

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Departamento de Bioquímica

**Isolamento e caracterização de clones da família de  
glicoproteínas (Tc-85) de *Trypanosoma cruzi***

Débora Rose de Oliveira

Dissertação de Mestrado

Orientadora:  
Profa. Maria Júlia Manso Alves

São Paulo  
2000

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48i Oliveira, Débora Rose de  
Isolamento e caracterização de clones da família de glicoproteínas (Tc-85) de *Trypanosoma cruzi* / Débora Rose de Oliveira. -- São Paulo, 2000.  
60p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Alves, Maria Júlia Manso

1. Biologia molecular 2. Bioquímica I. T. II. Alves, Maria Júlia Manso. orientador.

574.88 CDD

**Ísolamento e Caracterização de Clones da  
Família de Glicoproteínas (Tc-85) de  
*Trypanosoma cruzi*.**

***DÉBORA ROSE DE OLIVEIRA***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS - ÁREA: BIOQUÍMICA

**Aprovada por:**

---

**Prof. Dra. MARIA JÚLIA MANSO ALVES**  
**(Orientadora e Presidente)**

---

**Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO**  
**IQ - USP**

---

**Prof. Dr. ARMANDO MORAIS VENTURA**  
**ICB – USP**

**SÃO PAULO**  
**23 DE NOVEMBRO DE 2000.**

*Dedico com muito amor a Wolmar Rose de Oliveira  
e Moisés de Oliveira, meus pais.*

Trabalho realizado no Laboratório de Bioquímica de Parasitas  
Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de São Paulo  
Universidade de São Paulo, SP, Brasil

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves, minha orientadora, pelo incentivo e apoio nos momentos árduos dos experimentos do Laboratório e também dos experimentos da vida.

Ao Prof. Dr. Walter Colli, pelo apoio e pelo bom humor que sempre eleva nosso espírito.

Ao Dr. Ricardo Giordano que me iniciou nos primeiros passos desta ciência.

A todos os amigos do Laboratório: Célia, Roberto, Marinei, Marinez, Luiz, Renata, Myriam, Maga, Henning e Jorge pelo carinho e atenção.

Aos amigos dos outros laboratórios do Instituto pela ajuda e pelas dicas.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

## Índice

	página
Índice.....	i
<i>Curriculum vitae</i> .....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Abreviaturas.....	ix
Código de aminoácidos.....	x
1. Introdução.....	1
Figura 1.....	2
1.1. Interação parasita-célula hospedeira.....	4
1.2. Família das trans-sialidases.....	6
Tabela 1.....	8
1.3. Família trans-sialidase símile.....	9
Figura 2.....	10
1.4. Moléculas envolvidas na invasão do parasita.....	11
2. Objetivos.....	16
3. Material e Métodos.....	16
3.1.Obtenção de parasitas.....	16
3.2. Extração de RNA total.....	16
3.3. Extração de mRNA.....	17
3.4. Oligonucleotídeos utilizados no PCR.....	18
3.5. Preparação do cDNA.....	18

3.6. PCR para obtenção do cDNA de Tc-85.....	19
3.7. Preparação de bactérias competentes com cloreto de cálcio.....	19
3.8. Preparação de células para eletroporação ( <i>E. coli</i> DH10B).....	20
3.9. Biblioteca de cDNA de Tc-85.....	21
Figura 4.....	22
3.10. Reação de ligação e transformação.....	23
3.11. Mini-preparações de DNA plasmidial.....	23
3.12. Digestão dos clones purificados e análise de restrição.....	23
3.13. PCR dos clones (preparação para a análise de restrição utilizando SAU 3AI).....	24
3.14. Análise de restrição dos clones sequenciados.....	24
Figura 3.....	25
3.15. Preparação de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	26
3.16. Amplificação em larga escala e purificação do pPROEX-1.....	26
3.17. Digestão do pPROEX-1 com Ehe I.....	27
3.18. Purificação dos produtos de PCR.....	27
3.19. Transformação de bactérias competentes (DH5 $\alpha$ ).....	27
3.20. Controle das etapas para a construção da biblioteca genômica no vetor pPROEX-1.....	28
3.21. Utilização de SureClone™Ligation Kit.....	29
3.22. Reação de ligação pPROEX-1 com o fragmento de PCR.....	30
3.23. Sequenciamento de DNA.....	30



3.24. Transformação e expressão.....	31
3.25. Eletroforese (SDS-PAGE unidimensional).....	32
3.26. Western blot.....	33
4. Resultados e Discussão.....	35
4.1. Biblioteca genômica de Tc-85.....	35
Figura 5.....	35
Figura 6.....	36
Tabela 2.....	37
4.2. Biblioteca genômica da família das gp85/trans-sialidase.....	39
4.3. Biblioteca de cDNA.....	41
Figura 7.....	42
Figura 8.....	43
4.4. Sequenciamento de DNA.....	43
4.5. Expressão das proteínas de fusão.....	44
4.6. Análise por Western blot.....	45
4.7. Considerações finais.....	46
Figura 9.....	50
Figura 10.....	51
Figura 11.....	52
Figura 12.....	53
5. Bibliografia.....	54

## ***Curriculum vitae***

Débora Rose de Oliveira

Nascida em 22 de abril de 1973, São Paulo, SP

### **Educação**

Curso Superior: Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, SP. Período: 1992-1996.

### **Ocupação**

Bolsista de Mestrado. Instituição financiadora: CNPq

### **Trabalho apresentado a Congresso**

Oliveira, D.R., Tonelli, R.R., Giordano, R., Colli, W. & Alves, M.J.M. (2000) Isolation and characterization of new clones from the Tc-85 gene family of *Trypanosoma cruzi*. XXVII ENCONTRO ANUAL EM PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, CAXAMBU, MG.

## Resumo

Vários laboratórios descreveram moléculas que estão envolvidas na invasão do *Trypanosoma cruzi* à célula hospedeira. Nosso laboratório foi o primeiro a descrever moléculas de 85 kDa pertencentes a uma família de glicoproteínas (Tc-85) que possuem graus diferentes de homologia de seqüência com os membros da superfamília das gp85/transialidases. Um componente ácido (Tc85-11) da família Tc-85 que se liga à laminina e a receptores da célula hospedeira foi clonado e expresso (Giordano *et al.*, JBC 274, 3461,1999). Nós levantamos a hipótese de que o polimorfismo dos diferentes membros da família Tc-85 poderiam determinar diferentes propriedades da adesão à célula hospedeira.

Para provar tal hipótese, uma biblioteca genômica de Tc-85 utilizando o vetor pTEX e os seguintes primers: R-1 (5´) ATGTCCCGGCGTGTGTTTACTTCC e GPI-2(3´) TCACAAAGTCGCAAAGCCCCACAGTCC, foi digerida com enzimas de restrição resultando em fragmentos de tamanho esperado (~2-2,5 kb) em 91% dos clones selecionados. Treze clones foram seqüenciados em suas extremidades 5´ e 3´. Nenhum era idêntico entre si apesar da variabilidade da homologia de seqüência (40-70%). No entanto, quando comparadas as regiões codantes para o peptídeo sinal foi encontrada uma homologia de 90%. Para assegurar a clonagem de genes funcionais, uma biblioteca de cDNA foi construída com primers degenerados (5´-ATTTTTGTTCCGCAGAAGACGCAGGTG, 3´-ATTCAGTGGGCGGTTGTACAGAAAGAC) por transcrição reversa de seqüências conservadas da superfamília das gp85/transialidases, excluindo a seqüência codante para o peptídeo sinal e a seqüência codante para âncora de GPI (presença de aminoácidos hidrofóbicos). Os cDNAs foram amplificados e clonados no vetor de expressão

pCR®T7/NT-TOPO. Foram selecionados 60 clones que foram submetidos à análise de restrição e 90% deles mostraram fragmentos com tamanho esperado. As proteínas de fusão de 4 destes clones foram reconhecidas em Western blot por um anticorpo policlonal feito contra um fragmento da Tc85-11 (H3.3). As seqüências obtidas da extremidade 5´ revelou que os quatro clones pertencem à superfamília das gp85/transialidase (GenBank™). O alinhamento destas seqüências com a Tc85-11 mostrou uma homologia de 60-80% e uma identidade de 40-70% na seqüência de aminoácidos. Estes dados confirmam a heterogeneidade da família da Tc-85 que é expressa pelo parasita. Ademais, a expressão de elevadas quantidades das proteínas correspondentes permitirá a identificação dos ligantes respectivos para estas proteínas de superfície específicas de tripomastigotas.

## Abstract

Several laboratories described molecules that are involved in *Trypanosoma cruzi* invasion of host-cells. Our laboratory was the first to describe molecules of 85 kDa belonging to a glycoprotein family (Tc-85) having different degrees of sequence homology with the members of the gp85/trans-sialidase supergene family. An acidic component (Tc85-11) of the Tc-85 family that binds to laminin and to host-cell receptors was cloned and expressed (Giordano *et al.*, JBC 274, 3461, 1999). We raised the hypothesis that the polymorphism of different members of the Tc-85 family could specify different adhesion properties to host proteins.

In order to prove the hypothesis, a genomic library of Tc-85 using the pTEX vector and primers R-1 (5') ATGTCCCGGCGTGTGTTTACTTCC and GPI-2 (3') TCACAAAGTCGCAAAGCCCCACAGTCC was cut with restriction enzymes resulting in fragments of the expected size (~2-2.5 kb) in 91% of the clones. Thirteen clones were sequenced from their 5' and 3' terminal ends. None were identical in spite of a variable sequence homology (40-70%), as opposed to 90% of homology when the signal peptide coding regions were compared. In order to assure the cloning of functional genes, a cDNA library was constructed with degenerated primers ((5') ATTTTGTTCGCGAGAAGACGCAGGTG / (3') ATTCAGTGGGCGGTTGTACAGAAAGAC) for reverse transcription of conserved sequences from the gp85/trans-sialidase supergene family excluding the hydrophobic sequences from both extremities. The cDNAs were amplified by PCR and cloned into pCR ®T7/NT-TOPO expression vector. 60 clones were selected and were subjected to restriction analysis and 90% of the clones showed fragments with the expected size. The expressed fusion proteins of 4 of these clones were recognized in Western blots by a polyclonal antibody raised against a fragment of Tc85-11 (H3.3). The sequences obtained from

the 5' termini revealed that all four clones belong to the gp85/trans-sialidase supergene family (GenBank <sup>TM</sup>). The alignment of these sequences with Tc85-11 showed a homology of 60-80% and an identity of 40-70% in aminoacid sequence. These data confirm the heterogeneity of the Tc-85 family that is expressed by the parasite. Additionally, the expression of high amounts of the corresponding proteins will allow the identification of putative ligands for these trypanomastigote specific surface proteins.

## **Abreviaturas**

BSA: albumina de soro bovino

cDNA: DNA complementar

dNTP: desoxiribonucleotídeos

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

g: aceleração da gravidade

GPI: glicosilfosfatidil-inositol

GYT: "glycerol-yeast-tryptone"

kDa: kilodalton

LB: meio Luria-Bertani

LLC-MK2: célula epitelial de rim de macaco Rhesus

LIT: infusão de fígado e triptose

M: molar

Mab: anticorpo monoclonal

mA: miliampère

mRNA: RNA mensageiro

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PCR: reação de polimerização em cadeia

PEG: polietilenoglicol

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

SDS: lauril-sulfato de sódio

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina

Tris: Tris-(hidroximetilaminoetano)

Tween: sorbitan monolaureato de polioxietileno

tRNA: RNA transportador

WGA: "Wheat-Germ-Agglutinin"- aglutinina de embrião de trigo

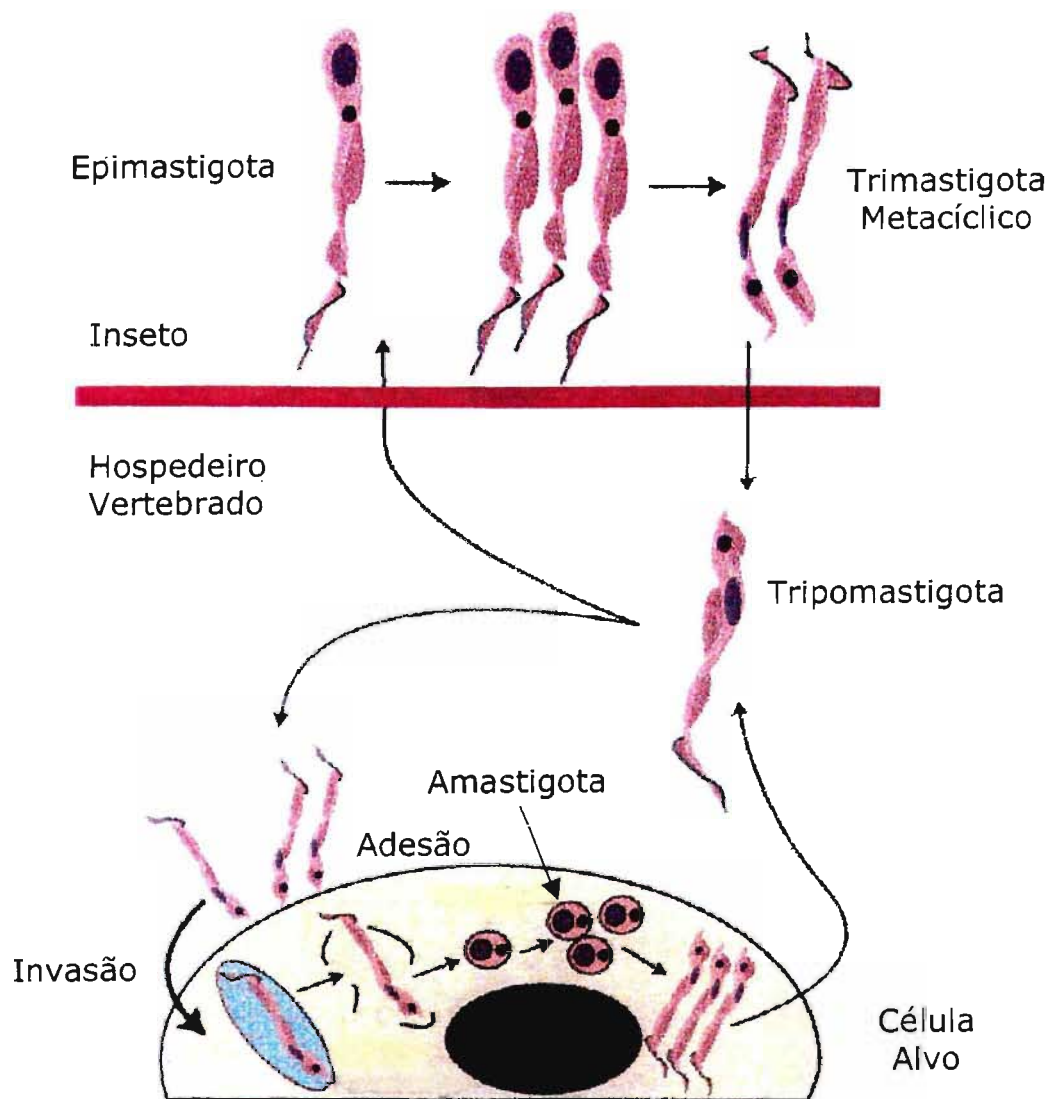
## **Código de Aminoácidos**

Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ác. Aspártico	Asp	D
Ác. Glutâmico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Aminoácido qualquer -		X



## 1. INTRODUÇÃO

*Trypanosoma cruzi* é o parasita que causa a doença de Chagas e prolifera no citossol de células de mamíferos, com um ciclo de vida que se alterna entre invertebrados e vertebrados. Trata-se de um ciclo complexo, pois possui três formas de desenvolvimento: epimastigota, amastigota e tripomastigota. Dias, E. (1934) apresentou uma descrição do ciclo evolutivo do parasita que, com algumas modificações, permanece até hoje (figura 1). Os insetos vetores da família *Reduviidae* ao alimentarem-se de sangue dos vertebrados parasitados, adquirem a forma sanguínea do hospedeiro. No intestino do inseto, o parasita diferencia-se em epimastigota, que é uma forma não infectiva e capaz de se dividir. Na porção superior do trato digestivo, os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (eliminados nas fezes) capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos podem ser fagocitados por células mononucleares e macrofágicas, não sendo, entretanto, destruídos por elas. Após o rompimento do vacúolo parasitóforo permanecem livres no citoplasma onde se diferenciam em amastigotas. Os amastigotas são as formas multiplicativas do hospedeiro vertebrado que posteriormente diferenciam em tripomastigotas, que são liberados no meio por rompimento das células.



**Figura 1:** Ciclo do *Trypanosoma cruzi*.

O processo pode ser reiniciado pela invasão de novas células ou pela captura de tripomastigotas pelo inseto vetor quando este se alimenta de sangue.

A doença de Chagas, de acordo com a OMS (WHO, 1996), afeta 18 milhões de pessoas nas Américas, e que em torno de 100 milhões (25% da população latino-americana) fazem parte do grupo de risco de contrair a infecção. No entanto, o programa de controle domiciliar mediante o uso de inseticidas, na tentativa de interromper o ciclo de transmissão envolvendo o vetor, tem permitido que 90% dos municípios infectados no Brasil estejam livres da transmissão da doença. Os dados também indicam que houve redução na taxa de contaminação por transfusão sanguínea de 6,5% para 1%. Embora a transmissão tenha sido eficientemente controlada, infecções congênitas e transfusão sanguínea são ainda importantes fontes da doença. Fatores econômicos e de saúde pública, particularmente em alguns países latino-americanos, fazem com que a doença de Chagas continue sendo um sério problema. No entanto, a existência de um ciclo silvestre do parasita, a invasão dessas regiões pelo homem e a descontinuidade dos programas de controle domiciliar fazem com que novos casos de infecção surjam na população, mesmo em países onde a transmissão parecia sob controle.

### **1.1. Interação parasita-célula hospedeira**

O parasita é capaz de invadir uma ampla quantidade de linhagens celulares, com exceção de hemácias e células hematocitopoiéticas (Dvorak e Howe, 1976). Todavia, *in vivo* o parasita aloja-se preferencialmente em células musculares, células inervadas pelo sistema nervoso autônomo e macrófagos. Este tropismo parece ser dependente não apenas do tipo celular, mas também da cepa de *T. cruzi* (Andrade, 1974; Melo *et al.*, 1978). Tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas são engolfados por macrófagos com formação do vacúolo parasitóforo, mas somente as formas tripomastigota e amastigota são capazes de sobreviver e dar continuidade à infecção. Os macrófagos estimulados *in vivo* por uma resposta imune específica para *T. cruzi* ou por agentes inflamatórios são capazes de eliminar todas as formas do parasita (Kress *et al.*, 1975; Nogueira e Cohn, 1976). O tratamento de macrófagos com proteases, glicosidases e inibidores metabólicos (tunicamicina, cicloheximida), indicaram que proteínas e carboidratos presentes na superfície destas células eram importantes para a invasão pelo parasita (Araújo-Jorge, 1989).

O processo de adesão e invasão é dotado de mecanismos ainda pouco elucidados (Colli, 1993). Testes com células não-fagocíticas profissionais mostraram que o processo de adesão de tripomastigotas é

dependente da energia metabólica do parasita (Schenkman *et al.*, 1991) e que a entrada de tripomastigotas ocorre preferencialmente pela região basolateral, independente do citoesqueleto das células (Schenkman *et al.*, 1988).

À etapa de adesão, segue-se a interação do parasita. Tardieux *et al.* (1992) verificaram que a migração dos lisossomos ocorre precocemente, sendo visualizada mesmo quando o parasita ainda está fora da célula, aderido à membrana celular e que a membrana dos lisossomos contribui para a formação do vacúolo parasitóforo. Os autores também observaram que tratamentos que induzem a movimentação de lisossomos da região perinuclear até próximo à membrana plasmática aumentam a infecção de células NRK (normal rat kidney cells) por tripomastigotas. O tratamento que inibe a migração também inibe a infecção. Nesse fenômeno foram detectados pulsos intracelulares de cálcio na célula hospedeira, levantando a hipótese de que este íon seja o segundo mensageiro utilizado (Tardieux *et al.*, 1994).

## 1.2. Família das trans-sialidases

Sialidases são enzimas hidrolíticas presentes de vírus a eucariotos superiores (Buschiazzo *et al.*, 1997). A trans-sialidase do tripanosoma é a única que realiza a reação de transferência de um ácido siálico a partir de glicoconjugados pré-formados do hospedeiro ou do meio em que se encontram esses parasitas, em vez da reação típica de hidrólise encontrada na maioria das sialidases (Smith *et al.*, 1997; Franchin *et al.*, 1997). O ácido siálico, ligado por ligações  $\alpha 2,3$  nos glicoconjugados, é transferido para aceptores da superfície celular do parasita que contêm resíduos  $\beta$ -galactosil terminais (Colli, 1993, Cross e Takle, 1993; Schenkman *et al.*, 1994; Ribeirão *et al.*, 1997).

A família das trans-sialidases (família TS) (figura 2) possui no mínimo 140 membros que podem ser classificados em grupos, de acordo com a estrutura e função das proteínas. As proteínas dessa família têm como característica a presença de pelo menos um motivo conservado dos aminoácidos SxDxGxTW (Asp box). Em todos os membros da família é encontrada uma seqüência de aminoácidos (VTVxNVxLYNR) altamente conservada próxima à região C-terminal (Colli, 1993; Cross e Takle, 1993; Schenkman *et al.*, 1994). O motivo FRIP (Phe Arg Ile Pro) típico das sialidases é encontrado próximo ao amino terminal das moléculas. Adotaremos aqui a classificação

apresentada na tabela 1 (Frasch, 2000). Dois grupos (TS e TS I) são expressos pelos tripomastigotas e são ancorados por glicosilfosfatidilinositol (GPI) na membrana do parasita. Estes grupos possuem duas regiões principais: N-terminal (catalítica) e C-terminal, com repetições dos aminoácidos DSSAHSTPSTPA ("SAPA repeats"). Ocorre uma diferença essencial entre o grupo TS e TS I na região N-terminal. O grupo TS tem atividade de trans-sialidase, porém o grupo TS I não possui tal característica, devido a uma substituição da Tyr342 por histidina.

Os membros de terceiro grupo (TS-e) são expressos por epimastigotas, a região repetitiva SAPA é ausente e possuem atividade de trans-sialidase. Assim, a região repetitiva SAPA não é determinante para a atividade enzimática. No entanto, a presença das repetições modula a produção de anticorpos contra a região catalítica. Essas repetições são imunodominantes e se propõe que devem prevenir a formação precoce de anticorpos contra a região catalítica, com inibição da atividade enzimática. É sugerido que esta deve ser a maneira de escape usada pelo parasita no período agudo da infecção, possibilitando portanto a transferência de ácido siálico pela trans-sialidase para moléculas da superfície do parasita. Posteriormente, imunoglobulinas são produzidas também contra o sítio catalítico que são capazes de inibir a atividade enzimática (Buscaglia *et al.*, 1998), prevenindo a

Name <sup>a</sup>	Protein size (kDa)	Structural features <sup>b</sup>	Parasite stage <sup>c</sup>	Gene number	Function/ activity <sup>d</sup>
<b>Trans-sialidase family</b>					
TS	120–200	Catalytic N-terminal region (638 aa) Tyr342 C-terminal SAPA repeats (variable size)	bT mT	70	Trans-sialidase/sialidase
TS I	120–200	Catalytic N-terminal region (638 aa) His342 <sup>e</sup> C-terminal SAPA repeats (variable size)	bT mT	70	Binding to $\beta$ -galactose
TS-e	85	Catalytic region (about 640aa) Tyr342	E	?	Trans-sialidase/sialidase
<b>Trans-sialidase-like family</b>					
Tc-85 <sup>f</sup>	85	About 750–850 aa Some members have C-termini containing aa repeats	bT mT A	?	Cell adhesion, laminin binding
FI/CEA/CRP	160	About 1000 aa	bT mT	700	Complement regulation
Tc13	85	Non-repetitive N-terminal domain C-terminal repetitive domain of 5 aa	bT mT	Dozens	?

**Tabela 1:** Membros das famílias das trans-sialidases e das trans-sialidase simile

<sup>a</sup> Tc13, antígeno 13 de *T. cruzi*; TS, trans-sialidase; TS I, TS inativa; TS-e TS de epimastigota; FI, proteína de flagelo associada a superfície; CEA, exoantígeno da fase crônica; CRP, proteína regulatória do complemento

<sup>c</sup> bT: tripomastigotas sanguíneos (bloodstream trypomastigotes) mT: tripomastigotas metacíclicas (metacyclic trypomastigotes) E: epimastigotas A: amastigotas

<sup>e</sup> Outras diferenças de aminoácidos estão presentes no sítio catalítico de membros inativos da família de trans-sialidase, mas essas diferenças na posição 342 define membros naturalmente inativos

<sup>f</sup> Nomes diferentes são dados às proteínas de 85kDa (TSA I, SA85, Tt34, ASP, etc). Trabalhos posteriores deverão determinar se estes membros serão agrupados em subfamílias

(Frasch, 2000)



invasão maciça das células pelo parasita, permitindo assim a sobrevivência do hospedeiro infectado.

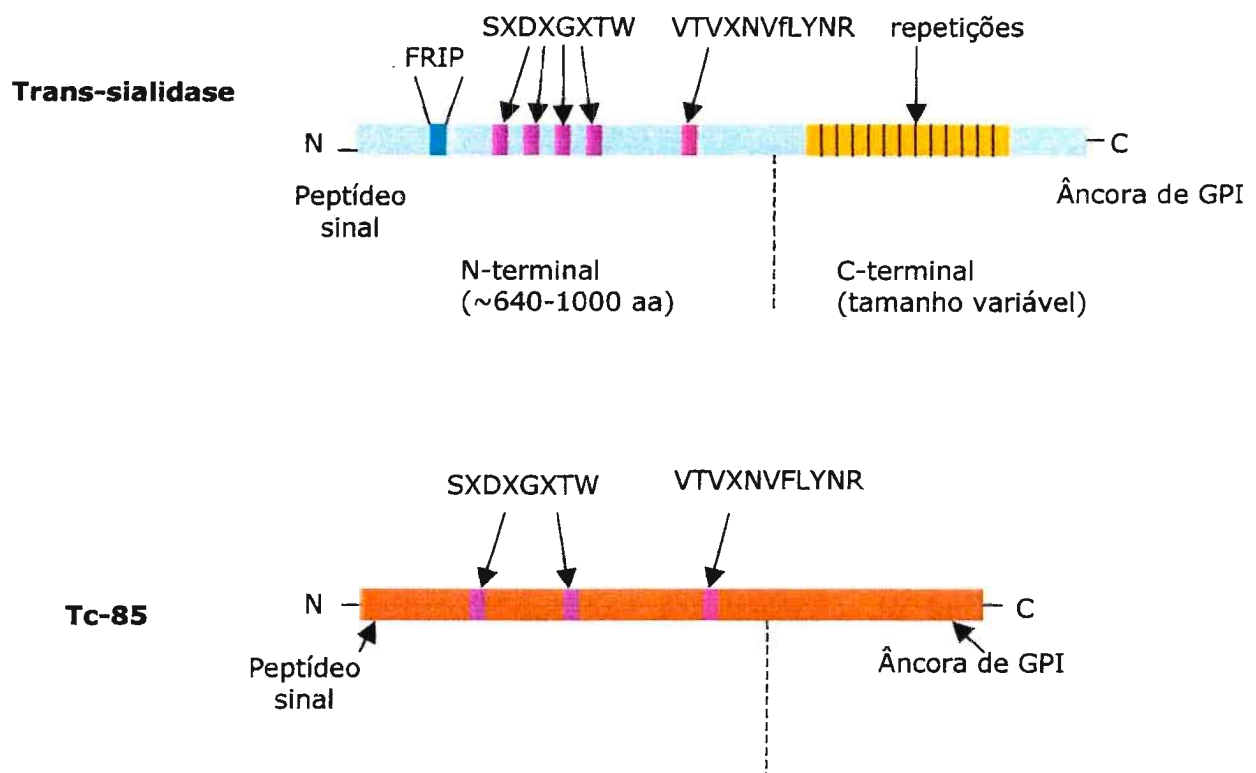
### **1.3. Família trans-sialidase símile**

Recentemente, alguns genes já identificados similares àqueles codificados pela família das trans-sialidases, mas que não têm atividade enzimática foram incluídos nesta família trans-sialidase símile (Frasch, 2000) (figura 2). Estes genes foram agrupados desta forma, porque apresentam identidade de 30-40% com os genes das trans-sialidases e também pelas seqüências deduzidas de proteínas da maioria dos membros terem 1-4 cópias do motivo SXDXGXTW e o motivo VTVXNVFLYNR, característico de todos os membros da família das trans-sialidases e da família trans-sialidase símile.

Membros da família trans-sialidase símile podem ser classificados em três grupos de acordo com a identidade de seqüência, massa molecular e outros.

Algumas características da família trans-sialidase símile chamam a atenção. Observa-se que a maioria dos membros são encontrados na membrana celular de tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas sangüíneos e amastigotas intracelulares, isto é, são as formas que interagem com o hospedeiro vertebrado.

Os membros desta família apresentam funções diferentes, como proteínas regulatórias que restringem a ativação das vias clássica e alternativa do complemento ligando-se aos componentes C3b e C4b (Tomlinson *et al*, 1998) e proteínas que se ligam à laminina e superfície celular (Giordano *et al.*, 1999; Ramirez *et al.*, 1993). São também os principais antígenos do parasita.



**Figura 2:** Estrutura geral dos membros das famílias das trans-sialidase e trans-sialidase símile. As funções propostas da região N-terminal em diferentes membros são: atividade de trans-sialidase, proteína regulatória do complemento, adesão celular, adesão a  $\beta$ -galactose e adesão a laminina. As repetições na região C-terminal podem estar envolvidas em: multimerização da proteína, estabilização da proteína no sangue e modulação da resposta imune contra a região N-terminal. As repetições do C-terminal estão presentes em alguns membros da família (DSSAHSTPSTPA). Os aminoácidos FRIP correspondem a PheArgIlePro..

#### **1.4. Moléculas envolvidas na invasão do parasita.**

As famílias das trans-sialidases, das trans-sialidase símile e também a família das mucinas constituem os grupos de proteínas mais abundantes da superfície do *Trypanosoma cruzi*. Os genes destas famílias ocupam 5% do genoma do parasita. A descrição das funções atribuída a estas proteínas é feita abaixo.

A correlação de várias glicoproteínas de superfície com o processo invasivo do *T. cruzi*, principalmente com a etapa de adesão, tem sido apontada por diversos grupos de pesquisa, envolvendo proteínas de 80-90kDa pertencentes à superfamília das gp85/trans-sialidases. Foi proposto que a sialilação ocorrida na superfície do parasita está relacionada com a invasão da célula hospedeira (Schenkman *et al.*, 1991). Outra função poderia ser a proteção à lise, por um caminho alternativo do complemento durante a circulação do parasita na fase aguda da doença ou seu escape do vacúolo parasitóforo (Colli, 1993).

Uma glicoproteína de 90kDa, específica de tripomastigotas metacíclicos, parece estar envolvida no processo de invasão sugerida pela inibição da invasão de células fagocíticas profissionais pelo anticorpo monoclonal 1G7 dirigido contra esta proteína (Yoshida *et al.*, 1990). Apresenta carboidratos N-ligados do tipo  $\alpha$ -manose e encontra-se associada à membrana por uma âncora de GPI. Um clone de cDNA

(MTS-gp90), que codifica para a porção carboxi-terminal da molécula e que apresenta homologia significativa com membros da superfamília das trans-sialidases, foi isolado e caracterizado

Os tripomastigotas metacíclicos expressam uma glicoproteína de superfície de 82kDa que foi relacionada com a invasão celular (Ramirez *et al.*, 1993). Análises da seqüência de aminoácidos sugerem a existência de várias modificações pós-traducionais, como N-glicosilação e adição de âncora de glicosilfosfatitil-inositol. De forma incomum, a gp82 não contém a seqüência amino-terminal correspondente ao peptídeo sinal (Gafvelin *et al.*, 1997). Foi demonstrado que os requerimentos para a seqüência do peptídeo sinal e processamento no *T. cruzi* são distintos dos de mamíferos. A gp 82 não é eficientemente processada em células VERO, possivelmente pela ausência de reconhecimento de sinais para a translocação até o retículo endoplasmático da célula de mamífero (Ramirez *et al.*, 1999). Peptídeos derivados da gp82, previamente implicados na invasão de célula hospedeira, foram expressados como proteínas de fusão com a proteína LamB de *Escherichia coli* expondo o peptídeo na superfície celular e se mostrou que estas bactérias aderem às células HeLa. As proteínas de fusão purificadas, ao ligarem-se às células HeLa, inibiram a infecção por *T. cruzi* (Pereira *et al.*, 1999).

Uma das primeiras glicoproteínas de superfície 85 KDa (Tc-85) (Katzin *et al.*, 1983), específica de tripomastigotas, que se liga à lectina WGA (wheat-germ agglutinin) foi descrita em nosso laboratório. Anticorpos monoclonais (Mab H1A10) gerados contra esta glicoproteína são capazes de inibir entre 50-90% a invasão de células de cultura pelo parasita, dependendo da cepa e do estágio do parasita utilizado (Alves *et al.*, 1986). A Tc-85 apresenta-se polimórfica quando analisada por eletroforese bidimensional (pIs 5,5-9,0) (Abuin *et al.*, 1989) constituindo uma família de proteínas. Um dos membros, com pI ácido, liga-se à laminina, componente mais importante da lâmina basal (Giordano *et al.*, 1994), levantando a possibilidade de que pelo menos alguns membros da família sejam moléculas de adesão (Alves, 1996). A Tc-85 está ligada à membrana por uma âncora de GPI-glicosilfosfatidilinositol (Couto *et al.*, 1993) e carboidratos N e O-ligados estão presentes na Tc-85. Uma única estrutura de oligossacarídeos N-ligado à proteína foi isolada e caracterizada e em manoses, possivelmente como dissacarídeos, foram encontradas O-ligações (Couto *et al.*, 1990).

A clonagem de um membro ácido da família da Tc-85 (Tc85-11) mostrou que a proteína recombinante liga-se à laminina e tem identidade com todos os membros das gp85/trans-sialidases. Apresenta dois motivos da neuraminidase bacteriana Asp Box (SKDNGSTW, SCDMGKWTW) e a seqüência comum aos membros da família das trans-

sialidases (VTVNFLYNR) na porção carboxi-terminal. O epítipo do anticorpo monoclonal (Mab H1A10) foi mapeado, localizando-se próximo à seqüência comum aos membros da família (VTVNFLYNR) (Giordano *at al.*, 1999).

Há ainda evidências de que outras moléculas tanto do parasita quanto do hospedeiro estejam envolvidas na invasão como a fibronectina, heparina e receptor de TGF $\beta$ , entre outras (Cornette e col., 1988; Ortega-Barria e Pereira, 1991; Ouaiissi e col., 1992).

Os resultados obtidos pelos diferentes grupos da área levaram o laboratório a trabalhar com a hipótese de que diferentes membros da família da Tc-85 se ligam a diferentes componentes da matriz extracelular, da membrana basal e da superfície celular do hospedeiro. Alternativamente, cada membro poderia ter múltiplos sítios de ligação. Evidentemente, as duas hipóteses não são mutuamente exclusivas.

Para verificar a validade das hipóteses acima, havia a necessidade de se obterem diferentes proteínas da família, sendo que o passo inicial, seria a obtenção de uma biblioteca enriquecida nos genes da família da Tc-85. A caracterização geral dessa biblioteca, a obtenção de proteínas de fusão de alguns desses clones para o estudo posterior de sua ligação a células e a componentes da matriz extracelular (como laminina, fibronectina, heparina) foram os objetivos iniciais de meu plano de mestrado.

Para o início do projeto partiu-se de uma biblioteca genômica enriquecida de Tc-85 que já havia sido construída por Ricardo Giordano. Entretanto, as proteínas de fusão obtidas correspondentes aos genes desta biblioteca eram muito insolúveis, dificultando a expressão e a purificação das proteínas de fusão. Com isso, partiu-se para a obtenção de uma biblioteca de cDNA enriquecida de Tc-85. Foram isolados 60 clones desta biblioteca que foi parcialmente caracterizada. Os resultados obtidos constam desta dissertação.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho são:

- 1) Obter e caracterizar uma biblioteca enriquecida de Tc-85;
- 2) Obter proteínas de fusão e verificar sua ligação à célula hospedeira ou a componentes da matriz extracelular.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

**3.1. Obtenção de parasitas** (epimastigotas e tripomastigotas de cultura de tecido). Formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y foram obtidas do sobrenadante de cultura de células LLC-MK<sub>2</sub> (10 garrafas de 75 ml) previamente infectadas com 30 a 50 milhões de parasitas. Os parasitas presentes no sobrenadante foram centrifugados a 4.000 g por 15 minutos a 4°C, sendo o precipitado lavado 2 vezes com DME. Ao final foram obtidos aproximadamente  $6 \times 10^9$  parasitas. As formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, foram obtidas por cultivo das células em meio LIT (Liver Infusion and Triptose), segundo Camargo (1964) e Castellani *et al.*(1967).

**3.2. Extração de RNA total.** Foram utilizados 15 ml do reagente Trizol™ (GibcoBRL) para  $6 \times 10^9$  parasitas. Após a lise e incubação (5 minutos à temperatura ambiente) das células com o reagente, foram



adicionados 200 $\mu$ l de clorofórmio para cada 1ml de Trizol<sup>TM</sup>, o extrato foi agitado gentilmente e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. As frações aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação (12000g, 15 min., 4<sup>o</sup>C). O RNA da fase aquosa foi precipitado com isopropanol (0,5ml/1 ml de Trizol<sup>TM</sup>) e após 10 minutos à temperatura ambiente, foi submetido a centrifugação (12000g, 10 minutos, 4<sup>o</sup>C). O precipitado de RNA foi lavado com etanol 75%, com centrifugação de 7500g, 5 min., 4<sup>o</sup>C. Após a secagem de 5-10 minutos à temperatura ambiente, o precipitado foi dissolvido com 200 $\mu$ l de água livre de RNAase e incubado por 10 minutos a 56<sup>o</sup>C. Através da leitura óptica 260/280nm, fez-se a correção da concentração do RNA para isolamento do mRNA para 0,55 mg/ml, com ajuste da concentração de sal para 0,5M (0,1 volume NaCl 5M).

**3.3. Extração de mRNA.** Foi utilizado kit MessageMaker<sup>TM</sup> (GibcoBRL). O RNA total foi aquecido por 5 minutos a 65<sup>o</sup>C e posto em gelo. Foi utilizado o volume de oligo d(T) indicado pelo fabricante e incubou-se a mistura RNA+oligo d(T) por 10 minutos a 37<sup>o</sup>C. A mistura foi transferida para a seringa-filtro e lavada duas vezes como descrito pelo fabricante. A eluição do mRNA foi feita com água aquecida a 65<sup>o</sup>C no volume indicado pelo fabricante. O RNA eluído foi submetido ao mesmo processo descrito acima. A concentração do mRNA obtida foi de ~ 68 ng/ $\mu$ l.

**3.4. Oligonucleotídeos utilizados no PCR.** Estes oligonucleotídeos foram utilizados para a obtenção da biblioteca de cDNA enriquecida em membros de Tc-85. O alinhamento de alguns genes codantes para proteínas da família gp85/trans-sialidasas (SA85-1, TC85-11, GP85-1, SILVIO, GP85-2, TSA-1 e TSA-E3), mostra regiões altamente conservadas. Com base nestas regiões, foram sintetizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

I (5') ATTTTGTTC CGCAGAAGACGCAGGTG

II (3') ATTCAGTGGGCGGTTGTACAGAAAGAC

**3.5. Preparação do cDNA.** Foi utilizado o kit First-strand cDNA Synthesis (Amersham Pharmacia Biotech) para obtenção da primeira fita de cDNA, com a seguinte mistura de 33µl reação: Mix 11µl; primer Not (1:25) 1µl; DTT 1µl; mRNA (136 ng) 2µl. A reação foi realizada por 45 minutos a 37<sup>0</sup>C, 15 minutos a 42<sup>0</sup>C e inativada por 5 minutos a 90<sup>0</sup>C e o tubo de reação foi então mantido em gelo. Este kit é dotado de uma transcriptase reversa de vírus de leucemia murina e o primer Not possui uma cauda de 18 timinas. Posteriormente, a primeira fita foi selecionada e amplificada por PCR com a seguinte reação: à mistura anterior (33µl) adicionaram-se: 40pmol dos oligonucleotídeos I e II (I (5') ATTTT GTTC CGCAGAAGACGCAGGTG/ II (3') ATTCAGTGGGCGGTTGTACAG AAAGAC ); 0,5µl de Taq polimerase em volume final de reação de 100µl. O ciclo de PCR utilizado foi: 1min./94<sup>0</sup>C; 45 seg./55<sup>0</sup>C; 2min./72<sup>0</sup>C.

**3.6. PCR para obtenção do cDNA de Tc-85.** A reação de amplificação foi feita com a AmpliTaq™ Gold (Perkin Elmer) e cDNA de Tc-85, usando-se oligonucleotídeos iniciadores I (5') ATTTTTGTTCCGCAGAAGACGCAGGTG / (3') ATTCAGTGGGCGGTTGTACAGAAAGAC, dNTP (200 $\mu$ M), tampão 10x para PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM) e MgCl<sub>2</sub>. A amplificação foi feita após estabelecer experimentalmente as condições de temperatura de reassociação, de concentração de MgCl<sub>2</sub> (4mM) e da quantidade de DNA adequadas à reação de polimerase em cadeia. O ciclo utilizado foi: 1min./94<sup>0</sup>C; 45 seg./55<sup>0</sup>C; 2min./72<sup>0</sup>C.

### **3.7. Preparação de bactérias competentes com cloreto de cálcio.**

Esta preparação foi feita segundo o método de Hanahan, 1983. Um tubo de bactéria da cepa desejada foi descongelado, mantendo-o por 15 minutos no gelo. As bactérias foram aplicadas em uma placa de LB contendo 10mM de MgSO<sub>4</sub> e incubada a 37<sup>0</sup>C durante a noite. Uma colônia isolada foi colocada em 2 ml de meio SOB pré-aquecido a 37<sup>0</sup>C e mantido por ~2 horas a 37<sup>0</sup>C e 200 rpm até D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,5. O pré-inóculo foi transferido para 50 ml de meio SOB aquecido e incubado a 37<sup>0</sup>C e 200 rpm até D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,6. O frasco com a cultura de bactérias (tubo de centrifuga de 50 ml) foi mantido em gelo por 15 minutos e a seguir foi adicionado 0.5 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M incubado por mais

15 minutos. A cultura foi centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10 ml de tampão RF I (vide abaixo) gelado deixando em repouso no gelo por 15 minutos. Foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm e 4°C. O precipitado foi ressuspendido em 2 ml de RF II (vide abaixo) gelado, sempre se mantendo o material em gelo. As bactérias foram aliqüotadas em 100 µl, congeladas em banho de gelo seco/acetona e armazenadas por até 2 meses a -80°C.

RF I : KCl 1M (100mM); MnCl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O 1M (50 mM); acetato de potássio 0,5 M pH 7,0 (30 mM); Ca Cl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O 1M (10 mM); glicerol 15%. O pH do tampão foi ajustado para 5,8 com ácido acético e esterilizado por filtração.

RF II : KCl 1 M (75 mM); Ca Cl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O 1M (75 mM); MOPS 0,5 M pH 7,0 (10 mM); MgCl<sub>2</sub> 1M (10 mM); glicerol 15%. O pH do tampão foi ajustado para 6,8 com ácido acético e esterilizado por filtração.

### **3.8. Preparação de células para a eletroporação (*E. coli* DH10B).**

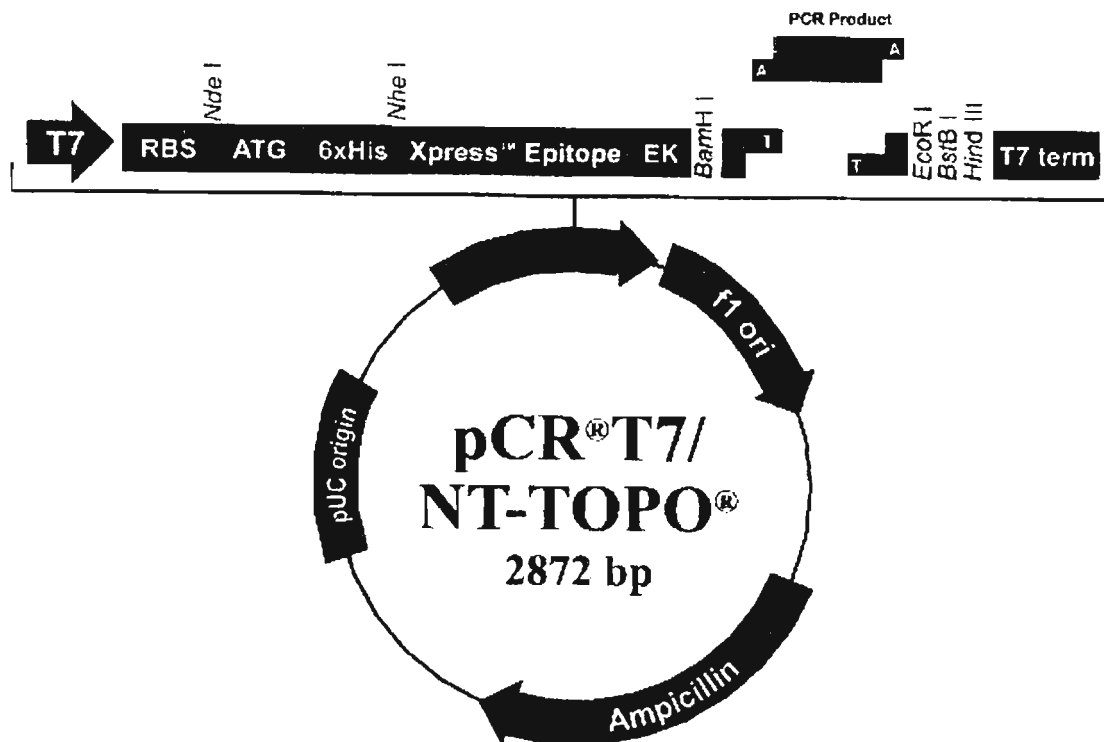
A eletroporação foi realizada na transformação de *E. coli* para obtenção de uma maior eficiência na construção da biblioteca genômica. As células foram preparadas como descrito na literatura (Technical Tips, 1995). Uma colônia isolada foi inoculada em 1 ml de meio LB e incubada a 37°C durante a noite. No dia seguinte, esta cultura foi inoculada em 100ml de LB a 37°C e 200 rpm até D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,6. A cultura foi

centrifugada a 3000 g por 5 minutos a 4<sup>0</sup>C. O precipitado foi lavado com glicerol 10% (2 vezes), ressuspendido em meio GYT (10% glicerol, 0,125% extrato de levedura e 0,25% de triptona) e as células foram aliquotadas (50µl), congeladas a - 80<sup>0</sup>C e armazenadas por até 2 meses.

**3.9. Biblioteca de cDNA de Tc-85.** A biblioteca de Tc-85 construída anteriormente no vetor pTEX (figura 3) não foi utilizada para expressão em bactéria, pois contém a 5' a região do peptídeo sinal que direciona a proteína para a glicosilação no retículo endoplasmático e uma sequência a 3' que codifica para uma região em aminoácidos hidrofóbicos, típicos de inserção de âncora de GPI. Dessa maneira, a construção da nova biblioteca visou à retirada destas duas porções.

Em uma primeira tentativa, utilizou-se o vetor pPROEX-1 com sítio de clonagem Ehe I (GGC/GCC: produz extremidades não coesivas). Com o surgimento de várias dificuldades com este tipo de ligação optou-se pela utilização do kit pCR<sup>®</sup>T7/NT TOPO Cloning (Invitrogen). Este kit possui um vetor linearizado pela topoisomerase e possui nas extremidades 3' uma timina (T) (figura 4). A ligação do vetor com o produto de PCR contendo adeninas na extremidade 3' é muito eficiente e ocorre em 5 minutos à temperatura ambiente. A topoisomerase liga-se à fita dupla do DNA e cliva o esqueleto fosfodiéster em uma fita no sítio específico 5' C/T (CCTT). Na reação de clivagem a energia de ligação é conservada através da ligação covalente entre o fosfato 3' da fita clivada

e a tirosina-274 da enzima. A topoisomerase pode religar covalentemente a fita de DNA a que está presa ou pode religar um acceptor heterólogo criando uma molécula recombinante. Está é uma reação de transesterificação (Cheng *et al.*, 2000).



**Figura 4:** Vetor de expressão em bactérias utilizado na construção da biblioteca de cDNA.

**3.10. Reação de ligação e transformação.** A reação de ligação realizada foi a seguinte: 1 $\mu$ l do produto de PCR (56 ng de cDNA); solução salina (200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>); 1 $\mu$ l vetor pCR T7 (10 ng) em um volume final de 5  $\mu$ l. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. As células competentes (*E. coli* TOP10F'), previamente mantidas em gelo, foram transformadas com 2 $\mu$ l do produto da reação anterior.

**3.11. Mini-preparações de DNA plasmidial.** As bactérias competentes foram transformadas com 1 $\mu$ l (~100ng) da biblioteca de cDNA de Tc-85, obtendo-se colônias isoladas. Cada colônia foi crescida separadamente em meio seletivo contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml) a 37°C, 200rpm, durante a noite. As mini-preparações de DNA plasmidial foram feitas utilizando-se o sistema de extração e purificação de DNA FlexiPrep™ (Amersham Pharmacia Biotech) segundo instruções do fabricante. As preparações obtidas foram ressuspensas em 50  $\mu$ l de tampão TE. Os clones da biblioteca genômica também foram preparados da mesma forma.

**3.12. Digestão dos clones purificados e análise de restrição.** Dos clones da biblioteca genômica de Tc-85 foi digerido 1 $\mu$ l do DNA purificado com as enzimas de restrição BamHI e Xho I, pois a clonagem deu-se nestes sítios. Os clones da biblioteca de cDNA enriquecida em

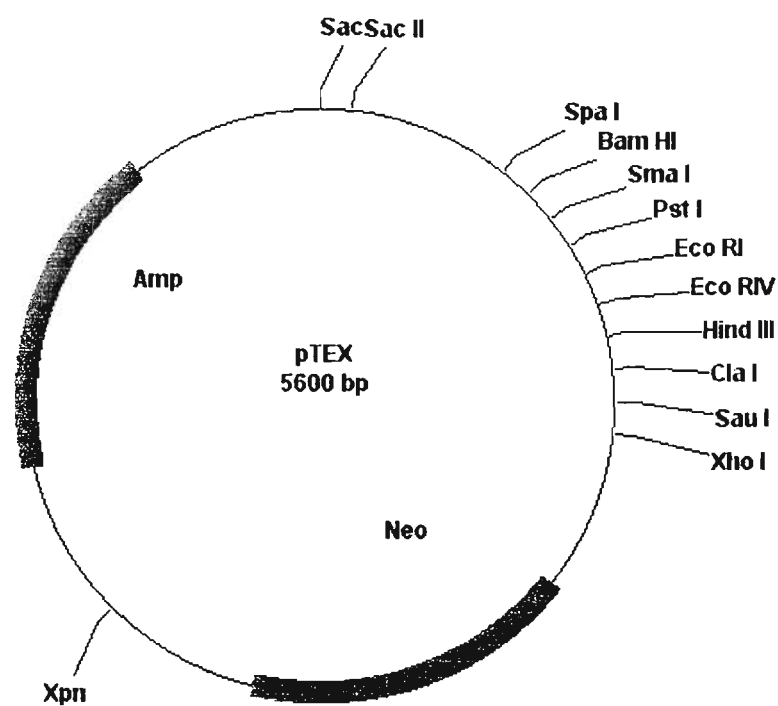
Tc-85 foram digeridos (2µl do cDNA purificado) com Bam HI e Eco RI (10 unidades de cada) e BSA diluída 100x. A reação de digestão foi mantida a 37°C por 2 horas. Toda reação foi aplicada em gel de agarose (1%).

**3.13. PCR dos clones (preparação para a análise de restrição utilizando SAU 3AI).** Previamente à análise de restrição (figura 5), realizou-se PCR dos clones da biblioteca genômica utilizando os primers pTEX 5' e 3' (os mesmos utilizados para o sequenciamento e descrito no item correspondente) para a amplificação de fragmentos. O procedimento executado foi o descrito no manual do fabricante da AmpliTaq™ Gold (Perkin Elmer), utilizando-se 30 ciclos de 94°C/1', 54°C/1', 72°C/2'. O produto da reação de PCR foi purificado com fenol/clorofórmio, precipitado com etanol e ressuspendido em 30 µl de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

**3.14. Análise de restrição dos clones sequenciados.** Os clones da biblioteca genômica purificados como descrito anteriormente, foram digeridos com Sau 3AI (volume da reação de 20µl, mantida a 37°C, 2 horas) e o produto da digestão foi aplicado em gel de acrilamida para ácidos nucleicos (8%). O padrão de massa molecular utilizado foi o Ladder 100 pb (Gibco). Para assegurar-se sobre o tamanho dos fragmentos também utilizou-se pBluescript digerido com Sau 3AI como



comparação, já que o padrão de digestão desse vetor é conhecido (dados não mostrados).



**Figura 3:** Vetor (5,6kb) para expressão em bactérias utilizado na construção da biblioteca genômica de Tc-85.

**3.15. Preparação de DNA genômico de *T. cruzi*.** Esta preparação foi realizada para obtenção de molde para a reação de PCR feita como descrito por Sambrook *et al.*, 1989. O DNA foi obtido a partir de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y que foram ressuspensas em 10 ml de tampão SET (0,15M de NaCl; 100mM de EDTA; 10mM de Tris pH 8,0), lisadas com 0,5% de uma solução de Sarkosil 10% e RNAase A (10  $\mu$ g/ ml) e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, foi adicionado 1mg de Proteinase K, o material homogeneizado e incubado por 3 horas a 50°C. Após este período, o DNA foi tratado com fenol tamponado (pH 8,0) com agitação suave por 5 minutos. Foi feita uma centrifugação (5000 rpm/10 minutos) e o precipitado tratado com fenol/clorofórmio (1:1) e depois um tratamento somente com clorofórmio. O DNA foi dialisado durante a noite contra 4 l de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0), 4°C e no dia seguinte contra 2 l de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0). O DNA foi analisado em gel de agarose 1% e o rendimento estimado foi de 100 ng/ $\mu$ l.

**3.16. Amplificação em larga escala e purificação do pPROEX-1.** O pPROEX-1 (vetor de expressão bacteriana com seleção por ampicilina) foi amplificado em *E. coli* DH5 $\alpha$  e purificado pela técnica de lise alcalina e cloreto de cézio (protocolo do manual do fabricante do pPROEX-1). O

vetor foi analisado em gel de agarose 1%, obtendo-se um rendimento final de 200 ng/ $\mu$ l.

**3.17. Digestão do pPROEX-1 com Ehe I.** O vetor utilizado foi digerido com a enzima de restrição Ehe I. Na digestão foram utilizados 200ng de plasmídio e 16 unidades da enzima. A reação foi mantida a 37°C por 2 horas. Para verificar a eficiência da digestão, o produto obtido foi analisado em gel de agarose 1% e comparado com a digestão com SalI.

**3.18. Purificação dos produtos de PCR.** A purificação dos produtos obtidos foi feita utilizando-se o sistema GFX<sup>TM</sup> Band Gel Purification (Amersham Pharmacia Biotech), segundo as instruções do fabricante.

**3.19. Transformação de bactérias competentes (DH5 $\alpha$ ).** As transformações realizadas na etapa de obtenção da biblioteca genômica de Tc-85 seguiram este protocolo. Primeiramente, as células preparadas com cloreto de cálcio foram mantidas em gelo por 10 minutos. Foi adicionado 1  $\mu$ l de DNA às bactérias. A mistura foi deixada no gelo por 30 minutos, seguindo-se um choque térmico de 2 minutos a 42°C e retornando ao gelo por 2 minutos. Foi adicionado 1 ml de meio SOC para recuperação das bactérias por 1 hora a 37°C, 200 rpm. Os

transformantes foram semeados em placas de ágar LB contendo ampicilina (100µg/ml). As placas foram incubadas durante a noite a 37°C.

### **3.20. Controle das etapas para a construção da biblioteca genômica no vetor pPROEX-1.**

a- Competência das células bacterianas (DH5α).

Para verificar se as bactérias competentes estavam eficientes, o vetor fechado foi utilizado na transformação.

b- Atividade da EheI.

Para verificar a ocorrência de digestão completa através do gel de agarose (1%), o pPROEX-1 (200ng) foi tratado com EheI e esta reação foi utilizada na transformação das células competentes.

c- Atividade da enzima ligase (New England Biolabs).

Para verificar a eficiência da ligase utilizada, o pPROEX-1 (200ng) foi digerido com Ehe I. Esta reação de digestão foi purificada pelo sistema de extração de DNA de bandas de gel de agarose e ressuspensa em 10µl de TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0). Este DNA foi utilizado para reação com 16 unidades de ligase e incubada a 16°C por 12 horas. Para inativar a enzima, a reação foi mantida por 10 minutos a 65°C e foi adicionada a 100 µl de bactéria competente para a transformação.

d- Atividade da enzima fosfatase alcalina (CIAP-New England Biolabs)

A fim de que o vetor digerido não se religasse, foi efetuado o tratamento com fosfatase alcalina. Após a digestão do pPROEX-1 com Ehe I, o vetor foi purificado pelo sistema de extração de DNA de bandas de gel de agarose, ressuspendido em 10 $\mu$ l de TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0) e utilizado na reação com fosfatase alcalina (1 $\mu$ l) que foi mantida por 1 hora a 37°C. Para eliminar a atividade de fosfatase, foi adicionado à reação 10mM de EDTA e feito o aquecimento por 10 minutos a 75°C. O produto da reação foi aplicado em gel de agarose 1% e a banda correspondente ao vetor foi purificada pelo sistema de extração de DNA de gel. O DNA foi ressuspendido em 10 $\mu$ l de TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) e foi utilizado em uma reação com ligase como anteriormente descrito. O produto desta reação foi utilizado na transformação de bactérias competentes.

**3.21. Utilização de SureClone™Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech).** Este kit elimina as adeninas nas extremidades 3' dos produtos de PCR adicionadas pela própria Taq DNA polimerase. Este sistema utiliza uma reação de retirada das adeninas pelo fragmento Klenow da DNA polimerase, fosforilação das extremidades do inserto e purificação pela coluna MicroSpin™. Desta forma, foram obtidas as extremidades não coesivas nos produtos de PCR.

**3.22. Reação de ligação pPROEX-1 com o fragmento de PCR.** O vetor preparado como descrito anteriormente, assim como os fragmentos de PCR, foram precipitados com etanol, purificados da banda de gel de agarose e aplicados no SureClone™ Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

A proporção usada de vetor e fragmentos foi de 2 ng e 5 ng, respectivamente. Foram utilizados também na reação PEG 8000 15% (agente caotrópico, já que a ligase necessita de menor volume possível de reação) e ATP 0,5mM. A reação foi incubada a 16°C, por 12 horas.

Foi realizada a eletroporação (1,8 kV, cubeta de 0,1 cm) com 1 e 2µl da reação de ligação para transformação de bactéria DH10B eletrocompetentes. Após a incubação destas células com meio SOC (1 hora, 37°C, 200 rpm), o transformante foi semeado em placas de ágar LB contendo ampicilina (100µg/ml).

**3.23. Seqüenciamento de DNA.** Para o seqüenciamento da primeira biblioteca genômica de Tc-85 efetuou-se o método da terminação de cadeia (Sanger *et al*, 1977), utilizando-se o kit Sequenase II (Amersham Pharmacia Biotech) e [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP para a marcação. Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados com base na seqüência 5' e 3' do plasmídio (pTEX 5' GAACTAGTGGATCCCCCG / pTEX 3' CTTGGAGTCGTAAATGGC). Os alinhamentos e as comparações entre as

seqüências foram feitos através do programa Align (tabela 2) e do Genbank™.

O sequenciamento da biblioteca de cDNA foi efetuado através de sequenciamento automático utilizando-se o kit DNA sequencing-BigDye™ Terminator (Perkin-Elmer). Os oligonucleotídeos utilizados associam-se no vetor e são fornecidos no kit (pCR T7/NT Topo ©Cloning): T7 Forward TAATACGACTCACTATAGGG e pRSET Reverse TTATTGCTCAGCGGTGG.

Os alinhamentos foram feitos no software GCG (<http://bioq.iq.usp.br>) e a tradução dos nucleotídeos no software MBS Translator ([www.mbshortcuts.com/translator](http://www.mbshortcuts.com/translator)).

**3.24. Transformação e expressão.** Esta etapa foi realizada utilizando-se a bactéria própria para expressão BL21(DE3)plyS. Foi adicionado 1 µl (~50 ng) de cDNA dos clones selecionados e já purificados pela miniprep às células descongeladas. A mistura foi incubada por 30 minutos em gelo e foi dado o choque térmico de 42°C por 30 segundos, retornando em seguida o tubo ao gelo. Foram adicionados às bactérias 250 µl do meio SOC seguindo-se uma incubação de 30 minutos a 37°C e 200 rpm. Toda a transformação foi adicionada a 10 ml de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol. A cultura foi incubada durante a noite a 37°C e 200 rpm.

Para o experimento de expressão foram inoculados 500  $\mu$ l da cultura incubada durante a noite em 10 ml de LB contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina e 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. O inóculo foi mantido por  $\sim$ 2 horas a 37°C e 200 rpm até  $DO_{600\text{ nm}}\sim 0,6$ . Neste ponto foram retirados 0,5 ml da cultura (não induzido) e adicionado 1mM de IPTG. Alíquotas de 0,5 ml foram retiradas em 1, 2 e 3 horas de incubação (protocolo descrito no manual do kit pCR®T7/NT TOPO Cloning-Invitrogen) e tratadas com tampão de amostra como descrito no item "Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE unidimensional)".

**3.25. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE unidimensional).** O método utilizado de eletroforese vertical de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi descrito por Laemmli (1970). A separação foi feita em gel na concentração contínua de 9% de poliacrilamida. O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 3% de poliacrilamida. As alíquotas a serem analisadas (extrato total de bactéria) foram coletadas como descrito (1, 2 e 3 horas de indução) e solubilizadas em 50 $\mu$ l de tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8, glicerol 38 %, EDTA 0,2 M, SDS 20% ,  $\beta$ -mercaptoetanol 4% e azul de bromofenol), aquecidas a 100°C por 5 minutos, centrifugadas em microcentrífuga por 2 minutos, sendo então aplicadas nas canaletas do gel de empilhamento. O restante da cultura de bactérias, após 3 horas de indução, foi centrifugado (5 minutos,



13000g) e o precipitado foi ressuspenso em 500µl de tampão de lise (50mM fosfato de potássio pH 7,8; 400 mM NaCl; 100mM KCl; 10% glicerol; 0,5% Triton X-100; 10mM imidazol). Para liberação de corpúsculos de inclusão, estas amostras foram congeladas em gelo seco e descongeladas a 42°C por três vezes e centrifugadas por 1 minuto a 4°C para precipitar as proteínas. O sobrenadante (fração solúvel) e o precipitado (fração insolúvel) foram recolhidos. À fração solúvel e à insolúvel foi adicionado 1 volume de tampão de amostra 2x concentrado e as amostras foram fervidas por 5 minutos.

A corrida foi feita à amperagem constante de 30 mA até que o corante de acompanhamento (azul de bromofenol) atingisse a borda inferior do gel. Em seguida, o gel foi corado com uma solução de 0,2% de azul de Coomassie em metanol/ácido acético/água (45:10:45) por 10-15 minutos e depois lavado em ácido acético a 7% ou então submetido a Western blot. O padrão de peso molecular usado foi o SDS-6H (Sigma).

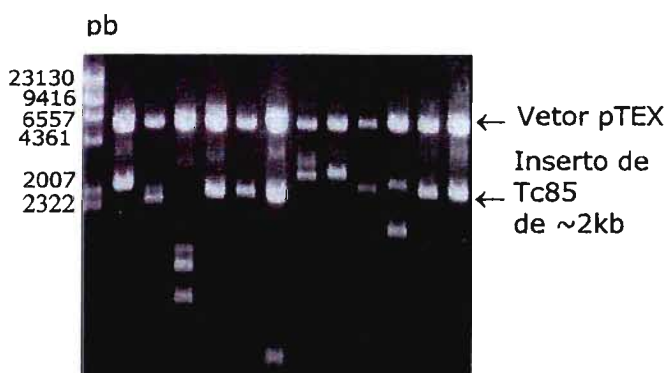
**3.26. Western blot.** As preparações submetidas a eletroforese foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio Rad) a 20 volts por 16-18 horas a 4°C em tampão de transferência (Towbin *et al.*, 1979). Ao final da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau S 0,2% em ácido acético 1% por 10 minutos e lavadas com água.

O bloqueio da nitrocelulose foi feito em tampão TBS 50 mM e leite Molico 3%, pH 8,0 por 60 minutos à temperatura ambiente, com lavagens subsequentes em TBS 50mM-Tween 20 0,03%, pH 8,0. Em seguida, adicionou-se o anticorpo policlonal anti-H3.3 (obtido em coelho) em TBS 50mM-Tween 20 0,03% e Triton X-100 0,05%, pH 8,0, mantendo-se a 4°C por 16-18 horas. A nitrocelulose foi lavada seqüencialmente com: TBS 50 mM pH 8,0, TBS 50mM-Tween 20 0,03% , pH 8,0 e TBS 50 mM, pH 8,0 por 5 a 10 minutos, sendo cada lavagem feita à temperatura ambiente. Repetiu-se o bloqueio como descrito anteriormente. Acrescentou-se como segundo anticorpo, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma), diluído em tampão de bloqueio, deixando-se à temperatura ambiente por 2 horas. Lavou-se com TBS 50mM-Tween 20 0,03%, pH 8,0 por 30 minutos e adicionou-se a solução de revelação para ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**4.1. Biblioteca genômica de Tc-85.** Foi obtida utilizando-se os oligonucleotídeos R-1 (5') ATGTCCCGGCGTGTGTTTACTTCC e GPI-2 (3') TCACAAAGTCGCAAAGCCCCACAGTCC, desenhados para flanquear nas extremidades 5' e 3' dos genes da Tc-85. O vetor escolhido foi o pTEX e os sítios de clonagem foram Bam HI e Xho I.

Todos os clones obtidos desta biblioteca genômica foram analisados em gel de agarose 1%. A análise mostrou que 52 de um total de 57 clones isolados (91%) apresentam insertos com o tamanho esperado (2-2,5 kb) (figura 5).



**Figura 5:** Mini-prep de DNA de diferentes colônias de bactérias transformadas com a biblioteca genômica de Tc85. O DNA foi digerido com Bam HI e Xho I. Os clones aqui mostrados foram escolhidos aleatoriamente. As setas indicam as bandas correspondentes ao vetor pTEX e aos insertos de Tc85 presentes na maioria dos clones selecionados.

Além disso, através do seqüenciamento de dez destes clones foi feito o alinhamento com alguns membros da família das gp85/trans-sialidases e observou-se alta homologia.

Um alinhamento entre os clones sequenciados também indicou alta homologia (40-70 %), mas nenhum deles era totalmente idêntico aos demais (tabela 2). Foi feito também um alinhamento da região correspondente ao peptídeo sinal, que contém aproximadamente 26 aminoácidos e observou-se 90% de homologia, incluindo a seqüência do primer utilizado (figura 6). Esta região foi observada devido a um trabalho publicado recentemente que mostrou ausência do peptídeo sinal na gp82, uma glicoproteína de superfície de *T. cruzi* que também pertence à superfamília gp85/trans-sialidasas. E de maneira muito interessante, esta proteína é expressa em células de mamíferos transfectadas em grande quantidade, todavia, não é importada pelo retículo endoplasmático e glicosilada (Ramirez *et al.*, 1999). O mecanismo de sinalização para glicosilação aparentemente é diverso no *Trypanosoma cruzi*.

```

psinal110-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC GCGGTG CTGCTCCTCCTCGTCGTGATGATGTGCTTCTGCNCGAGTGGTGGAGCT
psinal122-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC .....C.TGTT..A.....G..C.....
psinal113-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC .....C.TGTT..A.....N..A.....
psinal103-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC A.....T.....C..T.....TGGATT..A...AAC..T.....
psinal116-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC .....AC..T.....TTG.....T..GTG..TG..AGC...CGACC...
psinal121-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC .....AT..T.....TTC.....T..GTG..TG..AGC...CA..CC...
psinal102-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC ..T.....AT..T.....TT.....GCA..TG..AGC..ACNNNN...
psinal120-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC .....G.....T.....A...GCG...A..TG...A..CT...
psinal125-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC A..NNNCGT.....T.....GCG...ACTG...ACTT...A
psinal123-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC .....C..T..A.....GCG...ATTG...AA..CT..TG
psinal124-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC .....GATGTGAGGCA..GGTG..GCCTCGAACNCC..TG
psinal112-5 ATGTCCCGGC GTGTGTTTACTTCC A.....C.....G.....C..T..TTT..CTTG..T.A...A..G...TGCG..CA..TC...GT

```

**Figura 6:** Alinhamento da provável região do peptídeo sinal incluindo a seqüência do primer (barra destacada).

Tabela de homologia das extremidades 5' dos clones de Tc-85

102	103	110	112	113	116	119	120	121	122	123	124	125	
-	57	55	57	57	79	39	55	76	53	52	51	53	102
	-	61	66	61	59	39	56	55	56	56	66	61	103
		-	56	91	61	35	72	49	80	65	63	62	110
			-	57	63	43	58	51	51	52	68	58	112
				-	61	39	67	50	83	62	58	58	113
					-	42	61	79	60	52	64	59	116
						-	46	45	48	40	36	43	119
							-	42	65	79	67	71	120
								-	52	49	48	54	121
									-	59	47	55	122
										-	56	70	123
											-	49	124
												-	125

Tabela de homologia das extremidades 3' dos clones de Tc-85

102	103	110	112	113	116	119	120	121	122	123	124	125	
-	62	49	32	37	58	57	44	60	41	59	39	55	102
	-	45	65	41	51	54	45	48	49	56	37	54	103
		-	53	98	56	73	62	54	93	57	48	62	110
			-	50	44	47	52	41	48	53	44	44	112
				-	52	66	56	51	95	49	44	49	113
					-	54	62	92	53	57	45	55	116
						-	62	51	68	64	46	70	119
							-	48	57	88	58	79	120
								-	49	50	49	60	121
									-	56	53	55	122
										-	52	85	123
											-	37	124
												-	125

**Tabela 2:** Em ambas as tabelas está indicada a porcentagem de similaridade de seqüências de nucleotídeos entre os diversos membros da biblioteca genômica de Tc-85 selecionados aleatoriamente. Como pode ser observado, em nenhum caso a similaridade foi de 100% (dados obtidos no programa Align).

Após o sequenciamento, 22 clones foram escolhidos para se obter um padrão de restrição. A enzima escolhida foi a Sau 3AI cujo sítio de restrição reconhece 4 nucleotídeos ( 5' ↓GATC 3' ), portanto, com a



probabilidade de encontrar um sítio de restrição a cada 256 nucleotídeos. Os fragmentos foram purificados e digeridos com Sau 3AI. Dos 22 clones, todos apresentaram diferentes padrões de restrição, sugerindo que eram distintos (dados não mostrados).

Estes dados mostram a grande similaridade, mas também a presença de distintos genes codantes para as várias moléculas da família da Tc-85 selecionados, o que aumenta a diversidade de moléculas que poderiam estar presentes na superfície dos parasitas em um dado momento. Isso poderia modular a capacidade invasiva do *T. cruzi* em decorrência de vários sítios de ligação possíveis a componentes da matriz extracelular e da superfície das células do hospedeiro. Não temos, no entanto, qualquer dado que indique se ou quais desses genes são expressos pelo parasita.

#### **4.2. Biblioteca genômica da família das gp85/trans-sialidases.** O

projeto, tal como proposto inicialmente, não pôde ser implementado uma vez que a biblioteca parcial de genes da Tc-85 construída anteriormente fornecia proteínas de fusão pouco solúveis. Deve-se considerar que estas proteínas possuem uma região do peptídeo sinal na porção amino-terminal que direciona a proteína para o retículo endoplasmático para glicosilação e, na porção carboxi-terminal, uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos típicos de inserção de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Giordano *et al.*, 1999). Essas considerações, somadas à grande diversidade aparente dos genes e do desconhecimento de quais genes poderiam ser expressos pelo parasita nos levaram a preparar outra biblioteca parcial de Tc-85 utilizando oligonucleotídeos desenhados de forma a excluir as duas porções nas extremidades da molécula. Houve também a intenção de abranger o maior número possível de genes da família, já que os oligonucleotídeos foram baseados na seqüência comum das gp85/trans-sialidases (figura 7).

A utilização inicial da DNA polimerase Deep Vent® (New England Biolabs) nas reações de PCR com os novos oligonucleotídeos visou aproveitar as propriedades desta enzima, pois ela produz diretamente fragmentos com extremidades não coesivas e também possui atividade revisora do DNA (exonucleásica). Entretanto, a quantidade de produto

formada foi bastante baixa possivelmente devido a esta mesma atividade de exonuclease, com a degradação do DNA após alguns ciclos de PCR. Além disso, essa polimerase foi muito pouco reprodutível, isto é, em condições idênticas observou-se a formação de quantidades de DNA muito variáveis. Por essas razões, após várias tentativas utilizamos a AmpliTaq™ Gold (Perkin Elmer) que adiciona algumas adeninas na extremidade 3' do DNA. Estes nucleotídeos foram retirados com a utilização do Sure Clone™ Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

A utilização da AmpliTaq possibilitou a obtenção de uma boa quantidade de fragmentos (200ng/50µl de reação) de tamanho esperado (2-2,5 Kb), apesar de que a purificação pelo SureClone™ Ligation Kit resultou em certa perda de produto, chegando-se ao final com 10 ng/µl.

Uma vez que a fosfatase alcalina provoca degradação nas extremidades do vetor, foram feitos controles para verificar a qualidade das enzimas utilizadas (Ehe I, ligase e fosfatase alcalina) e das bactérias competentes. Apesar dessas tentativas, nossos resultados foram negativos.

Supomos que a dificuldade de ligar extremidades não coesivas tenha sido responsável pelos resultados insatisfatórios deste primeiro passo, apesar de todas as modificações introduzidas. Com isso, optamos por preparar uma biblioteca de cDNA de Tc-85 utilizando outro vetor



que facilitasse a ligação com os insertos. Ademais, há a vantagem teórica do cDNA representar o conjunto de proteínas possivelmente expressas em determinada fase da célula.

**4.3. Biblioteca de cDNA.** Para a construção de uma nova biblioteca, foram utilizados os oligonucleotídeos degenerados (figura 7) tendo como base regiões mais afastadas do início e do fim da molécula, isto é, regiões afastadas da região do peptídeo sinal (5') e inserção de âncora de GPI. Dessa maneira, a construção da nova biblioteca visou à retirada destas porções para teoricamente possibilitar a obtenção de uma proteína de fusão solúvel e a seleção de um espectro amplo de genes da família das gp85/trans-sialidases. Dessa biblioteca foram selecionados 60 clones.

(5')

ATTTTTGTTCCGCAGAAGACGCAGGTG

SA85-1 (187) CTTTTGTGCCGCAGAAGACGCAGGTGCTGCCGAAGAAGGGGCCTGACTCA  
 TC85-11 (190) . . A . . . . . T . . . . . C . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . . G . . . . .  
 GP85-1 (136) . . A . . . . . GT. T. . . . . T. . . . . GAGGT. . . AGG . A. T. . . . .  
 SILVIO (127) A . G . . . . . A . . . . . . G . A . . A . . A . GT. . . TGG. . . . AGGC  
 GP85-2 (61) A . G . . . . . A . . . . . . G . A . . A . . A . GT. . . TGG. . . . AGGC  
 TSA-1 (52) A . GC . . . . . A . T . . . . . . G . A . . A . . A . GT. . . TGG. . . . AGGC  
 TSA-E3 (54) A . G . . . . . A . . . . . . G . A . . A . . A . GT. . . TGG. . . . AGGC

(3')

CAGAAAGACATGTTGGCGGGTGACTTA \*

SA85-1 (2002) GTCTTTCTGTACAACCGCCCACTGAATTCCACTGAAATGCGTGCAATCAAG  
 TC85-11 (2005) . . . . . G . . . . . AC . . . . .  
 GP85-1 (1930) . . . . . G . . . . .  
 SILVIO (1912) . . . . . G . . . . . G . G . TGA . . . . . C . AAAAATG . . . . .  
 GP85-2 (1915) . . . . . G . GT . GG . . . . . C . AAAAATG . . . . .  
 TSA-1 (2012) . . . . . G . GT . GG . . . . . C . AAAAATG . . . . .  
 TSA-E3 (54) . . . . . G . GT . GG . . . . . C . AAAAATG . . . . .

\*ATTCAGTGGGCGGTTGTACAGAAAGAC

**Figura 7:** Alinhamento de diversos genes da família das gp85/trans-sialidases (já descritos na literatura) e a seqüência dos dois oligonucleotídeos desenhados para a construção da biblioteca enriquecida em genes codantes da família.

O DNA isolado de cada clone foi tratado com enzimas de restrição (Bam HI e Eco RI), verificando-se que cerca de 90% dos 60 clones obtidos da biblioteca de cDNA apresentam tamanho esperado (~2kb) e que alguns deles apresentavam um padrão mais complexo com mais de uma banda de digestão o que indica a presença de outros sítios de Bam HI ou Eco RI (figura 8). Após esta análise partiu-se imediatamente para o sequenciamento.



**Figura 8:** Digestão de clones aleatórios da biblioteca de cDNA com Bam HI e Eco RI. As setas estão indicando o vetor utilizado e os fragmentos de cDNA de ~2kb. A sexta canaleta, da esquerda para direita, há pouco DNA, pois as bactérias utilizadas na mini-prep cresceram pouco.

**4.4. Seqüenciamento de DNA.** O seqüenciamento das extremidades 5' e 3' terminais de 13 clones selecionados da biblioteca genômica de Tc-85 (102, 103, 110, 112, 113, 116, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125) foi realizado.

Na biblioteca de cDNA de Tc-85, das 50 reações de seqüenciamento automático realizadas, somente nove seqüências apresentaram bons resultados. Ao comparar as seqüências obtidas com as contidas no GenBank™, verificamos que todas tinham homologia com a superfamília das gp85/trans-sialidases. Ao efetuar o alinhamento das seqüências dos clones entre si, encontrou-se uma homologia de 60-80%. O alinhamento desses clones está mostrado na figura 9. A comparação das seqüência de aminoácidos deduzidas de quatro desses clones (3, 10, 33, 34) mostrou 40-50% de identidade com a Tc85-11 e 40-65% entre si (figura 10). Todavia, essas seqüências de aminoácidos

deduzidas apresentam alguns "stop codons" que muito provavelmente decorrem de erros na seqüências dos nucleotídeos. Deve-se ressaltar no entanto, que a presença de "stop codons" em mRNA de *T. cruzi* já foi detectada por outros grupos da área. O alinhamento das seqüências de aminoácidos das extremidades amino-terminal e carboxi-terminal de alguns clones mostrou regiões conservadas nas duas extremidades, com a presença porção carboxi-terminal, da "seqüência FLY". Entretanto, a região correspondente ao peptídeo G que contém o epítipo do anticorpo monoclonal H1A10, não foi observada (figura 12).

Deve-se notar ainda que as regiões correspondentes ao ASP box, característica da família, não estão compreendidas na porção sequenciada.

**4.5. Expressão das proteínas de fusão.** Para realizar uma primeira análise, todos os 60 transformantes foram submetidos ao protocolo de expressão, como descrito em "Material e Métodos", utilizando-se a cepa bacteriana BL21(DE3)/plyS.

**4.6. Análise por Western blot.** Dos 60 clones expressos como acima, detectaram-se quatro clones (3, 10, 33, 34) reconhecidos por um anticorpo policlonal anti-H3.3 (fragmento interno da Tc-85), quando da realização dos "imunoblots". Das amostras obtidas como no item "Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE unidimensional)" retirou-se uma alíquota de 10 $\mu$ l que foi aplicada no gel para transferência em membrana de nitrocelulose. As proteínas assim utilizadas não foram submetidas à dosagem.

A migração das bandas indicadas (figura 11) está anormal, ou seja, está mais abaixo de que esperávamos. Há várias possibilidades para explicar esses resultados. O primeiro fator é a ausência de nas extremidades do peptídeo sinal e da cauda hidrofóbica que já tinham sido retiradas ao selecionar os oligonucleotídeos iniciadores e ao obter o cDNA correspondente. Outras possibilidades poderiam ser a migração anômala da proteína de fusão em SDS-PAGE ou mesmo a degradação das proteínas de fusão. Também é observado que as proteínas de fusão estão na fração insolúvel da preparação. As quatro (3, 10, 33, 34) proteínas de fusão analisadas não foram reconhecidas pelo anticorpo monoclonal H1A10 em ensaios de Western blot (dados não mostrados), confirmando os resultados do seqüenciamento descritos anteriormente.

**4.7. Considerações Finais.** A Tc-85 em tripomastigotas está relacionada com a capacidade invasiva do parasita. Em nosso laboratório, foi confirmado este fenômeno inibindo-se a penetração de tripomastigotas em células de cultura com o MabH1A10 (Alves *et al.*, 1986). É notável que o epítipo reconhecido pelo monoclonal H1A10 está localizado em uma região pouco conservada entre os diferentes membros da família, exemplificando seu polimorfismo. A Tc-85 apresentou-se polimórfica quando analisada por eletroforese bidimensional (pIs 5,5-9,0) (Abuin *et al.*, 1989), portanto constituindo uma família de proteínas. Os genes das gp85 e Tc-85 estão dispersos em múltiplo sítios do genoma, sendo observada sua presença em muitas bandas cromossômicas (Giordano *et al.*, 1999). Um dos membros, com pI ácido, liga-se à laminina, componente mais importante da lâmina basal (Giordano *et al.*, 1994), levantando a possibilidade de que pelo menos alguns membros da família sejam moléculas de adesão (Alves, 1996).

Os resultados descritos neste trabalho confirmam a grande heterogeneidade da superfamília das gp85/trans-sialidases composta de cerca de 1000 genes. O sequenciamento das extremidades 5' e 3' do DNA de uma biblioteca genômica parcial, enriquecida em genes de Tc-85, e o seu posterior alinhamento mostrou que todas as seqüências tinham similaridade significativa com os membros da família das

gp85/trans-sialidases. E, fato relevante, todos os 52 clones selecionados são distintos entre si (tabela 2).

A análise de restrição da biblioteca parcial de cDNA das gp85/trans-sialidase com as enzimas Bam HI e Eco RI também mostrou um padrão de restrição variável. O sequenciamento do DNA de alguns clones desta biblioteca e sua comparação com dados depositados no GenBank™, permitiu verificar que todas as seqüências eram homólogas com a superfamília das gp85/trans-sialidases. O alinhamento das extremidades 5' e 3' desses clones mostrou 60-80% de homologia entre si e 40-50% de identidade. As três seqüências a 3' obtidas apresentam a região correspondente à "seqüência FLY" conservada, típica da família. Novamente, embora neste caso poucos membros tenham sido analisados, os clones são bastante distintos entre si, sendo que em nenhum deles foi encontrada a região codante para o peptídeo G, que contém o epítipo do MabH1A10. A ausência de reação da proteína de fusão dos clones selecionados com o MabH1A10 (dado não mostrado) nos experimentos de Western blot confirma a ausência do epítipo nas seqüências analisadas. Da proteína de fusão dos 60 clones, ainda por análise de Western blot, somente 4 foram reconhecidos por um anticorpo policlonal (anti H3.3) feito contra um fragmento interno de 132 aminoácidos da Tc85-11.

Embora tenhamos analisado um número pequeno de genes expressos nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, chama a atenção a grande variabilidade encontrada. A pergunta imediata que surge, além de qual a função do produto de cada um, é se a variabilidade é devida a um grande número de genes expressos por diferentes membros da população de *T. cruzi*. Na tentativa de elucidar esse tipo de questão, Kahn *et al.* (1999) detectaram na superfície da célula, a presença de pelo menos dois subgrupos da glicoproteína SA85-1, um membro da família das gp85/trans-sialidases, em um único parasita. Esta análise foi feita utilizando-se uma série de anticorpos monoclonais contra várias porções da molécula.

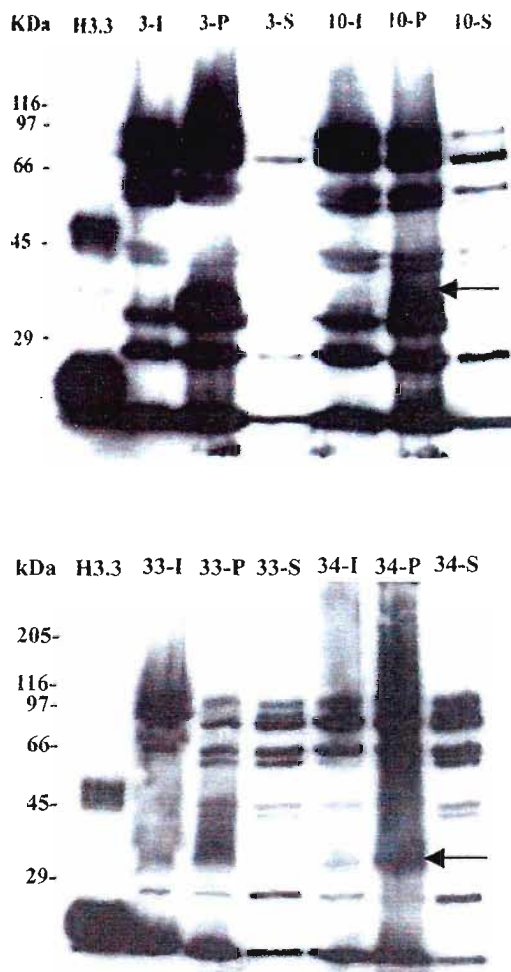
Dados da literatura (Abuin *et al.*, 1999) mostram que a expressão da trans-sialidase e da Tc-85 em determinado estágio do parasita é controlado por regulação pós-transcricional. Os níveis de mRNA de amastina, de trans-sialidase e de genes membros da família de glicoproteínas de 85kDa foram analisados por Northern blot. Foi observado que o nível de mRNA de amastina é alto em amastigotas, o mRNA de trans-sialidase é encontrado principalmente em formas intermediárias de desenvolvimento (epimastigota intracelular). O mRNA de Tc-85 é observado somente nas formas tripomastigotas. Seria interessante verificar nos genes por nós isolados, qual a sua distribuição nos diferentes estágios do *T. cruzi* e a relação da proteína respectiva



com o mecanismo de invasão da célula hospedeira pelo parasita. Nosso trabalho abre a perspectiva ao laboratório de realizá-lo em futuro próximo.







**Figura 11:** Western Blot revelado com o anticorpo anti-H3.3 dos clones 3, 10, 33 e 34 da biblioteca de cDNA. As bandas indicadas (setas) estão presentes no extrato total induzido de 3 horas (I) e na fração insolúvel (P) da preparação. O sobrenadante está indicado por "S" (fração solúvel).

**(A)**

(1) MSRRVFASAVLLLLLVLCDDRGAATTAQVEKATDASTPSGSALTGAI TAAGSASGSVELPQESILFVPOQTQVLQKTGTGSSGRDSFVPSLSVSAAGVIAAFEAEGRINAKNTSPTE (115)  
-----F\_PP\_P-----  
-----KNH.VT.\_SEIGVKFA.LT..LN...MV...SIVAIDF...G.  
-----K...VT.EESEIGVKFA.LT..L...MV...SIVAIDFS..G.  
-----HK...VT.EESEIGVKFA.LT..L...MV...SIVAIDFS..G.  
-----K...VT.EESEIGVKFA.LT..L...MV...SIVAIDFS..G.  
-----R.VT.\_ESEIGAKFA.LT.....  
-----

**(B)**

Peptídeo G "Sequência FLY"  
(592) (637)  
1 ---TGETPLEPFGFCGACGEDDDGEEPSPEEIGKKPR-----VVTNVFLYNRPLN-----  
2 VPL...K...I.A...KI.G.E..S.K.....  
3 ---P...-----LGHEITHFYFGGEGDINSN-----KGWILLIVIV  
4 ---MIPTLETQGEIIPQFYVGGDEGDINSS..M.....  
5 ---MIPTLETQGEIIPQFYVGGDEGDINSS..M.....

**Figura 12: (A)** Alinhamento da sequência de aminoácidos da região amino-terminal de: 1) Tc85-11 2) clone 3 3) clone 4 4) clone 10 5) clone 13 6) clone 14 7) clone 33.

**(B)** Alinhamento da sequência de aminoácidos da região carboxi-terminal de: 1) Tc85-11 2) SA85 3) clone 12 4) clone 33 5) clone 34.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Abuin, G.; Freitas-Junior, L. H. G.; Colli, W.; Alves, M. M. A; Schenkman, S. (1999) Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. *J. Biol. Chem*, **274(19)**: 13041-13047.
- Abuin, G.; Colli, W.; Alves, M. J. (1989) Turnover and shedding of the Tc-85 surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **29(3)**: 335-341.
- Alves, M. J. M.; Abuin, G; Kuwajima, V. Y.; Colli, W. (1986) Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **21**: 75-82.
- Alves, M. J. (1996) Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are adhesion proteins. *Braz. J. Med. Res.* **29(7)**: 831-833.
- Andrade. S. G. (1974) Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Pat. Trop.*, **1**: 65-121
- Araújo-Jorge, T. C. (1989) The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **84 (4)**: 441-462.
- Burleigh, B. A.; Andrews, N. W. (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**: 175-200
- Buscaglia, C. A. *et al* (1998) The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. *J. Infect. Dis.*, **177**: 431- 436.

- Buschiazzo A.; Campetella, O., Frasch, A. C. (1997) *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology*, **7(8)**: 1167-1173.
- Camargo, E. P. (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **6**: 93-100
- Castellani, O.; Ribeiro, L.V.; Fernandes, J. F. (1967) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.*, **14**: 447-451.
- Charonis, A. S.; Tsilibary, E. C.; Yurchenco, P. D., Furthmayr, H , Coritz, A. (1985) Binding of laminin to type IV collagen: A morfological study. *J. Cell Biol.*, **100 (6)**: 1848-1853.
- Cheng, C.; Shuman, S. (2000) DNA strand transfer catalyzed by vaccinia topoisomerase: ligation of DNAs containing a 3'mononucleotide overhang. *Nucl. Acids Res.*, **28(9)**: 1893-1898.
- Colli, W. (1993) Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.*, **7(13)**: 1257-1264.
- Cornette, J.; Capron, A.; Ouassi, M. A. (1988) *Trypanosoma cruzi*: fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **86(2)**: 139-146.
- Couto, A. S.; Gonçalves, M. F.; Colli, W. e Lederkremer, R. M. (1990) The N-linked carbohydrate chain of the Tc-85 kilodalton glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes contains sialyl, fucosyl and galactosyl (a1-3) galactose units. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **39**: 101-108.

- Couto, A. S.; Lederkremer, R. M.; Colli, W. e Alves, M. J. M. (1993) The glycoposphatidylinositol anchor of the trypomastigote specific Tc-85 glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.*, **217**: 597-602.
- Cross, G. A. M. , Takle, G. B. (1993) The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**: 385-411.
- Dias, E. (1934) Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **28**:1-110.
- Dvorak, J. A. e Howe, C. L. (1976) The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells *in vitro*. *J. Protozool.*, **23**: 534-537.
- Engvall, E. & Rouslahti, E. (1977) Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer*, **20**: 1-5.
- Franchin, G.; Pereira-Chiocola, V. L.; Schenkman, S. & Rodrigues, M. M. (1997) Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infect. Immun.*, **65(7)**: 2548-2554.
- Frasch, A. C. C. (2000) Functinal diversity in the Trans-sialidase and Mucin Families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, **16(7)**: 282-286.
- Gafvelin, G.; Sakaguchi, M.; Andersson, H. e von Heijne, G. (1997) Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 6119-6127
- Giordano, R.; Fouts, D. L.; Tewari, D.; Colli, W.; Manning, J. E.; Alves, M. J. M. (1999) Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J. Biol. Chem.*, **274( 6)**: 3461-3468.



- Giordano, R.; Chammas, R.; Veiga, S. S.; Colli, W.; Alves, M. J. (1994) An acidic component of the heterogenous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **65(1)**: 85-94.
- Giordano, R.; Chammas, R.; Veiga, S. S.; Colli, W.; Alves, M. J. M (1994) *Trypanosoma cruzi* binds to laminin in a carbohydrate-independent way. *Braz. J. Med. Res.*, **27(9)**: 2315-2318.
- Hanahan, D. (1983) Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580.
- Kahn, S. J.; Nguyen, D.; Norsen, J. Wleklinski, M. Granston, T.; Kahn, M. (1999) *Trypanosoma cruzi*: monoclonal antibodies to the surface glycoprotein superfamily differentiate subsets of the 85-kDa surface glycoproteins and confirm simultaneous expression of variant 85-kDa surface glycoproteins. *Exper. Parasitol.*, **92**: 48-56
- Katzin, A. M. e Colli, W. (1983) Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*, an N-acetyl-D-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochim. Biophys. Acta*, **727**: 403-411.
- Kress, Y.; Bloom, B. R.; Wittner, M.; Rowen, A. e Tanowitz, H. (1975) Resistance of *Trypanosoma cruzi* to killing by macrophages. *Nature*, **257**: 394-396.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Melo, R. C. e Brenez, Z. (1978) Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, **64** (3): 475-482.
- Nogueira, N. e Cohn, Z. (1976) *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, **143**: 1402-1420.

- Ortega-Barria, E.; Pereira, M. E. (1991) A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*, **67(2)**: 411-421.
- Pereira, C. M.; Favoreto Jr, S.; Franco, J.; Yoshida, N. e Castilho, B. A. (1999) Adhesion of *Escherichia coli* to HeLa cells mediated by *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein-derived peptides inserted in the outer membrane protein LamB. *Infec. Immun.*, **67(9)**: 4908-4911.
- Ouaisi, A. Cornette, J. Schoneck, R.; Plumas-Marty, B.; Taibi, A.; Loyens M.; Capron, A. (1992) Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur. J. Cell. Biol.*, **59(1)**: 68-79.
- Ramirez, M. I.; Boscardin, S. B.; Sang, W. H.; Paranhos-Baccala, G.; Yoshida, N.; Kelly, J. M.; Mortara, R. A. e Franco, J. (1999) Heterologous expression of a *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein (gp82) in mammalian cells indicates the existence of different signal sequence requirements and processing. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **46(6)**: 557-565.
- Ramirez, M. I.; Ruiz, R. C.; Araya, J. E.; Franco, J. e Yoshida, N. (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect. Immun.*, **6**: 3636-3641.
- Ribeirão, M.; Pereira-Chioccola, V. L.; Eichinger, D.; Rodrigues, M.M., Schenkman, S. (1997) Temperature differences for transglycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* sialidase. *Glycobiology*, **7(8)**: 1237-1246.
- Sanger, F.; Nicklen, S. e Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5463-5467

- Schenkman, S.; Eichinger, D.; Pereira, M. E. A. e Nussenzweig, V. (1994) Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**: 499-523.
- Schenkman, S.; Jiang, M. S.; Hart, G. W. e Nussenzweig, V. (1991) A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, **65**: 1117-1125.
- Schenkman, S.; Andrews, N. W.; Nussenzweig, W. e Robbins, E. S. (1988) *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell*, **55**:157-165.
- Smith, L. E., Eichinger, D. (1997) Directed mutagenesis of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enzyme identifies two domains involved in its sialyltransferase activity. *Glycobiology*,**7(3)**, 445-451.
- Tardieux, I.; Nathanson, M. H. e Andrews, N. A. (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free Ca<sup>2+</sup> transients. *J. Exp. Med.*, **179**: 1017-1022.
- Tardieux, I.; Webster, P.; Ravesloot, J.; Boron, W.; Lunn, J. A.; Heuser, J. E. e Andrews, N. A. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for Trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, **71**: 1117-1130.
- Technical Tips (1995) *Trends in genetics*, **11(4)**: 128.
- Tomlinson, S. e Raper, J. (1998) Natural human immunity to trypanosomes. *Parasitology Today*, **14**:354-359.
- Towbin, H.; Stachelin, T.; Gordon, J. (1979) Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.

WHO disease: a disease whose days are numbered. Geneva: Division of Control of Tropical Diseases. World Health Organization, 1996. 16p.

Yoshida, N.; Blanco, S. A.; Araguth, M. F.; Russo, M. e Gonzales, J. (1990) The stage-specific 90 kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **39**: 39.