

Identificación de epítopes T citotóxicos restringidos a la molécula HLA-A2.1 en la proteína HSP70 de *T. cruzi*.

Identification of HLA-A2.1 restricted CTLs epitopes in the T. cruzi HSP70 protein

MARAÑÓN C¹, THOMAS MC^{1*}, GUZMAN F², PATARROYO ME², LÓPEZ MC^{1#}

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina «López Neyra», CSIC, Calle Ventanilla 11, 18001- Granada, Spain. ²Instituto de Inmunología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. E-mail: mclopez@ipb.csic.es

RESUMEN

El análisis de la capacidad de unión a células T2 realizado con 31 péptidos correspondientes a distintas regiones de la proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi*, muestra que 14 de estos péptidos tienen una alta o media afinidad por la molécula presentadora A2.1. Interesantemente, el presente manuscrito pone de manifiesto que la inmunización de ratones transgénicos A2/K^b con la proteína recombinante HSP70 de *T. cruzi* induce CTLs que reconocen células EL4-A2/K^b cargadas de forma independiente con tres de los péptidos con afinidad de unión a moléculas A2. Estos péptidos presentan una homología menor del 65% con sus homólogos de la proteína HSP70 humana. Los resultados obtenidos permiten sugerir la posibilidad de que la HSP70 de *T. cruzi* pueda ser usada como diana para inducir actividad inmune citotóxica en humanos.

PALABRAS CLAVES: Linfocitos T citotóxicos, HSP70, *Trypanosoma cruzi*, HLA-A2.1, Ratones transgénicos A2/K^b.

ABSTRACT

In the present paper we have analyzed the capability of binding to T2 cells of 31 HSP70 peptides containing theoretical binding motifs to the HLA-A2.1 molecule. The results obtained show that fourteen peptides have high or medium binding affinity to the presenting molecule. Interestingly, we have also observed that the immunization of A2/K^b transgenic mice with the Trypanosoma cruzi HSP70 recombinant protein elicits a CTLs immune response which recognize EL4-A2/K^b cells loaded with three peptides corresponding to the HLA-A2.1 motifs present in the HSP70 protein. These peptides have a relative low homology (lower than 65%) with their homologous sites in the human HSP70 protein. The results shown in this paper lead us to suggest the possibility that the T. cruzi HSP70 protein could be used as target for the induction of CTL activity in humans.

KEY WORDS: Cytotoxic T lymphocytes, HSP70, *Trypanosoma cruzi*, HLA-A2.1, A2/K^b transgenic mice.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, la cual afecta a unos 18 millones de personas, siendo para muchos países de Centro y Sudamérica uno de los principales problemas de salud pública (1). La quimioterapia convencio-

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas' disease or American trypanosomiasis that affects 18 million people. The Chagas' disease represents one of the major public health problems in many countries of Central and South America (1). Conventional chemotherapy has low

nal tiene una baja eficacia (2) y resulta bastante tóxica. Además no existen tratamientos de inmunoprofilaxis efectivos. La ausencia hasta la fecha de una vacuna eficiente frente a *T. cruzi*, hace que la caracterización de nuevos antígenos del parásito capaces de inducir respuestas inmunes protectoras sea una prioridad. Diversas evidencias han mostrado que linfocitos T citotóxicos (CTLs) frente a antígenos del parásito son requeridos para generar inmunidad protectora frente a la infección por *T. cruzi*.

Las proteínas de choque térmico (HSPs) han sido ampliamente estudiadas como moléculas chaperonas (4). En los últimos años estas proteínas han recibido una particular atención, al ser reconocidas como dianas principales por el sistema inmune de pacientes de una amplia variedad de patologías, entre ellas numerosas enfermedades infecciosas. Así, se ha descrito que proteínas HSP70 de organismos patógenos son capaces de inducir inmunoprotección (5). Sin embargo, se ha sugerido que también podrían estar involucradas en el desarrollo de procesos autoinmunes (6). Diferentes estudios han mostrado que las proteínas de choque térmico pueden interactuar con las células presentadoras de antígenos y con ello modular la respuesta inmune. Recientemente se ha descrito que la proteína HSP70 es capaz de inducir una respuesta T CD8⁺ citotóxica específica de antígeno, en presencia de macrófagos peritoneales, a través de la secreción activa de IFN- γ y TNF- α (7). En las células APCs, las proteínas de choque térmico colocalizan con las moléculas MHC de clase I en los endosomas tardíos, lo que sugiere una interacción directa entre las HSPs y las moléculas MHC (8).

La proteína HSP70 del protozoo parásito *T. cruzi* ha resultado ser un antígeno dominante en infección humana, existiendo un alto nivel de anticuerpos frente al referido antígeno en pacientes chagásicos (9). El análisis de los determinantes antigénicos de la proteína, empleando péptidos solapantes que abarcan el 92% de la secuencia proteica, indica que tanto los sueros de pacientes chagásicos como los de individuos sanos reconocen secuencias de aminoácidos específicas de la proteína HSP70. Además, se ha observado que durante la infección por *T. cruzi* la reactividad frente a estos péptidos se incrementa (10). Es de señalar, que la mayoría de los péptidos reconocidos por los sueros de los donantes sanos y de

eficacia (2) and is rather toxic. Moreover, effective immunoprophylactic regimens are non-existent. To date, there are no efficient vaccines against *T. cruzi* so the characterization of new parasite antigens capable of eliciting protective immune-responses becomes now a priority. Several evidences have shown that cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against parasite antigens are required to generate a protective immunity against *T. cruzi* infections (3).

The heat shock proteins (HSPs) have been extensively studied as chaperone molecules (4). In the last years the HSPs proteins have received particular attention since they are recognized as major target by the immune system in a large number of pathologies including infectious diseases. Thus, even the HSP70 proteins from some pathogenic organisms have been reported as capable of inducing immunoprotection (5). However, it has been also suggested that they could be involved in the development of autoimmune processes (6). In fact, several studies have indicated that antigen-presenting cells are capable of interacting with heat shock proteins and can be stimulated in order to adapt the immune response. Recently, it has been described that the HSP70 protein was able to stimulate the antigen-specific cytotoxic activity of a CD8⁺ T cell clones in the presence of peritoneal macrophages as antigen-presenting cells through the active secretion of IFN- γ and TNF- α (7). In APC cells, heat shock proteins are co-localized with MHC class I molecules in late endosomes, suggesting a direct interaction between HSPs and MHC molecules (8).

The HSP70 protein from the protozoan parasite *T. cruzi* has been found to be a dominant antigen in the human infection, existing a high antibody levels against the *T. cruzi* HSP70 antigen in chagasic patients (9). The analysis of the antigenic determinants of the protein using overlapping peptides covering 92% of the protein indicates that both the sera from chagasic patients and from healthy donors recognize specific amino acids sequences of the HSP70 protein. Moreover, it has been observed that during infection the reactivity against specific peptides increases (10). Remarkably, most of the peptides recognized by the sera of healthy donors and Chagas patients map in conserved sites of the HSP70 protein family (10). Recently we have shown that the *T. cruzi* HSP70 protein has the

los pacientes chagásicos, se localizan en sitios conservados para la familia de proteínas HSP70 (10). Recientemente, hemos mostrado que la proteína HSP70 de *T. cruzi* tiene la capacidad de estimular esplenocitos o células de nódulos linfáticos de ratones no inmunizados previamente e independiente del haplotipo. Las células que responden a la HSP70 expresan un amplio rango de citoquinas, entre ellas IFN- γ , IL-2 y TNF- α (11).

En el trabajo aquí presentado, se muestra la expresión y purificación de la proteína recombinante HSP70 de *T. cruzi* en condiciones no desnaturizantes. Además, se determinan las regiones de la proteína que podrían ser potenciales inductoras de citotoxicidad restringida a clase A2, tras inmunización de ratones transgénicos C57BL/6-A2/Kb (B6-A2/Kb) con la proteína HSP70.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonaje, expresión y purificación de la proteína recombinante HSP70 de T. cruzi. Para el clonaje de la proteína HSP70 de *T. cruzi*, la unidad genómica HSP70 es amplificada por PCR desde el DNA del fago Tc70.6 (12), utilizando los oligonucleótidos 70-U (5'-TCCTTTCTCCCTATTC-3') y 70-L (5'-CGCACACACTACGCTCTA-3'), y el producto de amplificación se clona en el vector pGEM-T (Promega). A continuación, el fragmento *DraI-SspI*, que contiene la secuencia codificante de la HSP70, se subclona en el sitio *SmaI* del vector de expresión pQE32 (Quiagen), en fase con una repetición de seis histidinas. La proteína recombinante es sobreexpresada en la cepa M15 de *E. coli* tras 3 horas de inducción a 37°C con IPTG 0,1 mM. La proteína se solubiliza tras suave sonicación en tampón fosfato 50 mM, ClNa 30 mM, SDS 0,025%, pH=8. Los extractos solubles se ajustan hasta una concentración final de ClNa 300 mM, α -mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM, Cl₂Mg 5 mM, glicerol 10%. La proteína recombinante soluble HSP70 se purifica por cromatografía de afinidad con una columna de agarosa NTA-Ni²⁺. La resina se lava con el mismo tampón a pH=8 seguido de tampón a pH=7,5. La proteína recombinante HSP70 se eluye finalmente con tampón fosfato 50 mM, ClNa 300 mM, PMSF 1 mM, Cl₂Mg 5 mM, glicerol 10%, SDS 0,025%, pH=6, y se dializa exhaustivamente frente al mismo tampón sin SDS.

capacity to stimulate splenocytes or lymph node cells from naive mice in a non-haplotype restricted way. The HSP70-responsive cells express a broad range of cytokines among which are worth mentioning IFN- γ , IL-2 and TNF- α (11).

In the present paper we show the expression and purification of the *T. cruzi* HSP70 recombinant protein in non-denaturation conditions. We have searched for potential sites in the protein that may elicit cytotoxicity in a A2-restricted way and that are susceptible of being recognized by splenocytes of C57BL/6-A2/K^b (B6-A2/K^b) transgenic mice immunized with HSP70 protein.

MATERIALS AND METHODS

Cloning, expression and purification of the T. cruzi HSP70 recombinant protein. For the cloning of the *T. cruzi* HSP70 protein, the HSP70 genomic unit was PCR-amplified from phage Tc70.6 DNA (12), using primers 70-U (5'-TCCTTTCTCCCTATTC-3') and 70-L (5'-CGCACACACTACGCTCTA-3'), and cloned in the pGEM-T vector (Promega). The *DraI-SspI* fragment containing the HSP70 coding region was subcloned in the *SmaI* site of pQE32 expression vector (Quiagen) in phase with a poly-histidine tract. The recombinant protein was overexpressed in *E. coli* M15 strain after induction for 3 hours at 37°C with 0.1 mM IPTG. The protein was solubilized in mild sonication conditions in 50 mM phosphate buffer, 30 mM NaCl, 0.025% SDS, pH=8. Soluble extracts were adjusted to reach final concentrations of 300 mM NaCl, 10 mM α -mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol. The soluble HSP70 recombinant protein was purified by Ni²⁺-NTA-agarose affinity column. The resin was washed with the same buffer at pH 8 followed by buffer at pH 7.5. The recombinant HSP70 protein was finally eluted with 50 mM phosphate buffer, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.025% SDS, pH=6, and then extensively dialyzed against the same buffer without SDS. The HSP70 protein concentration was measured by Bradford method. All purified HSP70 fractions were free of endotoxin contamination, as assessed by the E-Toxate reaction kit (Sigma).

Synthetic Peptides. A library of peptides bearing the described HLA-A2.1 binding motif (13)

La concentración de la proteína HSP70 se determina por el método de Bradford. Todas las fracciones de HSP70 purificadas se sometieron a la reacción del E-Toxate (Sigma), resultando libres de contaminación por endotoxinas.

Péptidos sintéticos. Se sintetiza una batería de péptidos que contienen los motivos descritos de unión a la molécula HLA-A2.1 (13) utilizando el método de síntesis múltiple en fase sólida (14). Los péptidos se ensamblan usando la estrategia estándar de síntesis de péptidos en fase sólida t-Boc (SPPS) sobre una resina de p-metilbenzidrilamida (MBHA) (15, 16). La pureza se comprueba por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Afinidad de la unión a HLA-A2.1. Células T2 deficientes en TAP (HLA-A2.1⁺) (17) se cargan con diferentes cantidades de péptido en medio RPMI libre de suero, suplementado con 1 µg/ml de β2 microglobulina humana (Sigma) y se incuban una noche a temperatura ambiente. Tras la incubación, las células se marcan con un anticuerpo monoclonal W6/32 (Sigma), específico para α1/α2 y dependiente de conformación. El péptido 58-66 de la matriz del virus Influenza (FLU-MA) y el péptido 335-343 del virus HB-ENV se incluyen en el ensayo como estándares internos. Los datos de afinidad se calculan según ha sido previamente descrito (18), como el porcentaje máximo de estabilización del complejo, empleando la fórmula: % de estabilización máxima = 100 X [(media de fluorescencia con péptido) - (fondo de media de fluorescencia)] / [(media de fluorescencia con 100 µM de péptido FLU-MA) - (fondo de media de fluorescencia)]. El fondo de la media de fluorescencia es el valor de fluorescencia que se obtiene cuando las células T2 se incuban en ausencia de antígeno y en las mismas condiciones.

Inmunización de los ratones. La cepa transgénica de ratón C57BL/6-A2/K^b (19) fue proporcionada por Dr. Linda Sherman (Scripps Laboratories, San Diego, CA). Hembras de edad comprendida entre las 6-8 semanas se inmunizan por triplicado con 100µg del péptido p30 del toxoide del tétano, emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) 1:1 (v:v). Después de 3 semanas los ratones se inmunizan con la misma mezcla añadiendo 10 µg de la proteína recombinante HSP70. A los 10 días de la inmunización con HSP70 los animales son sacrificados mediante anoxia con CO₂ y las células de

was synthesized by simultaneous multiple-peptide solid-phase synthetic method (14). The peptides were assembled using the standard t-Boc solid phase peptide synthesis (SPPS) strategy on a p-methylbenzhydrylamide (MBHA) resin (15, 16). Purity was checked by high performance liquid chromatography (HPLC).

HLA-A2.1 binding affinity. TAP-deficient T2 cells (HLA-A2.1⁺) (17) were loaded with different quantities of peptide in serum-free RPMI medium supplemented with 1 µg/ml of human β2 microglobulin (Sigma) and incubated overnight at room temperature. After incubation, cells were stained with the conformational dependent α1/α2-specific W6/32 monoclonal antibody (Sigma). The Influenza virus matrix₅₈₋₆₆ peptide (FLU-MA) and the HB-ENV₃₃₅₋₃₄₃ peptide were included in the assay as internal standards. Affinity data were calculated as percentage of maximum complex stabilization as described (18) using the formula: % of maximal stabilization = 100 x [(mean fluorescence with peptide) - (background mean fluorescence)] / [(mean fluorescence with 100 µM FLU-MA peptide) - (background mean fluorescence)]. Background mean fluorescence means the fluorescence value obtained with T2 cells incubated without antigen.

Mice immunization. C57BL/6-derived A2/K^b transgenic mouse strain (19) provided by Dr. Linda Sherman (Scripps Laboratories, San Diego, CA) was used. 6-8 weeks old females were immunized in triplicate with 100µg of tetanus toxoid p30 peptide emulsioned with IFA 1:1 (v:v). After three weeks the mice were immunized with the same mixture adding 10 µg of the HSP70 recombinant protein. Ten days after HSP70 immunization animals were sacrificed by CO₂ anoxia. The lymph node cells were collected and washed twice with RPMI 1640 medium (RPMI).

CTL assay. Murine EL-4 lines stably transfected with the A2/K^b transgene were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 0.6 mg/ml G418. Lymph node cells of immunized mice were grown in RPMI medium supplemented with 10 U/ml recombinant murine (rm) IL-2 (Sigma) and 10 ng/ml of rmIL-7 (R&D) at concentration of 2x10⁶ cells /ml. Six days later, CTL activity against EL-4/A2-K^b cells loaded with 1 mM of the different peptides was monitored with a four hours chromium release assay as described (20). Samples were included in

los nódulos linfáticos se recogen y se lavan 2 veces con medio RPMI 1640 (Gibco).

Ensayo CTL. La línea celular murina EL-4, transfectada establemente con el transgen A2/K^b se mantiene en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino inactivado FCS 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y 0,6 mg/ml de antibiótico G418. Las células de nódulos linfáticos de los ratones inmunizados se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con 10 U/ml de IL-2 recombinante murina (Sigma) y 10 ng/ml de IL-7 recombinante murina (R&D), a una concentración de 2×10^6 células /ml. Seis días más tarde, la actividad CTL frente a células EL-4/A2-K^b cargadas con diferentes péptidos a 1 mM se monitoriza en el ensayo de liberación de cromo de 4 horas, tal y como se ha descrito (20). Las muestras se incluyen por duplicado siendo la desviación estándar entre duplicados menor del 10% en todos los casos. Los resultados se expresan como el porcentaje de lisis según la fórmula: % lisis = 100 X (liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación total - liberación espontánea).

RESULTADOS

Expresión y purificación de la proteína recombinante HSP70 de *T. cruzi*. Mediante PCR a partir de DNA del fago que contiene el locus *HSP70* de *T. cruzi*, se obtiene el fragmento de DNA de 2.3 Kb que codifica para la proteína HSP70 (Figura 1A) y se introduce en el plásmido pQE32 digerido con la enzima *Sma*I. El fragmento clonado comienza en la primera metionina de la proteína HSP70. Así, el plásmido pQE70 resultante contiene corriente arriba del gen *HSP70*, la secuencia de DNA que codifica para 6 residuos de histidina y la señal *lacO* que permite la sobreexpresión de la proteína recombinante en respuesta a IPTG. La figura 1B muestra el patrón de proteínas obtenido en la cepa M15 de *E. coli* transformada con el vector recombinante pQE70. El análisis en geles de SDS/PAGE de los extractos proteicos totales bacterianos revela la presencia de una banda teñida intensamente de aproximadamente 75 kDa, que se corresponde con la proteína recombinante HSP70 sobreexpresada (Figura 1B, línea 1). Las líneas F4 a F7 de la figura 1B, muestran las bandas resultantes de la purificación de la proteína recombinante

duplicate, being the standard deviations between duplicates in all assays lower than 10%. Results were expressed as percentage of lysis using the formula: % lysis = 100 x (experimental release - spontaneous release) / (total release - spontaneous release).

RESULTS

Expression and purification of *T. cruzi* recombinant HSP70 protein. A 2.3 kb DNA fragment coding for the *T. cruzi* HSP70 protein was obtained by PCR amplification from a phage containing the *T. cruzi* *HSP70* loci (Figure 1A). The fragment containing the HSP70 coding sequence was further subcloned into the *Sma*I-digested pQE32 plasmid. The cloned fragment starts at the first methionine of the *HSP70* gene. Thus, the resulting pQE70 plasmid contains, upstream of the *HSP70* gene, the DNA sequence coding for six histidine residues and the *lacO* signal that allows the overexpression of the recombinant protein in response to IPTG induction. Figure 1B shows the protein profile obtained in an *E. coli* M15 strain transformed with the recombinant pQE70 vector. SDS/PAGE analysis from total extracts from bacteria transformed with the recombinant pQE70 vector revealed the presence of an intensely stained band of approximately 75 kDa which corresponds to the overexpressed of the HSP70 recombinant protein (Figure 1B, lane 1). In Figure 1B, lanes F4 to F7 we show the SDS/PAGE band resulting from purification of the HSP70 recombinant protein after passing the soluble fraction of total expressed proteins (Figure 1B, lane 2) through a Ni²⁺ affinity chromatography column. Thus, the purified HSP70 protein is observed as an unique stained band of approximately 75 kDa in accordance to the expected size of the recombinant protein. The protein's purity was higher than 95% as assessed by Coomassie Blue staining.

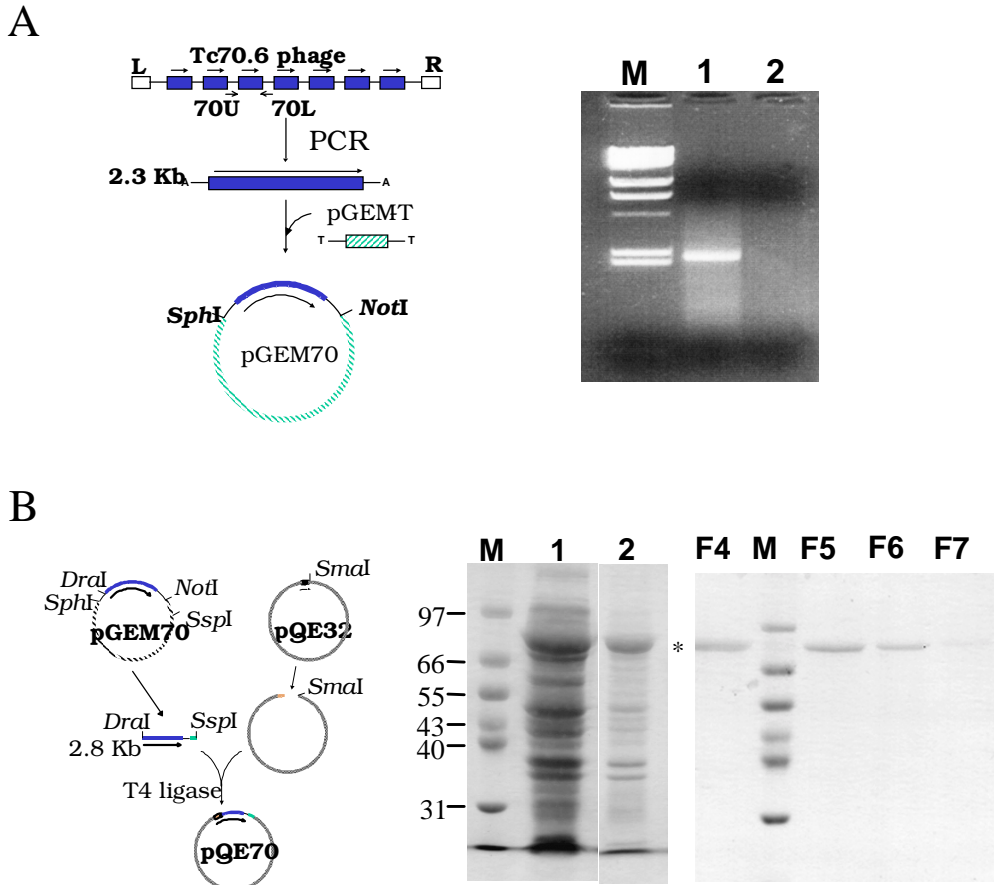
Binding assays of HSP70 peptides to HLA-A2.1 molecule. The sequence of *T. cruzi* HSP70 protein was analyzed in order to identify sequences bearing binding motifs to the HLA-A2.1 molecule (13). 31 motifs were selected and the corresponding peptides synthesized (see, Figure 2). In order to analyze the affinity of the synthesized peptides to the MHC class I molecule we studied the capability of these peptides for bin-

HSP70 después de pasar la fracción soluble de proteínas totales (Figura 1B, línea 2) por una columna de agarosa-Ni²⁺. La proteína HSP70 purificada se observa como una única banda de aproximadamente 75 kDa, lo que está de acuerdo con el tamaño esperado para la proteína recombinante. La pureza de la proteína observada tras coloración con azul de Coomassie fue mayor del 95%.

ding HLA-A2.1 expressing T2 cells. The HB-ENV and the FLU-MA peptides were included in the assays as internal references. As shown in Figure 3, when compared with the standard peptides, six peptides (12777, 12778, 12780, 12782, 12783 and 12788) showed high A2.1 affinity. Moreover, eight peptides (12762, 12764, 12765, 12772, 12773, 12774, 12775 and 12779) presented an intermediate affinity (with binding values of approximately 50 to 80 %).

FIGURE 1.- Cloning purification of HSP70 protein. (A) PCR amplification and cloning of *T. cruzi* HSP70 coding region. HSP70 genomic unit was PCR-amplified as described in *Materials and Methods*, and cloned into pGEM-T vector. M, molecular weight marker (*Hind*III digested lambda gt11 phage DNA). 1, PCR amplification of HSP70 genomic unit. 2, negative PCR control, Lambda gt11 phage DNA. (B) Cloning of HSP70 coding fragment in pQE32 expression vector and purification of the recombinant protein. M, molecular weight marker. 1, total extracts of bacteria transformed with pQE70 vector after IPTG induction. 2, soluble extracts. F4 to F7, HSP70 purify fractions obtained after purification trough Ni²⁺ chromatography column.

FIGURE 1.- Cloning purification of HSP70 protein. (A) PCR amplification and cloning of *T. cruzi* HSP70 coding region. HSP70 genomic unit was PCR-amplified as described in *Materials and Methods*, and cloned into pGEM-T vector. M, molecular weight marker (*Hind*III digested lambda gt11 phage DNA). 1, PCR amplification of HSP70 genomic unit. 2, negative PCR control, Lambda gt11 phage DNA. (B) Cloning of HSP70 coding fragment in pQE32 expression vector and purification of the recombinant protein. M, molecular weight marker. 1, total extracts of bacteria transformed with pQE70 vector after IPTG induction. 2, soluble extracts. F4 to F7, HSP70 purify fractions obtained after purification trough Ni²⁺ chromatography column.



Ensayos de unión de los péptidos de la HSP70 a la molécula HLA-A2.1. La secuencia de la proteína HSP70 de *T. cruzi* fue analizada con el fin de identificar regiones que contuvieran los motivos de unión a la molécula HLA-A2.1 (13). 31 epítopes diferentes conteniendo motivos A2 fueron seleccionados y los péptidos correspondientes sintetizados (ver Figura 2). Para analizar la afinidad de los péptidos sintetizados a la molécula MHC de clase I, estudiamos la capacidad de referidos péptidos para unirse a la molécula HLA-A2.1 de las células T2. Los péptidos HB-ENV y FLU-MA se incluyeron en los ensayos como referencias internas. Como mostramos en la figura 3, seis péptidos perteneciente a la proteína HSP70 (12777, 12778, 12780, 12782, 12783 y 12788) muestran similares porcentajes de unión a la molécula A-2.1 que los péptidos control. Además, ocho péptidos (12762, 12764, 12765, 12772, 12773, 12774, 12775 y 12779) presentan una afinidad intermedia (con valores de afinidad de unión de aproximadamente el 50 al 80%).

CTL response in immunized mice. In order to analyze the capability of the *T. cruzi* HSP70 to elicit a specific CTL response, A2/K^b transgenic mice were immunized with the HSP70 recombinant protein in the presence of the tetanus toxoid p30 peptide. As target cells we used EL4-A2/K^b cells loaded separately with HSP70 peptides exhibiting different binding affinities to the HLA-A2.1 molecule (see Figure 3). Ten days after the HSP70 immunization the animals were sacrificed and a suspension of lymph node cells were used as effector cells in CTL assays. As seen in Figure 4, the lymph node cells from the mice immunized with the HSP70 protein recognize the target cells pulsed with the 12772, 12773 and 12779 peptides inducing cellular lysis percentages between 10 and 15%. These peptides correspond to intermediate HLA-A2.1 binding affinity peptides. Interestingly, they have a low homology percentage (62, 52 and 62%, respectively) when compared with their homologous sequences in the human and mouse HSP70 proteins.

FIGURA 2.- Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de *T. cruzi* (tchsp70), HSP70 humana (humhsp70) y HSP70 de ratón (mushsp701); números de registro en el GENE BANK X13690, M11717, M35021, respectivamente. El alineamiento de la referidas secuencias ha sido realizado usando el programa PILEUP. En cursiva indicamos la secuencia consenso para las HSP70 representadas. Los números situados a la izquierda y derecha de cada bloque de homología indican la posición de aminoácidos en la HSP70 de *T. cruzi*. Los péptidos sintéticos correspondientes a motivos teóricos de unión a la molécula HLA-A2.1 presentes en la proteína HSP70 de *T. cruzi* se encuentran subrayados e identificados por los números 12759 al 12789.

FIGURE 2.- Comparison of amino acid sequences of the *T. cruzi* HSP70 (tchsp70), human HSP70 (humhsp70) and mouse HSP70 (mushsp70); accession numbers X13690, M11717, M35021, respectively. The alignment of the proteins was performed using the PILEUP program. In italic is indicated the HSP70 consensus sequence of the compared proteins. The numbers at the right- and left-hand sides indicate the amino acid position in the *T. cruzi* HSP70 containing theoretical HLA-A2.1 binding motifs are underlined and identified by numbers (12759 to 12789).

	1		50
<i>Consenso</i>	<i>-M----</i>	<i>A-GI DLGTTYSCVG V-Q---VEII ANDQGNRTTP SYVAF</i>	<i>TD-ER</i>
{mushsp701}	~MAKNTAIGI	DLGTTYSCVG VFQHGKVEII ANDQGNRTTP	SYVAFDTER
{humhsp70}	~MAKAAAVGI	DLGTTYSCVG VFQHGKVEII ANDQGNRTTP	SYVAFDTER
{tchsp70}	~MTYEGAIGI	DLGTTYSCVG VWQNERVEII ANDQGNRTTP	SYVAFDTSER
			_____12759
	51		100
<i>Consenso</i>	<i>LIGDAAKNQV A-NP-NTVFD AKRLIGRKF-</i>	<i>D-VVQSDMKH WPF-V---</i>	<i>G-</i>
{mushsp701}	LIGDAAKNQV ALNPQNTVFD AKRLIGRKF	DAVVQSDMKH WPFQVNDG.	
{humhsp70}	LIGDAAKNQV ALNPQNTVFD AKRLIGRKF	DPVVQSDMKH WPFQVINDG.	
{tchsp70}	LIGDAAKNQV AMNPRNTVFD AKRLIGRKF	DPVVQSDMKH WPFKVI	TKGD
	_____12760	_____12761	_____12762 _____12763

	101		150
<i>Consenso</i>	<i>DKP--QV---</i>	<i>GE---F-PEE</i>	<i>-SSMVL-KMK EIAE-YLG-- V--AV-TVPA</i>
{mushsp701}	DKPKVQVNYK	GESRSFFPEE	ISSMVLTKMK EIAEAYLGHP VTNNAVITVPA
{humhsp70}	DKPKVQVSYK	GETKAFYPEE	ISSMVLTKMK EIAEAYLGYP VTNNAVITVPA
{tchsp70}	DKPVIQVQFR	GETKTFNPEE	VSSMVL SKMK EIAESYLGKQ VVKAVTVPA
		12764	12765
			12766
	151		200
<i>Consenso</i>	<i>YFNDSQRQAT KDAG-IAGL-</i>	<i>VLRIINEPTA AAIAYGLD-- ---K-ERNVL</i>	
{mushsp701}	YFNDSQRQAT KDAGVIAGLN	VLRIINEPTA AAIAYGLDRT G..KGERNVL	
{humhsp70}	YFNDSQRQAT KDAGVIAGLN	VLRIINEPTA AAIAYGLDRT G..KGERNVL	
{tchsp70}	YFNDSQRQAT KDAGTIAGLE	VLRIINEPTA AAIAYGLDKV EDGK.ERNVL	
	12767	12768	12769
			12770
	201		250
<i>Consenso</i>	<i>IFDLGGGTFD V--LTID-GI</i>	<i>FEVKAT-GDT HLGGEDFDNR LV-HF--EFK</i>	
{mushsp701}	IFDLGGGTFD VSILTIDDGI	FEVKATAGDT HLGGEDFDNR LVSHFVEEFK	
{humhsp70}	IFDLGGGTFD VSILTIDDGI	FEVKATAGDT HLGGEDFDNR LVNHFVEEFK	
{tchsp70}	IFDLGGGTFD VTLLTIDGGI	FEVKATNGDT HLGGEDFDNR LVAHFTDEFK	
	12771	12772	
	251		300
<i>Consenso</i>	<i>RK-K-KD-S- N-RA-RRRLRT</i>	<i>ACERAKRTLS S--QA--EID -LF---DF--</i>	
{mushsp701}	RKHK.KDISQ NKRAVRRRLRT	ACERAKRTLS SSTQASLEID SLFEGIDFYT	
{humhsp70}	RKHK.KDISQ NKRAVRRRLRT	ACERAKRTLS SSTQASLEID SLFEGIDFYT	
{tchsp70}	RKNKGKDLST NLRALRRLRT	ACERAKRTLS SAAQATIEID ALFDNVDFQA	
	12773	12774	
	301		350
<i>Consenso</i>	<i>-ITRARFEEL C--LFR-TL-</i>	<i>PVE--L-DAK -DK---HD-V LVGGSTRIPK</i>	
{mushsp701}	SITRARFEEL CSDLFRGTL	PVEKALRDAK MDKAQIHDLV LVGGSTRIPK	
{humhsp70}	SITRARFEEL CSDLFRSTLE	PVEKALRDAK LDKAQIHDLV LVGGSTRIPK	
{tchsp70}	TITRARFEEL CGELFRGTLQ	PVERVLQDAK MDKRAVHDVV LVGGSTRIPK	
	12775	12776	12777
			12778
	351		400
<i>Consenso</i>	<i>V--L--DFF- G--L-KSI-P</i>	<i>DEAV-YGAAV QA-IL-G-KS -----LLLLL</i>	
{mushsp701}	VQKLLQDFFN GRDLNKSINP	DEAVAYGAAV QAAILMGDKS ENVQDLLLLL	
{humhsp70}	VQKLLQDFFN GRDLNKSINP	DEAVGYGAAV QAAILMGDKS ENVQDLLLLL	
{tchsp70}	VMQLVSDFFR GKELKKSQIP	DEAVAYGAAV QAFILTGKKS KQTEGLLLLLL	
	12779		
	401		450
<i>Consenso</i>	<i>V-PL-LG-ET AGGVMT-LIK</i>	<i>RN-TIPTK-- Q-F-TY-DNQ PGV-IQV-EG</i>	
{mushsp701}	VAPLSLGLLET AGGVMTALIK	RNSTIPTKQT QTFTTYSDNQ PGVLIQVYEG	
{humhsp70}	VAPLSLGLLET AGGVMTALIK	RNSTIPTKQT QIFTTYSDNQ PGVLIQVYEG	
{tchsp70}	VTPLTLGIET AGGVMTSLIK	RNTTIPTKKS QIFSTYADNQ PGVHIQVFEQ	
	12780	12781	

del 10 al 15%. Estos péptidos se corresponden con péptidos de afinidad de unión intermedia a la molécula HLA-A2.1. Interesantemente, estos péptidos muestra tener un bajo porcentaje de homología (62, 52 y 62% respectivamente) con sus homólogos en las proteínas HSP70 humana y de ratón.

explored the possible existence of class I-restricted epitopes contained in the *T. cruzi* HSP70 protein. Affinity assays of different *T. cruzi* HSP70 peptides containing theoretical binding motifs to the HLA-A2.1 molecule (13) have shown the existence of various peptides with high or medium binding affinity. Thus, fourteen out of thir-

FIGURE 3.- T2 binding affinity assay of HSP70-derived peptides bearing HLA-A2.1 binding motif. Peptides were used at a concentration of 50µg/ml, and binding percentage was calculated using as a reference the fluorescence index obtained with FLU-MA₅₈₋₆₆ peptide. HB represents the Hepatitis B virus-derived ENV₃₃₅₋₃₄₃ peptide.

FIGURE 3.- T2 binding affinity assay of HSP70-derived peptides bearing HLA-A2.1 binding motif. Peptides were used at a concentration of 50µg/ml, and binding percentage was calculated using as a reference the fluorescence index obtained with FLU-MA₅₈₋₆₆ peptide. HB represents the Hepatitis B virus-derived ENV₃₃₅₋₃₄₃ peptide.

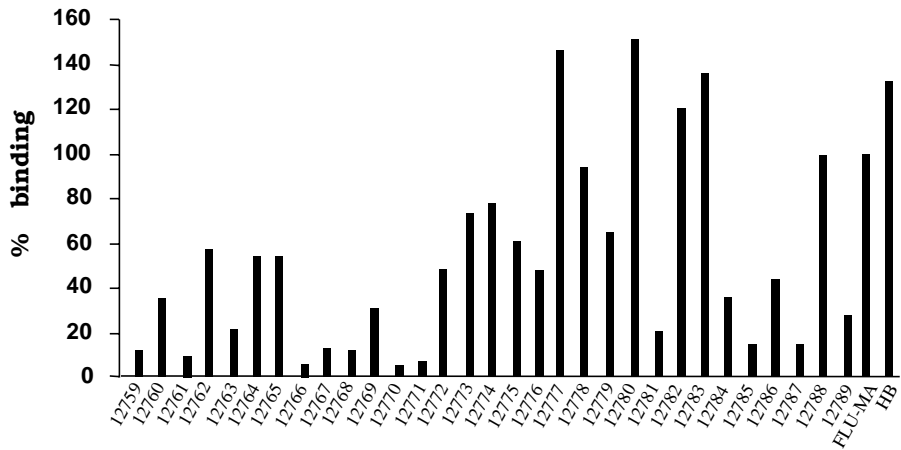
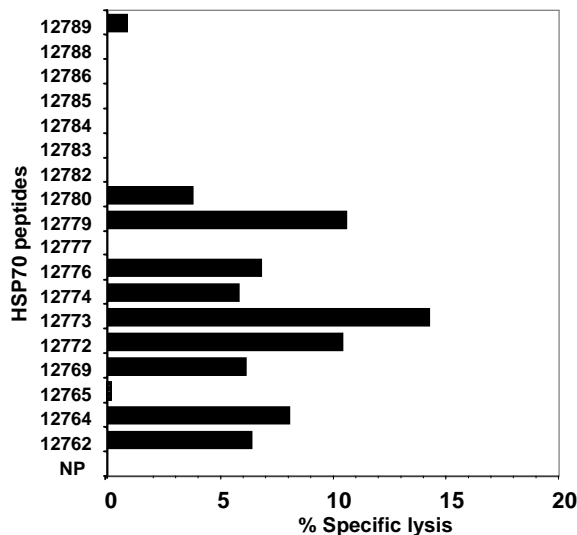


FIGURE 4.- CTL activity induction by inoculation of the recombinant protein HSP70. After immunization, as described in *Material and Methods*, lymph node cells were used in a chromium release assay using EL4-A2/K^b cells pulsed with 1µM of peptide. NP, target cells without peptide.

FIGURE 4.- CTL activity induction by inoculation of the recombinant protein HSP70. After immunization, as described in *Material and Methods*, lymph node cells were used in a chromium release assay using EL4-A2/K^b cells pulsed with 1µM of peptide. NP, target cells without peptide.



DISCUSIÓN

En los últimos años ha sido descrito que la HSP70 está implicada en un gran número de procesos bioquímicos e inmunológicos. De hecho, la HSP70 ha sido descrita como un fuerte inmunógeno (22) capaz de actuar como estimulador del sistema inmune a varios niveles (23), siendo particularmente eficiente en la activación de CD8⁺ (24). Recientemente, ha sido mostrado que animales inmunizados con la proteína HSP70 de *M. tuberculosis* es capaz de activar una respuesta CTL específica frente a un antígeno fusionado covalentemente a la proteína (8). En el contexto de la enfermedad de Chagas, ha sido recientemente descrito que la identificación de dianas que induzcan una respuesta citotóxica frente a las células infectadas por *T. cruzi* sería crucial para el diseño racional de una vacuna frente a este parásito (25). En el presente estudio, analizamos la posible existencia de epítopes restringidos a clase I contenidos en la proteína HSP70 de *T. cruzi*. Los ensayos de afinidad de los péptidos con motivo de unión a la molécula presentadora de clase I HLA-A2.1 mostraron que la proteína HSP70 contiene varios péptidos con capacidad para unirse con alta o media afinidad al elemento de restricción elegido. Así, catorce péptidos de la serie de treinta y uno ensayada por poseer motivos teóricos de unión a HLA-A2.1 presentan una afinidad biológicamente significativa por la referida molécula presentadora. Dada la relación demostrada entre la afinidad de unión por moléculas HLA de clase I e inmunogenicidad de específicos péptidos (21) nuestros datos sugieren la posibilidad de que la proteína HSP70 pueda ser usada como diana para la inducción de actividad CTL. Resulta llamativo que alguno de los péptidos que muestran una alta afinidad de unión a la molécula HLA-A2.1 tienen una relativa baja identidad con la secuencia consenso de las proteínas HSP70 de eucariotas.

Interesantemente, el análisis de la respuesta CTL inducida tras la inmunización de ratones transgénicos A2/K^b con la proteína recombinante HSP70 de *T. cruzi*, indican que esta proteína tienen *in vivo* capacidad de inducir una respuesta inmune CTL, reconociendo células EL4-A2/K^b cargadas con tres péptidos correspondientes a motivos de unión A2 presentes en la proteína. Los péptidos reconocidos están localizados en la región central de la proteína y presentan una

ty one potential HLA-A2.1-binding peptides have significant binding affinity to the presenting molecule. Since it has been described that there is a relationship between binding affinity for HLA class I molecules and immunogenicity of peptide epitopes (21) our data suggest the possibility that the *T. cruzi* HSP70 could be used as target for the induction of CTL activity. It should be stressed that some of the peptides which have high binding affinity to the HLA-A2.1 molecule have a relative low sequence identity with the consensus sequence of HSP70 proteins.

Interestingly, the analysis of the CTL responses induced in A2/K^b transgenic mice after immunization with the purified *T. cruzi* HSP70 recombinant protein indicated that the *T. cruzi* HSP70 protein has *in vivo* the ability to elicit a CTL immune response recognizing EL4-A2/K^b cells loaded with three peptides corresponding to A2-binding motifs present in the protein. The recognized peptides are located in the central region of the protein and present a homology lower than 62% relative to the human and mice HSP70 proteins. We took advantage of the HLA-transgenic mice expressing the chimerical A2/K^b class-I molecule, since the hybrid molecule contains α -1 and α -2 domains of human HLA-A2.1 molecule and α -3 domain of murine H-2K^b. This humanized molecule allows the binding of HLA-A2.1-restricted epitopes and an optimal interaction with β -2 microglobulin and the CD8 co-receptor in the mouse. In this model, it has been shown that human and mice T cells repertoire against HLA-A2.1 restricted epitopes are almost wholly overlapped (26). Moreover, HLA-A2.1 molecule is the most common HLA allele in people living in endemic areas of Chagas' disease (27).

At this moment the data reported about the existence of *T. cruzi* antigens which may be presented by human HLA-class I are very scarce, although some studies in mice has led to the identification of epitopes recognized by T lymphocytes with ability to lysis infected cells (28,29). The results showed in this paper indicate that there is possible that the *T. cruzi* HSP70 protein could be a target for CTL activity and induction of protection. However, a detailed understanding of the role that the HSP70 specific CTL response could be playing in the control of the parasite infection would require further extensive studies.

homología de secuencia menor al 62% con las correspondientes HSP70 humana y de ratón. El uso de los ratones transgénicos para el gen quimérico A2/K^b permite estudiar el reconocimiento de antígenos en el contexto de moléculas de histocompatibilidad humanas utilizando modelos murinos. Estos ratones expresan en la superficie de sus células una molécula presentadora de clase I con el dominio intracelular y α_3 correspondientes a la molécula H2-K^b de ratón, y los dominios α_1 y α_2 de la molécula presentadora humana A2.1. De esta forma se consigue que los ratones que expresan este gen quimérico presenten un repertorio de péptidos semejante al de un individuo positivo para HLA-A2.1 y al mismo tiempo se obtiene una óptima interacción entre la molécula presentadora y el co-receptor CD8 murino, que hace posible una activación eficaz del linfocito T citotóxico. En este modelo, ha sido mostrado que el repertorio de epítopes restringidos a la molécula HLA-A2.1 generados frente a células T humanas y de ratón está frecuentemente sobrelapados (26). Además, la molécula presentadora de clase I HLA-A2.1 presenta una alta frecuencia en la población de las zonas endémicas para la enfermedad de Chagas (27).

Actualmente, los datos reportados acerca de la existencia de antígenos de *T. cruzi* que puedan ser presentados por moléculas HLA de clase I de humanos son muy escasos. Sin embargo, algunos estudios en ratones han permitido la identificación de epítopes reconocidos por linfocitos T con capacidad de lisar células infectadas (28,29). Los resultados mostrados en este manuscrito indican que la proteína HSP70 de *T. cruzi* es una posible diana de actividad CTL y consecuentemente una potencial inductora de protección. Un mayor conocimiento del papel que puede jugar en el control de la infección del parásito la respuesta CTL específica de la HSP70 observada requerirá futuros estudios.

AGRADECIMIENTOS/ACKNOWLEDGMENTS

El presente trabajo ha sido financiado por los proyectos BIO96-0468 y 1FD1997-0630-C02-01 del Plan Nacional I+D - FEDER (DGESIC), España. Los autores agradecen al Dr. P. Romero la cesión de las células T2 y EL4-A2/K^b y a la Dra. L. Sherman la cesión de la cepa de ratón transgénica C57BL/6-A2.1/K^b.

This work was supported by grants BIO96-0468 and 1FD1997-0630-C02-01 from the Plan Nacional I+D – FEDER (DGESIC), Spain. The authors thank the following for providing us with some of the materials used in this study: Dr. P. Romero for the T2 and EL4-A2/K^b cells and Dr. L. Sherman for the C57BL/6-A2.1/K^b mouse strain.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- 1 Marsden PD. American trypanosomiasis. In: Cook GC (ed) Manson's tropical disease. Saunders, London, pp.1197-1212.
- 2 de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet 1996; 348: 1407-1413.
- 3 Tarleton RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 1990; 144: 717-724.
- 4 Henics T, Nagy E, Oh HJ, Csermely P, von Gabain A, Subjectk JR. Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. J Biol Chem 1999; 274: 17318-17324.
- 5 Tascón RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. Nature Medicine 1996; 2: 888-892.
- 6 Salvetti M, Ristori G, Buttinelli C, Fiori P, Falcone M, Britton W, et al. The immune response to mycobacterial 70-KDa heat shock proteins frequently involves autoreactive T cells and is quantitatively dysregulated in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 1996; 65: 143-153.
- 7 Breloer M, Fleischer B, von Vonin A. *In vivo* and *in vitro* activation of T cells after administration of Ag-negative heat shock proteins. J Immunol 1999; 162: 3141-3147.
- 8 Suzue K, Zhou X, Eisen HN, Young RA. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 13146-13151.
- 9 Engman DM, Dragin EA, Donelson JE. Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol 1990; 144: 3987-3991.
- 10 Requena JM, Soto M, Guzman F, Maekelt A, Noya O, Patarroyo ME et al. Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals. Mol Immunol 1993; 30(12): 1115-1121.
- 11 Marañón C, Planelles L, Alonso C, López MC. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. Int Immunol 2000; 12: 1685-1693.
- 12 Requena JM, Jiménez A, Soto M, Assiego R, Santaren JF, López, MC et al. Regulation of HSP70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. Mol Biochem Parasitol 1992; 53: 201-212.
- 13 Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs: First listing. Immunogenetics 1995; 41:178-228.
- 14 Sarin VK, Tam JP, Merrifield RB. Quantitative monitoring of solid phase peptide system by the ninhydrin reaction. Ann Biochem 1981; 117: 147-157.
- 15 Houghten RA. General method for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen antibody interaction at the level of individual amino acids. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 5131-5135.
- 16 Puentes F, Guzmán F, Marín V, Alonso C, Patarroyo ME, Moreno A. *Leishmania*: Fine mapping of the leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization. Exp Parasitol 1999; 93: 7-22.
- 17 Zweerink HJ, Gammon MC, Utz U, Sauma SY, Harrer T, Hawkins JC, et al. Presentation of endogenous peptides to MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in transport deletion mutant T2 cells". J Immunol 1993; 150: 1763-1771.
- 18 Pogue RR, Eron J, Frelinger JA, Matsui M. Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and *in vitro* immunogenicity. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 8166-8170.
- 19 Vitiello A, Marchersini D, Furze J, Sherman LA, Chesnut RW. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic response in transgenic mice carrying a chimeric human-murine class I major histocompatibility complex. J Exp Med 1991; 173(4): 1007-1015.
- 20 Men Y, Miconnet I, Valmori D, Rimoldi D, Cerottini JC, Romero P. Assessment of immunogenicity of human Melan-A peptide analogues in HLA-A*0201/K^b transgenic mice. J Immunol 1999; 162: 3566-3573.
- 21 Sette A, Vitiello A, Reheman B, Fowler P, Nayersina R, Kast WM, et al. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. J Immunol 1994; 153(2): 5586-5592.
- 22 Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade K. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. Immunity 1998; 8: 657-665.

- 23 Schild H, Arnold-Schild D, Lammert E, Rammensee HG. Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(1): 109-113.
- 24 Anthony LSD, Wu H, Sweet H, Turnnir C, Boux LJ, Mizzen LA. Priming of CD8⁺ CTL effector cells in mice by immunization with a stress protein-influenza virus nucleoprotein fusion molecule. *Vaccine* 1999; 17: 373-383.
- 25 Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 1998; 20: 207-216.
- 26 Wentworth PA, Vitiello A, Sidney J, Keogh E, Chesnut RW, Grey H, et al. Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice. *Eur J Immunol* 1996; 26: 97-101.
- 27 Krausa P, Brywka M^{3rd}, Savage D, Hui KM, Bunce M, Ngai JLF, et al. Genetic polymorphism within HLA-A*02: significant allelic variation revealed in different populations. *Tissue Antigens* 1995; 45: 223-231.
- 28 Nickell SP, Stryker G, Arevalo C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J Immunol* 1993; 150: 1446-1457.
- 29 Low HP, Santos MAM, Wizel B, Tarleton RL. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8⁺ CTL. *J Immunol* 1998; 160: 1817-1823.