAG. El producto de PCR resultante fue clonado en el vector pBOMB4-MCI o pBOMB4R-MCI (Bauler and Hackstadt, 2014), respectivamente, digerido con SacII/KpnI y transformado en *E. coli* DH5 α . Los plásmidos resultantes, pBOMB4-192Ptr y pBOMB4R-*ptrF*, fueron verificados por análisis de restricción y secuenciamiento y utilizados para transformar *C. trachomatis* L2 y L2 *ptr*::GII. De manera similar, para complementar la cepa *knock-out* L2 *pmpC*::GII, *pmpC* fue amplificado por

PCR a partir de ADN genómico de *C. trachomatis* L2 purificado siguiendo las instrucciones del fabricante (DNeasy kit, Qiagen) utilizando los cebadores FrpoB-PmpC y R-PmpCFLAG. El producto de PCR resultante fue clonado en el vector pBOMB4R-MCI (Bauler and Hackstadt, 2014), digerido con SacII/KpnI y transformado en *E. coli* DH5 α . El plásmido resultante, pBOMB4R-pmpCF, fue verificado por análisis de restricción y secuenciamiento y utilizado para transformar *C. trachomatis* L2 pmpC::GII.

Curva de crecimiento

Monocapas de células HeLa fueron infectadas con *C. trachomatis* con una MOI de 0,6 hasta los tiempos indicados (6, 20, 24, 30, 42 hpi), en los cuales las bacterias fueron cosechadas por lisis osmótica. Diluciones seriadas de estos lisados se utilizaron para infectar una nueva monocapa de células HeLa. Las células infectadas fueron fijadas con metanol a las 30hpi, y marcadas con anti-Slc1 y un anticuerpo secundario AlexaFluor 488 anti-*rabbit* IgG. Las imágenes de las inclusiones se obtuvieron con un objetivo 20x en un microscopio de epifluorescencia Leica DMI8 y se contaron para determinar las IFUs. Estas fueron luego normalizadas por el input (inóculo inicial).

Determinación del tamaño de la inclusión

Para medir el tamaño de la inclusión bajo diversas condiciones: no tratado (24 y 30hpi), tratado con IFN γ (24 hpi), y recuperación (48hpi) las bacterias se marcaron con anticuerpos anti-Slc1 (Saka et al., 2011), y el área de la inclusión se midió y se expresó en unidades arbitrarias utilizando una macro de ImageJ.

Determinación del número de copias de genoma

Para la determinación del número de copias de genoma, se purificó ADN de células HeLa infectadas en diferentes condiciones (con IFN γ a las 2hpi, 48hpi y 72hpi; luego del tratamiento con IFN γ y el agregado de triptófano a las 48 hpi y 72hpi) utilizando el kit DNeasy (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se prepararon con PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) y se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real en un equipo ABI 7500 (Applied Biosystems). Para la obtención de una curva estándar *ompA* fue clonado en un vector plasmídico. Para ello, *ompA* fue amplificado a partir de ADN genómico de *C. trachomatis* L2 utilizando los cebadores FompA_BamHI y RompA_SalI (Tabla 5). El producto de PCR fue clonado en los sitios BamHI/SalI de pET24d y transformado en *E.coli* DH10B. El plásmido resultante pET24d_ompA purificado con una miniprep (Promega) fue cuantificado con Qubit (Thermo Fisher Scientific) y utilizado para generar una curva estándar.

Las copias de *ompA* fueron cuantificadas utilizando los cebadores MOMP_F y MOMP_R (Tabla 5). Las condiciones de ciclado fueron: 10 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15" y 60°C por 1 min.

Microscopía electrónica de transmisión

Para evaluar las características ultraestructurales de las células HeLa infectadas con distintas cepas, las monocapas infectadas fueron fijadas a los tiempos indicados con 2,5% glutaraldehído/0,1M cacodilato de sodio (pH 6,7-7) por 3 min y levantadas suavemente del pocillo con un scraper. Las células fijadas fueron centrifugadas 5 min a 1500 rpm en un tubo eppendorf de 1,5mL. El pellet obtenido se incluyó en agar 1% tibio. Luego se post-fijó con 0,8 mL 0,8% K₄Fe(CN)₆ / 1% OsO cubiertos de la luz por 1 h. Luego de remover la solución se lavó 4 x 5 min con 2mL de cacodilato de sodio 0,1M. Se tiñó con ácido tánico 1% por 20 min y se lavó 3x5 min con 1mL de agua destilada. Se tiñó con 2mL de acetato de uranilo 0,5% por toda la noche a 4°C para obtener un buen contraste y se lavó con agua 5 x 5 min. Posteriormente se llevó a cabo una deshidratación gradual con etanol, se embebió en resina, y se realizaron los cortes semi-finos y finos con cuchilla de diamante. Las muestras RifR, *pmpA*(-), *pmpB*(-), *pmpC*(-) y M275 fueron tratadas en la Duke Electron Microscopy Facility. L2, L2 ptr::GII y L2 ptr::GII PTR-F fueron procesadas por el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc.).

Infección en ratones

Las infecciones en ratones hembras se llevaron a cabo como se ha descripto previamente (Lujan et al., 2018). Ratones C57BL/6 hembras de 6 semanas de vida fueron alimentados y mantenidos bajo condiciones SPG. El protocolo de infección genital fue aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Cuyo (CICUAL, FCM, UNCuyo). Para sincronizar el ciclo estral se inyectó una única dosis de 2,5 mg de acetato de medroxiprogesterona (Holliday Scott SA) de manera subcutánea en cada animal 5 días antes de la inoculación con *C. trachomatis*. Los animales fueron inoculados intra-vaginalmente con 1,5E5 EBs purificados por gradiente bajo anestesia de ketamina (Holliday Scott SA) y xilazina (König SA). Los animales fueron divididos en tres grupos: i) controles no infectados (NI, n=3); ii) L2 (L2; n=3); y iii) L2 ptr::GII (L2 ptr::GII; n=3). A los 14 dpi los ratones hembras fueron sacrificados y se realizó una disección de los úteros para su posterior análisis.

Cuantificación de la progenie infecciosa de *C. trachomatis* en secreciones vaginales

La progenie infecciosa de secreciones vaginales fue cuantificada esencialmente como ya se ha descrito (Gondek et al., 2012) con modificaciones menores. Estas secreciones fueron colectadas con micro-aplicadores desechables (Multi-Brush; Denbur Inc.) los días 10 y 14 post-infección y utilizados para infectar monocapas de células HeLa crecidas en placas de 24 pocillos por 72h en la presencia de gentamicina 50 µg/mL. Luego, la progenie bacteriana fue colectada y utilizada para infectar monocapas de células HeLa crecidas en coverslips en placas de 24 pocillos para realizar recuento de IFUs. Las inclusiones se detectaron con anti-OmcB y Alexa Fluor 488 y se visualizaron en un microscopio Leica DMI8 de epifluorescencia. Los experimentos se realizaron en triplicados.

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios obtenidos en conejo utilizados fueron: anti-HA epitope tag (Life Technologies, 715500), anti-Slc1 (CTO43) (Saka et al., 2011), anti-IncA (Cocchiari et al., 2008), y anti-omcB del laboratorio de Ted Hackstadt. Los anticuerpos primarios obtenidos en ratón fueron: anti-clatrina (abcam, ab2731), anti-MOMP (abcam, ab20881) y anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, F3165). Se generaron anticuerpos policlonales en ratón contra un péptido de la proteína Ptr (GenScript) como se describe posteriormente.

Para inmunofluorescencia los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 488 o 594 anti-*mouse* o anti-*rabbit* (Jackson Immuno Research). Para western-blot se utilizaron los anticuerpos: goat anti-*rabbit* o anti-*mouse* HRP-conjugated IgG (Jackson Immuno Research) o anticuerpos secundarios marcados con fluorescente (LI-COR Biosciences).

Inmunofluorescencia

El ADN fue teñido con Hoechst 33258 (Life Technologies). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de epifluorescencia Leica DMI8 (Leica microsystems), en un microscopio invertido de fluorescencia EVOS (Invitrogen), en un microscopio confocal Olympus FV1000 y un confocal Airyscan (ZEISS). Las imágenes fueron procesadas con ImageJ 1.51n y/o Adobe Photoshop CS6. Para el análisis de co-localización de Ptr y Ptr-FLAG, se utilizó el plugin BAR para ImageJ (data repository: DOI 10.5281/zenodo.28838). Para la deconvolución de imágenes z-stack, se utilizó Huygens Professional Software (Scientific Volume Imaging, The Netherlands) utilizando el algoritmo clásico de estimación de máxima verosimilitud, una PSF (función de dispersión de punto) teórica, una relación de señal-ruido de 10, un máximo de 40 iteraciones y una búsqueda

automática de fondo. La película de co-localización de Ptr (verde) y CT143 (rojo) fue generada utilizando Huygens Surface Renderer software (Scientific Volume Imaging B.V.) con la siguiente configuración de transparencia: canal verde 100%, canal rojo 0%.

El protocolo general utilizado para inmunofluorescencia indirecta fue el siguiente:

1. Fijación: Lavar las células con PBS dos veces y fijar en paraformaldehído 4% por 15 minutos o metanol en frío por 15 minutos.
2. Lavar las células con PBS dos veces, en este punto las células fijadas pueden permanecer a 4°C por ~ 72h.
3. Permeabilización (no es necesaria si se fija con metanol):
 - a. 0,1% TX100 en PBS 15 min.
 - b. Lavar con PBS 2x 3min.
4. Bloqueo: 5% BSA en PBS (30 min).
5. Anticuerpo Primario: Agregar el anticuerpo primario diluido en 5% BSA/PBS (tiempo dependiente del anticuerpo utilizado ~1 a 3h, rocker, temperatura ambiente). Lavar con PBS 3x5 min.
6. Anticuerpo Secundario: Agregar el anticuerpo secundario diluido en 5% BSA/PBS junto con Hoescht (1:1000). (~45 min, temperatura ambiente, protegido de la luz). Lavar con PBS 3x5 min.
7. Montaje: Utilizar una solución de Mowiol (Sigma Aldrich) para el montaje de *coverslips* en portaobjetos. En el caso de inmunofluorescencia en placas de 96 pocillos este paso no se realiza.
8. Guardar a 4°C, protegido de la luz.

En el caso de tinciones que requerían más de un anticuerpo primario se realizaron ambas tinciones de manera consecutiva (se repitieron los pasos 5 y 6). Cuando únicamente se deseaba teñir el ADN se utilizó Hoechst por 10 min y se lavó con PBS.

Análisis de trans-complementación mediante co-infecciones

Para evaluar la posibilidad de transcomplementar el fenotipo de agregación se realizó la co-infección de células HeLa con las cepas formadoras de agregados Δpmc y la cepa Wt, cada una expresando una proteína fluorescente para identificarlas. Las células fueron previamente sembradas en cápsulas de vidrio de 22mm (WILLCO WELLS), e infectadas 24 h después con una MOI de 10 para cada cepa, para aumentar las posibilidades de que ambas co-infecten una misma

célula. La infección se llevó a cabo agregando los preparados de bacterias a cada placa e incubándolos a 37°C por 26 o 44 h antes de tomar las imágenes en el microscopio.

Western blots

Para los ensayos de *western blot*, los extractos proteicos se generaron lisando las células con buffer Laemmli caliente. Las muestras fueron sonicadas, hervidas (90°C por 5-10 min) y centrifugadas. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (10%, 12% o gradiente) y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-rad). Se realizaron transferencias semi-secas en un equipo Trans-Blot SD Semy-Dry (Bio-rad, 170-394) con el buffer recomendado por el fabricante, 1h a 15V. Para la visualización de proteínas se utilizó una solución de rojo Ponceau y se lavó con TBS y agua destilada. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5% en TBS Tween 0,2% 1h a temperatura ambiente en agitación constante. Se incubó con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C con agitación en rocker (IBI Scientific). Se realizaron lavados con TBS-Tween 0,2% (2x 5 min) y con TBS (1x 5min). Se incubó con los anticuerpos secundarios 1h a temperatura ambiente siempre en agitación. Nuevamente se realizaron lavados con TBS-Tween 0,2% (2x 5 min) y con TBS (1x 5min). Las bandas fueron visualizadas con Pierce Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific) en un ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science) o con con Odyssey CLx (LI-COR Biosciences).

Fraccionamiento crudo de *Chlamydia* para la detección de proteínas secretadas

Para llevar a cabo un fraccionamiento crudo de las bacterias y los lisados celulares, las células plaqueadas en placas de 6 pocillos fueron infectadas con L2 PTR-F o L2 ptr::GII PTR-F y lisadas suavemente con 400µL de agua (15 min, 37°C) a las 30 hpi. Los lisados fueron centrifugados (15.000 rpm, 4°C, 15 min) para separar los pellets bacterianos del sobrenadante. Para lisar las bacterias el pellet fue resuspendido en buffer de lisis [Tris.HCl 20 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, Tritón X100 1%, PMSF 1mM, protease inhibitor cocktail (Roche), SDS 1%, DTT 15 mM, 2-mercapto etanol 14,3 mM]. Ambos, el lisado bacteriano y el lisado celular, fueron mezclados con buffer Laemmli (2x final), sonicados (20% amplitud, 1 min) en hielo, incubados 10 min a 65°C y hervidos 10 min. Los lisados celulares fueron resueltos por SDS-PAGE y se utilizaron anticuerpos anti-FLAG (para detectar Ptr-FLAG) y anti-MOMP.

Producción de anticuerpos policlonales

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de raza pura (de 10 semanas de edad) alojados en el bioterio del Instituto Mercedes y Martín Ferreyra para generar un antisuero policlonal de ratón contra el péptido de Ptr. Los ratones se mantuvieron en las instalaciones para animales SPF con enriquecimiento ambiental aprobadas por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL N° 001-2017). Se utilizó el recurso de análisis de la base de datos de epítopes inmunes (<http://tools.iedb.org/>) para la selección de péptidos. Se consideraron positivamente las regiones con conformación de giro beta predicha, alta antigenicidad, accesibilidad a la superficie e hidrofiliidad. El péptido seleccionado (SSPYAAPSYYPQRKP) se sintetizó con conjugación de KLH en el extremo N-terminal (GenScript). Se añadió una cisteína en el extremo N para la conjugación con KLH. El péptido elegido se ubica en la secuencia de la proteína CTL0175 entre los aminoácidos 746 y 760. Esta región se encuentra aguas arriba del codón stop previsto en M275 (W801*). Dos ratones C57BL/6 machos fueron inyectados por vía intraperitoneal con 200 µg de antígeno emulsionado con Sigma Adjuvant System (SAS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (1: 1) en un volumen final de 200 µl en los días 1, 21 y 45. Se obtuvieron antisueros policlonales después de la segunda y la tercera inmunización y se analizó la producción de anticuerpos anti-Ptr mediante inmunofluorescencia (10) y *western blot*. El anticuerpo anti-Ptr obtenido fue útil para IF pero no para ensayos de *western blot*. Para determinar la especificidad de los anticuerpos en IF, los anticuerpos anti-Ptr se incubaron con el péptido Ptr sintético (0,5 mg) durante la noche a 4 ° C en un rocker, y luego se usaron para marcar células HeLa infectadas con un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488.

Ensayos de adherencia e invasión

Cuerpos elementales de *C. trachomatis* (MOI ~50) previamente transformados con un plásmido que permite la expresión de una proteína fluorescente (mCherry) se dejaron adherir a células HeLa por 30 min a 4°C. Las células estaban preparadas en placas multipocillo de 24 pocillos con *coverslips* y fueron crecidas en medio completo (DMEM, 10% FBS) por 24h previo a la infección. Los cultivos fueron lavados con PBS frío y la temperatura se cambió a 37°C mediante la adición de medio completo pre-calentado. Luego los cultivos fueron incubados por 1h a 37°C. Los cultivos fueron fijados con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente por 15 min y lavados con PBS. Las células no fueron permeabilizadas. Los EB extracelulares fueron marcados con un anticuerpo primario anti-MOMP seguido de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. Los *coverslips* fueron enjuagados y montados en un porta objeto con Mowiol (Sigma Aldrich). Las células fueron observadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica DMI8 y las

imágenes procesadas en Adobe Photoshop CS6. El número de EBs totales, en el interior (rojos) y exterior (amarillos) celular fue determinado para cada célula. Luego se dividió el número de EBs en el interior por el de EBs en el exterior para obtener una tasa de invasión. Y se cuantificó el número total de EBs por célula para tener una idea de adherencia.

Cepas de *E.coli*, plásmidos, cebadores y medios de cultivo

Se utilizaron las cepas bacterianas: *E. coli* DH5α (Thermo Fisher Scientific); *E. coli* DH10B (Thermo Fisher Scientific); *E. coli* BL21-CodonPlus (Agilent); *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Thermo Fisher Scientific). Los plásmidos utilizados y generados en esta tesis se detallan en la Tabla 4.

Plásmidos utilizados y generados

Plásmido	Descripción y propósito	Origen
pHisparallel	Clonado de <i>Pmps</i> y <i>Ptr</i> recombinantes para expresarlas en <i>E. coli</i> .	Gentileza Dr. Valdivia (Duke University)
pBOMB4RMCI	Clonado de <i>Pmps</i> y <i>Ptr</i> para complementar su expresión en <i>C. trachomatis</i> bajo el promotor <i>rpoB</i> . Expresa constitutivamente <i>mCherry</i> .	(Bauler and Hackstadt, 2014)
pBOMB4MCI	Clonado de <i>Pmps</i> y <i>Ptr</i> para complementar su expresión en <i>C. trachomatis</i> bajo su promotor nativo. Expresa constitutivamente <i>mCherry</i> .	(Bauler and Hackstadt, 2014)
pET24d-ompA	Cuantificación del número de copias de <i>ompA</i> para generar una curva estándar en el ensayo de la cuantificación de genomas por qRT-PCR.	Gentileza Dr. Valdivia (Duke University)
pDFTT3 aada	Plásmido de base para aplicar la técnica TargeTron con resistencia a espectinomicina.	(Lowden et al., 2015)
pTOPO XL	Para pasos intermedios de clonado de genes largos.	Thermo Fisher
pCT143-2HA	Plásmido utilizado para expresar CT143-2HA en <i>C. trachomatis</i> .	da Cunha et al., 2017
p2TK2-SW2 IncDProm-mCherry-IncDTerm, p2TK2-SW2 IncDProm-CFP-IncDTerm, p2TK2-SW2 IncDProm-RSGFP-IncDTerm	Plásmidos utilizados para visualizar distintas cepas a través de la expresión de proteínas fluorescentes: CFP, <i>mCherry</i> y GFP.	(Agaisse and Derre, 2013)
pBOMB4-192ptr	Plásmido para llevar a cabo la expresión de <i>ptr</i> en <i>C. trachomatis</i> bajo el promotor nativo. Clonado con las enzimas <i>SacII</i> y <i>KpnI</i> . Primers: <i>FPtr192</i> y <i>RrpoB-Ptr</i> .	Esta Tesis
pBOMB4prompmpA	Plásmido para llevar a cabo la expresión de <i>pmpA</i> en <i>C. trachomatis</i> bajo el promotor nativo. Clonado con las enzimas <i>SacII</i> y <i>KpnI</i> . Primers: <i>F300pmpA</i> y <i>R-PmpA</i> .	Esta tesis
pBOMB4RpmpA	Plásmido para llevar a cabo la expresión de <i>pmpA</i> en <i>C. trachomatis</i> bajo el promotor <i>rpoB</i> . Clonado con las enzimas <i>SacII</i> y <i>KpnI</i> . Primers: <i>FrpoB-PmpA</i> y <i>R-PmpA</i> .	Esta tesis

pBOMB4RpmpA-Flag	<i>Plásmido para llevar a cabo la expresión de pmpA-FLAG en C. trachomatis bajo el promotor rpoB. Clonado con las enzimas SacII y KpnI. Primers: FrpoB-PmpA y PmpAFLAG-R.</i>	Esta tesis
pBOMB4RpmpB-Flag	<i>Plásmido para llevar a cabo la expresión de pmpB-FLAG en C. trachomatis bajo el promotor rpoB. Clonado con las enzimas BamHI y KpnI. Primers: FrpoB-PmpB y R-PmpB-FLAG.</i>	Esta tesis
pBOMB4RpmpC-Flag	<i>Plásmido para llevar a cabo la expresión de pmpC-FLAG en C. trachomatis bajo el promotor rpoB. Clonado con las enzimas SacII y KpnI. Primers: FrpoB-PmpC y R-PmpCFLAG.</i>	Esta Tesis
pBOMB4Rptr	<i>Plásmido para llevar a cabo la expresión de ptr en C. trachomatis bajo el promotor rpoB. Clonado con las enzimas SacII y KpnI. Primers: FrpoB-Ptr y RrpoB-Ptr.</i>	Esta Tesis
pBOMB4RptrFLAG	<i>Plásmido para llevar a cabo la expresión de ptr-FLAG en C. trachomatis bajo el promotor rpoB. Clonado con las enzimas SacII y KpnI. Primers: FrpoB-Ptr y PtrFLAG-R.</i>	Esta Tesis
pDFTT3adda-pmpA1.3	<i>Plásmido para llevar a cabo la inserción de un intrón tipo II en el sitio I de pmpA.</i>	Esta tesis
pDFTT3adda-pmpA2.3	<i>Plásmido para llevar a cabo la inserción de un intrón tipo II en el sitio II de pmpA.</i>	Esta tesis
pDFTT3adda-pmpB1.1	<i>Plásmido para llevar a cabo la inserción de un intrón tipo II en el sitio I de pmpB.</i>	Esta tesis
pDFTT3adda-pmpB2.2	<i>Plásmido para llevar a cabo la inserción de un intrón tipo II en el sitio II de pmpB.</i>	Esta tesis
pDFTT3adda-pmpC1.4	<i>Plásmido para llevar a cabo la inserción de un intrón tipo II en el sitio I de pmpC.</i>	Esta Tesis
pDFTT3adda-pmpC2.2	<i>Plásmido para llevar a cabo la inserción de un intrón tipo II en el sitio II de pmpC.</i>	Esta Tesis
pDFTT3adda-ptr1.2	<i>Plásmido para llevar a cabo la inserción de un intrón tipo II en el sitio I de ptr.</i>	Esta Tesis
pDFTT3adda-ptr2.4	<i>Plásmido para llevar a cabo la inserción de un intrón tipo II en el sitio II de ptr.</i>	Esta Tesis
pHisparallel-rPmpA	<i>Fragmento PmpA clonado con las enzimas NcoI y StuI para la expresión en E. coli. Primers: FHisP-PmpA y RHisP-PmpA.</i>	Esta Tesis
pHisparallel-rPmpB1	<i>Fragmento PmpB1 clonado con las enzimas NcoI y StuI para la expresión en E. coli. Primers: FHisP-PmpB1 y RHisP-PmpB1.</i>	Esta Tesis
pHisparallel-rPmpB2	<i>Fragmento PmpB2 clonado con las enzimas NcoI y StuI para la expresión en E. coli. Primers: FHisP-PmpB2 y RHisP-PmpB2.</i>	Esta Tesis
pHisparallel-rPmpC1	<i>Fragmento PmpC1 clonado con las enzimas NcoI y StuI para la expresión en E. coli. Primers: FHisP-PmpC1 y RHisP-PmpC1.</i>	Esta Tesis
pHisparallel-rPmpC2	<i>Fragmento PmpC2 clonado con las enzimas NcoI y StuI para la expresión en E. coli. Primers: FHisP-PmpC2 y RHisP-PmpC2.</i>	Esta Tesis
pHisparallel-rPtr1	<i>Fragmento Ptr1 clonado con las enzimas NcoI y StuI para la expresión en E. coli. Primers: FHisP-PTR1 y RHisP-PTR1.</i>	Esta Tesis
pHis-Ptr	<i>Plásmido para llevar a cabo la expresión de ptr-His en E. coli. Clonado con las enzimas NcoI y StuI para la expresión en E. coli. Primers: FHisP-Ptr y RHisP-Ptr.</i>	Esta Tesis
pTOPO-192ptr	<i>Para el clonado de 192-ptr posteriormente en pBOMB4 con las enzimas SacII y KpnI. Las 192 bases anteriores al gen se clonaron para conseguir la expresión nativa, la ubicación del promotor es desconocida.</i>	Esta Tesis
pTOPO-HISptr	<i>Para el clonado de ptr posteriormente en pHisparallel con las enzimas NcoI y StuI.</i>	Esta Tesis

pTOPO-rpobPtr	Para el clonado de ptr posteriormente en pBOMB4R con las enzimas SacII y KpnI.	Esta Tesis
---------------	--	------------

Tabla 4: Plásmidos utilizados y desarrollados en esta tesis.

Cebadores utilizados

Cebador	Propósito	Secuencia
aadaF	Chequeo intrón	GTAACGCGTCCCAGGCCTGATAGTTTGGCTGTGAG
aadaR	Chequeo intrón	TCTACGCGTTGCCTGACGATGCGTGGAG
RBP436	Chequeo intrón	AGTGCTATAGCCTTTTTCTCTCT
RBP468	Chequeo intrón	TGGTGCAAACCAGTCACAGT
A1tarF	Chequeo TargeTron pmpA	ACGAAAACCTTGTTGCTTTTGGGA
A1tarR	Chequeo TargeTron pmpA	GCTCCCCCGTTAGCTATTGT
A2tarF	Chequeo TargeTron pmpA	AGAAATCCATGCTCACTACGATCA
A2tarR	Chequeo TargeTron pmpA	ACGAGAAATCACTGAGTATGAGT
B1tarF	Chequeo TargeTron pmpB	GGTGAAGGCGGTGCTATCTT
B1tarR	Chequeo TargeTron pmpB	AGCAAAGATCGCTCCTCCAT
B2tarF	Chequeo TargeTron pmpB	ACTACCAATACAACAACCTCCCAC
B2tarR	Chequeo TargeTron pmpB	ACTAGAACCCGACGTTTCGC
FcheckTargp mpC1	Chequeo TargeTron pmpC	ACCGACTGCAATGTTAGCAA
RcheckTargp mpC1	Chequeo TargeTron pmpC	TGTCATGGAGTTCTATGCTTGGGA
FcheckTargp mpC2	Chequeo TargeTron pmpC	TTTGAAAACTCGGCAGGTCA
RcheckTargp mpC2	Chequeo TargeTron pmpC	CGAGGAGGAAGAGGGGGTAG
Ptr2F	Chequeo TargeTron ptr	GCGTTTTAATGGGTGATTTTTAGGA
Ptr2R	Chequeo TargeTron ptr	CGGAGCCGCTTTAGTTGTCA
Ptr1F	Chequeo TargeTron ptr	GGCTAAGCCTGGGAATTCGA
Ptr1R	Chequeo TargeTron ptr	CGCCCTACGTGCTTTAAGAG
FompA_Bam HI	Clonado ompA	ATATTTGGATCCCGATGAAAAAATCTTGAAATCG
RompA_SalI	Clonado ompA	ATTGAGTCGACGAAGCGGAATTGTGCA
R-PmpA	Clonado pmpA en pBOMB	CGGGTACCTTAGAAGCCAACATAGCCTCCG
F3oopmpA	Clonado pmpA en pBOMB	GCCCCGGTCAATATGAAGATGTTGCTGCTGC

PmpAFLAG-R	<i>Clonado pmpA en pBOMB</i>	CGGGTACCCTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCGATGTCATGATCTT TATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTGAAGCCAACATAGCCTCCG
FrpoB-PmpA	<i>Clonado pmpA en pBOMB</i>	GCCCCGGGACATGAATCGAGTTATAGAAATCCATGCT
R-PmpB-FLAG	<i>Clonado pmpB en pBOMB</i>	CGGGTACCCTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCGATGTCATGATCTT TATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTGAAGATCATGCGAGCACCG
R-PmpB	<i>Clonado pmpB en pBOMB</i>	CGGGTACCTTAGAAGATCATGCGAGCACCG
FrpoB-PmpB	<i>Clonado pmpB en pBOMB</i>	GCCGGATCCATGAAATGGCTGTCAGCTACTG
FrpoB-PmpC	<i>Clonado pmpC en pBOMB</i>	GCCCCGGGACATGAAATTTCTGTCAGCTACTGCTG
R-PmpC	<i>Clonado pmpC en pBOMB</i>	CGGGTACCTTAGAATATCATAACGAGCACCGCA
R-PmpCFLAG	<i>Clonado pmpC en pBOMB</i>	CGGGTACCCTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCGATGTCATGATCTT TATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTGAATATCATAACGAGCACCGCA
F-rpoBPtr	<i>Clonado ptr bajo promotor rpoB</i>	GCCCCGGGACATGGACAACCACCTTCCTGTTATCA
FPtr192	<i>Clonado ptr en pBOMB con prom. nativo</i>	GCCCCGGGAACTTTGGAGACGAACTGTTGCTCG
RrpoB-Ptr	<i>Clonado ptr en pBOMB C-ter libre</i>	CGGGTACCTTATTTTTCTGCGACGAGTTGGCT
R-PtrFLAG-R	<i>Clonado ptr unida a FLAG</i>	CGGGTACCCTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCGATGTCATGATCTT TATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTTTTTCTGCGACGAGTTGGC T
FHisP-PmpA	<i>Expresar rPmpA con His-tag</i>	GCGCCATGGATTTCGTTTGCAGAAATGGAATTAGCT
RHisP-PmpA	<i>Expresar rPmpA con His-tag</i>	CGAGGCCTTTAATTCGCACCCGAGAAAACG
FHisP-PmpB1	<i>Expresar rPmpB1 con His-tag</i>	GCGCCATGGATTCTCGCGTAGGAACTTCTTCC
RHisP-PmpB1	<i>Expresar rPmpB1 con His-tag</i>	CGAGGCCTTTATCCTGCAGATGCTTGAGCT
FHisP-PmpB2	<i>Expresar rPmpB2 con His-tag</i>	GCGCCATGGATACAGGAGGTAATGGTGGAGGC
RHisP-PmpB2	<i>Expresar rPmpB2 con His-tag</i>	CGAGGCCTTTACAAAGAGTTTTGGCATAGATGG

FHisp-PmpC1	<i>Expresar rPmpC1 con His-tag</i>	GCGCCATGGATGCGAGCTCGATCCAAGATCA
RHisp-PmpC1	<i>Expresar rPmpC1 con His-tag</i>	CGAGGCCTTTAGGATGAATTCCTGAAAGTTCAAGA
FHisp-PmpC2	<i>Expresar rPmpC2 con His-tag</i>	GCGCCATGGATGGTGGGGTTATTTCATTCTAAAACGG
RHisp-PmpC2	<i>Expresar rPmpC2 con His-tag</i>	CGAGGCCTTTATGGCACCAACCCAATAGCAGA
FHisp-Ptr	<i>Expresar rPtr con His-tag</i>	GCGCCATGGATATGGACAACCACCTTCCTGTTATCA
RHisp-Ptr	<i>Expresar rPtr con His-tag</i>	CGAGGCCTTTATTTTTCTGCGACGAGTTGGCT
FHisp-PTR1	<i>Expresar rPtr1 con His-tag</i>	GCGCCATGGATACTTACAGCACGCAAACCGAG
RHisp-PTR1	<i>Expresar rPtr1 con His-tag</i>	CGAGGCCTTTACGAGTTGGCTCCATAGACG
bioF_gene_F	<i>Genotipo bioF</i>	AGTTTCCGCCATAATGATCTGGA
bioF_gene_R	<i>Genotipo bioF</i>	GAGGACAAGCGACTCCAACA
oppC_gene_F	<i>Genotipo oppC</i>	TCCCGAACATGCTCTTCAGT
oppC_gene_R	<i>Genotipo oppC</i>	TGGTAAGCTAAAGAATGAATGCCT
Ptr_gene_F	<i>Genotipo ptr</i>	TCTAACTTTGCAGAAGCTTCGT
Ptr_gene_R	<i>Genotipo ptr</i>	TCACAGTACTTTTTGAAATAGCTGT
recC_gene_F	<i>Genotipo recC</i>	CGAAGAACTGTTTCAACCCTACG
recC_gene_R	<i>Genotipo recC</i>	AGGAACGACAACCTCCCATGT
Ptr923F	<i>Primer interno ptr para secuenciamiento</i>	GGCATTTTTATGATGCTCCA
Ptr1949R	<i>Primer interno ptr para secuenciamiento</i>	GCATTGATAAGAACAGGAGAGG
MOMP_F	<i>qPCR ompA</i>	TTTGCCGCTTTGAGTTCTGC
MOMP_R	<i>qPCR ompA</i>	CGCCGAAACCTTCCCATAGA
Universal	<i>TargeTron</i>	CGAAATTAGAACTTGC GTTCAGTAAAC
PmpA_1_IBS 1/2	<i>TargeTron pmpA</i>	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGTTACCGCTTGGGTGCGCCAGATAG GGTG
PmpA_1_EB S1/delta	<i>TargeTron pmpA</i>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGCTTGGTTTAACTTA CCTTTCTTTGT
PmpA_1_EB S2	<i>TargeTron pmpA</i>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTGTAACGATAGAGGAAAGTGTCT
PmpA_2_IBS 1/2	<i>TargeTron pmpA</i>	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACTAAGCAGTTTGGTGCAGCCAGATAG GGTG
PmpA_2_EB S1/delta	<i>TargeTron pmpA</i>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAGTTTGTATAACTTA CCTTTCTTTGT
PmpA_2_EB S2	<i>TargeTron pmpA</i>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGTTCTTAGTCGATAGAGGAAAGTGTCT
PmpB_1_IBS 1/2	<i>TargeTron pmpB</i>	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGCCGACTCATTTGTGCGCCAGATAG GGTG

PmpB_1_EB S1/delta	<i>TargeTron pmpB</i>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTCATTTCCTAACTTA CCTTTCTTTGT
PmpB_1_EB S2	<i>TargeTron pmpB</i>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTTTCGGCTCGATAGAGGAAAGTGTCT
PmpB_2_IBS 1/2	<i>TargeTron pmpB</i>	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGCCTTCACCAGTGTGCGCCAGATAG GGTG
PmpB_2_EB S1/delta	<i>TargeTron pmpB</i>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCACCAGTCATAACTTA CCTTTCTTTGT
PmpB_2_EB S2	<i>TargeTron pmpB</i>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTAAGGCTCGATAGAGGAAAGTGTCT
PmpC_1_IBS 1/2	<i>TargeTron pmpC</i>	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGAAGACACTCCTGTGCGCCAGATAG GGTG
PmpC_1_EB S1/delta	<i>TargeTron pmpC</i>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCACTCCTTCTAACTTA CCTTTCTTTGT
PmpC_1_EB S2	<i>TargeTron pmpC</i>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTTCTTCTCGATAGAGGAAAGTGTCT
PmpC_2_IBS 1/2	<i>TargeTron pmpC</i>	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAGTTTCTTAGTGGTGCAGCCAGATAG GGTG
PmpC_2_EB S1/delta	<i>TargeTron pmpC</i>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTTAGTGCATAACTTA CCTTTCTTTGT
PmpC_2_EB S2	<i>TargeTron pmpC</i>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTAACTTCGATAGAGGAAAGTGTCT
Ptr_2_EBS2	<i>TargeTron ptr</i>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTAAGCATCGATAGAGGAAAGTGTCT
Ptr_2_ EBS1/delta	<i>TargeTron ptr</i>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTTCTTCTAACTTA CCTTTCTTTGT
Ptr_2_IBS1/ 2	<i>TargeTron ptr</i>	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATGCTTCTTCTTCTGCGCCAGATAG GGTG
Ptr_1_IBS1/2	<i>TargeTron ptr</i>	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGTTAGCAAAGAAGTGCAGCCAGATAG GGTG
Ptr_1_ EBS1/delta	<i>TargeTron ptr</i>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAAAGAAGGTAAGTAACTTA CCTTTCTTTGT
Ptr_1_EBS2	<i>TargeTron ptr</i>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTCTAACTTCGATAGAGGAAAGTGTCT
Seq_pBOMB 4R_F	<i>Chequeo insertos en pBOMB</i>	TAGCTGGAAAGCATCTGTCGT

Tabla 5: Cebadores utilizados en esta tesis.

Todas las cepas de *E. coli* fueron crecidas en caldo Luria Bertani (LB), a 37 °C y con agitación (200 rpm). Se adicionó agar-agar 12 g/l para obtener medios de cultivo sólidos. Los medios fueron suplementados con el antibiótico kanamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) o ampicilina (100 µg/mL) según la necesidad de selección. Para obtener los cultivos saturados empleados rutinariamente para preparaciones plasmídicas, a partir de los correspondientes stocks congelados (-80°C) de las cepas bacterianas se realizó un cultivo en medio LB líquido a 37 °C con agitación (200 rpm) durante aproximadamente 16 h. Para realizar transformaciones bacterianas se prepararon y utilizaron competentes químicas por el método de KCM.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Revistas científicas con referato

- **Panzetta ME**, Lujan AL, Bastidas, RJ, Damiani MT, Valdivia RH and Saka HA (2019) ***Ptr/CTLo175 Is Required for the Efficient Recovery of Chlamydia trachomatis From Stress Induced by Gamma-Interferon.*** Front. Microbiol. 10:756. doi: 10.3389/fmicb.2019.00756.
- **Panzetta ME**, Valdivia RH and Saka HA (2018) ***Chlamydia Persistence: A Survival Strategy to Evade Antimicrobial Effects in-vitro and in-vivo.*** Front. Microbiol. 9:3101. doi: 10.3389/fmicb.2018.03101.

Presentaciones a congresos

- EMBO-FEBS The New Microbiology 2019 (Spetses – Grecia). **MODALIDAD: Poster.**
A novel C. trachomatis protease is required for efficient recovery from IFN γ -induced persistence. **Panzetta ME**; Lujan AL; Bastidas RJ; Damiani MT; Valdivia RH; Saka HA.
- 9th Biennial Meeting CBRS (*Chlamydia* Basic Research Society) 2019(Seattle – Estados Unidos). **MODALIDAD: Comunicación oral.**
Chlamydia trachomatis Ptr is required for efficient recovery upon IFN γ -induced persistence. **Panzetta ME**; Lujan AL; Bastidas RJ; Damiani MT; Valdivia RH; Saka HA.
- 54^o Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) 2018 (Paraná – República Argentina). **MODALIDAD: Comunicación oral.**
Disruption of ctlo175 hampers Chlamydia trachomatis replication post IFN- gamma-induced stress. **Panzetta ME**; Lujan AL; Bastidas RJ; Damiani MT; Valdivia RH; Saka HA. BIOCELL 42 (suppl.4), 2018 ISSN 1667-5746, pág. 18.
- Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias 2017. (Buenos Aires– República Argentina). **MODALIDAD: Poster.**
The Chlamydia trachomatis insulinase/protease ctlo175 is required for efficient recovery upon IFN γ -induced stress. **Panzetta, ME**; Bastidas, RJ; Valdivia, R; Saka, HA. MEDICINA 77 (Suppl. I) Infectology 12 (486), pág. 556, 2017.

- Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias 2017. (Buenos Aires– República Argentina). **MODALIDAD: Poster.**
Characterization of Chlamydia trachomatis Pmp mutant strains Panzetta, ME; Baxter, R; Bastidas, RJ; Valdivia, R; Saka, HA. MEDICINA 77 (Suppl. I) Infectology 12 (499), pág. 557, 2017.
- 8th Biennial Meeting CBRS (*Chlamydia* Basic Research Society) 2017 (Charlotte – Estados Unidos). **MODALIDAD: Poster.**
Reduced expression of the lipid transfer protein StarD7 promotes chlamydial replication. Panzetta, ME; Flores Martin, JB; Genti-Raimondi, S; Saka, HA.
- I Congreso Científico Profesional de Bioquímica. (Córdoba– República Argentina). **MODALIDAD: Poster.**
Rol de la proteína StarD7 en la infección por Chlamydia trachomatis. Panzetta, Maria E.; Flores Martin, Jesica B.; Genti-Raimondi, Susana; Saka, Héctor A.
- XI Congreso de Microbiología (SAMIGE - 2015). (Córdoba– República Argentina). *Organización y asistencia.*
- 50^o Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) (Rosario– República Argentina). **MODALIDAD: Poster.**
Characterization of Escherichia coli dam mutations. Panzetta, ME; Martina, MA; Barra, JL. BIOCELL 38 (Suppl. 2) MI-P36, pág. 140, 2014.
- 50^o Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) (Rosario– República Argentina). **MODALIDAD: Poster.**
Identification of Chlamydia trachomatis mutants defective for persistence. Saka, HA; Baxter; Bastidas, RJ; Panzetta, ME; Valdivia, RH. BIOCELL 38 (Suppl. 2) MI- P12, pág. 132, 2014.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1977). *Diseases of the outer eye, Part I. System of ophthalmology*,. Henry Kimpton.
- (2016). in *WHO Guidelines for the Treatment of Chlamydia trachomatis*. (Geneva).
- Abdelrahman, Y., Ouellette, S.P., Belland, R.J., and Cox, J.V. (2016). Polarized Cell Division of *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Pathog* 12(8), e1005822. doi: 10.1371/journal.ppat.1005822.
- Agaisse, H., and Derre, I. (2013). 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* 8(2), e57090. doi: 10.1371/journal.pone.0057090.
- Aiyar, A., Quayle, A.J., Buckner, L.R., Sherchand, S.P., Chang, T.L., Zea, A.H., et al. (2014). Influence of the tryptophan-indole-IFN γ axis on human genital *Chlamydia trachomatis* infection: role of vaginal co-infections. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 72. doi: 10.3389/fcimb.2014.00072.
- Al-Rifai, K.M.J. (1988). Trachoma through history. *Int Ophthalmol* 12(1), 9-14. doi: 10.1007/BF00133774.
- Anónimo (1942). La historia del Tracoma desde hace 5000 años. *Revista médica hondureña* M-A 99.
- Augenbraun, M.H., and McCormack, W. M. (2015). "Urethritis," in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th edn ed (Philadelphia: Elsevier Saunders), 1349–1357.
- Baehr, W., Zhang, Y.X., Joseph, T., Su, H., Nano, F.E., Everett, K.D., et al. (1988). Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(11), 4000-4004.
- Barbour, A.G., Amano, K., Hackstadt, T., Perry, L., and Caldwell, H.D. (1982). *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol* 151(1), 420-428.
- Bastidas, R.J., and Valdivia, R.H. (2016). Emancipating *Chlamydia*: Advances in the Genetic Manipulation of a Recalcitrant Intracellular Pathogen. *Microbiol Mol Biol Rev* 80(2), 411-427. doi: 10.1128/MMBR.00071-15.
- Bauler, L.D., and Hackstadt, T. (2014). Expression and targeting of secreted proteins from *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 196(7), 1325-1334. doi: 10.1128/JB.01290-13.
- Bavoil, P.M., Marques, P.X., Brotman, R., and Ravel, J. (2017). Does Active Oral Sex Contribute to Female Infertility? *J Infect Dis* 216(8), 932-935. doi: 10.1093/infdis/jix419.
- Beatty, W.L., Belanger, T.A., Desai, A.A., Morrison, R.P., and Byrne, G.I. (1994a). Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun* 62(9), 3705-3711.
- Beatty, W.L., Byrne, G.I., and Morrison, R.P. (1993). Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9), 3998-4002. doi: 10.1073/pnas.90.9.3998.
- Beatty, W.L., Morrison, R.P., and Byrne, G.I. (1994b). Persistent *chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 58(4), 686-699.
- Bebear, C., and de Barbeyrac, B. (2009). Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect* 15(1), 4-10. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02647.x.
- Becker, A.B., and Roth, R.A. (1992). An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9), 3835-3839. doi: 10.1073/pnas.89.9.3835.
- Becker, E., and Hegemann, J.H. (2014). All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *Microbiologyopen* 3(4), 544-556. doi: 10.1002/mbo3.186.
- Bell, T.A., Stamm, W.E., Wang, S.P., Kuo, C.C., Holmes, K.K., and Grayston, J.T. (1992). Chronic *Chlamydia trachomatis* infections in infants. *JAMA* 267(3), 400-402.
- Belland, R.J., Nelson, D.E., Virok, D., Crane, D.D., Hogan, D., Sturdevant, D., et al. (2003). Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN- γ -mediated persistence and reactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26), 15971-15976. doi: 10.1073/pnas.2535394100.
- Bennett, J.E., Dolin, R., and Blaser, M.J. (2015). *Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica + acceso web*. Elsevier Health Sciences Spain.
- Bernstein-Hanley, I., Coers, J., Balsara, Z.R., Taylor, G.A., Starnbach, M.N., and Dietrich, W.F. (2006). The p47 GTPases IgtP and Irgb10 map to the *Chlamydia trachomatis* susceptibility locus Ctrq-3 and mediate cellular resistance in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(38), 14092-14097. doi: 10.1073/pnas.0603338103.

- Billiau, A., and Matthys, P. (2009). Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(2), 97-113. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.02.004.
- Binet, R., and Maurelli, A.T. (2005). Fitness cost due to mutations in the 16S rRNA associated with spectinomycin resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC. *Antimicrob Agents Chemother* 49(11), 4455-4464. doi: 10.1128/AAC.49.11.4455-4464.2005.
- Bonner, C.A., Byrne, G.I., and Jensen, R.A. (2014). *Chlamydia* exploit the mammalian tryptophan-depletion defense strategy as a counter-defensive cue to trigger a survival state of persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 17. doi: 10.3389/fcimb.2014.00017.
- Borel, N., Summersgill, J.T., Mukhopadhyay, S., Miller, R.D., Ramirez, J.A., and Pospischil, A. (2008). Evidence for persistent *Chlamydia pneumoniae* infection of human coronary atheromas. *Atherosclerosis* 199(1), 154-161. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.09.026.
- Brinkworth, A.J., Wildung, M.R., and Carabeo, R.A. (2018). Genomewide Transcriptional Responses of Iron-Starved *Chlamydia trachomatis* Reveal Prioritization of Metabolic Precursor Synthesis over Protein Translation. *mSystems* 3(1). doi: 10.1128/mSystems.00184-17.
- Burton, M.J., and Mabey, D.C. (2009). The global burden of trachoma: a review. *PLoS Negl Trop Dis* 3(10), e460. doi: 10.1371/journal.pntd.0000460.
- Byrne, G.I., Lehmann, L.K., and Landry, G.J. (1986). Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun* 53(2), 347-351.
- Byrne, G.I., Ouellette, S.P., Wang, Z., Rao, J.P., Lu, L., Beatty, W.L., et al. (2001). *Chlamydia pneumoniae* expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect Immun* 69(9), 5423-5429. doi: 10.1128/iai.69.9.5423-5429.2001.
- Byron, E.B. (2012). "Chlamydia infection and epidemiology," in *Intracellular Pathogens I: Chlamydiales*, ed. M.T.a.P. Bavoil. (Washington, DC: ASM Press), 1-26.
- Caldwell, H.D., Wood, H., Crane, D., Bailey, R., Jones, R.B., Mabey, D., et al. (2003). Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest* 111(11), 1757-1769. doi: 10.1172/JCI17993.
- Campbell LA, K.C. (2006). "Interactions of *Chlamydia* with the host cells that mediate attachment and uptake," in *Chlamydia : Genomics and Pathogenesis*, ed. W.P. Bavoil PM. (Norwich: Horizon Bioscience), 505-522.
- Carrasco, J.A., Tan, C., Rank, R.G., Hsia, R.C., and Bavoil, P.M. (2011). Altered developmental expression of polymorphic membrane proteins in penicillin-stressed *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol* 13(7), 1014-1025. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01598.x.
- Charbonneau, M.E., Berthiaume, F., and Mourez, M. (2006). Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* 188(24), 8504-8512. doi: 10.1128/JB.00864-06.
- Chen, Y.S., Bastidas, R.J., Saka, H.A., Carpenter, V.K., Richards, K.L., Plano, G.V., et al. (2014). The *Chlamydia trachomatis* type III secretion chaperone Slc1 engages multiple early effectors, including TepP, a tyrosine-phosphorylated protein required for the recruitment of CrkI-II to nascent inclusions and innate immune signaling. *PLoS Pathog* 10(2), e1003954. doi: 10.1371/journal.ppat.1003954.
- Cocchiario, J.L., Kumar, Y., Fischer, E.R., Hackstadt, T., and Valdivia, R.H. (2008). Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(27), 9379-9384. doi: 10.1073/pnas.0712241105.
- Cocchiario, J.L., and Valdivia, R.H. (2009). New insights into *Chlamydia* intracellular survival mechanisms. *Cell Microbiol* 11(11), 1571-1578. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01364.x.
- Coers, J., Bernstein-Hanley, I., Grotzky, D., Parvanova, I., Howard, J.C., Taylor, G.A., et al. (2008). *Chlamydia muridarum* evades growth restriction by the IFN-gamma-inducible host resistance factor Irgb10. *J Immunol* 180(9), 6237-6245. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6237.
- Cortina, M.E., Ende, R.J., Bishop, R.C., Bayne, C., and Derre, I. (2019). *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia muridarum* spectinomycin resistant vectors and a transcriptional fluorescent reporter to monitor conversion from replicative to infectious bacteria. *PLoS One* 14(6), e0217753. doi: 10.1371/journal.pone.0217753.
- Crane, D.D., Carlson, J.H., Fischer, E.R., Bavoil, P., Hsia, R.C., Tan, C., et al. (2006). *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(6), 1894-1899. doi: 10.1073/pnas.0508983103.

- Culp, E., and Wright, G.D. (2017). Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *J Antibiot (Tokyo)* 70(4), 366-377. doi: 10.1038/ja.2016.138.
- Cunningham, K.A., and Beagley, K.W. (2008). Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Reprod* 79(2), 180-189. doi: 10.1095/biolreprod.108.067835.
- da Cunha, M., Pais, S.V., Bugalhão, J.N., and Mota, L.J. (2017). The *Chlamydia trachomatis* type III secretion substrates CT142, CT143, and CT144 are secreted into the lumen of the inclusion. *PLoS One* 12(6), e0178856. doi: 10.1371/journal.pone.0178856.
- Darville, T. (2005). *Chlamydia trachomatis* infections in neonates and young children. *Semin Pediatr Infect Dis* 16(4), 235-244. doi: 10.1053/j.spid.2005.06.004.
- Darville, T., and Hiltke, T.J. (2010). Pathogenesis of genital tract disease due to *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis* 201 Suppl 2, S114-125. doi: 10.1086/652397.
- Dautry-Varsat, A., Subtil, A., and Hackstadt, T. (2005). Recent insights into the mechanisms of *Chlamydia* entry. *Cell Microbiol* 7(12), 1714-1722. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00627.x.
- Dean, D. (2013). "*Chlamydia trachomatis* Pathogenicity and Disease," in *Chlamydial Infection: A Clinical and Public Health Perspective*, ed. B. CM.), 25-60.
- Dean, D., Suchland, R.J., and Stamm, W.E. (2000). Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp1 genotyping. *J Infect Dis* 182(3), 909-916. doi: 10.1086/315778.
- Di Pietro, M., Tramonti, A., De Santis, F., De Biase, D., Schiavoni, G., Filardo, S., et al. (2012). Analysis of gene expression in penicillin G induced persistence of *Chlamydia pneumoniae*. *J Biol Regul Homeost Agents* 26(2), 277-284.
- Ding, H., Gong, S., Tian, Y., Yang, Z., Brunham, R., and Zhong, G. (2013). Transformation of sexually transmitted infection-causing serovars of *chlamydia trachomatis* using Blasticidin for selection. *PLoS One* 8(11), e80534. doi: 10.1371/journal.pone.0080534.
- Elwell, C., Mirrashidi, K., and Engel, J. (2016). *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 14(6), 385-400. doi: 10.1038/nrmicro.2016.30.
- Elwell, C.A., Ceesay, A., Kim, J.H., Kalman, D., and Engel, J.N. (2008). RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in *Chlamydia trachomatis* entry. *PLoS Pathog* 4(3), e1000021. doi: 10.1371/journal.ppat.1000021.
- Fadel, S., and Eley, A. (2008a). Differential glycosaminoglycan binding of *Chlamydia trachomatis* OmcB protein from serovars E and LGV. *J Med Microbiol* 57(Pt 9), 1058-1061. doi: 10.1099/jmm.0.2008/001305-0.
- Fadel, S., and Eley, A. (2008b). Is lipopolysaccharide a factor in infectivity of *Chlamydia trachomatis*? *J Med Microbiol* 57(Pt 3), 261-266. doi: 10.1099/jmm.0.47237-0.
- Favaroni, A. (2017). *Role of adhesin proteins in Chlamydia infection*. Doctor, Heinrich Heine University Düsseldorf.
- Fehlner-Gardiner, C., Roshick, C., Carlson, J.H., Hughes, S., Belland, R.J., Caldwell, H.D., et al. (2002). Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase. *J Biol Chem* 277(30), 26893-26903. doi: 10.1074/jbc.M203937200.
- Ferreira, R., Borges, V., Nunes, A., Borrego, M.J., and Gomes, J.P. (2013). Assessment of the load and transcriptional dynamics of *Chlamydia trachomatis* plasmid according to strains' tissue tropism. *Microbiol Res* 168(6), 333-339. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.001.
- Fischer, A., Harrison, K.S., Ramirez, Y., Auer, D., Chowdhury, S.R., Prusty, B.K., et al. (2017). *Chlamydia trachomatis*-containing vacuole serves as deubiquitination platform to stabilize Mcl-1 and to interfere with host defense. *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.21465.
- Fisher, D.J., Fernandez, R.E., Adams, N.E., and Maurelli, A.T. (2012). Uptake of biotin by *Chlamydia* Spp. through the use of a bacterial transporter (BioY) and a host-cell transporter (SMVT). *PLoS One* 7(9), e46052. doi: 10.1371/journal.pone.0046052.
- Ford, C., Nans, A., Boucrot, E., and Hayward, R.D. (2018). *Chlamydia* exploits filopodial capture and a macropinocytosis-like pathway for host cell entry. *PLoS Pathog* 14(5), e1007051. doi: 10.1371/journal.ppat.1007051.
- Fritsch, H., A. Hoetatter, K. Lindner (1910). Experimentelle Untersuchungen über die Beziehung zwischen Einschlussblennorrhoe und Trachom. *Z. Augenheilk* 31, 475.
- Fujita, A., Oka, C., Arikawa, Y., Katagai, T., Tonouchi, A., Kuhara, S., et al. (1994). A yeast gene necessary for bud-site selection encodes a protein similar to insulin-degrading enzymes. *Nature* 372(6506), 567-570. doi: 10.1038/372567a0.
- Galasso, G.J., and Manire, G.P. (1961). Effect of antiserum and antibiotics on persistent infection of HeLa cells with meningopneumonitis virus. *J Immunol* 86, 382-385.

- Gallo Vaulet, L., Entrocassi, C., Corominas, A.I., and Rodriguez Fermepin, M. (2010). Distribution study of *Chlamydia trachomatis* genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires, Argentina: association between genotype E and neonatal conjunctivitis. *BMC Res Notes* 3, 34. doi: 10.1186/1756-0500-3-34.
- Gawarzewski, I., Smits, S.H., Schmitt, L., and Jose, J. (2013). Structural comparison of the transport units of type V secretion systems. *Biol Chem* 394(11), 1385-1398. doi: 10.1515/hsz-2013-0162.
- Geisler, W.M., Wang, C., Morrison, S.G., Black, C.M., Bandea, C.I., and Hook, E.W., 3rd (2008). The natural history of untreated *Chlamydia trachomatis* infection in the interval between screening and returning for treatment. *Sex Transm Dis* 35(2), 119-123. doi: 10.1097/OLQ.0b013e318151497d.
- Gerard, H.C., Mishra, M.K., Mao, G., Wang, S., Hali, M., Whittum-Hudson, J.A., et al. (2013). Dendrimer-enabled DNA delivery and transformation of *Chlamydia pneumoniae*. *Nanomedicine* 9(7), 996-1008. doi: 10.1016/j.nano.2013.04.004.
- Gerard, H.C., Whittum-Hudson, J.A., Schumacher, H.R., and Hudson, A.P. (2004). Differential expression of three *Chlamydia trachomatis* hsp60-encoding genes in active vs. persistent infections. *Microb Pathog* 36(1), 35-39.
- Goellner, S., Schubert, E., Liebler-Tenorio, E., Hotzel, H., Saluz, H.P., and Sachse, K. (2006). Transcriptional response patterns of *Chlamydomphila psittaci* in different in vitro models of persistent infection. *Infect Immun* 74(8), 4801-4808. doi: 10.1128/IAI.01487-05.
- Gomes, J.P., Bruno, W.J., Nunes, A., Santos, N., Florindo, C., Borrego, M.J., et al. (2007). Evolution of *Chlamydia trachomatis* diversity occurs by widespread interstrain recombination involving hotspots. *Genome Res* 17(1), 50-60. doi: 10.1101/gr.5674706.
- Gomes, J.P., Nunes, A., Bruno, W.J., Borrego, M.J., Florindo, C., and Dean, D. (2006). Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *J Bacteriol* 188(1), 275-286. doi: 10.1128/JB.188.1.275-286.2006.
- Gondek, D.C., Olive, A.J., Stary, G., and Starnbach, M.N. (2012). CD4+ T cells are necessary and sufficient to confer protection against *Chlamydia trachomatis* infection in the murine upper genital tract. *J Immunol* 189(5), 2441-2449. doi: 10.4049/jimmunol.1103032.
- Gonzales, G.F., Munoz, G., Sanchez, R., Henkel, R., Gallegos-Avila, G., Diaz-Gutierrez, O., et al. (2004). Update on the impact of *Chlamydia trachomatis* infection on male fertility. *Andrologia* 36(1), 1-23.
- Grimwood, J., Olinger, L., and Stephens, R.S. (2001). Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infect Immun* 69(4), 2383-2389. doi: 10.1128/IAI.69.4.2383-2389.2001.
- Grimwood, J., and Stephens, R.S. (1999). Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics* 4(3), 187-201. doi: 10.1089/omi.1.1999.4.187.
- Gupta, R.S., Naushad, S., Chokshi, C., Griffiths, E., and Adeolu, M. (2015). A phylogenomic and molecular markers based analysis of the phylum *Chlamydiae*: proposal to divide the class *Chlamydiae* into two orders, *Chlamydiales* and *Parachlamydiales* ord. nov., and emended description of the class *Chlamydiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108(3), 765-781. doi: 10.1007/s10482-015-0532-1.
- Haggerty, C.L., Gottlieb, S.L., Taylor, B.D., Low, N., Xu, F., and Ness, R.B. (2010). Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. *J Infect Dis* 201 Suppl 2, S134-155. doi: 10.1086/652395.
- Halberstädter L, v.P., S. (1907). Zur Aetiologie des Trachoms. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 33(1285), 7.
- Halberstädter L, v.P., S. (1909). Ueber Chlamydozoen befunde bei Blennorrhoea neonatorum non gonorrhoeica. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 46(1839).
- Haldar, A.K., Foltz, C., Finethy, R., Piro, A.S., Feeley, E.M., Pilla-Moffett, D.M., et al. (2015). Ubiquitin systems mark pathogen-containing vacuoles as targets for host defense by guanylate binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(41), E5628-5637. doi: 10.1073/pnas.1515966112.
- Haldar, A.K., Piro, A.S., Finethy, R., Espenschied, S.T., Brown, H.E., Giebel, A.M., et al. (2016). *Chlamydia trachomatis* Is Resistant to Inclusion Ubiquitination and Associated Host Defense in Gamma Interferon-Primed Human Epithelial Cells. *MBio* 7(6). doi: 10.1128/mBio.01417-16.
- Hammerschlag, M.R. (2011). Chlamydial and gonococcal infections in infants and children. *Clin Infect Dis* 53 Suppl 3, S99-102. doi: 10.1093/cid/cir699.

- Hegemann J. H., M.K. (2012). *Intracellular Pathogens I: Chlamydiales, CHLAMYDIAL ADHESION AND ADHESINS*. Washington, USA: ASM Press.
- Henderson, I.R., and Lam, A.C. (2001). Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol* 9(12), 573-578.
- Herring, A., and Richens, J. (2006). Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect* 82 Suppl 4, iv23-25. doi: 10.1136/sti.2006.023143.
- Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., and Timms, P. (2004). Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 72(4), 1843-1855. doi: 10.1128/iai.72.4.1843-1855.2004.
- Holland, S.M., Hudson, A.P., Bobo, L., Whittum-Hudson, J.A., Viscidi, R.P., Quinn, T.C., et al. (1992). Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture-negative state. *Infect Immun* 60(5), 2040-2047.
- Hsia, R., Ohayon, H., Gounon, P., Dautry-Varsat, A., and Bavoil, P.M. (2000). Phage infection of the obligate intracellular bacterium, *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis. *Microbes Infect* 2(7), 761-772.
- Hurst, E.W., Landquist, J.K., Melvin, P., Peters, J.M., Senior, N., Silk, J.A., et al. (1953). The therapy of experimental psittacosis and lymphogranuloma venereum (inguinale) II. The activity of quinoxaline-1:4-dioxide and substituted and related compounds, with a note on the morphological changes induced in lymphogranuloma virus by these compounds and by antibiotics. *Br J Pharmacol Chemother* 8(3), 297-305. doi: 10.1111/j.1476-5381.1953.tb00798.x.
- Huston, W.M., Theodoropoulos, C., Mathews, S.A., and Timms, P. (2008). *Chlamydia trachomatis* responds to heat shock, penicillin induced persistence, and IFN-gamma persistence by altering levels of the extracytoplasmic stress response protease HtrA. *BMC Microbiol* 8, 190. doi: 10.1186/1471-2180-8-190.
- Hybiske, K., and Stephens, R.S. (2007). Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(27), 11430-11435. doi: 10.1073/pnas.0703218104.
- Ingmer, H., and Brondsted, L. (2009). Proteases in bacterial pathogenesis. *Res Microbiol* 160(9), 704-710. doi: 10.1016/j.resmic.2009.08.017.
- Inic-Kanada, A., Stojanovic, M., Marinkovic, E., Becker, E., Stein, E., Lukic, I., et al. (2016). A Probiotic Adjuvant *Lactobacillus rhamnosus* Enhances Specific Immune Responses after Ocular Mucosal Immunization with Chlamydial Polymorphic Membrane Protein C. *PLoS One* 11(9), e0157875. doi: 10.1371/journal.pone.0157875.
- Inic-Kanada, A., Stojanovic, M., Schlacher, S., Stein, E., Belij-Rammerstorfer, S., Marinkovic, E., et al. (2015). Delivery of a Chlamydial Adhesin N-PmpC Subunit Vaccine to the Ocular Mucosa Using Particulate Carriers. *PLoS One* 10(12), e0144380. doi: 10.1371/journal.pone.0144380.
- Jacquier, N., Frandi, A., Pillonel, T., Viollier, P.H., and Greub, G. (2014). Cell wall precursors are required to organize the chlamydial division septum. *Nat Commun* 5, 3578. doi: 10.1038/ncomms4578.
- Jewett, T.J., Miller, N.J., Dooley, C.A., and Hackstadt, T. (2010). The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion. *PLoS Pathog* 6(7), e1000997. doi: 10.1371/journal.ppat.1000997.
- JF., N. (2002). *Ancient Egyptian Medicine*. University of Oklahoma Press.
- Johnson, C.M., and Fisher, D.J. (2013). Site-specific, insertional inactivation of incA in *Chlamydia trachomatis* using a group II intron. *PLoS One* 8(12), e83989. doi: 10.1371/journal.pone.0083989.
- Jorda, G.B., Hanke, S.E., Ramos-Rincon, J.M., Mosmann, J., Lopez, M.L., Entrocassi, A.C., et al. (2018). [Prevalence and phylogenetic analysis of *Chlamydia trachomatis* in a population of women in Posadas, Misiones]. *Rev Esp Quimioter* 31(1), 21-26.
- Jorgensen, I., and Valdivia, R.H. (2008). Pmp-like proteins Pls1 and Pls2 are secreted into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Infect Immun* 76(9), 3940-3950. doi: 10.1128/IAI.00632-08.
- Joyner, J.L., Douglas, J.M., Jr., Foster, M., and Judson, F.N. (2002). Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by polymerase chain reaction in untreated patients. *Sex Transm Dis* 29(4), 196-200.
- Julie A. Brothwell, M.K.M., Guangming Zhong and David E. Nelson (2018). "Advances and Obstacles in the Genetic Dissection of Chlamydial Virulence," in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, ed. G. Häcker. (Switzerland: Springer International Publishing AG 2017), 133-158.
- K., L. (1909). Zur Trachomforschung. *Z Augenheilk* 22(547).
- K., L. (1910). Zur Atilogie der gonokokkenfreien Urethritis. *Wien klin Wochschr.* 23(283).

- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R.W., et al. (1999). Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* 21(4), 385-389. doi: 10.1038/7716.
- Kannan, R.M., Gerard, H.C., Mishra, M.K., Mao, G., Wang, S., Hali, M., et al. (2013). Dendrimer-enabled transformation of *Chlamydia trachomatis*. *Microb Pathog* 65, 29-35. doi: 10.1016/j.micpath.2013.08.003.
- Kari, L., Goheen, M.M., Randall, L.B., Taylor, L.D., Carlson, J.H., Whitmire, W.M., et al. (2011). Generation of targeted *Chlamydia trachomatis* null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17), 7189-7193. doi: 10.1073/pnas.1102229108.
- Kari, L., Southern, T.R., Downey, C.J., Watkins, H.S., Randall, L.B., Taylor, L.D., et al. (2014). *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a virulence factor involved in early host-cell interactions. *Infect Immun* 82(7), 2756-2762. doi: 10.1128/IAI.01686-14.
- Kari, L., Whitmire, W.M., Crane, D.D., Reveneau, N., Carlson, J.H., Goheen, M.M., et al. (2009). *Chlamydia trachomatis* native major outer membrane protein induces partial protection in nonhuman primates: implication for a trachoma transmission-blocking vaccine. *J Immunol* 182(12), 8063-8070. doi: 10.4049/jimmunol.0804375.
- Karunakaran, K., Subbarayal, P., Vollmuth, N., and Rudel, T. (2015a). *Chlamydia*-infected cells shed Gp96 to prevent chlamydial re-infection. *Mol Microbiol* 98(4), 694-711. doi: 10.1111/mmi.13151.
- Karunakaran, K.P., Yu, H., Jiang, X., Chan, Q., Moon, K.M., Foster, L.J., et al. (2015b). Outer membrane proteins preferentially load MHC class II peptides: implications for a *Chlamydia trachomatis* T cell vaccine. *Vaccine* 33(18), 2159-2166. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.02.055.
- Keb, G., Hayman, R., and Fields, K.A. (2018). Floxed-Cassette Allelic Exchange Mutagenesis Enables Markerless Gene Deletion in *Chlamydia trachomatis* and Can Reverse Cassette-Induced Polar Effects. *J Bacteriol* 200(24). doi: 10.1128/JB.00479-18.
- Kiguen, A.X., Marrama, M., Ruiz, S., Estofan, P., Venezuela, R.F., Mosmann, J.P., et al. (2019). Prevalence, risk factors and molecular characterization of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women from Cordoba, Argentina: A prospective study. *PLoS One* 14(5), e0217245. doi: 10.1371/journal.pone.0217245.
- Kim, J.H., Jiang, S., Elwell, C.A., and Engel, J.N. (2011). *Chlamydia trachomatis* co-opts the FGF2 signaling pathway to enhance infection. *PLoS Pathog* 7(10), e1002285. doi: 10.1371/journal.ppat.1002285.
- Kintner, J., Lajoie, D., Hall, J., Whittimore, J., and Schoborg, R.V. (2014). Commonly prescribed beta-lactam antibiotics induce *C. trachomatis* persistence/stress in culture at physiologically relevant concentrations. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 44. doi: 10.3389/fcimb.2014.00044.
- Kiselev, A.O., Skinner, M.C., and Lampe, M.F. (2009). Analysis of pmpD expression and PmpD post-translational processing during the life cycle of *Chlamydia trachomatis* serovars A, D, and L2. *PLoS One* 4(4), e5191. doi: 10.1371/journal.pone.0005191.
- Kiselev, A.O., Stamm, W.E., Yates, J.R., and Lampe, M.F. (2007). Expression, processing, and localization of PmpD of *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 during the chlamydial developmental cycle. *PLoS One* 2(6), e568. doi: 10.1371/journal.pone.0000568.
- Kokes, M., Dunn, J.D., Granek, J.A., Nguyen, B.D., Barker, J.R., Valdivia, R.H., et al. (2015). Integrating chemical mutagenesis and whole-genome sequencing as a platform for forward and reverse genetic analysis of *Chlamydia*. *Cell Host Microbe* 17(5), 716-725. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.014.
- La Rosa, L., Svidler Lopez, L., Entrocassi, A.C., Santos, B., Caffarena, D., and Rodriguez Fernepin, M. (2018). [Clinical polymorphism of anorectal lymphogranuloma venereum in Buenos Aires City]. *Medicina (B Aires)* 78(3), 207-210.
- Laitinen, K., Laurila, A.L., Leinonen, M., and Saikku, P. (1996). Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* infection in mice by cortisone treatment. *Infect Immun* 64(4), 1488-1490.
- Lambden, P.R., Pickett, M.A., and Clarke, I.N. (2006). The effect of penicillin on *Chlamydia trachomatis* DNA replication. *Microbiology* 152(Pt 9), 2573-2578. doi: 10.1099/mic.0.29032-0.
- Lan, J., van den Brule, A.J., Hemrika, D.J., Risse, E.K., Walboomers, J.M., Schipper, M.E., et al. (1995). *Chlamydia trachomatis* and ectopic pregnancy: retrospective analysis of salpingectomy specimens, endometrial biopsies, and cervical smears. *J Clin Pathol* 48(9), 815-819. doi: 10.1136/jcp.48.9.815.
- Lewis, M.E., Belland, R.J., AbdelRahman, Y.M., Beatty, W.L., Aiyar, A.A., Zea, A.H., et al. (2014). Morphologic and molecular evaluation of *Chlamydia trachomatis* growth in human endocervix reveals distinct growth patterns. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 71. doi: 10.3389/fcimb.2014.00071.

- Liechti, G., Kuru, E., Packiam, M., Hsu, Y.P., Tekkam, S., Hall, E., et al. (2016). Pathogenic *Chlamydia* Lack a Classical Sacculus but Synthesize a Narrow, Mid-cell Peptidoglycan Ring, Regulated by MreB, for Cell Division. *PLoS Pathog* 12(5), e1005590. doi: 10.1371/journal.ppat.1005590.
- Liechti, G.W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M., et al. (2014). A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature* 506(7489), 507-510. doi: 10.1038/nature12892.
- Liu, X., Afrane, M., Clemmer, D.E., Zhong, G., and Nelson, D.E. (2010). Identification of *Chlamydia trachomatis* outer membrane complex proteins by differential proteomics. *J Bacteriol* 192(11), 2852-2860. doi: 10.1128/JB.01628-09.
- Liu, Y., Chen, C., Gong, S., Hou, S., Qi, M., Liu, Q., et al. (2014a). Transformation of *Chlamydia muridarum* reveals a role for Pgp5 in suppression of plasmid-dependent gene expression. *J Bacteriol* 196(5), 989-998. doi: 10.1128/JB.01161-13.
- Liu, Y., Huang, Y., Yang, Z., Sun, Y., Gong, S., Hou, S., et al. (2014b). Plasmid-encoded Pgp3 is a major virulence factor for *Chlamydia muridarum* to induce hydrosalpinx in mice. *Infect Immun* 82(12), 5327-5335. doi: 10.1128/IAI.02576-14.
- Lo, C.C., Xie, G., Bonner, C.A., and Jensen, R.A. (2012). The alternative translational profile that underlies the immune-evasive state of persistence in *Chlamydiaceae* exploits differential tryptophan contents of the protein repertoire. *Microbiol Mol Biol Rev* 76(2), 405-443. doi: 10.1128/MMBR.05013-11.
- Longbottom, D., Russell, M., Dunbar, S.M., Jones, G.E., and Herring, A.J. (1998). Molecular cloning and characterization of the genes coding for the highly immunogenic cluster of 90-kilodalton envelope proteins from the *Chlamydia psittaci* subtype that causes abortion in sheep. *Infect Immun* 66(4), 1317-1324.
- Longbottom, D., Russell, M., Jones, G.E., Lainson, F.A., and Herring, A.J. (1996). Identification of a multigene family coding for the 90 kDa proteins of the ovine abortion subtype of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiol Lett* 142(2-3), 277-281. doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08443.x.
- Lopez, L.S., La Rosa, L., Entrocassi, A.C., Caffarena, D., Santos, B., and Fermepin, M.R. (2019). Rectal Lymphogranuloma Venereum, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 25(3), 598-599. doi: 10.3201/eid2503.180600.
- Lowden, N.M., Yeruva, L., Johnson, C.M., Bowlin, A.K., and Fisher, D.J. (2015). Use of aminoglycoside 3' adenylyltransferase as a selection marker for *Chlamydia trachomatis* intron-mutagenesis and in vivo intron stability. *BMC Res Notes* 8, 570. doi: 10.1186/s13104-015-1542-9.
- Lu, C., Holland, M.J., Gong, S., Peng, B., Bailey, R.L., Mabey, D.W., et al. (2012). Genome-wide identification of *Chlamydia trachomatis* antigens associated with trachomatous trichiasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(6), 2551-2559. doi: 10.1167/iovs.11-9212.
- Lujan, A.L., Croci, D.O., Gambarte Tudela, J.A., Losinno, A.D., Cagnoni, A.J., Marino, K.V., et al. (2018). Glycosylation-dependent galectin-receptor interactions promote *Chlamydia trachomatis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(26), E6000-E6009. doi: 10.1073/pnas.1802188115.
- Malinverni, R., Kuo, C.C., Campbell, L.A., and Grayston, J.T. (1995). Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* lung infection in mice by cortisone. *J Infect Dis* 172(2), 593-594. doi: 10.1093/infdis/172.2.593.
- Markel, H. (2000). "The eyes have it": trachoma, the perception of disease, the United States Public Health Service, and the American Jewish immigration experience, 1897-1924. *Bull Hist Med* 74(3), 525-560.
- Marrama, M. (2013). *Prevalencia de Chlamydia trachomatis en embarazadas asistidas en centros de salud municipales de la ciudad de Córdoba*.
- Mathews, S., George, C., Flegg, C., Stenzel, D., and Timms, P. (2001). Differential expression of *ompA*, *ompB*, *pyk*, *nlpD* and *Cpn0585* genes between normal and interferon-gamma treated cultures of *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Pathog* 30(6), 337-345. doi: 10.1006/mpat.2000.0435.
- Matsumoto, A., Izutsu, H., Miyashita, N., and Ohuchi, M. (1998). Plaque formation by and plaque cloning of *Chlamydia trachomatis* biovar trachoma. *J Clin Microbiol* 36(10), 3013-3019.
- Matsumoto, A., and Manire, G.P. (1970). Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 101(1), 278-285.
- Maurer, A.P., Mehlitz, A., Mollenkopf, H.J., and Meyer, T.F. (2007). Gene expression profiles of *Chlamydia pneumoniae* during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence. *PLoS Pathog* 3(6), e83. doi: 10.1371/journal.ppat.0030083.

- McClarty, G., Caldwell, H.D., and Nelson, D.E. (2007). Chlamydial interferon gamma immune evasion influences infection tropism. *Curr Opin Microbiol* 10(1), 47-51. doi: 10.1016/j.mib.2006.12.003.
- McKuen, M.J., Mueller, K.E., Bae, Y.S., and Fields, K.A. (2017). Fluorescence-Reported Allelic Exchange Mutagenesis Reveals a Role for *Chlamydia trachomatis* TmeA in Invasion That Is Independent of Host AHNAK. *Infect Immun* 85(12). doi: 10.1128/IAI.00640-17.
- Miyairi, I., Mahdi, O.S., Ouellette, S.P., Belland, R.J., and Byrne, G.I. (2006). Different growth rates of *Chlamydia trachomatis* biovars reflect pathotype. *J Infect Dis* 194(3), 350-357. doi: 10.1086/505432.
- Molestina, R.E., Klein, J.B., Miller, R.D., Pierce, W.H., Ramirez, J.A., and Summersgill, J.T. (2002). Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEP-2 cells. *Infect Immun* 70(6), 2976-2981. doi: 10.1128/iai.70.6.2976-2981.2002.
- Molleken, K., Becker, E., and Hegemann, J.H. (2013). The *Chlamydia pneumoniae* invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry. *PLoS Pathog* 9(4), e1003325. doi: 10.1371/journal.ppat.1003325.
- Molleken, K., Schmidt, E., and Hegemann, J.H. (2010). Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Mol Microbiol* 78(4), 1004-1017. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07386.x.
- Morrison, R.P. (2000). Differential sensitivities of *Chlamydia trachomatis* strains to inhibitory effects of gamma interferon. *Infect Immun* 68(10), 6038-6040. doi: 10.1128/iai.68.10.6038-6040.2000.
- Moulder, J.W. (1966). The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol* 20, 107-130. doi: 10.1146/annurev.mi.20.100166.000543.
- Mucci, M.J., Cuestas, M.L., Cervetto, M.M., Landaburu, M.F., and Mujica, M.T. (2016). A prospective observational study of vulvovaginitis in pregnant women in Argentina, with special reference to candidiasis. *Mycoses* 59(7), 429-435. doi: 10.1111/myc.12490.
- Mukhopadhyay, S., Miller, R.D., Sullivan, E.D., Theodoropoulos, C., Mathews, S.A., Timms, P., et al. (2006). Protein expression profiles of *Chlamydia pneumoniae* in models of persistence versus those of heat shock stress response. *Infect Immun* 74(7), 3853-3863. doi: 10.1128/IAI.02104-05.
- Muller, T., Becker, E., Stallmann, S., Waldhuber, A., Rommler-Dreher, F., Albrecht, S., et al. (2017). Vaccination with the polymorphic membrane protein A reduces *Chlamydia muridarum* induced genital tract pathology. *Vaccine* 35(21), 2801-2810. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.04.017.
- Muramatsu, M.K. (2017). *The identification and characterization of novel persistence genes in chlamydia trachomatis*. Doctor of Philosophy, Indiana University.
- Muramatsu, M.K., Brothwell, J.A., Stein, B.D., Putman, T.E., Rockey, D.D., and Nelson, D.E. (2016). Beyond Tryptophan Synthase: Identification of Genes That Contribute to *Chlamydia trachomatis* Survival during Gamma Interferon-Induced Persistence and Reactivation. *Infect Immun* 84(10), 2791-2801. doi: 10.1128/IAI.00356-16.
- Murthy, A.K., Chambers, J.P., Meier, P.A., Zhong, G., and Arulanandam, B.P. (2007). Intranasal vaccination with a secreted chlamydial protein enhances resolution of genital *Chlamydia muridarum* infection, protects against oviduct pathology, and is highly dependent upon endogenous gamma interferon production. *Infect Immun* 75(2), 666-676. doi: 10.1128/IAI.01280-06.
- Murthy, A.K., Cong, Y., Murphey, C., Guentzel, M.N., Forsthuber, T.G., Zhong, G., et al. (2006). Chlamydial protease-like activity factor induces protective immunity against genital chlamydial infection in transgenic mice that express the human HLA-DR4 allele. *Infect Immun* 74(12), 6722-6729. doi: 10.1128/IAI.01119-06.
- Nguyen, B.D., and Valdivia, R.H. (2012). Virulence determinants in the obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* revealed by forward genetic approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(4), 1263-1268. doi: 10.1073/pnas.1117884109.
- Nunes, A., Gomes, J.P., Karunakaran, K.P., and Brunham, R.C. (2015). Bioinformatic Analysis of *Chlamydia trachomatis* Polymorphic Membrane Proteins PmpE, PmpF, PmpG and PmpH as Potential Vaccine Antigens. *PLoS One* 10(7), e0131695. doi: 10.1371/journal.pone.0131695.
- Nunes, A., Gomes, J.P., Mead, S., Florindo, C., Correia, H., Borrego, M.J., et al. (2007). Comparative expression profiling of the *Chlamydia trachomatis* pmp gene family for clinical and reference strains. *PLoS One* 2(9), e878. doi: 10.1371/journal.pone.0000878.
- O'Neill, C.E., Skilton, R.J., Pearson, S.A., Filardo, S., Andersson, P., and Clarke, I.N. (2018). Genetic Transformation of a *C. trachomatis* Ocular Isolate With the Functional Tryptophan Synthase

- Operon Confers an Indole-Rescuable Phenotype. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 434. doi: 10.3389/fcimb.2018.00434.
- Occhionero, M., Paniccia, L., Pedersen, D., Rossi, G., Mazzucchini, H., Entrocassi, A., et al. (2015). [Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection and factors with the risk of acquiring sexually transmitted infections in college students]. *Rev Argent Microbiol* 47(1), 9-16. doi: 10.1016/j.ram.2014.11.003.
- Ong, V.A., Marsh, J.W., Lawrence, A., Allan, J.A., Timms, P., and Huston, W.M. (2013). The protease inhibitor JO146 demonstrates a critical role for CtHtrA for *Chlamydia trachomatis* reversion from penicillin persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 100. doi: 10.3389/fcimb.2013.00100.
- Ostergaard, O., Follmann, F., Olsen, A.W., Heegaard, N.H., Andersen, P., and Rosenkrands, I. (2016). Quantitative Protein Profiling of *Chlamydia trachomatis* Growth Forms Reveals Defense Strategies Against Tryptophan Starvation. *Mol Cell Proteomics* 15(12), 3540-3550. doi: 10.1074/mcp.M116.061986.
- Ouellette, S.P. (2018). Feasibility of a Conditional Knockout System for *Chlamydia* Based on CRISPR Interference. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 59. doi: 10.3389/fcimb.2018.00059.
- Ouellette, S.P., Hatch, T.P., AbdelRahman, Y.M., Rose, L.A., Belland, R.J., and Byrne, G.I. (2006). Global transcriptional upregulation in the absence of increased translation in *Chlamydia* during IFN γ -mediated host cell tryptophan starvation. *Mol Microbiol* 62(5), 1387-1401. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05465.x.
- Ouellette, S.P., Karimova, G., Subtil, A., and Ladant, D. (2012). *Chlamydia* co-opts the rod shape-determining proteins MreB and Pbp2 for cell division. *Mol Microbiol* 85(1), 164-178. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08100.x.
- Ouellette, S.P., Messerli, P.R., Wood, N.A., and Hajovsky, H. (2018). Characterization of Chlamydial Rho and the Role of Rho-Mediated Transcriptional Polarity during Interferon Gamma-Mediated Tryptophan Limitation. *Infect Immun* 86(7). doi: 10.1128/IAI.00240-18.
- Ouellette, S.P., Rueden, K.J., and Rucks, E.A. (2016). Tryptophan Codon-Dependent Transcription in *Chlamydia pneumoniae* during Gamma Interferon-Mediated Tryptophan Limitation. *Infect Immun* 84(9), 2703-2713. doi: 10.1128/IAI.00377-16.
- Packiam, M., Weinrick, B., Jacobs, W.R., Jr., and Maurelli, A.T. (2015). Structural characterization of muopeptides from *Chlamydia trachomatis* peptidoglycan by mass spectrometry resolves "chlamydial anomaly". *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(37), 11660-11665. doi: 10.1073/pnas.1514026112.
- Pal, S., Favaroni, A., Tifrea, D.F., Hanisch, P.T., Luczak, S.E.T., Hegemann, J.H., et al. (2017). Comparison of the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* for their ability to induce protective immune responses in mice against a *C. muridarum* challenge. *Vaccine* 35(19), 2543-2549. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.03.070.
- Pando, M.A., Balan, I.C., Marone, R., Dolezal, C., Leu, C.S., Squiquera, L., et al. (2012). HIV and other sexually transmitted infections among men who have sex with men recruited by RDS in Buenos Aires, Argentina: high HIV and HPV infection. *PLoS One* 7(6), e39834. doi: 10.1371/journal.pone.0039834.
- Pantoja, L.G., Miller, R.D., Ramirez, J.A., Molestina, R.E., and Summersgill, J.T. (2001). Characterization of *Chlamydia pneumoniae* persistence in HEp-2 cells treated with gamma interferon. *Infect Immun* 69(12), 7927-7932. doi: 10.1128/IAI.69.12.7927-7932.2001.
- Patton, D.L., Askienazy-Elbhar, M., Henry-Suchet, J., Campbell, L.A., Cappuccio, A., Tannous, W., et al. (1994). Detection of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tube tissue in women with postinfectious tubal infertility. *Am J Obstet Gynecol* 171(1), 95-101.
- Persson, K., Ronnerstam, R., Svanberg, L., and Pohla, M.A. (1983). Neonatal chlamydial eye infection: an epidemiological and clinical study. *Br J Ophthalmol* 67(10), 700-704. doi: 10.1136/bjo.67.10.700.
- Pettengill, M.A., Lam, V.W., and Ojcius, D.M. (2009). The danger signal adenosine induces persistence of chlamydial infection through stimulation of A2b receptors. *PLoS One* 4(12), e8299. doi: 10.1371/journal.pone.0008299.
- Phillips-Campbell, R., Kintner, J., and Schoborg, R.V. (2014). Induction of the *Chlamydia muridarum* stress/persistence response increases azithromycin treatment failure in a murine model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58(3), 1782-1784. doi: 10.1128/AAC.02097-13.
- Phillips Campbell, R., Kintner, J., Whittimore, J., and Schoborg, R.V. (2012). *Chlamydia muridarum* enters a viable but non-infectious state in amoxicillin-treated BALB/c mice. *Microbes Infect* 14(13), 1177-1185. doi: 10.1016/j.micinf.2012.07.017.

- Pickett, M.A., Everson, J.S., Pead, P.J., and Clarke, I.N. (2005). The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology* 151(Pt 3), 893-903. doi: 10.1099/mic.0.27625-0.
- Pokorzynski, N.D., Brinkworth, A.J., and Carabeo, R. (2019). A bipartite iron-dependent transcriptional regulation of the tryptophan salvage pathway in *Chlamydia trachomatis*. *Elife* 8. doi: 10.7554/eLife.42295.
- Pospischil, A., Borel, N., Chowdhury, E.H., and Guscetti, F. (2009). Aberrant chlamydial developmental forms in the gastrointestinal tract of pigs spontaneously and experimentally infected with *Chlamydia suis*. *Vet Microbiol* 135(1-2), 147-156. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.035.
- Prusty, B.K., Bohme, L., Bergmann, B., Siegl, C., Krause, E., Mehlitz, A., et al. (2012). Imbalanced oxidative stress causes chlamydial persistence during non-productive human herpes virus co-infection. *PLoS One* 7(10), e47427. doi: 10.1371/journal.pone.0047427.
- Rank, R.G., Whittimore, J., Bowlin, A.K., and Wyrick, P.B. (2011). In vivo ultrastructural analysis of the intimate relationship between polymorphonuclear leukocytes and the chlamydial developmental cycle. *Infect Immun* 79(8), 3291-3301. doi: 10.1128/IAI.00200-11.
- Rank, R.G., and Yeruva, L. (2014). Hidden in plain sight: chlamydial gastrointestinal infection and its relevance to persistence in human genital infection. *Infect Immun* 82(4), 1362-1371. doi: 10.1128/IAI.01244-13.
- Rapoza, P.A., Tahija, S.G., Carlin, J.P., Miller, S.L., Padilla, M.L., and Byrne, G.I. (1991). Effect of interferon on a primary conjunctival epithelial cell model of trachoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(11), 2919-2923.
- Richmond, S.J., Hilton, A.L., and Clarke, S.K. (1972). Chlamydial infection. Role of *Chlamydia* subgroup A in non-gonococcal and post-gonococcal urethritis. *Br J Vener Dis* 48(6), 437-444. doi: 10.1136/sti.48.6.437.
- Rockey, D.D., Lenart, J., and Stephens, R.S. (2000). Genome sequencing and our understanding of *chlamydiae*. *Infect Immun* 68(10), 5473-5479. doi: 10.1128/iai.68.10.5473-5479.2000.
- Ronnerstam, R., Persson, K., Hansson, H., and Renmarker, K. (1985). Prevalence of chlamydial eye infection in patients attending an eye clinic, a VD clinic, and in healthy persons. *Br J Ophthalmol* 69(5), 385-388. doi: 10.1136/bjo.69.5.385.
- Roshick, C., Wood, H., Caldwell, H.D., and McClarty, G. (2006). Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun* 74(1), 225-238. doi: 10.1128/IAI.74.1.225-238.2006.
- Roth, A., König, P., van Zandbergen, G., Klinger, M., Hellwig-Burgel, T., Daubener, W., et al. (2010). Hypoxia abrogates antichlamydial properties of IFN-gamma in human fallopian tube cells in vitro and ex vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(45), 19502-19507. doi: 10.1073/pnas.1008178107.
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., et al. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PLoS One* 10(4), e0119248. doi: 10.1371/journal.pone.0119248.
- Ryu, Y., Kim, Y.J., Kim, Y.R., and Seok, Y.J. (2012). Expression of *Vibrio vulnificus* insulin-degrading enzyme is regulated by the cAMP-CRP complex. *Microbiology* 158(Pt 5), 1294-1303. doi: 10.1099/mic.0.055269-0.
- Saka, H.A., Thompson, J.W., Chen, Y.S., Kumar, Y., Dubois, L.G., Moseley, M.A., et al. (2011). Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol Microbiol* 82(5), 1185-1203. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07877.x.
- Saka, H.A., and Valdivia, R.H. (2010). Acquisition of nutrients by *Chlamydiae*: unique challenges of living in an intracellular compartment. *Curr Opin Microbiol* 13(1), 4-10. doi: 10.1016/j.mib.2009.11.002.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32(2), 234-258. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
- Schachter, J., Grossman, M., Sweet, R.L., Holt, J., Jordan, C., and Bishop, E. (1986). Prospective study of perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis*. *JAMA* 255(24), 3374-3377.
- Schachter, J., Stoner, E., and Moncada, J. (1983). Screening for chlamydial infections in women attending family planning clinics. *West J Med* 138(3), 375-379.
- Schautteet, K., De Clercq, E., and Vanrompay, D. (2011). *Chlamydia trachomatis* vaccine research through the years. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011, 963513. doi: 10.1155/2011/963513.

- Schoborg, R.V. (2011). *Chlamydia* persistence -- a tool to dissect *Chlamydia*--host interactions. *Microbes Infect* 13(7), 649-662. doi: 10.1016/j.micinf.2011.03.004.
- Schoborg, R.V., and Borel, N. (2014). Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) co-infection induced chlamydial persistence/stress does not require viral replication. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 20. doi: 10.3389/fcimb.2014.00020.
- Sega, G.A. (1984). A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 134(2-3), 113-142.
- Sharma, M., and Rudel, T. (2009). Apoptosis resistance in *Chlamydia*-infected cells: a fate worse than death? *FEMS Immunol Med Microbiol* 55(2), 154-161. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00515.x.
- Shaw, J.H., Key, C.E., Snider, T.A., Sah, P., Shaw, E.I., Fisher, D.J., et al. (2018). Genetic Inactivation of *Chlamydia trachomatis* Inclusion Membrane Protein CT228 Alters MYPT1 Recruitment, Extrusion Production, and Longevity of Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 415. doi: 10.3389/fcimb.2018.00415.
- Sherchand, S.P., and Aiyar, A. (2019). Ammonia generation by tryptophan synthase drives a key genetic difference between genital and ocular *Chlamydia trachomatis* isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/pnas.1821652116.
- Shima, K., Klinger, M., Solbach, W., and Rupp, J. (2013). Activities of first-choice antimicrobials against gamma interferon-treated *Chlamydia trachomatis* differ in hypoxia. *Antimicrob Agents Chemother* 57(6), 2828-2830. doi: 10.1128/AAC.02211-12.
- Sixt, B.S., Bastidas, R.J., Finethy, R., Baxter, R.M., Carpenter, V.K., Kroemer, G., et al. (2017). The *Chlamydia trachomatis* Inclusion Membrane Protein CpoS Counteracts STING-Mediated Cellular Surveillance and Suicide Programs. *Cell Host Microbe* 21(1), 113-121. doi: 10.1016/j.chom.2016.12.002.
- Sixt, B.S., and Valdivia, R.H. (2016). Molecular Genetic Analysis of *Chlamydia* Species. *Annu Rev Microbiol* 70, 179-198. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095539.
- Skilton, R.J., Cutcliffen, L.T., Barlow, D., Wang, Y., Salim, O., Lambden, P.R., et al. (2009). Penicillin induced persistence in *Chlamydia trachomatis*: high quality time lapse video analysis of the developmental cycle. *PLoS One* 4(11), e7723. doi: 10.1371/journal.pone.0007723.
- Skipp, P., Robinson, J., O'Connor, C.D., and Clarke, I.N. (2005). Shotgun proteomic analysis of *Chlamydia trachomatis*. *Proteomics* 5(6), 1558-1573. doi: 10.1002/pmic.200401044.
- Skipp, P.J., Hughes, C., McKenna, T., Edwards, R., Langridge, J., Thomson, N.R., et al. (2016). Quantitative Proteomics of the Infectious and Replicative Forms of *Chlamydia trachomatis*. *PLoS One* 11(2), e0149011. doi: 10.1371/journal.pone.0149011.
- Slade, J.A., Brockett, M., Singh, R., Liechti, G.W., and Maurelli, A.T. (2019). Fosmidomycin, an inhibitor of isoprenoid synthesis, induces persistence in *Chlamydia* by inhibiting peptidoglycan assembly. *PLoS Pathog* 15(10), e1008078. doi: 10.1371/journal.ppat.1008078.
- Snavely, E.A., Kokes, M., Dunn, J.D., Saka, H.A., Nguyen, B.D., Bastidas, R.J., et al. (2014). Reassessing the role of the secreted protease CPAF in *Chlamydia trachomatis* infection through genetic approaches. *Pathog Dis* 71(3), 336-351. doi: 10.1111/2049-632X.12179.
- Solomon, A.W., and Mabey, D.C.W. (2017). "*Chlamydia* (Trachoma and Sexually Transmitted Infections)," in *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*, ed. S.R. Quah. (Oxford: Academic Press), 554-564.
- Somboonna, N., Ziklo, N., Ferrin, T.E., Hyuk Suh, J., and Dean, D. (2019). Clinical Persistence of *Chlamydia trachomatis* Sexually Transmitted Strains Involves Novel Mutations in the Functional alphabetaalpha Tetramer of the Tryptophan Synthase Operon. *MBio* 10(4). doi: 10.1128/mBio.01464-19.
- Stallmann, S., and Hegemann, J.H. (2016). The *Chlamydia trachomatis* Ctad1 invasin exploits the human integrin beta1 receptor for host cell entry. *Cell Microbiol* 18(5), 761-775. doi: 10.1111/cmi.12549.
- Stamm, W.E. (1999). *Chlamydia trachomatis* infections: progress and problems. *J Infect Dis* 179 Suppl 2, S380-383. doi: 10.1086/513844.
- Stamm, W.E., and Cole, B. (1986). Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* urethritis in men. *Sex Transm Dis* 13(3), 163-165.
- Stenberg, K., and Mardh, P.A. (1991). Genital infection with *Chlamydia trachomatis* in patients with chlamydial conjunctivitis: unexplained results. *Sex Transm Dis* 18(1), 1-4.
- Stephens, R.S., Sanchez-Pescador, R., Wagar, E.A., Inouye, C., and Urdea, M.S. (1987). Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol* 169(9), 3879-3885.

- Stocks, M.E., Ogden, S., Haddad, D., Addiss, D.G., McGuire, C., and Freeman, M.C. (2014). Effect of water, sanitation, and hygiene on the prevention of trachoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 11(2), e1001605. doi: 10.1371/journal.pmed.1001605.
- Subbarayal, P., Karunakaran, K., Winkler, A.C., Rother, M., Gonzalez, E., Meyer, T.F., et al. (2015). EphrinA2 receptor (EphA2) is an invasion and intracellular signaling receptor for *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Pathog* 11(4), e1004846. doi: 10.1371/journal.ppat.1004846.
- Suchland, R.J., Dimond, Z.E., Putman, T.E., and Rockey, D.D. (2017). Demonstration of Persistent Infections and Genome Stability by Whole-Genome Sequencing of Repeat-Positive, Same-Serovar *Chlamydia trachomatis* Collected From the Female Genital Tract. *J Infect Dis* 215(11), 1657-1665. doi: 10.1093/infdis/jix155.
- Susana Di Bartolomeo, M.R., Diego Sauka y Ramón Alberto de Torres (2001). Perfil microbiológico en secreciones genitales de embarazadas sintomáticas, en el Gran Buenos Aires, Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19, 99-102.
- Swanson, K.A., Taylor, L.D., Frank, S.D., Sturdevant, G.L., Fischer, E.R., Carlson, J.H., et al. (2009). *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is an oligomeric autotransporter with a higher-order structure. *Infect Immun* 77(1), 508-516. doi: 10.1128/IAI.01173-08.
- Tam, J.E., Davis, C.H., and Wyrick, P.B. (1994). Expression of recombinant DNA introduced into *Chlamydia trachomatis* by electroporation. *Can J Microbiol* 40(7), 583-591.
- Tamura, A., and Manire, G.P. (1968). Effect of penicillin on the multiplication of meningopneumonitis organisms (*Chlamydia psittaci*). *J Bacteriol* 96(4), 875-880.
- Tan, C., Hsia, R.C., Shou, H., Carrasco, J.A., Rank, R.G., and Bavofil, P.M. (2010). Variable expression of surface-exposed polymorphic membrane proteins in in vitro-grown *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol* 12(2), 174-187. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01389.x.
- Tan, C., Hsia, R.C., Shou, H., Haggerty, C.L., Ness, R.B., Gaydos, C.A., et al. (2009). *Chlamydia trachomatis*-infected patients display variable antibody profiles against the nine-member polymorphic membrane protein family. *Infect Immun* 77(8), 3218-3226. doi: 10.1128/IAI.01566-08.
- Taylor-Robinson, D. (2017). The discovery of *Chlamydia trachomatis*. *Sexually Transmitted Infections* 93(1), 10-10. doi: 10.1136/sextrans-2016-053011.
- Thygeson, P. (1963). Epidemiologic Observations on Trachoma in the United States. *Invest Ophthalmol* 2, 482-489.
- Tietzel, I., El-Haibi, C., and Carabeo, R.A. (2009). Human guanylate binding proteins potentiate the anti-chlamydia effects of interferon-gamma. *PLoS One* 4(8), e6499. doi: 10.1371/journal.pone.0006499.
- Tifrea, D.F., Pal, S., Popot, J.L., Cocco, M.J., and de la Maza, L.M. (2014). Increased immunoaccessibility of MOMP epitopes in a vaccine formulated with amphipols may account for the very robust protection elicited against a vaginal challenge with *Chlamydia muridarum*. *J Immunol* 192(11), 5201-5213. doi: 10.4049/jimmunol.1303392.
- Till, B.J., Zerr, T., Comai, L., and Henikoff, S. (2006). A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nat Protoc* 1(5), 2465-2477. doi: 10.1038/nprot.2006.329.
- Valdivia, R.H., and Bastidas, R.J. (2018). The Expanding Molecular Genetics Tool Kit in *Chlamydia*. *J Bacteriol* 200(24). doi: 10.1128/JB.00590-18.
- van Kuppeveld, F.J., van der Logt, J.T., Angulo, A.F., van Zoest, M.J., Quint, W.G., Niesters, H.G., et al. (1992). Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 58(8), 2606-2615.
- Van Lent, S., Creasy, H.H., Myers, G.S., and Vanrompay, D. (2016). The Number, Organization, and Size of Polymorphic Membrane Protein Coding Sequences as well as the Most Conserved Pmp Protein Differ within and across *Chlamydia* Species. *J Mol Microbiol Biotechnol* 26(5), 333-344. doi: 10.1159/000447092.
- van Liere, G.A., Hoebe, C.J., Wolffs, P.F., and Dukers-Muijers, N.H. (2014). High co-occurrence of anorectal chlamydia with urogenital chlamydia in women visiting an STI clinic revealed by routine universal testing in an observational study; a recommendation towards a better anorectal chlamydia control in women. *BMC Infect Dis* 14, 274. doi: 10.1186/1471-2334-14-274.
- Vandahl, B.B., Pedersen, A.S., Gevaert, K., Holm, A., Vandekerckhove, J., Christiansen, G., et al. (2002). The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in *Chlamydia pneumoniae* strain CWL029. *BMC Microbiol* 2, 36.

- Vanover, J., Kintner, J., Whittimore, J., and Schoborg, R.V. (2010). Interaction of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) glycoprotein D with the host cell surface is sufficient to induce *Chlamydia trachomatis* persistence. *Microbiology* 156(Pt 5), 1294-1302. doi: 10.1099/mic.0.036566-0.
- Vasilevsky, S., Stojanov, M., Greub, G., and Baud, D. (2016). Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates. *Virulence* 7(1), 11-22. doi: 10.1080/21505594.2015.1111509.
- Vickers, L. (2013). *Heterologous expression of Chlamydia trachomatis polymorphic membrane proteins for in vitro studies*. Doctoral, Sheffield Hallam University
- Vromman, F., Laverriere, M., Perrinet, S., Dufour, A., and Subtil, A. (2014). Quantitative monitoring of the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle using GFP-expressing bacteria, microscopy and flow cytometry. *PLoS One* 9(6), e99197. doi: 10.1371/journal.pone.0099197.
- W.H.O. 2019. Trachoma: Fact Sheet: World Health Organization. [Accessed May 2019].
- Wang, J., Zhang, Y., Lu, C., Lei, L., Yu, P., and Zhong, G. (2010). A genome-wide profiling of the humoral immune response to *Chlamydia trachomatis* infection reveals vaccine candidate antigens expressed in humans. *J Immunol* 185(3), 1670-1680. doi: 10.4049/jimmunol.1001240.
- Wang, Y., Kahane, S., Cutcliffe, L.T., Skilton, R.J., Lambden, P.R., and Clarke, I.N. (2011). Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector. *PLoS Pathog* 7(9), e1002258. doi: 10.1371/journal.ppat.1002258.
- Wang, Y., Kahane, S., Cutcliffe, L.T., Skilton, R.J., Lambden, P.R., Persson, K., et al. (2013). Genetic transformation of a clinical (genital tract), plasmid-free isolate of *Chlamydia trachomatis*: engineering the plasmid as a cloning vector. *PLoS One* 8(3), e59195. doi: 10.1371/journal.pone.0059195.
- Webb, S.G. (1990). Prehistoric eye disease (trachoma?) in Australian aborigines. *Am J Phys Anthropol* 81(1), 91-100. doi: 10.1002/ajpa.1330810110.
- Weber, M.M., Noriea, N.F., Bauler, L.D., Lam, J.L., Sager, J., Wesolowski, J., et al. (2016). A Functional Core of Inca Is Required for *Chlamydia trachomatis* Inclusion Fusion. *J Bacteriol* 198(8), 1347-1355. doi: 10.1128/JB.00933-15.
- Wehrl, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., Meyer, T.F., and Szczepek, A.J. (2004). From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol* 51(2), 319-334. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03838.x.
- Weiss, E. (1950). The effect of antibiotics on agents of the psittacosis-lymphogranuloma group. I. The effect of penicillin. *J Infect Dis* 87(3), 249-263. doi: 10.1093/infdis/87.3.249.
- Weiss, S.G., Newcomb, R.W., and Beem, M.O. (1986). Pulmonary assessment of children after chlamydial pneumonia of infancy. *J Pediatr* 108(5 Pt 1), 659-664. doi: 10.1016/s0022-3476(86)81037-x.
- Westrom, L. (1995). Effect of pelvic inflammatory disease on fertility. *Venereology* 8(4), 219-222.
- Wheelock, E.F. (1965). Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science* 149(3681), 310-311. doi: 10.1126/science.149.3681.310.
- White, J.A. (2009). Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. *Curr Opin Infect Dis* 22(1), 57-66. doi: 10.1097/QCO.0b013e328320a8ae.
- WHO. 2011. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, syphilis and *Trichomonas vaginalis*: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates. .
- Wickstrum, J., Sammons, L.R., Restivo, K.N., and Hefty, P.S. (2013). Conditional gene expression in *Chlamydia trachomatis* using the tet system. *PLoS One* 8(10), e76743. doi: 10.1371/journal.pone.0076743.
- Wiedeman, J.A., Kaul, R., Heuer, L.S., Thao, N.N., Pinkerton, K.E., and Wenman, W.M. (2005). Tobacco smoke induces a persistent, but recoverable state in *Chlamydia pneumoniae* infection of human endothelial cells. *Microb Pathog* 39(5-6), 197-204. doi: 10.1016/j.micpath.2005.09.001.
- Wood, N.A., Chung, K.Y., Blocker, A.M., Rodrigues de Almeida, N., Conda-Sheridan, M., Fisher, D.J., et al. (2019). Initial Characterization of the Two ClpP Paralogs of *Chlamydia trachomatis* Suggests Unique Functionality for Each. *J Bacteriol* 201(2). doi: 10.1128/JB.00635-18.
- Workowski, K.A., Berman, S., Centers for Disease, C., and Prevention (2010). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep* 59(RR-12), 1-110.

- Wyrick, P.B., and Knight, S.T. (2004). Pre-exposure of infected human endometrial epithelial cells to penicillin in vitro renders *Chlamydia trachomatis* refractory to azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 54(1), 79-85. doi: 10.1093/jac/dkh283.
- Xu, S., Battaglia, L., Bao, X., and Fan, H. (2013). Chloramphenicol acetyltransferase as a selection marker for chlamydial transformation. *BMC Res Notes* 6, 377. doi: 10.1186/1756-0500-6-377.
- Zhong, G. (2011). *Chlamydia trachomatis* secretion of proteases for manipulating host signaling pathways. *Front Microbiol* 2, 14. doi: 10.3389/fmicb.2011.00014.
- Zhu, Y., Jiang, J., Said-Sadier, N., Boxx, G., Champion, C., Tetlow, A., et al. (2015). Activation of the NLRP3 inflammasome by vault nanoparticles expressing a chlamydial epitope. *Vaccine* 33(2), 298-306. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.11.028.
- Ziklo, N., Huston, W.M., Hocking, J.S., and Timms, P. (2016a). *Chlamydia trachomatis* Genital Tract Infections: When Host Immune Response and the Microbiome Collide. *Trends Microbiol* 24(9), 750-765. doi: 10.1016/j.tim.2016.05.007.
- Ziklo, N., Huston, W.M., Taing, K., Katouli, M., and Timms, P. (2016b). In vitro rescue of genital strains of *Chlamydia trachomatis* from interferon-gamma and tryptophan depletion with indole-positive, but not indole-negative *Prevotella* spp. *BMC Microbiol* 16(1), 286. doi: 10.1186/s12866-016-0903-4.
- Zucotti, A., Bolano, L., Berruezo, F.A., Vitozzi, S., and Bottiglieri, M. (2018). [Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women during the first trimester in a private institution in Cordoba.]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 75(3), 183-188. doi: 10.31053/1853.0605.v75.n3.19810.