

# *Identificación y caracterización de las proteínas NcROP40 y NcNTPasa, y evaluación de su utilidad vacunal frente a la neosporosis*

IVÁN PASTOR FERNÁNDEZ

## TESIS DOCTORAL

*Neospora caninum* es un parásito formador de quistes reconocido a nivel mundial como la principal causa de aborto en ganado vacuno, donde produce importantes pérdidas económicas. A pesar de que la vacunación se ha descrito como la estrategia de control más eficiente frente a la neosporosis bovina, hasta la fecha no existen formulaciones eficaces que prevengan la transmisión vertical y el aborto. En la actualidad, las medidas de control de la enfermedad dependen de un diagnóstico adecuado asociado a unas medidas de manejo concretas, por lo que el desarrollo de una vacuna frente a la neosporosis bovina es una tarea urgente. En este sentido, las vacunas de subunidades se presentan como una buena alternativa al uso de vacunas vivas, debido a su mayor seguridad y menor coste de producción; además, dichas vacunas pueden ser específicamente diseñadas frente a proteínas determinadas con el fin de bloquear procesos esenciales para la supervivencia del parásito. Desgraciadamente, el conocimiento de los mecanismos de invasión y proliferación de *N. caninum* es muy limitado a nivel molecular. Además, son pocos los estudios en los que se haya abarcado la identificación de factores de virulencia potenciales del parásito. Todo ello dificulta la selección de dianas apropiadas a la hora de diseñar nuevas formulaciones vacunales frente a la neosporosis.

El primer objetivo de la presente tesis doctoral fue determinar los cambios en el proteoma e inmunoma de dos aislados virulentos (Nc-Liv y Nc-Spain7) y uno no virulento (Nc-Spain1H) mediante DIGE y Western-blot en dos dimensiones. La hipótesis de partida fue que las diferencias en la abundancia de proteínas entre los distintos aislados permitirían identificar nuevos candidatos vacunales. Los estudios de DIGE acoplados a las técnicas de MALDI TOF-MS determinaron que el aislado Nc-Spain7 presenta el mayor número de proteínas diferencialmente expresadas con respecto a los aislados Nc-Liv y Nc-Spain1H. Sin embargo, no se encontró ningún punto proteico específico de ningún aislado. En este sentido, las proteínas NcMIC1, NcROP40, NcNTPasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y aspartil-ARNt sintetasa mostraron una mayor abundancia en los aislados virulentos. Estas variaciones podrían determinar las diferencias en el comportamiento *in vitro* e *in vivo* entre los aislados estudiados, aportando candidatos vacunales potenciales para desarrollar vacunas de subunidades. Por otro lado, y de forma complementaria, se estudiaron los posibles cambios existentes en el perfil antigénico de los aislados Nc-Liv, Nc-Spain7 y Nc-Spain1H. Para ello, se utilizaron sueros de ratones experimentalmente infectados con cada uno de los tres aislados, y se enfrentaron individualmente a cada uno de los tres extractos proteicos de cada aislado (diseño 3x3). Curiosamente, las diferencias en la abundancia de proteínas entre los aislados estudiados no tuvieron influencia alguna en su perfil antigénico, que fue muy similar entre ellos. Las principales variaciones observadas en su inmunoma dependieron únicamente del suero empleado. El suero de los ratones infectados con el aislado Nc-Liv reconoció el mayor número de antígenos, mientras que el suero de los ratones infectados con el aislado Nc-Spain1H detectó un menor número. Estas diferencias podrían ser debidas a las variaciones en

la dinámica de infección descritas entre los distintos aislados. Destacablemente, el suero de los ratones infectados con el aislado Nc-Spain1H no reconoció a las proteínas NcGAP45, serín-treonín fosfatasa 2C, superóxido dismutasa y NcGRA1, lo que sugiere su uso potencial como marcadores de virulencia.

El segundo objetivo de la presente tesis doctoral fue dirigido a caracterizar aquellas proteínas más abundantes en los aislados virulentos, exclusivamente encontradas en las organelas de secreción de los parásitos apicomplejos y escasamente estudiadas hasta la fecha. De acuerdo a estos criterios, las proteínas NcROP40 y NcNTPasa fueron caracterizadas por primera vez. Las secuencias de los genes que codifican para NcROP40 y NcNTPasa fueron analizadas en detalle. Posteriormente, ambas se analizaron en el contexto de las relaciones parásito-hospedador y en comparación con las proteínas NcROP2Fam-1 y NcGRA7, previamente caracterizadas. Para ello, se llevó a cabo el estudio de la dinámica de las proteínas, su secreción, fosforilación y perfil de transcripción a lo largo del ciclo lítico del taquizoíto.

Los análisis de la secuencia ORF disponible para NcROP40 evidenciaron que su extremo N-terminal no estaba correctamente anotado, lo que dio lugar a la descripción de la secuencia NcROP40-long, la versión corregida de la anotación inicial de NcROP40. Curiosamente, la comparación del ORF de NcROP40 de los aislados Nc-Liv, Nc-Spain7 y Nc-Spain1H no reveló ningún polimorfismo que pudiera explicar las diferencias en la abundancia y en la virulencia entre ellos. Además, la proteína carece de los dominios RAH, lo que explica su falta de interacción con la membrana de la vacuola parasitófora (MVP) mediante inmunofluorescencia. NcROP40 se localiza en el cuerpo de las roptrias, siendo probablemente objeto de una maduración proteolítica, aunque su secreción no fue evidenciada. No obstante, NcROP40 podría secretarse en el citosol de la célula hospedadora o ser translocada a su núcleo, donde podría alterar la expresión génica del hospedador. En contraste, la proteína NcROP2Fam-1 se secreta ampliamente y se asocia con la MVP. Curiosamente, la descarga de las roptrias no se vio afectada por un incremento de los niveles de calcio intracelular, y la secreción de NcROP2Fam-1 sólo se asoció al contacto con la célula hospedadora.

Por otro lado, en el presente trabajo se ha descrito por primera vez la distribución genómica de la proteína NcNTPasa. Ésta se encuentra codificada por tres *loci* diferentes que contienen tres copias distintas del gen dentro del genoma del aislado Nc-Liv. Además, se ha demostrado la existencia de hasta seis alelos diferentes para la proteína. Las proteínas NcNTPasa y NcGRA7 fueron establecidas como proteínas GRA canónicas, cuya secreción es detectable durante la invasión temperana, la formación de la vacuola parasitófora y la egresión. Ambas mostraron una interacción clara con la MVP, aunque se evidenciaron diferencias en su distribución durante la invasión y la egresión. Además, la secreción de las proteínas NcNTPasa y NcGRA7 demostró ser un proceso regulado de forma diferente entre ambas, siendo la secreción de la primera independiente de las cascadas intracelulares de calcio.

Asimismo, la expresión de ARNm de las proteínas NcROP40, NcROP2Fam-1, NcNTPasa y NcGRA7 mostró un perfil similar a lo largo del ciclo lítico. Todos los transcritos alcanzaron un pico de expresión a las 6 y 56 horas

post-infección, coincidiendo con la invasión temprana y/o la egresión. Por lo tanto, su función podría ser necesaria para garantizar la progresión del ciclo lítico en las fases siguientes del mismo. No obstante, sólo la expresión de NcROP2Fam-1, NcNTPasa y NcGRA7 se vio afectada por la suplementación con DTT, lo que sugiere su participación más directa en la egresión. Además, sólo las proteínas NcROP2Fam-1, NcNTPasa y NcGRA7 fueron fosforiladas durante esta etapa, coincidiendo con sus niveles máximos de transcripción y con la secreción de la proteína. Estos hallazgos podrían indicar un mecanismo de regulación común necesario para su participación en el ciclo lítico.

El tercer objetivo de la presente tesis doctoral fue evaluar la utilidad vacunal de las proteínas NcROP40, NcROP2Fam-1, NcNTPasa y NcGRA7 formuladas como preparados polivalentes en un modelo murino de neosporosis bien establecido. Todas las formulaciones redujeron la gravedad de la infección por *N. caninum* en los ratones vacunados, aunque las cargas parasitarias fueron menos pronunciadas en los ratones vacunados con las proteínas de roptrias. La vacunación prolongó ligeramente el tiempo de supervivencia medio de las crías, aunque sólo rNcROP2Fam-1 y la combinación de rNcROP40 con rNcROP2Fam-1 previnieron la mortalidad neonatal, al menos parcialmente, con tasas de supervivencia del 6.3 y del 16.2%, respectivamente. En este sentido, cabe destacar que la combinación de rNcROP40 con rNcROP2Fam-1 mostró un efecto sinérgico y bloqueó la transmisión vertical en todas las crías supervivientes y procedentes de diferentes camadas. Por el contrario, no se observó ningún sinergismo tras la asociación de las proteínas rNcNTPasa y rNcGRA7. Por lo tanto, el uso de proteínas de roptrias como antígenos en formulaciones vacunales e presenta como una estrategia prometedora para bloquear los procesos en los que éstas participan durante el ciclo lítico del parásito.

La presente tesis doctoral abarcó la identificación de aquellos elementos diferencialmente abundantes entre aislados virulentos y no virulentos con el fin de profundizar en los mecanismos subyacentes a la virulencia del parásito. Las proteínas NcROP40, NcROP2Fam-1, NcNTPasa y NcGRA7 han mostrado interesantes características que están asociadas a fases específicas del ciclo lítico, por lo que parecen ser esenciales para su progresión. Además, este trabajo sugiere el uso potencial de las proteínas de roptrias como antígenos para el desarrollo de futuras formulaciones vacunales. Sin embargo, y dado que hasta la fecha no se ha identificado ningún factor de virulencia de *N. caninum*, sería necesario estudiar la relevancia funcional de las proteínas de la familia ROP2 en la virulencia del parásito y en su probable modulación de la célula hospedadora. Por otro lado, se requieren más estudios para aclarar el papel de la NcNTPasa en la patogenicidad del parásito. En este escenario, la utilización de técnicas de genética reversa sería de gran utilidad para dilucidar la función de las proteínas NcROP40 y NcNTPasa dentro del ciclo lítico. Además, sería necesario realizar experimentos a gran escala que incluyeran un mayor número de aislados de *N. caninum*. Para ello, el empleo de plataformas proteómicas complementarias y la disponibilidad de un mayor número de genomas secuenciados de distintos aislados del parásito serían de gran utilidad para identificar nuevos elementos implicados en la patogenicidad del parásito.