

Tesis de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología. Universidad Nacional de San Martín

Universidad Nacional de San Martín

Título de Tesis: ***Capacidad protectora y dinámica de secreción de la subfamilia de proteínas TcTASV-C de Trypanosoma cruzi. Búsqueda de nuevos factores de virulencia mediante análisis proteómicos de vesículas extracelulares***

Doctorando: Lucas D. Caeiro

Directora: Dra. Valeria Tekiel

Co-director: Dr. Daniel Sánchez

Lugar de realización: Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo Ugalde”; Laboratorio de Interacción parásito-huésped

Fecha defensa: Septiembre 2020

Resumen

El tripomastigote es el estadio infeccioso de *T. cruzi* en los mamíferos. Si bien las proteínas más abundantes de la superficie del tripomastigote están bien caracterizadas, se sabe poco acerca de otras familias multigénicas menos abundantes y descubiertas más recientemente. Estas familias podrían tener funciones críticas en la interacción parásito-huésped. La familia multigénica TcTASV (por sus siglas en inglés, *T. cruzi* Trypomastigote Alanine, Serine y Valine rich proteins) es de tamaño medio con ~40 miembros en 4 subfamilias (A, B, C y W). TcTASV permaneció sin ser descubierta hasta hace relativamente pocos años cuando fue identificada a través de una biblioteca de ADNc enriquecido con genes de expresión en tripomastigotes (García E et al, 2010). En simultáneo, un ensayo de inmunización con una biblioteca de expresión diseñado para descubrir nuevos antígenos vacunales contra *T. cruzi* resaltó a la subfamilia TcTASV-C, ya que se identificó un fragmento de un gen de esta subfamilia entre un conjunto de clones protectores (Tekiel V et al, 2009). Un rasgo distintivo que caracteriza a las proteínas TcTASV -y en particular a la subfamilia TcTASV-C- es su expresión diferencial en la superficie de tripomastigotes y su secreción al medio, por lo que hipotetizamos, podría representar un objetivo interesante para la intervención racional contra *T. cruzi*. Teniendo en cuenta estos antecedentes, propusimos los siguientes objetivos para mi doctorado: evaluar la utilidad de algunos miembros de TcTASV como antígenos vacunales contra la infección por *T. cruzi*, utilizando diferentes esquemas de inmunización y adyuvantes que estimularan las respuestas humorales y celulares; determinar el mecanismo de secreción y expresión de TcTASV-C tanto en los tripomastigotes cultivados *in vitro* como en los circulantes sanguíneos; determinar a gran escala la composición proteica de tripomastigotes provenientes de cultivos *in*

vitro y de sangre de animales infectados y sus vesículas extracelulares, en busca de nuevos factores de virulencia y/o potenciales blancos vacunales.

En un trabajo previo, habíamos demostrado que la subfamilia TcTASV-C fue parcialmente protectora en un esquema de inmunización heterólogo con ADN y proteínas, sin embargo, no pudimos inducir una adecuada respuesta inmune celular. En esta tesis ensayamos varios esquemas de inmunización, obteniendo resultados prometedores con TcTASV-C formulado junto con U-Omp19, un novedoso adyuvante proteico de *Brucella abortus*. Los animales presentaron una fuerte respuesta inmune celular con producción de IFN- γ e IL-17, y una respuesta inmune humoral mixta IgG1/IgG2a. Después de un desafío letal con tripomastigotes de la cepa RA, los ratones vacunados con TcTASV-C+U-Omp19 tuvieron menor parasitemia y mayor supervivencia que los controles. Además, realizamos otros esquemas de inmunización, en los que evaluamos la combinación de TcTASV-C con TcTASV-A. La subfamilia TcTASV-A se expresa intracelularmente tanto en amastigotes como en tripomastigotes, mientras que TcTASV-C se expresa en la superficie de tripomastigotes (García E et al, 2010; Bernabó G et al, 2013). Teniendo en cuenta que ambas subfamilias están en contacto con el sistema inmune del huésped (Florida-Yapur N et al, 2016 y 2019), también evaluamos diferentes protocolos de inmunización empleando TcTASV-A+C con diferentes combinaciones de adyuvantes (hidróxido de aluminio, saponina y/o U-Omp19).

Estudiando el mecanismo de secreción de TcTASV-C, encontramos que esta subfamilia se secreta principalmente a través de vesículas extracelulares (VEs) de tripomastigotes. Además, demostramos que la expresión de TcTASV-C es mucho mayor en los tripomastigotes purificados de la sangre que los derivados de cultivo. Esto fue observado en diferentes cepas de *T. cruzi* y parece ser específico para algunas proteínas (por ej. TcTASV-C), ya que no ocurre con otros factores de virulencia del parásito comúnmente estudiados como las *trans*-sialidasas del grupo I. Todo esto, junto con los resultados de vacunaciones, indican que TcTASV-C podría ser considerado como un novedoso factor de virulencia secretado por tripomastigotes y -aunque su función biológica es aún desconocida- planteamos la hipótesis de su participación en las primeras etapas de la infección en el huésped mamífero ya que la generación de una respuesta inmune contra esta subfamilia produce sistemáticamente un retraso en la parasitemia durante la primera etapa de la infección.

Las VEs secretadas por patógenos protozoarios son capaces de alterar funciones del huésped, favoreciendo el establecimiento de la infección (Trocoli Torrecilhas AC et al, 2009; Coakley G et al, 2015). Para determinar el contenido global de las VEs de tripomastigotes y a la vez identificar posibles nuevos factores de virulencia en *T. cruzi*, realizamos un análisis proteómico de las VEs de la cepa de referencia CL-Brener. Purificamos dos subpoblaciones de vesículas, después de 2 y 16 hs de ultracentrifugaciones secuenciales (V2 y V16, respectivamente), cada una de las cuales presentó un conjunto diferencial de proteínas, y un núcleo menor de proteínas comunes. En ambas fracciones de VEs encontramos que alrededor del 50% de su contenido fueron proteínas de superficie. Hallamos numerosos factores de virulencia y moduladores del sistema inmune, y mayormente proteínas implicadas en patogénesis (Gene Ontology, GO). Por otro lado, observamos que una alta proporción de los antígenos ya empleados en formulaciones vacunales exitosas son secretados en VEs. Teniendo esto en cuenta, analizamos la presencia de epitopes T y B entre las proteínas

identificadas en las VEs para hallar potenciales nuevos candidatos vacunales. Los parásitos *in vivo* enfrentan un ambiente más complejo y hostil que los de cultivo, lo que puede ser el reflejo de diferencias en el contenido proteico. Con el objetivo de identificar nuevos factores de virulencia, proteínas de interacción con el sistema inmune y entender mejor la interacción de *T. cruzi* y el huésped mamífero en las primeras etapas de la infección, realizamos proteómicas comparativas de tripomastigotes de cultivo y purificados de sangre (y sus VEs) de la cepa RA (linaje TcVI). Escogimos esta cepa por ser un aislamiento argentino altamente virulento y sin datos de proteómica publicados hasta la fecha. En el análisis de parásitos de cultivo, encontramos un gran número de proteínas únicas de tripomastigotes o sus VEs y un núcleo menor de proteínas compartidas entre ellas. El análisis por GO reveló que la mayoría de los factores de virulencia conocidos se encontraban en las VEs. La comparación con el proteoma de VEs de CL Brener evidenció que las VEs de RA tenían una mayor proporción de proteínas involucradas en el metabolismo. Por otro lado, el análisis del proteoma de parásitos de sangre demostró que la mayoría de las proteínas de *T. cruzi* que sólo se encontraron en los VEs fueron factores de virulencia y proteínas relacionadas con la evasión del sistema inmune (TS grupo II y V, GP63, entre otras). Curiosamente, en las muestras de tripomastigotes purificadas de sangre y sus VEs identificamos proteínas del ratón mayormente implicadas en el metabolismo y el sistema inmune (como las proteínas del sistema del complemento (23/97) y fragmentos de anticuerpos (41/97) que se encontraron exclusivamente asociadas a los VEs). También encontramos proteínas marcadoras de VEs de mamíferos en el parásito. Estos datos sugieren que los tripomastigotes podrían evitar la acción del sistema inmune en su superficie al secretar proteínas del ratón en las VEs. El conocimiento de las proteínas expresadas en los tripomastigotes sanguíneos y sus VEs puede ser útil para comprender la biología *in vivo* de *T. cruzi*, y también para identificar nuevos blancos para el desarrollo de vacunas o medicamentos. En resumen, los resultados presentados en esta tesis destacan fuertemente a TcTASV-C como un nuevo factor de virulencia secretado por tripomastigotes de *T. cruzi* y a la secreción en vesículas extracelulares como una de las estrategias de evasión del sistema inmune que tiene el parásito.

Resumen en inglés (Abstract)

Trypomastigote is the infective stage of *T. cruzi*. While the most abundant proteins of the trypomastigote surface are fairly well characterized, little is known about other, less abundant and more recently discovered multigenic families, which could have critical functions in the parasite—host interaction. The *T. cruzi* Trypomastigote Alanine, Serine and Valine rich proteins (TcTASV) belong to a medium-size multigene family of ~40 members with four subfamilies (A, B, C and W). TcTASV-C remained unobserved until few years ago when it was identified through a trypomastigote-enriched cDNA library (García et al, 2010). Simultaneously, an expression library immunization approach designed to discover novel vaccine antigens in *T. cruzi*, spotlighted the TcTASV-C subfamily, as a fragment of a TcTASV-C gene was identified in a pool of protective clones (Tekiel et al, 2009). A distinctive feature that characterizes TcTASV proteins –and particularly the TcTASV-C subfamily- is their differential expression in

trypomastigotes surface and their secretion. Therefore, we hypothesize that it could represent an interesting target for rational intervention against *T. cruzi*. Taking this background into account, we proposed the following objectives for my thesis: to evaluate the utility of TcTASV as a vaccine antigen against *T. cruzi* infection, using different immunization schemes and adjuvants to stimulate humoral and cellular responses; to determine the TcTASV-C secretion mechanism and expression both in culture-derived *in vitro* and bloodstream trypomastigotes; to determine and compare the protein composition of *in vitro* cultured and circulating trypomastigotes of bloodstream of infected animals and their EVs on a large scale in search for novel virulence factors and/or potential vaccine targets.

In a previous work, we had demonstrated that the TcTASV-C subfamily was partially protective in a heterologous immunization scheme with DNA and proteins, however an adequate cellular immune response could not be induced. In this thesis we tested different immunization schemes, obtaining promising results with TcTASV-C formulated together with U-Omp19, a novel protein adjuvant of *Brucella abortus*. With this protocol animals presented a strong cellular response with IFN- γ and IL-17 production, and a mixed humoral response IgG1/IgG2a. After a lethal challenge with RA strain trypomastigotes, TcTASV-C+U-Omp19 vaccinated mice had a lower parasitemia and higher survival than controls. Moreover, we carry out other immunization schemes, in which we evaluate a combination of TcTASV-C with TcTASV-A. The subfamily TcTASV-A is expressed intracellularly both in amastigotes and trypomastigotes while TcTASV-C is expressed in trypomastigotes surface (García et al, 2010; Bernabó et al, 2013). Considering that both TcTASV-A and TcTASV-C subfamilies are in contact with the host immune system (Floridia-Yapur et al, 2016 and 2019), we evaluated different immunization protocols employing TcTASV-A+C and adjuvants combinations (saponin, aluminium hydroxide and U-Omp19).

Studying the TcTASV-C secretion mechanism, we found that TcTASV-C is mainly secreted through extracellular vesicles (EVs) of tripomastigotes. We demonstrate that TcTASV-C expression is much higher in bloodstream than in culture-derived trypomastigotes. This was observed in different strains of *T. cruzi* and appears to be specific for some proteins (e.g. TcTASV-C), as it does not occur with other commonly studied parasite virulence factors such as *trans*-sialidases group 1. All this, together with the vaccination results, indicate that TcTASV-C could be considered as a novel virulence factor secreted by trypomastigotes and -although its biological function is still unknown- we hypothesize its participation in the early stages of the infection in the mammalian host since the generation of an immune response against this subfamily systematically produces a delay in the parasitemia during the first stage of the infection.

The EVs released from protozoan pathogens alter host cell function, favouring the establishment of the infection (Trocoli Torrecilhas et al, 2009; Coakley et al, 2015). To determine the overall content of the tripomastigote VEs and simultaneously identify possible novel *T. cruzi* virulence factors, we perform a qualitative proteomic analysis of trypomastigote EVs (*T. cruzi* reference strain: CL Brener). We purified two EVs subpopulations, after 2 and 16 hs of ultracentrifugations (V2 and V16, respectively). Each EV subpopulation presented a differential set of major proteins and a minor core of common proteins. In both EV fractions we found that about 50% of their content were surface proteins. We found several virulence factors and immune system

modulators, mostly involved in the pathogenesis (Gene Ontology, GO). On the other hand, we observe that a high proportion of the antigens already employed in successful vaccine formulations are secreted in VEs. With these considerations in mind, we analyzed the presence of T and B epitopes among the EVs identified proteins to find potential new vaccine candidates.

In vivo parasites face a more complex and hostile environment than *in vitro* cultured parasites, which may reflect differences in their protein content. In order to identify new virulence factors, immune system interaction proteins and to further understand the interaction of *T. cruzi* and the mammalian host in the early stages of infection, we performed comparative proteomics of cultured and purified blood trypomastigotes (and their EVs) of the RA strain (TcVI lineage). We selected this strain because it is a highly virulent argentinean isolate with no published proteomics data to date. In the analysis of *in vitro* cultured parasites, we found a minor core of proteins shared between trypomastigotes and their EVs. In a GO analysis we found that most of the known virulence factors were present in the EVs. A comparison with the CL-Brener EVs proteome evidenced that the RA EVs had a higher proportion of proteins involved in the metabolism. On the other hand, the analysis of bloodstream parasites showed that most of *T. cruzi* proteins found only in the EVs were virulence factors and proteins related to immune system evasion (TS group II and V, GP63, among others). Interestingly, we identified mouse proteins in blood purified trypomastigote samples and their EVs, mostly involved in metabolism and the immune system (such as complement system proteins (23/97) and antibody fragments (41/97) that were found exclusively associated with EVs). We also found mammalian EVs marker proteins in the parasite. These data suggest that tripomastigotes could prevent the action of the immune system on their surface by secreting mouse proteins with their EVs. The knowledge of proteins differentially expressed on bloodstream trypomastigote and their EVs may be helpful to understand the *in vivo* biology of *T. cruzi*, and also to identify novel targets for vaccine or drug development.

In summary, the results presented in this thesis strongly emphasize TcTASV-C as a novel virulence factor secreted by *T. cruzi* trypomastigotes and the secretion of extracellular vesicles as one of the immune system evasion strategies of the parasite.

Palabras clave: Tripomastigotes, vesículas extracelulares, *Trypanosoma cruzi*, vacuna, TcTASV, proteómica, secreción

Keywords: trypomastigotes, extracellular vesicles, *Trypanosoma cruzi*, vaccine, TcTASV, proteomics, secretion