**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

KETNA GUILHERMINO KHUSAL

**Caracterização de um receptor de *Trypanosoma cruzi*
identificado por técnica de *phage display***

Versão corrigida

(Versão original disponível na Biblioteca do Instituto de Química da Universidade de São Paulo)

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
24/05/2011

KETNA GUILHERMINO KHUSAL

Caracterização de um receptor de *Trypanosoma cruzi*
identificado por técnica de *phage display*

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Biológicas
(Bioquímica).*

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Maria Júlia Manso Alves

São Paulo
2011

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

K45c Khusal, Ketna Guilhermino
Caracterização de um receptor de *Trypanosoma cruzi* identificado
por técnica de *phage display* / Ketna Guilhermino Khusal. --
São Paulo, 2011.
107p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Alves, Maria Júlia Manso

1. Bioquímica 2. Biologia celular : Trypanosoma 3. Receptores :
Biologia molecular I. T. II. Alves, Maria Júlia Manso, orientador.

574.192 CDD

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e minha irmã pelo apoio constante.

À Professora Dra. Maria Julia Manso Alves, pela orientação durante este trabalho, pelas ricas discussões e pelo apoio.

Ao professor Dr. Walter Colli, pelas discussões e apoio oferecidos.

Ao grupo de pesquisa dos Professores Dra. Maria Julia, Dr. Walter Colli e Dr. Robert Ivan Schumacher no Instituto de Química da USP – Eliciane Mattos, Viviana Paes, Renata Tonelli, Ana Cláudia Torrecilhas, Mayara Uchiyama – e aos técnicos do laboratório – Célia Ludio, Marinêi, Roberto e Maria Luiza Baldini.

À Professora Dra Nathalie Cella, pelas animadas discussões e pelo apoio oferecido.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação foi financiado pelas agências de fomento CNPq e FAPESP.

RESUMO

Khusal, K. G.

Caracterização de um receptor para *Trypanosoma cruzi* identificado por técnica de *phage display*, 2011.

107 páginas.

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado agente causador da Doença de Chagas, patologia endêmica da América Latina. Tripomastigotas de *T. cruzi* expressam em sua superfície celular glicoproteínas denominadas Tc-85 e pertencentes à superfamília gp85/trans-sialidase. Vários membros desta superfamília têm sido implicados na invasão das células hospedeiras pelo *T. cruzi* e componentes da matriz extracelular, como fibronectina e laminina, foram descritos como alguns de seus ligantes.

Utilizando a técnica de *phage display*, a seqüência GGIALAG foi identificada por ligar-se especificamente e de uma forma dose-dependente ao H3.3p, uma proteína recombinante que corresponde a um fragmento interno de um membro clonado da Tc85 (Tc85-11). A análise através de alinhamento identificou o receptor de procineticina 2 (PKR2) como candidato putativo. Os receptores de procineticina (PKR1 e PKR2) são expressos em muitos tecidos e estruturalmente são membros da família da rodopsina,

com sete domínios transmembranares e sítios putativos para modificações pós-traducionais. Os ligantes, as procinetinas 1 e 2, são peptídeos envolvidos em uma variedade de processos biológicos, tais como angiogênese, hematopoiese, diferenciação de monócitos, ativação de macrófagos, sobrevivência neuronal, ativação do bulbo olfatório, motilidade gastrointestinal, nocicepção, ritmo circadiano, coordenação do comportamento circadiano e sua fisiologia e na função reprodutiva.

Com o objetivo de verificar se os PKRs poderiam ser receptores de Tc85, foi utilizada a linhagem epitelial MCF10A, derivada de células mamárias humanas, que expressam PKR2 e PKR1, avaliado pelas técnicas de imunofluorescência, Western Blot e RT-PCR. A estratégia envolveu ensaios de ligação da proteína recombinante H3.3p e ensaios de inibição da invasão por *T. cruzi* em células MCF10A utilizando anticorpo anti-PKR2 ou um peptídeo sintético com a sequência GGIALAG. Este trabalho mostrou que 1. H3.3p se liga à superfície de MCF10A, detectado por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo monoclonal G1/G8 (que reconhece H3.3p); 2. H3.3p se liga a uma banda de ~45 kDa em um extrato de MCF10A, observado em um blot de nitrocelulose (“overlay”) 3. O peptídeo sintético GGIALAG inibe a ligação do H3.3p à banda de ~45 kDa do extrato de MCF10A, região reconhecida pelo anticorpo anti-PKR2; 4. Os antígenos reconhecidos por anticorpos anti-PKR2 e anticorpos anti-GGIALAG colocalizam na superfície da célula MCF10A, avaliada por microscopia confocal; 5. Anticorpos anti-PKR2 inibem até ~ 60% da infecção de MCF10A pelo *T. cruzi*; 6. O peptídeo sintético GGIALAG (0,2mM) inibe até ~ 40% da infecção de MCF10A pelo *T. cruzi*; 7. Anticorpos anti-PKR1 inibem até ~ 60% da infecção de MCF10A pelo *T. cruzi*. Em conjunto, e aliado ao fato de PKRs serem expressos numa grande variedade de tecidos e órgãos, incluindo alguns classicamente

alvo de *T. cruzi*, os dados sugerem que PKRs são ligantes para *T. cruzi* durante a infecção. Os dados sugerem ainda que a sequência de aminoácidos GIALAG, presente em PKR2 estaria envolvida neste processo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Tc85, receptor de procineticina 2, células MCF10A.

ABSTRACT

Khusal, K. G.

Characterization of a putative receptor for *Trypanosoma cruzi* identified by *phage display*, 2011.

Number of pages, 107.

Master Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Trypanosoma cruzi is a flagellated protozoan causing Chagas' disease. Trypomastigotes, an infective stage of *T. cruzi*, express at the cell surface members of Tc85, glycoproteins that belong to the gp85/trans-sialidase gene superfamily. Several members of the superfamily have been implicated in the invasion of host cells by *T. cruzi* and components of the extracellular matrix, as fibronectin and laminin, were described as their ligands.

Using the phage display technique, a sequence (GGIALAG) was identified that specifically binds in a dose-dependent manner to H3.3p, a recombinant protein corresponding to an internal fragment of a cloned member of Tc-85. Alignment analysis identified the prokineticin receptor 2 (PKR2), as a putative candidate. Prokineticin receptors (PKR1, PKR2) are expressed in many tissues and are members of the rhodopsin family, with seven transmembrane domains and putative post-translational

modifications. The ligands, prokineticins 1 and 2, are peptides involved in a variety of biological processes, such as angiogenesis, hematopoiesis, monocyte differentiation, neuronal survival, macrophage activation, olfactory bulb activation, gastrointestinal motility, pain sensitization, circadian rhythm and coordination of circadian behavior and physiology, as well as in reproduction function.

In order to verify whether PKRs may be Tc85 receptors, MCF10A, a human mammary epithelial cell line, which expresses PKRs, as assessed by indirect immunofluorescence, Western Blot and RT-PCR, was employed as host cell. The strategy involved binding assays of H3.3p to MCF10A and invasion assay of MCF10A by *T. cruzi* in the presence of the synthetic peptide GGIALAG or in the presence of anti-PKR1, anti-PKR2 and anti-GGIALAG antibodies. This work shows that: 1. H3.3p binds to the surface of MCF10A; 2. H3.3p binds to a ~45 kDa band in a nitrocellulose blot of MCF10A cell extract (overlay); 3. The synthetic peptide GGIALAG inhibits the binding of H3.3p to the ~45 kDa band of MCF10A cell extract in the same region recognized by anti-PKR2 antibody; 4. The antigens recognized by anti-PKR2 antibody and by anti-GGIALAG antibody co-localize at the cell surface of MCF10A; 5. Anti-PKR2 antibody inhibits by ~60% the infection of MCF10A by *T. cruzi*; 6. The synthetic peptide GGIALAG (0.2 mM) inhibits by ~40% the infection of MCF10A by *T. cruzi*. 7. Anti-PKR1 antibody inhibits by ~60% the infection of MCF10A by *T. cruzi*;

Altogether, and supported by the fact that PKR2 is widely expressed, including some classical targets of *T. cruzi*, the data herein indicate a possible role of PKR2, in particular the amino acid sequence GGIALAG, as a ligand for *T. cruzi* infection.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Tc85, prokineticin receptors, MCF10A cells.

ÍNDICE

Introdução	12
1. <i>Trypanosoma cruzi</i> : da Doença de Chagas à biologia celular.....	12
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> : parasita causador da Doença de Chagas.....	12
1.2 Características morfológicas do parasita	15
1.3 Ciclo de vida	17
1.4 Interação parasita-hospedeiro: processos de invasão e sinalização	20
1.4.1 Processos de invasão	21
1.4.2 A superfamília das gp85/Trans-sialidase e principais moléculas envolvidas na invasão por <i>T. cruzi</i>	22
1.4.3 Interação de <i>T. cruzi</i> com a matriz extracelular do hospedeiro	26
1.4.4 Tc85 – proteína multi-adesiva	31
2. A via das Procinetinas e dos Receptores de Procinetinas	32
2.1 As Procinetinas.....	32
2.2 Os receptores de procinetina (PKRs)	34
Objetivo Geral	39
Material e Métodos	40
1. Culturas celulares.....	40
1.1 Manutenção de células.....	40
1.2 Manutenção de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
2. Ensaio de invasão por <i>T. cruzi</i>	41
2.1 Ensaio de inibição da invasão utilizando anticorpos.....	41
2.2 Ensaio de inibição da invasão utilizando o peptídeo GGIALAG	42
2.3 Marcação e contagem da infecção.....	42
3. Métodos gerais de análise.....	43
3.1 Extração de proteína total das culturas celulares	43
3.2 Dosagem de proteínas	44
3.3 SDS-PAGE	44
3.4 Western Blot.....	45

3.5 Imunofluorescência indireta.....	45
3.6 Anticorpos utilizados.....	46
4. Ligação de H3.3p em células MCF10A	47
4.1 Obtenção de H3.3p purificado	47
4.2 Ligação de H3.3p purificado em culturas de MCF10A fixadas	49
4.3 Ligação de H3.3p em extratos de células MCF10A.....	50
5. Obtenção de anticorpo contra o peptídeo sintético GGIALAG	50
5.1 Ligação do peptídeo a BSA.....	50
5.2 Obtenção de anticorpo policlonal	51
5.3 Co-localização de anti-PKR2 e anti-GGIALAG.....	51
6. Análise da via de sinalização mediada pelo peptídeo GGIALAG em <i>T. cruzi</i>	52
6.1. Preparação dos extratos de proteína	52
6.2 Separação das proteínas em Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)	52
7. Clonagem dos Receptores de Procineticina.....	53
7.1 Obtenção dos receptores de procineticina humanos.....	53
7.2 PCR Reversa (RT-PCR)	54
7.3 Clonagem de PKR1 ou PKR2 humanos no vetor pGEM®-T Easy.....	54
7.4 Obtenção do plasmídeo pCDNA3.0 5'F contendo os genes de PKRs	55
7.5 Transfecção de células CHO com lipofectamina	55
7.6 Sequenciamento dos plasmídeos contendo sequências de PKRs humanos	56
7.7 Clonagem de PKR1 ou 2 no vetor de expressão pET28a ⁽⁺⁾	56
7.8 Transformação de <i>E. coli</i> com os receptores PKR1 e PKR2 humanos	57
Resultados e Discussão	58
1. <i>Panning</i> com biblioteca de phage display: possíveis novos ligantes da Tc85.....	58
2. Expressão de receptores de procineticinas em linhagens celulares	59
3. A proteína recombinante H3.3p liga-se à superfície de células MCF10A.....	63
4. Anticorpos contra o receptor de procineticina inibem a invasão de <i>T. cruzi</i>	65
5. O peptídeo sintético GGIALAG inibe invasão de culturas de MCF10A por <i>T. cruzi</i> ...	67
6. Obtenção de anticorpo contra a sequência GGIALAG	69
7. Co-localização de antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-PKR2 e anti-GGIALAG em células MCF10A	70

8. Análise da sinalização desencadeada pelo peptídeo GGIALAG no <i>T. cruzi</i>	72
9. Clonagem dos receptores de procineticina 1 e 2	77
Conclusões	84
Referências	86
Anexos	99
1. A técnica de <i>Phage display</i>	99
2. <i>Primers</i> utilizados	101
3. Mapas dos vetores utilizados	102