

Universidad Nacional de San Martín (UNSAM)
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBio)

Caracterización de la familia de antígenos TolT de *T. cruzi*

Tesis presentada para optar por el título de Doctora en Biología
Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín

Autora: Lic. M Maite Lobo
Director: Dr. Carlos Andrés Buscaglia

2024

Resumen

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Enfermedad de Chagas, una zoonosis desatendida de gran relevancia médica y socioeconómica en América Latina y un problema emergente para la salud pública global. Actualmente, no existen vacunas ni fármacos apropiados para el tratamiento de esta enfermedad, y los métodos de diagnóstico disponibles presentan serias limitaciones. Además, debe considerarse que este parásito tiene una estructura poblacional compleja, compuesta por múltiples cepas que presentan diferencias genéticas, eco-epidemiológicas y biológicas (susceptibilidad a drogas, composición antigénica, tropismo tisular, virulencia en modelos animales de infección, etc.) que pueden afectar su dinámica de transmisión, la eficacia del tratamiento y la evolución clínica de la enfermedad.

TolT es un antígeno de *T. cruzi* de estructura aparentemente simple (en su descripción original de 1990 se mostró que estaba codificado por tres genes casi idénticos dispuestos en tándem) y con expresión restringida al flagelo del estadio tripomastigote infectivo. A lo largo de los años, diversos estudios revelaron su potencialidad para el desarrollo de aplicaciones serodiagnósticas y terapéuticas. La recurrente identificación de secuencias TolT en bases de datos ‘ómicas’ del parásito sugiere que este antígeno presenta una gran variabilidad intra- e inter-cepas y que cumple roles relevantes en la biología del parásito. En vista de la urgente necesidad de biomarcadores, y teniendo en consideración la abundancia de herramientas moleculares y celulares generadas para el análisis de *T. cruzi* en los últimos años, planteamos como objetivo general de esta Tesis la re-evaluación antigénica y funcional de TolT.

Primeramente, se exploró su diversidad genética, utilizando herramientas bioinformáticas y los genomas disponibles de *T. cruzi*. Se generó una base de datos curada de aproximadamente 190 secuencias TolT, incluyendo genes y pseudogenes; que se clasificaron en tres grupos principales (A, B y C). Estos grupos muestran una distribución diferencial entre cepas de *T. cruzi*, así como distintas propiedades estructurales, bioquímicas y antigénicas. Con cierta variabilidad, también se identificaron secuencias TolT en otros tripanosomátidos relacionados. A partir de estos datos y de exhaustivos mapeos genómicos, se logró capturar de manera fehaciente la amplitud y complejidad de la familia multigénica TolT, planteándose una hipótesis sobre su evolución.

Para la caracterización de las proteínas TolT se utilizaron enfoques bioinformáticos y bioquímicos. En términos generales, las TolT cuentan con un péptido señal clivable, un motivo de anclaje a la capa externa de la membrana lipídica mediante la adición de un grupo

glicosilfosfatidilinositol y múltiples sitios potenciales de N-glicosilación, todas firmas de localización en superficie y/o secreción en tripanosomátidos. También se describe la aplicación de un sistema genético basado en la expresión homóloga en *T. cruzi* para ahondar en la caracterización molecular de TolT.

Para la caracterización estructural se utilizaron herramientas de modelado molecular y ensayos de dicroísmo circular. Para todos los grupos de TolT se propone una configuración tridimensional común (que a su vez es similar a la descrita para las proteínas TolA bacterianas), ensamblada a partir de hélices α que se disponen formando una ‘cabeza’ N-terminal y un ‘tallo’ C-terminal, que facilita el espaciamiento respecto a la membrana plasmática del parásito. Mediante la generación de proteínas recombinantes con mutaciones puntuales, se exploró también el rol de residuos cisteínas absolutamente conservados en la estabilización de la ‘cabeza’ N-terminal de las TolT.

Se analizó la expresión, tanto a nivel de ARNm como de proteína, y la localización subcelular de las TolT en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. En tripomastigotes, los tres tipos de moléculas se localizan en la superficie del flagelo, en la zona de contacto entre esta estructura y el cuerpo del parásito. TolT-A y -B presentan un patrón punteado, aunque con mínima co-localización entre ellas; mientras que TolT-C presenta una distribución continua. También se demostró la expresión de las TolT en amastigotes, donde muestran una localización diferencial, aunque invariablemente intracelular.

En la última sección, se describe de manera exhaustiva el perfil antigénico de las proteínas TolT, con la idea de optimizar su uso como reactivo serodiagnóstico. Utilizando ensayos inmunoquímicos basados en microarreglos de péptidos y/o proteínas recombinantes, se definieron sus epítomos B lineales y los tipos de reconocimiento por anticuerpos presentes en sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas provenientes de distintas zonas endémicas.

Finalmente, se presenta una discusión global de los resultados obtenidos, sus limitaciones y potencialidades, y su articulación en el marco del conocimiento actual sobre la biología de *T. cruzi* y el diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Si bien aún quedan desafíos por delante, los hallazgos presentados en esta Tesis contribuyen al desarrollo e implementación de estrategias conducentes a un mejor control de esta enfermedad de gran impacto regional.

Palabras clave:

Trypanosoma cruzi, Enfermedad de Chagas, TolT, antígeno, diagnóstico serológico.

Abstract

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, a neglected zoonosis of significant medical and socioeconomic relevance in Latin America and an emerging problem for global public health. Currently, there are no vaccines or appropriate drugs for treating this disease, and the available diagnostic methods display serious limitations. Additionally, it should be considered that this parasite has a complex population structure, made up of multiple strains that exhibit genetic, eco-epidemiological, and biological differences (drug susceptibility, antigenic composition, tissue tropism, virulence in animal infection models, etc.) that can affect its transmission dynamics, treatment efficacy, and clinical evolution of the disease.

TolT is a *T. cruzi* antigen with an apparently simple structure (in its original description from 1990, it was shown to be encoded by three nearly identical genes arranged in tandem) and expression restricted to the flagellum of the infective trypomastigote stage. Over the years, various studies have revealed its potential for the development of serodiagnostic and therapeutic applications. The recurrent identification of TolT sequences in parasite's 'omics' databases suggested that this antigen exhibits significant intra- and inter-strain variability and plays relevant roles in the parasite's biology. Given the urgent need for biomarkers, and considering the abundance of molecular and cellular tools generated for the analysis of *T. cruzi* in recent years, the general objective of this PhD Thesis is the antigenic and functional re-evaluation of TolT.

Firstly, its genetic diversity was explored using bioinformatics tools and the available *T. cruzi* genomes. A curated database of approximately 190 TolT sequences, including genes and pseudogenes, was generated and classified into three main groups (A, B, and C). These groups show differential distribution among *T. cruzi* strains, as well as different structural, biochemical, and antigenic properties. With some variability, TolT sequences were also identified in other related trypanosomatids. Based on these data and exhaustive genomic mappings, the breadth and complexity of the TolT multigene family were accurately captured, and an hypothesis about its evolution was proposed.

For the characterization of TolT proteins, bioinformatic and biochemical approaches were used. In general, TolT proteins feature a cleavable signal peptide, an anchor motif to the outer layer of the lipid membrane through the addition of a glycosylphosphatidylinositol group, and multiple potential N-glycosylation sites, all signatures of surface localization and/or secretion in trypanosomatids. The application of a genetic system based on

homologous expression in *T. cruzi* for in-deph molecular characterization of TolT is also described.

For structural characterization, molecular modeling tools and circular dichroism assays were used. A common three-dimensional configuration is proposed for all TolT groups (which is similar to that described for bacterial TolA proteins), assembled from α -helices forming an N-terminal 'head' and a C-terminal 'stem', facilitating the spacing from the parasite's plasma membrane. By generating recombinant proteins with point mutations, the role of absolutely conserved cysteine residues in stabilizing the N-terminal 'head' of TolT was also explored.

The expression, at both mRNA and protein levels, and the subcellular localization of TolT in the different stages of the *T. cruzi* life cycle were analyzed. In trypomastigotes, all three types of molecules are located on the flagellum's surface, at the contact zone between this structure and the parasite's body. TolT-A and -B show a dotted pattern, although with minimal co-localization between them, while TolT-C displays a continuous distribution. The expression of TolT in amastigotes was also demonstrated, where they exhibit differential but invariably intracellular localization.

In the last section, the antigenic profile of TolT proteins is exhaustively described, aiming to optimize their use as serodiagnostic reagents. Using immunochemical assays based on peptide microarrays and/or recombinant proteins, their linear B epitopes and antibody recognition types present in sera from Chagas disease patients from different endemic areas were defined.

Finally, a comprehensive discussion of the obtained results, their limitations and potential, and their integration within the current knowledge of *T. cruzi* biology and Chagas disease diagnosis and treatment is presented. Although challenges remain ahead, the findings presented in this PhD Thesis contribute to the development and implementation of strategies leading to better control of this disease with significant regional impact.

Key words:

Trypanosoma cruzi, Chagas Disease, TolT, antigen, serological diagnosis.