UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

***Trypanosoma cruzi* E A INTERAÇÃO COM A MATRIZ
EXTRACELULAR: MODELAGEM DA PROTEÍNA Tc85-11 E
DETERMINAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO A LAMININA**

MIRYAM MARROQUIN QUELOPANA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: Dra. MARIA JULIA MANSO ALVES

SÃO PAULO

30 de outubro de 2003

MIRYAM MARROQUIN QUELOPANA

Trypanosoma cruzi E A INTERAÇÃO COM A MATRIZ
EXTRACELULAR: MODELAGEM DA PROTEÍNA Tc85-11 E
DETERMINAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO A LAMININA

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica.

São Paulo

2003

A mis padres: *Olger y Eliana*, por todo el amor y confianza que me brindaron siempre y por haberme enseñado a luchar por mis ideales.

A *Celso*, mi esposo y a mis hijas *Andrea Nataly y Eliana Paula*, con todo mi amor.

A mis *hermanos* y *sobrinos*, siempre presentes a pesar de la distancia.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Maria Júlia Manso Alves** e ao **Dr Walter Colli**, por me aceitarem no seu laboratório, pela orientação científica no trabalho, confiança e amizade.

Ao **Dr. Alberto Spisni** e a sua equipe da Ressonância Magnética Nuclear do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron pelo apoio na parte estrutural do trabalho, em especial à **Dra. Thelma Pertinhez**, pela discussão do trabalho, à **Rita Figueredo** pelo auxílio técnico nos experimentos de difração circular, ao **Dr. Sergio Oyama Jr.** pela valiosa colaboração na obtenção do modelo da proteína Tc85-11, apresentado neste trabalho.

À **Dra. Vilma R. Martins** e a sua equipe do Instituto Ludwig, pela acolhida no seu laboratório e pelo apoio generoso nas experiências de marcação radiativa da proteína Tc85-N, em especial a **Marilene H. Lopes** e **Gláucia N. M. Hajj**.

À equipe do Laboratório de Sequenciamento do Instituto Butantan, pelo importante apoio.

À equipe da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelo eficiente apoio.

Ao **Dr. Robert Ivan Schumacher**, pelas sugestões e ajuda na microscopia.

Ao **Dr. Henning Ulrich**, pelo constante apoio e as sugestões na purificação receptores de membranas para a proteína Tc85-N (dados não apresentados no presente trabalho).

Ao **Dr. Celso Romero Ramos**, pela sua inestimável ajuda, comentários críticos e sugestões.

A **Marinêi, Célia e Roberto** por manter a organização, prover meios de cultivo e cultura de células e tripomastigotas, fundamentais para a realização deste trabalho e sobretudo pela amizade, carinho e pelos bons momentos vividos nestes anos.

Aos amigos do laboratório: **Débora, Paulo, Melissa, Luiz, Renata, Maga, Ariel, Roberto, Camila, Larissa, Paula**, pelos protocolos, conselhos, apoio e pela amizade.

A *Fernando, Juan, Julio, César, Paola, Luis Fernando, Roberto T., Daniela, Juliana, Anita, Erik, Victor y Alvaro* pela amizade e os momentos de descontração.

Agradesco a mis padres y a mis hermanos: *Charo, Elmer, Mary, Alina, Eliana, Olger y Maribel*, por el incentivo y cariño constantes.

Un agradecimiento especial a *Eliana*, por hacer de la vida lejos de casa menos triste, e a mis hijitas *Andrea Nataly* y *Elanita Paula*, por dar alegría e sentido a mi vida.

A *Celso*, por el amor, paciencia y comprensión.

Agradesco a Dios, por darme fuerzas en los momentos difíciles.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Parasitas do Instituto de Química da USP, sob a orientação da Doutora Maria Júlia Manso Alves, e contou com os auxílios financeiros das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através da bolsa de Mestrado.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através da bolsa de Doutorado Direto.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através da verba concedida ao projeto de pesquisa coordenado pela Dra. M.J.M. Alves.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIACÕES	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2. A doença de Chagas	3
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> : a sua interação com o hospedeiro	4
1.3.1. A Super família gênica das gp85/trans-sialidasas	6
1.4. Moléculas do parasita envolvidas na invasão celular.....	8
1.5. A matriz extracelular	9
1.6. Lamininas	11
1.7. Tc85-11: glicoproteína ligante de laminina	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Linhagens de células e plasmídeos	17
3.1.1 Linhagem Celular:	17
3.1.2 Linhagens de Bactéria.....	17
3.1.3 Plasmídeos	17
3.2. Cultura de células de mamíferos LLC-MK ₂	18
3.3. Cultura das bactérias	18
3.4. Amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonagem dos produtos.....	19
3.5. Extração e digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição	19
3.6. Análise, recuperação e ligação de fragmentos de DNA.....	20
3.7. Preparação e transformação de células competentes das cepas de <i>Escherichia coli</i>	20
3.8. Sequenciamento de DNA e análise das seqüências.....	21
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	21
3.10. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal imobilizado	22
3.11. Dicroísmo Circular	23
3.12. Sínteses de peptídeos	23
3.13. Adesão de células LLC-MK ₂ a peptídeos sintéticos	24
3.14. Invasão de células de cultura pelo <i>T. cruzi</i>	24
3.15. Ensaio de ligação da proteína Tc85-N recombinante a moléculas de matriz extracelular (ELISA)	25
3.16. Ligação da proteína recombinante ¹²⁵ I-Tc85-N com laminina	26
3.17. “Laminin overlay assay”	26
3.18. Produção de anticorpos anti-proteína Tc85-N	27
3.19. Western blot	28
3.20. Imunocitoquímica.....	28

3.21. Alinhamento de seqüências	29
3.22. Modelagem por homologia.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Modelagem por Homologia da Tc85-11.....	30
4.2. Clonagem dos domínios correspondentes ao amino e carboxila da proteína Tc85-11.....	32
4.2.1. Amplificação dos domínios da proteína Tc85-11	33
4.2.2. Clonagem no vetor de expressão pAE.....	39
4.3. Expressão e purificação de proteínas recombinantes	40
4.4. Análise das proteínas recombinantes por Dicroísmo Circular	44
4.5. Mapeamento de sítios de adesão celular no domínio amino terminal da Tc85-11 utilizando peptídeos sintéticos	45
4.6. Inibição da Infecção do T.cruzi na célula de mamífero pelos peptídeos sintéticos.....	48
4.7. Ligação da Tc85-N a laminina	51
4.7.1. ELISA	51
4.7.2. “Laminin overlay”	53
4.8. Mapeamento do sítio de ligação da Tc85-N a laminina utilizando peptídeos sintéticos	54
4.9. Análise dos peptídeos sintéticos por Dicroísmo Circular.....	57
4.10. Efeito da Tc85-N na expressão de laminina	59
5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2: Diagrama “ribbons” da estrutura da trans-sialidase de <i>T. cruzi</i>	5
Figura 3: Comparação da estrutura geral de um membro da família das trans-sialidasas (a trans-sialidase) com um membro da família das trans-sialidase-símile (Tc-85) de <i>T. cruzi</i>	7
Figura 4: Esquema da estrutura da lâmina basal.....	10
Figura 5: Esquema da estrutura da laminina, mostrando os domínios de ligação a integrinas, assim como os fragmentos proteolíticos desta molécula (Belkin e Stepp, 2000).....	12
Figura 6: Alinhamento de seqüência usado para a modelagem da proteína Tc85-11.....	31
Figura 7: Modelo estrutural da proteína Tc85-11 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Figura 8: Estratégia da clonagem dos domínios da proteína Tc85-11.....	34
Figura 9: Estratégia para a obtenção dos plasmídeos de expressão dos domínios da proteína Tc85-11.	35
Figura 10: Amplificação de região codificante para os domínios amino e carboxila da proteína Tc85-11.	36
Figura 11: Alinhamento entre a proteína Tc85-11 e o domínio Tc85-N.	37
Figura 12: Alinhamento entre a proteína Tc85-11 e o domínio Tc85-C.	38
Figura 13: Análise de restrição dos plasmídeos de expressão para os domínios amino e carboxila da proteína Tc85-11.	39
Figura 14: Seleção de cepas bacterianas para a expressão da proteína Tc85-N.....	41
Figura 15: Western blot da expressão da proteína Tc85-C na cepa BL21-SI.	42
Figura 16: Purificação por IMAC da proteína Tc85-N, expressa na cepa BL21-Codon plus (DE3)-RIL.....	43
Figura 17: Western blot do processo de purificação por IMAC da proteína Tc85-C, expressa na cepa BL21-SI.	44
Figura 18: Análise de estrutura por dicroísmo circular.....	45
Figura 19: Localização do sítio de ligação da proteína Tc85-11 na célula hospedeira....	47
Figura 20: Infecção de células LLC-MK ₂ pelo <i>T. cruzi</i> na presença de peptídeos.....	49
Figura 21: Efeito inibitório dos peptídeos sintéticos na invasão de celular pelo <i>T. cruzi</i>	50
Figura 22: Ligação dos domínios amino e carboxila da proteína Tc85-11 a laminina....	52
Figura 23: Ligação da proteína Tc85-N a laminina.....	52
Figura 24: Análise de interação de proteínas por “LN-overlay”.	53
Figura 25: Inibição da ligação da TC85-N a laminina na presença de peptídeos sintéticos.	55
Figura 26: Diagramas de superfície e “ribbons” da estrutura do domínio amino da proteína Tc85-11 mostrando a posição dos peptídeos selecionados.	56
Figura 27: Espectros de dicroísmo circular de peptídeos em água.....	57
Figura 28: Espectros de dicroísmo circular de peptídeos em 30% de TFE.....	58
Figura 29: Detecção de laminina na superfície das células LLC-MK ₂	60
Figura 30: Alinhamento parcial de seqüências de membros da superfamília das trans-sialidasas.	66

LISTA DE ABREVIACÕES

ϵ - coeficiente de extinção molar
Abs – *absorbância*
BSA – albumina de soro bovino
CD – *Dicroísmo Circular*
cDNA – DNA complementar (*complementary DNA*)
DAB – diaminobenzidina
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP – deoxinucleotídeo trifosfato
DME – meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DTT – ditioneitol
DMSO – dimetilsulfóxido
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA – (*Enzyme Lynked Immuno Assay*)
GPI –glicosilfosfatidilinositol
IMAC – cromatografia de afinidade a metal imobilizado
IPTG – isopropil tio β -galactosídeo
HPLC – cromatografia líquida de alta resolução
Kpb – quilo pares de bases (mil pares de bases)
kDa – kilo Dalton
LB – meio de cultura Luria - Bertani
LB-ON – meio de cultura Luria – Bertani sem NaCl
LBG – Laminin binding glycoprotein
MCS – (*multicloning site*)
mRNA- RNA mensageiro (*messenger RNA*)
OPD – (*O-phenylenediamine dihydrochloride*)
ORF – *open reading frame*
pb – pares de bases
PBS – solução salina tamponada por fosfato (*phosphate buffer saline*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)
PDB – *protein data bank*
pDNA – DNA plasmidial (*plasmid DNA*)
pI – ponto isoelétrico
RNA – ácido ribonucléico
RBS – *ribosome binding site*
rpm – rotações por minuto
SDS – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE – *denaturing polyacrilamide gel electrophoresis*
SFB – soro fetal bovino
TAE – tampão Tris Acetato EDTA
TFE – trifluoroetano
tRNA – RNA de transferência (transfer RNA)
Tris – Tris (hidroximetil) amino metano

RESUMO

Trypanosoma cruzi expressa um grupo de glicoproteínas de superfície, as Tc85, que pertencem à superfamília gênica das gp85/trans-sialidases. Neste trabalho mostramos um modelo de estrutura para um membro desta família, a proteína Tc85-11, a qual tem propriedades adesivas para laminina e para a superfície da célula. Esta estrutura consiste em um domínio N-terminal com pregamento β -propeller e um domínio C-terminal β -sandwich conectados por uma α -hélice longa. A proteína recombinante que corresponde ao domínio amino terminal (Tc85-N), mas não ao domínio carboxi-terminal (Tc85-C), liga-se a laminina de uma maneira específica. Cinco peptídeos sintéticos, contidos no domínio N-terminal, aderem na superfície das células LLC-MK₂ e inibem a infecção pelo *T. cruzi*. Dois destes peptídeos também podem inibir a interação Tc85-N - laminina de modo específico e poderiam representar o sítio de ligação a laminina. Estes resultados reforçam a hipótese que a Tc85-11 é uma proteína multi-adesiva, já que o domínio C-terminal, liga-se a citoqueratina-18. Por outro lado, o tratamento de células em cultura com Tc85-N aumenta a expressão de laminina, efeito já observado *in vivo* e quando culturas de células foram incubadas com antígenos liberados pelo parasita. A Tc85-11 pode ter, por tanto, um papel relevante na interação do parasita com o hospedeiro modulando ainda a expressão de componentes da matriz extracelular.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi expresses the Tc85 proteins, a set of surface glycoproteins belonging to the gp85/trans-sialidase supergene family. In this report we show a structure model for Tc85-11 a member of this family, which has adhesive properties to laminin and to the host cell surfaces. That structure consists in an N-terminus β -propeller and a C-terminus β -sandwich domains connected by a long α -helix. The recombinant protein corresponding to the N-domain (Tc85-N), but not to the C-domain (Tc85-C), was able to bind laminin in a specific manner. Five synthetic 20-mer peptides from the N-domain adhere onto LLC-MK₂ cell surface and inhibit the *T. cruzi* infection. Two of these peptides can also inhibit specifically Tc85-N - laminin interaction and may represent the laminin-binding site. These results reinforce the hypothesis that the Tc85-11 protein is a multi-adhesive protein, since it also binds to citokeratin-18 by C-terminus domain. On the other hand, the treatment of host cells with Tc85-N increases the expression of laminin in the cell culture, as was previously reported for treatment with *T. cruzi* released antigens. In summary, Tc85-11 protein may play an important role in the host-parasite interaction, including the modulation of ECM expression.

1. INTRODUÇÃO

A Tripanosomíase Americana, ou doença de Chagas é uma importante infecção parasitária na América Latina em termos de saúde e impacto econômico. Estima-se que em nosso continente, desde o México até o sul da Argentina, haja entre 16-18 milhões de pessoas infectadas e 120 milhões estejam em risco de adquiri-la (Moncayo *et al.*, 1999). Em 1909 Carlos Chagas estabeleceu que o protozoário *Trypanosoma cruzi* é o parasita que causa esta doença. Este parasita é transmitido ao hospedeiro humano e outros mamíferos por algumas espécies de insetos triatomíneos (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, entre outros). Em seres humanos, a doença atinge principalmente o sistema nervoso e o coração, podendo causar a morte.

1.1. O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* tem um complexo ciclo de vida (Figura 1) que envolve mamíferos e insetos, conhecendo-se três estágios de desenvolvimento morfológico e funcionalmente diferenciados. Epimastigota e amastigota são formas que se reproduzem e estão presentes no trato intestinal dos insetos e dentro de células de mamífero hospedeiro, respectivamente. Tripomastigota, a forma infectiva do parasita, não se reproduz. Epimastigotas intracelulares, formas intermediárias entre amastigotas e tripomastigotas, foram recentemente caracterizadas (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999).

A infecção pode acontecer quando mucosas ou pele irritada são expostas às fezes do inseto vetor contendo os tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*, forma infectiva do parasita. A transfusão de sangue também é uma rota importante de infecção que pode ser evitada pelo controle da qualidade do sangue de doadores. São descritos casos de infecção congênita em recém-nascidos de mães infectadas, mas em menor proporção (Miles *et al.*, 2003). Ocasionalmente também há relatos de transmissão oral da doença pela ingestão de alimentos contaminados por triatomíneos infectados.

No hospedeiro mamífero, para sobreviver e se reproduzir, o parasita invade células macrofágicas ou não. Dentro delas, o tripomastigota diferencia-se em amastigota o qual se

multiplica por sucessivas divisões binárias e posterior diferenciação. A ruptura da célula parasitada libera novos parasitas, a maioria dos quais já diferenciados em tripomastigotas que penetram em novas células e reiniciam o ciclo de infecção. O parasita distribui-se para outros tecidos através da circulação sanguínea. Os tripomastigotas não sobrevivem por muito tempo no sangue, pois não podem infectar hemácias nem se multiplicar (Zingales e Colli, 1985), e se disseminam facilmente atravessando a barreira endotelial do sistema circulatório do hospedeiro vertebrado para atingir novos tecidos.

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

(Modificado de www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.html)

O ciclo de vida do parasita continua quando um inseto vetor se alimenta com sangue de um hospedeiro infectado. No intestino do inseto os tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas, que passam a se reproduzir por divisão binária e, no final do trato digestivo, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) que são eliminados nas dejeções do inseto (Brener *et al.*, 2000).

1.2. A doença de Chagas

Clinicamente a doença de Chagas tem uma apresentação "caleidoscópica", ou seja, diversa. No local de exposição às dejeções do inseto infetado pode acontecer uma reação inicial dando lugar a conjuntivite ou edema bipalpebral, conhecido como sinal de Romana (Romana, 1935) ou à aparição de uma lesão na pele. Quando o parasita inicia sua migração para outros tecidos (infecção generalizada), temos a fase aguda da infecção que frequentemente é assintomática e passa despercebida, embora tripanossomas possam ser detectados no sangue por microscopia e métodos de concentração. A persistência do parasita no paciente conduz à fase crônica da infecção com uma parasitemia detectável só através de hemocultura ou xenodiagnóstico. A fase crônica pode ser assintomática (indeterminada), mas efeitos no coração são comuns, com anormalidades vistas no eletrocardiograma. Aneurisma do ápice do ventrículo esquerdo é característico na cardiomiopatia chagásica, assim como megasíndromes, particularmente megaesôfago e megacólon, podem ocorrer durante a fase crônica. As manifestações da doença crônica são diferentes dependendo da região endêmica. Megasíndromes são comuns no Brasil central e no sul da América do Sul, mas raras ou ausentes no norte da América do Sul e América Central.

O custo que a doença de Chagas causa na saúde pública é enorme. Não há vacina, não existe nenhuma droga profilática e o tratamento com benzonidazol, embora salve vidas na fase aguda, tem efeitos colaterais e não garante a eliminação do parasita na fase crônica (WHO, 2002). Muitos países de América Latina estão fazendo progressos no controle da doença, através de entidades nacionais e internacionais enfocados na eliminação de populações domésticas de triatomíneos, por meio de inseticidas e fazendo controle sorológico de sangue e órgãos doados. Assim, países como: Uruguai em 1997, Chile em 1999, o Brasil central e meridional em 2001, quatro províncias da Argentina em 2002, e um departamento do Paraguai em 2003, foram certificados como livres da transmissão deste parasita, seguindo este programa. Outros países como Peru, Equador e México encontram-se ainda na fase inicial da campanha de controle (Ramsey e Schofield, 2003).

1.3. *Trypanosoma cruzi*: a sua interação com o hospedeiro

A interação entre o *T. cruzi* e o hospedeiro é mediada por várias moléculas do parasita, seus respectivos receptores na célula hospedeira e a sinalização desencadeada por essa interação. Dentre as moléculas descritas no *T. cruzi* destacam-se os membros da família da gp85/trans-sialidase.

T. cruzi, não sintetiza ácido siálico, mas expressa as trans-sialidasas (TS) que catalisam a transferência do ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro à superfície do parasita, sendo as mucinas os principais aceptores (revisto em Colli, 1993). A atividade de TS foi detectada em soro de pacientes na fase aguda da doença. Eritrócitos de camundongos infectados e de pacientes no estado agudo da doença estão desializados, sendo que o tecido cardíaco também é desializado pela enzima *in vitro*. A região carboxila terminal desta enzima apresenta repetições *in tandem* de 12 aminoácidos DSSAHSTPSTPA altamente imunogênicas, com a resposta imune contra o parasita durante a fase aguda da infecção dirigida a este domínio (SAPA, de Shed Acute Phase Antigen). Porém, anticorpos contra o domínio catalítico que inibem a atividade enzimática também foram detectados em animais experimentalmente infectados, depois do recrudescimento da parasitemia, assim como no soro de pacientes crônicos (Schenkman *et al.*, 1994). Embora a trans-sialidase tenha sido implicada na invasão de células hospedeiras pelo parasita, seu papel nesta etapa não foi esclarecido (Schenkman e Eichinger, 1993). Por outro lado, tem se mostrado que a remoção do ácido siálico das glicoproteínas dos lisossomas (Lgps, as quais são altamente sialiladas) por ação da TS facilita a ruptura da membrana fagossômica pela Tc-toc, uma proteína formadora de poro de *T. cruzi*, permitindo assim que o parasita escape rapidamente do fagossoma (Andrews *et al.*, 1990). Mostrou-se também que anticorpos contra um grupo pequeno de proteínas sialiladas de 85 kDa inibem parcialmente a invasão celular (Alves *et al.*, 1986 ; Ramirez *et al.*, 1993).

A trans-sialidase foi extensivamente estudada. Recentemente foi caracterizada por cristalografia a estrutura da trans-sialidase de *T. cruzi*, sem as repetições SAPA (Buschiazzo *et al.*, 2002). Na figura 2 se mostra um diagrama estrutural ressaltando as principais características desta proteína.

Figura 2: Diagrama “ribbons” da estrutura da trans-sialidase de *T. cruzi*.

A figura **B** corresponde ao giro da molécula 90° para a direita em relação à figura **A**. Na parte superior mostra-se o domínio catalítico com enovelamento β -propeller (com os “blades” enumerados do 1 ao 6) ligando uma molécula de lactose (em “spacefill”) e na parte inferior temos o domínio “lectin-like” com enovelamento β -sandwich. Ambos os domínios estão conectados por uma α -hélice. A seta indica a ausência de alguns amino ácidos na estrutura (PDB 1NS1, Buschiazzi *et al.*, 2002).

O domínio catalítico apresenta um enovelamento denominado β -propeller de seis fitas “blades” e está unido por uma longa α -hélice a um domínio com estrutura β -sandwich semelhante às lectinas, pelo que foi denominado “lectin-like”. Anteriormente este domínio foi denominado Fn3 por ter semelhança de sequência ao módulo III da fibronectina, que também possui estrutura de β -sandwich, mas com uma topologia distinta (Buschiazzi *et al.*, 2002). No

domínio amino-terminal têm-se três seqüências denominadas ASP-boxes (SXDYGXTW) presentes nas sialidases de bactérias (*Clostridium perfringens* e *Salmonella typhimurium*) e vírus. Ao domínio “lectin-like” segue um domínio que apresenta as seqüências repetitivas *in tandem* mencionadas, cuja estrutura não foi desvendada, mas é provável que apresente estrutura aleatória ou “coiled-coil” e seja responsável pela multimerização desta proteína. As trans-sialidases estão unidas à membrana do parasita por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) na extremidade carboxi-terminal (Pereira *et al.*, 1991).

A sialidase de *Trypanosoma rangeli* (TrSA), do mesmo modo que a TcTS é um produto de uma família multigênica (Buschiazzi *et al.*, 1993, 1997), Embora tendo ~70% de identidade em 640 aminoácidos com a TcTS, carece de repetições no domínio C-terminal e de atividade de trans-sialidase (Pontes-de-Carvalho *et al.*, 1993). A estrutura desta molécula foi resolvida por cristalografia, mostrando também um domínio catalítico com pregamento β -propeller associado a um domínio semelhante a lectina. Estudos de mutagênese junto ao modelo estrutural da TcTS permitiu identificar substituições de aminoácidos no sítio ativo que modula a atividade sialotransferase (Buschiazzi *et al.*, 2000).

1.3.1. A Super família gênica das gp85/trans-sialidases

O genoma de *T. cruzi* contém centenas de genes que codificam para trans-sialidases e proteínas homólogas sem atividade enzimática (Egima *et al.*, 1996). Todas elas fazem parte da super-família gênica das gp85/trans-sialidases. As proteínas desta família têm como característica comum a presença de pelo menos um motivo da seqüência conservada ASP box, a seqüência conservada VTVXNVXLYNR no domínio carboxila terminal e o motivo FRIP (Phe-Arg-Ile- Pro), típicos das sialidases, que é encontrado no início do domínio amino terminal. Frasch (2000) classificou os membros desta superfamília, na base da estrutura e função dos seus produtos, nas famílias das trans-sialidases e trans-sialidases símile.

1.3.1.a. Família das trans-sialidases

A família das trans-sialidases, está composta por três grupos: TS, TS I e TS-e. Os membros dos grupos TS e TS-I são expressos nos tripomastigotas, metacíclicos e sanguíneos,

e estão ancorados na membrana do parasita por GPI. Estes grupos apresentam duas regiões: N-terminal (catalítica) e C-terminal com repetições SAPA. A diferença entre ambos os grupos reside na região N-terminal, sendo que o grupo TS tem atividade enzimática de trans-sialidase, enquanto que o grupo TS-I não possui tal característica, devido a uma substituição da tirosina na posição 432 por histidina (troca Y432H). Estas proteínas conservam a capacidade de ligação de β -galactosídeos (Cremona *et al.*, 1999). Os membros do grupo TS-e são expressos por epimastigotas, possuem atividade de trans-sialidase, mas não têm as repetições SAPA.

1.3.1.b. Família das trans-sialidase símile

Foram incluídos nesta família genes com estrutura similar ao das trans-sialidasas, mas que não possuem atividade enzimática (Frasch, 2000). Estas proteínas podem apresentar de 1 a 4 cópias completas ou degeneradas das seqüências ASP-box, contêm a seqüência conservada VTVXNVLYNR e uma identidade de seqüência de amino ácidos de 30-40 % com as trans-sialidasas (figura 3).

Figura 3: Comparação da estrutura geral de um membro da família das trans-sialidasas (a trans-sialidase) com um membro da família das trans-sialidase-símile (Tc-85) de *T. cruzi*.

Os membros desta família foram classificados em três grupos de acordo com a massa molecular, identidade de sequência e outras características: as Tc85, CRP e Tc13. Com o avanço do Projeto genoma do *T. cruzi*, novos genes estão sendo caracterizados o que permitirá uma classificação mais definida. As funções dos membros desta família são variadas, todas elas relacionadas a processos patogênicos. No grupo das CRP (CRP de Complement Regulatory Protein) temos proteínas que restringem a ativação das vias clássica e alternativa do complemento (Norris 1998). As proteínas Tc85 estão envolvidas na adesão/invasão do parasita na célula hospedeira (Alves, 1996; Ramirez *et al.*, 1993) assim como nos componentes da matriz extracelular (Alves *et al.*, 1986; Abuin *et al.*, 1989; Ouaiissi *et al.*, 1986; Lima e Villalta, 1989; Ortega-Barria e Pereira 1991; Giordano *et al.*, 1994 e 1999). Por último foi caracterizada a função de uma proteína Tc13, que mostrou capacidade de ligação à segunda alça (loop) extracelular do receptor beta (1) adrenérgico (Garcia *et al.*, 2003).

1.4. Moléculas do parasita envolvidas na invasão celular

A forma tripomastigota de *T. cruzi* é capaz de invadir todos os tipos de células em cultura, com exceção de hemácias, sendo algumas linhagens de células mais suscetíveis à infecção do que outras (Dvorak e Howe, 1976). Também foi observada a capacidade invasiva da forma amastigota, tanto em cultura de células HeLa como em animais de experimentação (Mortara, 1991). O *T. cruzi* é capaz de invadir todos os tipos de células em cultura, com exceção de hemácias, sendo algumas linhagens de células mais suscetíveis à infecção do que outras (Dvorak e Howe, 1976). As barreiras que o parasita tem que atravessar estão constituídas, além da membrana celular e da matriz extracelular, pela lâmina basal formada principalmente por laminina, colágeno IV, heparan sulfato e entactina. No processo de invasão são importantes as interações entre moléculas do parasita e as do hospedeiro. Assim, estudos realizados para compreender este fenômeno mostraram que nele estão envolvidas várias moléculas de ambas as partes que se relacionam como sistemas de tipo receptor-ligante (Zingales e Colli, 1985; Burleigh e Andrews, 1993, Burleigh e Woolsey 2002).

Neste sentido relacionam-se com o processo de adesão e penetração glicoproteínas de superfície do parasita de 82-90 kDa (revisto em Colli *et al.*, 1993; Schenkman *et al.*, 1994; Weston *et al.*, 1999, Burleigh e Woolsey 2002; Ramirez *et al.*, 1993) -todos membros da super-família gênica das trans-sialidases- e proteínas de 35/50 kDa presentes nos

tripomastigotas metacíclicos (Yoshida *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 1993). Do lado do hospedeiro, o ácido siálico (Schenkman *et al.*, 1994) e outras moléculas como laminina (Alves, 1996; Giordano, *et al.*, 1994); integrinas (Fernandez, *et al.*, 1993), fibronectina (Ouaisi *et al.*, 1984) e colágeno (Santana *et al.*, 1997) estão comprometidos nos processos de invasão celular. A galectina-3 humana (lectina que liga galactosídeos, presentes em glicoproteínas contendo resíduos de polilactosaminas, tais como laminina) aumenta a união de tripomastigotas à matriz extracelular, a qual é inibida por lactose (Moody *et al.*, 2000). Resíduos de manose da superfície de amastigotas e tripomastigotas, também foram implicados nos processos da invasão da célula hospedeira (Soeiro *et al.*, 1999). A manose e a galactose podem mediar a interação parasita-hospedeiro através de lectinas (Cremona *et al.*, 1999). A sinalização desencadeada na célula hospedeira por algumas dessas moléculas foi estudada, com várias vias sendo acionadas (revisto em Burleigh e Woolsey 2002).

1.5. A matriz extracelular

Um dos determinantes da patogênese de diversos organismos, como bactérias e protozoários, é sua capacidade de ligação a moléculas do hospedeiro presentes na superfície das células e tecidos. As moléculas dos patógenos responsáveis por esta função são denominadas adesinas (Soto e Hultgren, 1999). A fibronectina e a laminina são alvos de adesinas de diferentes patógenos. Assim, se identificou uma proteína de 67 kDa na superfície de *Leishmania donovani* que se une de modo saturável e com grande afinidade a laminina (Bandyopadhyay *et al.*, 2002). Marques e colaboradores (2001) demonstraram que a cadeia $\alpha 2$ da laminina presente na superfície das células de Schwann estão envolvidas no processo de adesão de *Mycobacterium leprae* a estas células. Proteínas semelhantes a histonas (Hlp) e proteínas ribossomais S4 e S5 (presentes na parede do *M. leprae*) foram identificadas como adesinas responsáveis pela ligação desta bactéria a laminina nas células de Schwann. Proteínas ligadoras de laminina também foram identificadas em outros patógenos como *Echinococcus granulosus* (Zhang *et al.*, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (Pethe *et al.*, 2002); *Helicobacter pylori* (Valkonen *et al.*, 1997), *Streptococcus anginosus* (Allen e Höök, 2002).

A matriz extracelular é uma rede intrincada de macromoléculas as quais ocupam o espaço extracelular nos tecidos. Variações na quantidade relativa das diferentes macromoléculas e no modo em que estão organizadas dão lugar a uma diversidade

surpreendente de formas de matriz extracelular, que se adaptam às exigências funcionais de cada tecido em particular. Assim, a matriz não é meramente uma estrutura que estabiliza a estrutura física dos tecidos, mas também tem papéis complexos, influenciando o desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função das células (Turner *et al.*, 1989).

As moléculas que constituem a matriz extracelular são geradas localmente por uma família de células denominados fibroblastos. Duas classes principais de macromoléculas constituem a matriz: 1) os glicosaminoglicanos (GAGS), cadeias polissacarídicas as quais se encontram covalentemente unidas a proteínas formando os proteoglicanos, e, 2) proteínas fibrosas funcionalmente diferentes: estruturais (por exemplo, colágeno e elastina) e adesivas (por exemplo, fibronectina e laminina). As moléculas adesivas da matriz extracelular contêm, tipicamente, múltiplos domínios com sítios de união específicos para outras moléculas de matriz e para receptores na superfície celular. Estas moléculas participam na organização de matriz e na sua união com as células. A laminina e o colágeno de tipo IV são componentes principais de um tipo especial de matriz extracelular denominado lâmina basal, uma fina, flexível e resistente folha (figura 4) que está abaixo das células epiteliais e vasos, circundando células individuais de músculo, adipócitos e células de Schwann.

Figura 4: Esquema da estrutura da lâmina basal.

(Tomado de Yurchenco e Schittny, 1990).

1.6. Lamininas

As lamininas são uma família de glicoproteínas heterotriméricas de aproximadamente 850 kDa de massa molecular, compostas das subunidades α , β e γ (Timpl *et al.*, 1979) (Figura 5).

Até hoje se conhecem 5 tipos de cadeias α , três de β e três de γ , que se combinam para gerar isoformas de lamininas, das quais 12 foram caracterizadas. Há especificidade de expressão dos distintos tipos de laminina nos tecidos e em determinados estágios de desenvolvimento, sendo que a laminina tipo 1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) é a mais estudada (Fujiwara *et al.*, 2001). Assim como a fibronectina, a laminina participa no arranjo da matriz extracelular, promovendo a migração, adesão, crescimento celular (Hakamori *et al.* 1984), assim como no controle da expressão de alguns genes (Roskelley *et al.* 1994). A interação das células com a laminina é mediada por uma variedade de receptores celulares incluindo integrinas, proteoglicanos unidos a membrana e outras glicoproteínas de membrana das quais as integrinas são cruciais no controle e diferenciação celular pela membrana basal (Kikkawa *et al.*, 1998). Na tabela I se mostram os distintos tipos de laminina, suas interações com outras moléculas e papel fisiológico.

A laminina-1 foi a primeira a ser descoberta e é a mais estudada (figura 5). A estrutura desta molécula observada por microscopia eletrônica lembra uma cruz, com três braços curtos e um braço longo. Cada braço curto é formado pela região N-terminal das três cadeias ($\alpha 1, \beta 1, \gamma 1$), sendo que a porção C-terminal forma uma tripla hélice formado pelas cadeia $\alpha 1$ (massa de 400 kDa) $\beta 1$ e $\gamma 1$ (com 200 kDa cada uma). Todas as cadeias das lamininas mostram uma estrutura de sub-domínios comuns, assim as cadeias α , β e γ têm similitude estrutural na região amino terminal, mas são diferentes na região carboxila terminal onde o domínio G esta presente apenas no extremo C-terminal da cadeia α . O domínio G da laminina-1 (LG) compreende cinco sub-domínios *in tandem* compactamente dobrados, designados LG1 até LG5 (Sasaki e Yamada, 1987; Sasaki *et al.*, 1987, 1988). Os domínios LG nas lamininas contêm o maior sítio de união para receptores celulares, tais como integrinas, sindecans e α -dystroglicano (revisto em Timpl *et al.*, 2000). Também foram descritos outros sítios de ligação para integrinas $\beta 1$ para os extremos N-terminal das cadeias α , β , e γ (Nomizu *et al.*, 1994) e o sítio de ligação para nidogênio na laminina-1 foi localizado no domínio III da cadeia $\gamma 1$ (Pöschl *et al.*, 1996).

Figura 5: Esquema da estrutura da laminina, mostrando os domínios de ligação a integrinas, assim como os fragmentos proteolíticos desta molécula (Belkin e Stepp, 2000)

O domínio VI presente extremo amino terminal das três cadeias das lamininas é conservado e está envolvido na polimerização das mesmas mediante um mecanismo de auto-montagem dependente de cálcio (Yurchenco e Cheng 1994) e não só de nidogênio (Ekblom *et al.*, 1994), mas também de integrinas da família $\beta 1$ (Di Persio *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1995) e α -distroglicano (Williamson *et al.*, 1997), interações que são importantes para a manutenção e função da estrutura da matriz extracelular.

1.7. Tc85-11: glicoproteína ligante de laminina

Na tentativa de identificar moléculas envolvidas na invasão de células do hospedeiro, nosso laboratório descreveu um grupo de glicoproteínas de 85 kDa, chamadas Tc-85, pertencentes à super-família das trans-sialidasas. A Tc-85 é um grupo heterogêneo de glicoproteínas de superfície ancoradas por GPI à membrana do parasita, com massa molecular semelhante, mas com diferentes pontos isoelétricos (pI) e apresentam uma vida média de 3,5 a 4 horas (Alves, 1996). A participação de um ou mais membros desta família de glicoproteínas na adesão e/ou internalização do parasita na célula do hospedeiro evidencia-se pela observação de que o anticorpo monoclonal H1A10 (mAbH1A10), que reconhece e definiu as glicoproteínas Tc-85, inibe parcialmente a invasão da célula do hospedeiro pelo parasita *in vitro* (Alves *et al.*, 1986). Por outro lado, mostrou-se que anticorpos anti-laminina inibiram a invasão de células hospedeiras pelos tripomastigotes (de 75-62%), sugerindo que a laminina poderia estar envolvida na adesão do parasita. Através de cromatografia de afinidade a laminina, purificou-se um componente ácido (pI 5,6-6,7) da família das glicoproteínas Tc-85 presente nos lisados de tripomastigotas, mas não de epimastigotas. Esta proteína foi denominada LBG (Laminin Binding Glycoprotein), a qual é reconhecida pelo anticorpo monoclonal H1A10 (Giordano *et al.*, 1994).

Recentemente no nosso laboratório, usando a técnica de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) se obtiveram aptâmeros de RNA que se ligam aos receptores da laminina na superfície de *T. cruzi*, e que são capazes de inibir a infecção das células LLC-MK₂ por este parasita (Ulrich *et al.*, 2002), reforçando a importância da laminina na interação parasita-hospedeiro.

Tabela I: Tipos de laminina e seus receptores (Colognato e Yurchenko, 2000).

Laminina		Receptor/proteína ligadora de superfície celular	Efeitos fisiológicos
<i>Laminina</i> ($\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$)	1	Integrinas $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 7 \beta 1$; distroglicana; receptor fosfatase LAR; heparan sulfato.	Crescimento de neuritos; migração celular, agrupamento de receptores de acetilcolinestase em miotubos.
<i>Laminina</i> ($\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$)	2	Integrinas $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 7 \beta 1$; distroglicana; heparan sulfato.	Crescimento de neuritos; agrupamento de receptores de acetilcolinestase em miotubos; sobrevivência em miotubos.
<i>Laminina</i> ($\alpha 2 \beta 2 \gamma 1$)	3	Não determinado.	Não determinado.
<i>Laminina</i> ($\alpha 2 \beta 2 \gamma 1$)	4	Provavelmente igual a laminina-2.	Não determinado
<i>Laminina</i> ($\alpha 3^A \beta 3 \gamma 2$)	5	Integrinas $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 6 \beta 1$.	Alta adesividade para células epiteliais; promoção de migração; formação de hemi-desmosoma; regeneração da pele, arranjo de junções GAP em queratinócitos.
<i>Laminina</i> ($\alpha 3^A \beta 1 \gamma 1$)	6	Não determinado.	Não determinado.
<i>Laminina</i> ($\alpha 3^A \beta 2 \gamma 1$)	7	Não determinado.	Não determinado.
<i>Laminina</i> ($\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$)	8	Integrinas $\alpha 6 \beta 1$.	Não determinado.
<i>Laminina</i> ($\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$)	9	Não determinado.	Não determinado.
<i>Laminina</i> ($\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$)	10	Integrinas $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$.	Não determinado.
<i>Laminina</i> ($\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$)	11	Integrinas $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$.	Sinal STOP em células de Schwann.
<i>Laminina</i> ($\alpha 2 \beta 1 \gamma 3$)	12	Não determinado.	Não determinado.

O gene que codifica a LBG foi clonado e continha a ORF completa para uma proteína de 786 aminoácidos denominada Tc85-11 (Giordano *et al.*, 1999), com seqüências de sinal de secreção no extremo amino terminal e de modificação por GPI no extremo carboxila terminal (figura 3). A proteína recombinante obtida a partir do cDNA clonado, se liga às células LLC-MK₂ e à laminina, mas não à gelatina nem à fibronectina. Por outro lado, um produto de degradação da Tc85-11 (de 37 kDa) mostrou capacidade de adesão às células LLC-MK₂ mas não a laminina, sugerindo a existência de dois domínios diferentes na proteína Tc85-11 um para laminina e outro para um outro receptor localizado na membrana celular (Giordano *et al.*, 1999). Com ajuda de peptídeos sintéticos mapeou-se o epítipo do anticorpo mAbH1A10 (peptídeo G, Giordano *et al.*, 1999) e um sítio de ligação para citoqueratina 18 (peptídeo J, Magdesian *et al.*, 2001). O peptídeo J tem uma seqüência de aminoácidos conservada em todos os membros da família das gp85/transialidases (VTVXNVXLYNR), mas ausente em neuraminidases bacterianas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a identificação dos sítios de ligação à laminina na proteína Tc85-11.

Para atingir este alvo foram colocados os objetivos específicos:

- ◆ Obter um modelo estrutural da proteína Tc85-11.
- ◆ Obter proteínas recombinantes correspondentes aos domínios da proteína Tc85-11.
- ◆ Mapear o sítio de ligação a laminina e à superfície de células LLC-MK₂ na Tc85-11, utilizando proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos.
- ◆ Continuar os estudos sobre o papel desta molécula na interação parasita-hospedeiro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens de células e plasmídeos

3.1.1 Linhagem Celular:

LLC-MK₂: células epiteliais de rim de macaco *Rhesus*, adquirida da ATCC.

3.1.1 Linhagem de *T. cruzi*:

Cepa Y mantida no nosso laboratório.

3.1.3 Linhagens de Bactéria

Escherichia coli

DH5 α : ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk- mk+) SupE44 relA1 deoR Δ (lac ZYA – arg I) u169 (Novagen).

BL21-Codon Plus (DE3)-RIL: F' ompT hsdS(rB– mB-) dcm+ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r] (Stratagene).

DE3, bacteriófago λ DE3 que contém o gene da RNA polimerase do fago T7 sob o controle do promotor Lac UV5 que se induz com isopropil-tiogalactosídeo (IPTG).

BL21 SI: F' ompT hsdS_B(rB- mB-) gal dcm endA1 proUp::T7RNAP::malQ-LacZ Tet^s (Life Technologies).

SI (Salt Induced), nesta cepa o gene da RNA polimerase do fago T7 está sob o controle do promotor proUp, que se induz com NaCl. Esta modificação foi inserida no genoma com a ajuda do transposon P1.

3.1.3 Plasmídeos

pGEM-T-Easy (Promega): Vetor para a clonagem de produtos de amplificação

pAE: vetor derivado do pRSETA (Invitrogen) e pET3-His que possui um alto número de cópias por célula e permite a expressão da proteína recombinante com uma fusão de seis histidinas consecutivas (6xHis) para facilitar a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado. O vetor foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (Ramos *et al.*, 2003).

pTc85-11: Vetor pET21a (Invitrogen) contendo o fragmento de 2,2 Kpb correspondente à ORF codificante da proteína Tc85 11 sem peptídeo sinal do extremo amino terminal, nem a região carboxila terminal que sinaliza a modificação por GPI, amplificado por PCR e clonado nos sítios Nde I e Xho I do vetor (Giordano *et al.*, 1999).

3.2. Cultura de células de mamíferos LLC-MK2 e de parasitas

As células de epitélio de rim de macaco Rhesus (LLC-MK₂) foram mantidas e subcultivadas em meio DME (Dulbecco Modified Eagle) contendo 1,2 g/l de Na₂HCO₃, 5 x 10³ U/L de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As garrafas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂. As sub-culturas foram realizadas a cada sete dias a partir de monocamadas de células, as quais foram lavadas com PBS (10 mM de tampão fosfato, 150 mM de NaCl, pH 7,4) e posteriormente digeridas com 0,1% de tripsina em PBS contendo 1 mM EDTA. As culturas foram iniciadas com aproximadamente 3 x 10⁴ células/cm² em garrafas Falcon de 75 cm² de área.

Tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, foram obtidos por infecção de cultura de células LLC-MK₂ conforme metodologia descrita na literatura (Andrews & Colli, 1982).

3.3. Cultura das bactérias

As cepas de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em meio LB e LBON preparados como segue (Sambrook *et al.*, 1989):

Meio LB.- composto de 1% de Bacto Triptona (Sigma) 0,5% de extrato de levedura e 1% de Cloreto de Sódio. O pH do meio foi acertado para 7,5 com NaOH (2N) e esterilizado por autoclavagem a 120°C por 30 minutos.

Meio LBON.- tem a mesma composição que o meio LB, mas sem NaCl.

Os meios sólidos utilizados são idênticos aos líquidos, acrescidos de 1,5% de Agar-agar (Sigma). Quando necessário a ampicilina e/ou cloranfenicol foram adicionados (concentração final de 100 e 34 µg/ml, respectivamente).

3.4. Amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonagem dos produtos

As reações de PCR foram feitas num volume total de 50 µl contendo: 5 µl do tampão de PCR 10x concentrado (Life Technologies); 1,5 µl cloreto de magnésio 50 mM (Life Technologies); 1 µl dNTP mix 10 mM (Life Technologies); 1 µl de cada primer “forward” e “reverse” (10 pmol/µl); 2 µl do molde (10 ng de DNA plasmidial); 0,5 µl Platinum Taq DNA polimerase 2 u/µl (Life Technologies).

A termociclagem foi feita no Termociclador Perkin-Elmer 2400, utilizando 4 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos nas seguintes temperaturas: desnaturação: 94°C por 45 segundos; emparelhamento: 52°C por 30 segundos; extensão: 72°C por 3 minutos. No final, seguiu-se uma extensão adicional a 72°C por 15 minutos.

Os oligonucleotídeos usados como “primers” para as amplificações de DNA (que serão descritos em detalhe na seção “resultados e discussão”) foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil (hoje Invitrogen).

Os produtos de PCR foram purificados a partir de géis de agarose, após caracterização por eletroforese, usando o kit In Concert Rapid Gel Extraction System (Life Technologies) e clonados diretamente no vetor de pGEM-T-Easy (Promega), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.5. Extração e digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição

Para a extração de DNA plasmidial, utilizou-se o kit In Concert Miniprep plasmid DNA isolation system (Life Technologies) segundo as recomendações do fabricante. Para a digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição, foram feitas misturas de reação em

volume de 80 µl digerindo-se 5 µg de DNA com 5 unidades de enzima por 2 horas a 37°C. As enzimas utilizadas foram da New England Bio Labs, com seus respectivos tampões de reação.

3.6. Análise, recuperação e ligação de fragmentos de DNA.

Os DNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Sigma). Os géis (0,8–1%) foram preparados em tampão TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989) contendo Brometo de etídio 0,1 µg/ml para a visualização do DNA sob a luz UV a 300 nm de comprimento de onda.

Os fragmentos de DNA correspondentes ao vetor e inserto foram fracionados em géis de agarose preparativos. As bandas de interesse foram cortadas e colocadas em tubos de 1,5 ml e o DNA recuperado usando o Kit In Concert Rapid Gel Purification System (Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante.

As ligações foram feitas misturando 100 ng de vetor, 100 ng do inserto e 2 unidades da T4 DNA Ligase (Life Technologies) em um volume final de 20 µl (1x do tampão de ligação). A reação foi mantida a 16°C, por 16 horas. Os produtos da reação de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli*, cepa DH5α.

3.7. Preparação e transformação de células competentes das cepas de *Escherichia coli*

As células competentes foram preparadas segundo o método de Inoue *et al.* (1990), que resulta em uma eficiência de transformação de 10^7 a 10^8 colônias por µg de DNA. Para a transformação, células competentes foram misturadas com o DNA (no máximo 100 ng de DNA) e incubadas em gelo por 1 hora. Após esse tempo, se aplicou um choque térmico a 42°C por 2 minutos e depois incubadas em gelo por mais 5 minutos. Adicionaram-se então 300 µl de meio SOC (Life Technologies) e as células foram cultivadas por 1,5 horas sob agitação a 37°C. Após esse período, 100 µl da cultura foram plaqueados em LB agar com ampicilina.

Para as transformações com os produtos de ligação utilizaram-se células competentes de *E. coli* DH5 α , enquanto que as cepas BL21-Codon Plus (DE3) RIL e BL21-SI, usadas para a expressão das proteínas recombinantes, foram transformadas com os plasmídeos de expressão.

3.8. Seqüenciamento de DNA e análise das seqüências

Os seqüenciamentos de DNA foram realizados pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo, adaptado para o seqüenciador capilar automático ABI 377 (Perkin-Elmer) do Laboratório de Seqüenciamento do Instituto Butantan. Usaram-se os “promoter primers” T7 e SP6 para o seqüenciamento dos clones em pGEM-T-Easy e o primer T7 para as construções de expressão no vetor pAE.

Os resultados dos seqüenciamentos foram analisados usando o programa Vector NTI Suite Version 6.05 (InforMax, Inc.) e o programa Chromas version 1.62, da Technelysium Pty Ltd, Austrália (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos seqüenciamentos foram analisadas com ajuda do servidor ProtParam Tool ([http // www. expasy.ch/tools/protparam.html](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)) para conhecer a massa molecular (MW), ponto isoeletrico (pI) e coeficiente de extinção molar (ϵ).

3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram feitas segundo o protocolo de Laemmli descrito em Sambrook e colaboradores (1989). Os géis utilizados foram de 12,5% de bisacrilamida/acrilamida (29:1) no gel de separação. As eletroforeses foram feitas a 8 V/cm no gel de empilhamento e 15 V/cm no gel de separação, à temperatura ambiente. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com 0,25% de “Coomassie Blue Brilliant” em 50% metanol (10 minutos) e descorados com 7% ácido acético em 20% de etanol por 1-2 horas à temperatura ambiente. Os géis foram secos no Slab Gel Dryer Model 583 da BioRAD.

3.10. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal imobilizado

Para a preparação de amostras de proteína recombinante em grande escala, preparou-se um inóculo com as cepas BL21(DE3) ou BL21-SI transformadas com os respectivos plasmídeos. Assim, 40 ml de meio foram inoculados com material proveniente de uma colônia única e cultivados sob agitação por uma noite. Com esta cultura inoculou-se 1 Litro de meio (suplementado com ampicilina) e as bactérias foram cultivadas sob agitação a 37°C até atingir Abs._{600nm} de 0,5 a 0,8. Acrescentou-se então IPTG (1 mM concentração final) ou NaCl (300 mM), dependendo da cepa e o cultivo foi mantido por mais 3 horas. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm por 15 minutos a 4°C) e o sedimento bacteriano foi processado imediatamente ou armazenado a -80°C. O sedimento foi ressuspensão em tampão 0,05 M NaH₂PO₄; 0,30 M NaCl; 0,01 M de Imidazol, utilizando-se uma relação de 5 ml de tampão por grama de precipitado celular. O material foi lisado na Prensa de French (French Pressure SL AMINCO Spectronic Instruments), centrifugado a 5000g por 15 minutos e tanto o sobrenadante (fração solúvel) como o precipitado (corpúsculo de inclusão) foram analisados por SDS-PAGE.

A proteína Tc85-N recombinante foi purificada a partir de corpúsculos de inclusão, os quais foram ressuspensos em 10 ml de tampão de solubilização (50 mM Tris-HCl, pH8,0; 0,5M NaCl; 8M uréia, 5 mM Imidazol; 5 mM beta mercaptoetanol) e mantidos em agitação por 4-16 horas, à temperatura ambiente. O solubilizado foi clarificado a 5000g por 15 minutos e carregado na coluna contendo a resina Chelating-sepharose (Pharmacia) ativada com Ni²⁺ (0,2ml/min). Após a absorção da amostra na resina foi feito um processo de refolding da proteína recombinante, lavando-se sucessivamente a coluna com 5 volumes das seguintes soluções: a) 8M, b) 4M e c) 2M de uréia em 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 0,5M NaCl. A coluna foi lavada com tampão de lavagem constituído de 40 mM imidazol, 0,5M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 (fluxo de 1ml/min) e a proteína recombinante foi eluída com o tampão de eluição (0,5 M imidazol, 0,1M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH6,0) a 0,5ml/min, coletando-se frações de 1 ml.

A proteína Tc85-C recombinante foi purificada a partir da fração solúvel, a qual foi clarificada por centrifugação a 15000 rpm por 30 minutos (rotor SS-34 Sorvall). O sobrenadante foi carregado numa coluna com a resina Chelating-sepharose ativada com

Níquel e equilibrada em tampão de lise. A coluna foi lavada com 5 volumes do tampão de lavagem e a proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição, nas mesmas condições que a proteína proveniente de corpúsculos de inclusão.

As frações derivadas tanto da fração de corpúsculo como da solúvel foram analisadas por SDS-PAGE, e os eluatos contendo a proteína recombinante foram reunidos e dializados contra 2 Litros de PBS ou 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH7,4 para as experiências de dicroísmo circular.

3.11. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) no UV-distante foram realizados no Espectropolarímetro Jaco J-810 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron com cubetas de 1 mm de caminho ótico a 20°C. As amostras das proteínas foram preparadas com concentração de 2,5 µM em 10 mM tampão Na-fosfato, pH 7,4. Os peptídeos foram ressuspendidos em água ou trifluoretanol (TFE) a concentrações entre 20 e 80 µM. Os espectros foram adquiridos na faixa de comprimento de onda entre 190 e 260 nm, com velocidade de 1 nm/seg. com um tempo de resposta de 1 segundo e resolução de 0,5 nm/segundo. Cinco espectros foram coletados para obter uma média para cada medida. Como branco foi usada apenas a solução do tampão. Os espectros de CD foram expressos em termos de elipticidade molar residual:

$[\theta] = \theta/10 \times C \times l \times aa$, onde θ elipticidade em mdeg, C é a concentração molar da proteína, l é o caminho ótico em cm, e aa é o número de aminoácidos da proteína.

3.12. Sínteses de peptídeos

Foram sintetizados 52 peptídeos de 20 aminoácidos de comprimento com sobreposição de 10 aminoácidos que abrangem o domínio amino terminal, a α hélice e parte do domínio carboxila terminal (com base a sequência depositada no GenBank para a proteína Tc85-11). A síntese e purificação foram realizadas pelo grupo da Dra. Maria Juliano, UNIFESP. A síntese foi feita em um sintetizador de fase sólida automático PSSM 8 system (Shimadzu) pela metodologia Fmoc. Os peptídeos foram desprotegidos e purificados por HPLC e a sua pureza e qualidade foi determinada por espectroscopia de massa MALDI-TOF

(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Fly) no modo reflectron no aparelho TofSpec-E (Micromass) e por seqüenciamento de amino ácidos (no seqüenciador automático Shimadzu modelo PPSq-23), quando necessário. Os peptídeos foram liofilizados para seu armazenamento.

3.13. Adesão de células LLC-MK₂ a peptídeos sintéticos

Para os ensaios, os peptídeos foram ressuspensos em DMSO 10%, adicionados em poços de microplaca de ELISA (10 µg/poço) e mantidos a 37°C com agitação durante a noite. Os poços foram lavados com PBS e bloqueados com albumina 3% a 37°C, deixando-se em agitação por duas horas. Depois da lavagem com PBS, foram colocadas 1×10^4 células LLC-MK₂ em cada poço e incubadas por uma hora a 37°C. A placa foi lavada com DME sem soro, analisada no microscópio e quantificada. Para a quantificação adicionaram-se 50 µl de Cristal violeta 2% em cada poço, e após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, os poços foram lavados 3 vezes com DME sem soro. Após a adição de 200 µl de SDS 1%, determinou-se a Absorbância a 600 nm de cada poço para estimar a quantidade de células aderidas.

3.14. Invasão de células de cultura pelo *T. cruzi*

Foram cultivadas 1×10^6 células LLC-MK₂ em lamínulas de vidro de 24x32 mm a 37°C por 48 horas. Os peptídeos 476G, 485A, 485D, 485E, 485G e 510H, solubilizados em DMSO, foram adicionados numa concentração final de 100 µM (concentração final de 2% de DMSO) e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados os tripomastigotas numa relação de 100 tripanosomas por célula e incubados a 37°C por 2 horas. O excesso de tripomastigotas foi retirado por meio de 3 lavagens com PBS, 1 lavagem com lymphoprep (Nycomed Pharma AS.) e mais três vezes com PBS. Após as lavagens, as células foram incubadas em meio DME/SFB 2% por 48 horas a 37°C e depois lavadas por 2 vezes com PBS, fixadas por 30 minutos à temperatura ambiente com metanol 100% e re-hidratadas com PBS/MgCl₂ 125 mM por 2 horas. Em seguida se adicionou cromomicina A (Sigma) diluída 1:100 em PBS/MgCl₂ 125 mM para coloração de ácidos nucléicos. As lâminas foram divididas em 5 campos, observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Microphot-FX) e foram feitas 5 fotos de diferentes campos, que foram

utilizadas para a contagem do número de células infectadas e a quantidade de tripanossomas por célula. A porcentagem de infecção corresponde ao número de células infectadas sobre o número total de células numa lâmina, multiplicada por 100. Para a determinação da inibição da infecção pelos peptídeos estudados, se tomou o experimento em presença de DMSO como controle (100% de infecção, 0% de inibição).

3.15. Ensaio de ligação da proteína Tc85-N recombinante a moléculas de matriz extracelular (ELISA)

No trabalho usamos a laminina-1 proveniente de tumor EHS e fibronectina, ambos da Sigma. Este ensaio de ligação é uma adaptação da metodologia proposta por Giordano e colaboradores (1999) usando a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay). As proteínas de matriz foram fixados em poços das placas (96 wells), incubando-se 100 µl da solução protéica (0,05 µM) em tampão carbonato 0,1M pH 9,0 por 16 horas a 4°C. Os poços foram lavados com tampão TBS-T (50 mM Tris, pH7,5, 150 mM NaCl, 0.03% Tween-20) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 1% BSA em TBS-T por 1 hora a 37°C. Após a incubação foram feitas 3 lavagens com TBS-T e foi adicionada a proteína recombinante Tc85-N em tampão TBS-T suplementado com 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ e incubada por 1 hora a 37°C. Após 3 lavagens com TBS-T, o complexo foi incubado com o anticorpo primário (Anti-His-Tag 1:2000 diluído em 1% BSA TBS-T) por 1 hora a 37°C. Depois da lavagem com TBS-T, o segundo anticorpo (anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase) foi incubado por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada 3 vezes com TBS-T e foram adicionados 100 µl da solução reveladora contendo o substrato OPD (O-phenylenediamine dihydrochloride) 10 ug/ml em 50 mM de ácido cítrico, 100 mM Na₂HPO₄ e 0,0003% H₂O₂ pH 5,0). Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reação foi detida pela adição de 100 µl de 2N H₂SO₄. A ligação da proteína recombinante nas moléculas testadas foi quantificada a 492nm em leitor de ELISA (Titer Tek, Co.). Os ensaios foram feitos em triplicata.

Para os ensaios de competição da interação Tc85-N com laminina pelos peptídeos sintéticos, a laminina fixada foi incubada com a Tc85-N na presença dos peptídeos em uma concentração 100 vezes maior que a proteína (40 µM peptídeo / 0.4 µM Tc85-N). Por outro

lado para os ensaios de inibição dose-dependente, a laminina foi incubada com a Tc85-N (0.4 μ M) na presença de quantidades crescentes dos peptídeos testados (0 – 40 μ M) .

3.16. Ligação da proteína recombinante 125 I-Tc85-N com laminina

A marcação da proteína Tc85-N com 125 I foi realizado usando a técnica de “Iodo-beads” (Pierce) segundo recomendações do fornecedor: cinco microgramas da Tc85-N foram incubadas com 0,5 mCi de Na 125 I (Amersham) em presença de um “Iodo-bead” em tampão 5X PBS, por 15 minutos, sob agitação. A reação foi detida com a retirada do “bead” da solução. O iodo não conjugado foi separado da proteína marcada através de filtração em gel (Sephadex G-25) usando como eluente PBS. As frações contendo proteína marcada foram reunidas, uma alíquota analisada no contador gama e foram feitos os cálculos de concentração e atividade específica.

A laminina (ou BSA, usado como controle) em tampão PBS foi adsorvida em placas de plástico (0,1 μ g/poço) durante 24 horas, a 4°C. Os poços foram lavados com TBS e bloqueados com 2% BSA por 2 horas, à temperatura ambiente. Após as lavagens, a laminina adsorvida foi incubada com quantidades crescentes da 125 I-Tc85-N durante 16 horas, a 4°C. Após extensiva lavagem com TBS, a radioatividade incorporada em cada poço foi medida através de um contador gama (LKB Wallac 1214 RCKBeta). Para estimar a ligação inespecífica, foram realizadas as mesmas experiências em presença de 10 vezes de excesso de proteína não marcada, e os valores obtidos foram subtraídos dos obtidos no experimento com a proteína marcada. Por último foram subtraídos os valores de ligação a BSA e o resultado foi usado para a construção do gráfico de Scatchard para determinar o valor da constante de dissociação (K_d).

3.17. “Laminin overlay assay”

Os experimentos “Laminin overlay assay” foram feitos conforme descrito por Chammas *et al.* (1991). As proteínas recombinantes (2,5 μ g) Tc85-N, YHR034p (proteína nucleolar de levedura com cauda de 6xHis usada como controle, cedida gentilmente pela Dra. Carla Columbano de Oliveira, IQ-USP) foram separadas eletroforéticamente e transferidas a

membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente com 1% de BSA em tampão TCM (50mM Tris-HCl, pH7,4; 50 mM NaCl; 5mM CaCl₂; 5mM MgCl₂). Logo após, as membranas foram incubadas com uma solução 10ug/ml de Laminina-1 (Sigma) em TCM, durante 16 horas, à temperatura ambiente. Após extensiva lavagem com TCM, as membranas foram incubadas, por 2 horas com anticorpo monoclonal anti-laminina (Sigma), diluído 1:2000 em TCM/1% BSA. Depois de novas lavagens, foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase por 2 horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente como descrito acima. A detecção foi realizada por quimio-luminescência usando o kit ECL, conforme instruções do fabricante (Amersham).

3.18. Produção de anticorpos anti-proteína Tc85-N

Para a produção de soro anti Tc85-N (domínio amino terminal da proteína Tc85-11), um grupo de quatro camundongos isogênicos Balb/c foram imunizados com a proteína Tc85-N recombinante. Antes da primeira imunização se coletou soro dos animais (soro preimune). Foram realizadas 4 imunizações semanais com 100 µg da proteína cada uma, a primeira com o adjuvante de Freund Completo e nas seguintes imunizações com adjuvante de Freund Incompleto. Após uma semana da última imunização foi coletado soro dos animais e o título e especificidade analisados por Western blot.

Para a remoção de anticorpos que reconhecem antígenos bacterianos, o soro obtido foi tratado segundo o método de Gruber e Zingales (1995). Brevemente: uma cultura de 500ml da cepa de *E. coli* BL21-Codon plus (DE3)-RIL em meio LB (37°C, 250 rpm por 18 horas) foi dividida em duas alíquotas, uma foi autoclavada e outra foi tratada com formaldeído 0,5% por 2 horas a 37°C em agitação. As duas suspensões de bactéria foram reunidas e centrifugadas a 5000g por 10 minutos. Após duas lavagens com PBS, o precipitado foi ressuspenso em PBS, alíquotado em tubos de centrifuga, centrifugados a 5000g por 10 min e o precipitado guardado a -20°C até serem usados. Para o tratamento, o precipitado bacteriano foi ressuspenso com o soro de interesse (diluído 1:50 em PBS/1% BSA) em aproximadamente 15-20 ml. A suspensão foi incubada por 2 horas a 4°C e depois centrifugada a 5000g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi submetido 4 vezes ao mesmo processo. Após o ultimo ciclo, o soro foi filtrado (filtro Millipore 0,22 µM) e armazenado a -20°C. O soro tratado foi avaliado por Western blot.

3.19. Western blot

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose a 20 V por 16 horas a 4°C em tampão de transferência (25 mM Tris-base, 150 mM Glicina, 20 % Metanol pH 8,3). Ao término da transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (0,1% Ponceau em 10% ácido acético) para evidenciar a transferência e marcar o padrão de massa molecular. O excesso de corante foi lavado com água. Os sítios inespecíficos na membrana foram bloqueados incubando-se a membrana com solução de bloqueio (1% BSA em TBS-T) em agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Após as lavagens por 3 vezes com TBS-TT (50 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 0.03% Tween-20, 0.05% Triton X-100), por 10 minutos cada, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em TBS-TT por 1 hora à temperatura ambiente. Depois da lavagem com TBS-T, o segundo anticorpo (anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase) foi incubado por 2 horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente como descrito acima. A detecção foi realizada por quimio-luminescência usando o kit ECL, conforme instruções do produtor (Amersham).

3.20. Imunocitoquímica

O efeito da Tc85-N do *T. cruzi* na expressão da laminina foi acompanhada como descrito por Pinho *et al.*, 2002, com algumas modificações. Brevemente, células LLC-MK₂ foram crescidas em placas de 8 wells (5x10⁴ cell/well) como descrito acima. As células foram incubadas por 20 horas a 37°C na presença da Tc85-N recombinante (150 µg/ml), antígenos liberados pelo *T. cruzi* (antígenos provenientes de 1x10⁹ tripomastigotes por ml de meio de cultura mantidas por 2 horas a 37°C) ou só com o meio de cultura, sem outra adição, como controle negativo. O meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol por 3 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com 4.5% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS, por 30 minutos à temperatura ambiente. Os poços foram lavados com PBS e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 1% BSA em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente. Após as lavagens, as células foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-laminina (Sigma) 1:250 em 1% BSA em PBS por 18 horas a 4°C. Após as

lavagens com PBS, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído em PBS/1%BSA (1:50) e incubado por 2 horas à temperatura ambiente. A reação de peroxidase foi desenvolvida com Diaminobenzidina (DAB, Sigma) em presença de peróxido de hidrogênio. As células foram analisadas no microscópio.

3.21. Alinhamento de seqüências

As seqüências foram obtidas do NCBI e alinhadas automaticamente pelo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) no servidor (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html) e edita usando o ESPript (<http://prodes.toulouse.inra.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>).

3.22. Modelagem por homologia

A construção do modelo estrutural foi executado em uma máquina Compaq AlphaServer ES40. A visualização molecular e procedimentos de refinamento foram realizados no programa InsightII graphical environment (Accelrys Inc.) numa estação de trabalho Octane2 workstation (Silicon Graphic Inc.). Os modelos por homologia para a proteína Tc85-11 foram gerados pelo programa MODELLER (Šali *et al.*, 1993). Os cálculos de minimização de energia foram executados usando como função de energia o “Consistent Valence Force Field” (CVFF) implementado no programa Discover module do InsightII. O programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) foi usado para avaliar a qualidade estéreo-química dos modelos finais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Modelagem por Homologia da Tc85-11

Como foi mencionado na “Introdução”, a proteína Tc85-11 de *T. cruzi* pertence à superfamília gênica das gp85/trans-sialidases. Recentemente foi determinada a estrutura de alguns membros desta família: a sialidase de *Trypanosoma rangeli* (TrSA) e a trans-sialidase de *T. cruzi* (TcTS) (Buschiazzo *et al.*, 2000; 2002 e Amaya *et al.*, 2003). A estrutura da trans-sialidase de *T. cruzi* foi determinada através de difração de raios-X a uma resolução de 1.65 Å (Buschiazzo *et al.*, 2002; PDB: 1MS3) e em complexo com DANA (3-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) a uma resolução de 1.80 Å (Buschiazzo *et al.*, 2002; PDB: 1MS1). As estruturas da sialidase de *T. rangeli* foram determinadas numa resolução de 1.64 Å (Buschiazzo *et al.*, 2000; PDB: 1N1S) e em complexo com DANA, a uma resolução de 1.60 Å (Amaya *et al.*, 2003; PDB: 1N1T). As coordenadas correspondentes a estas estruturas foram usadas como moldes para a modelagem estrutural da proteína Tc85-11 por homologia. As seqüências correspondentes aos aminoácidos 27 a 48 presentes na seqüência N-terminal da proteína Tc85-11 madura, assim como a região rica em prolinas no C-terminal, não guardam homologia com nenhum dos modelos utilizados e não foram considerados na modelagem.

Os alinhamentos de seqüência foram ajustados manualmente de uma maneira interativa até o modelo resultante alcançar uma boa qualidade estereoquímica (figura 6). As identidades e diferenças estão distribuídas ao longo das seqüências. Correspondentemente aos moldes usados, o modelo estrutural da proteína Tc85-11 (figura 7) indicou a presença de dois domínios: um domínio de β -propeller na região amino terminal, correspondente ao domínio catalítico na trans-sialidase, e de β -sandwich (lectin like) na região de carboxila terminal, interconectados por uma estrutura em α -hélice. Diferentemente da Ts de *T. cruzi* (figura 2), a Tc85-11, após a α -hélice conectiva, tem uma alça mais curta no lugar da seqüência de aminoácidos sem coordenadas atômicas.

Figura 6: Alinhamento de sequência usado para a modelagem da proteína Tc85-11.

As seqüências correspondentes à estrutura da sialidase de *T. rangeli* e a trans-sialidase de *T. cruzi* com/sem o inibidor Dana (1N1S/1N1T e 1MS3/1MS1, respectivamente) foram alinhadas com a proteína Tc85-11. O símbolo /// representa resíduos perdidos nas estruturas determinadas por cristalografia.

Figura 7: Modelo estrutural da proteína Tc85-11 de *Trypanosoma cruzi*.

A figura B corresponde ao giro da molécula 90° para a direita em relação à figura A. Na parte superior o domínio N-terminal com estrutura β -propeller de seis fitas “blades” (enumerados de 1 ao 6) e na parte inferior o domínio de C-terminal que possui pregeamento β -sandwich (lectin like domain), ligados por α -hélice, em amarelo. A seta indica o loop mais curto da Tc85-11 em relação a estrutura da trans-sialidase mostrada na figura 2.

4.2. Clonagem dos domínios correspondentes ao amino e carboxila da proteína Tc85-11

Para se estudar o papel de cada domínio da proteína Tc85-11 na adesão celular, se precedeu à clonagem dos fragmentos de DNA correspondentes e a obtenção das respectivas proteínas recombinantes.

4.2.1. Amplificação dos domínios da proteína Tc85-11

O cDNA da Tc85-11 codifica uma proteína de 786 aminoácidos. A numeração usada para esta proteína corresponde à sequência completa informada no GenBank (AAD13347.1). Os primeiros 26 aminoácidos da extremidade N-terminal correspondem ao peptídeo sinal, necessário para secreção de proteína, e os últimos 22 aminoácidos da extremidade C-terminal representam o motivo para âncora de GPI (figura 3). Adicionalmente, a sequência de 77 aminoácidos (de 690 a 764) contem um alto conteúdo de prolina. Para a produção da forma recombinante dos domínios da proteína Tc85-11, essas sequências foram eliminadas (Giordano *et al.*, 1999). O esquema geral para a obtenção das proteínas recombinantes correspondentes aos domínios amino (Tc85-N) e carboxila (Tc85-C) está mostrado na figura 8. Os “primers” utilizados estão na figura 9A e o esquema da clonagem no vetor de expressão está apresentado na figura 9B. Na porção chamada “N” a sequência corresponde aos nucleotídeos 79 a 1350 pb (amino ácidos 27 a 450) e na porção “C” aos nucleotídeos 1540 a 2049 pb (amino ácidos 484 a 683), levando em conta a numeração da sequência depositada no GenBank.

Para a amplificação por PCR as regiões codificantes para os domínios amino e carboxila terminal da proteína Tc85-11, se usou como molde o plasmídeo pET21a-Tc85-11 (Giordano *et al.*, 1999) que contém a sequência codificante para a proteína madura (sem peptídeo sinal, nem sequência de modificação por GPI). O PCR, feito nas condições descritas em "Materiais e Métodos", fornecem um produto de amplificação de aproximadamente 1,3 e 0,5 Kpb para os domínios amino e carboxila, respectivamente, como se esperava (figura 10).

Os produtos de PCR obtidos foram ligados ao vetor pGEM-T-Easy e utilizados para transformar células competentes da cepa DH5 α . Após seleção das colônias transformantes, a presença do DNA plasmidial foi confirmada após tratamento com a enzima de restrição EcoRI, que libera os insertos clonados no vetor pGEM-T-Easy. As construções resultantes foram denominadas pGEM-N e pGEM-C.

Figura 8: Estratégia da clonagem dos domínios da proteína Tc85-11.

Na parte superior se mostra o diagrama “ribbons” do modelo da proteína Tc85-11. No meio se mostra o esquema da proteína expressa no vetor pET21a-Tc85-11 e embaixo estão representados os domínios amino e carboxila da proteína a serem expressos em forma recombinante.

Figura 9: Estratégia para a obtenção dos plasmídeos de expressão dos domínios da proteína Tc85-11.

A.- Sequência dos primers usados na amplificação dos domínios (com setas se indica a posição dos nucleotídeos no cDNA da Tc85-11). **B.-** Esquema das clonagens para a obtenção dos plasmídeos de expressão.

Figura 10: Amplificação de região codificante para os domínios amino e carboxila da proteína Tc85-11.

M.- Lambda DNA/Hind III; **N e C.-** Produtos do PCR dos fragmento de DNA correspondentes aos domínios amino e carboxila, respectivamente.

Dois clones de cada construção (pGEM-N e pGEM-C) foram seqüenciados com os primers T7 e SP6, para verificar a fidelidade da amplificação. As seqüências obtidas foram analisadas com ajuda dos programas Chromas v1.62 e Vector NTI v6.05, sendo evidenciadas algumas diferenças entre estas seqüências e a reportada para a proteína Tc85-11 por Giordano *et al.*, (1999). A análise de alinhamento das seqüências de amino ácidos obtidas com outros membros da família das trans-sialidases de *T. cruzi*, mostrou que as trocas observadas em Tc85-N e Tc85-C existem em outras proteínas depositadas no GenBank. Nos alinhamentos das figuras 11 e 12 se mostra a identidade e diferença entre a Tc85-11 e as proteínas Tc85-N e Tc85-C, respectivamente, e sua comparação com outro membro das trans-sialidases, a proteína SA85-1.1.

A)

Tc85_11	QVEKATDASTPSGSALTGAITAAGSASGSVELPQ ESI LFVPQTTQVLQKT	76
Tc85_N	QVEKATDASTPSGSALTGAITAAGSASGSVELPQ GVD LFVPQTTQVLQKT	50
Tc85_11	GTGSSGRDSFVSPSLVSAGGVIAAFAEGRINAKNTSPTESTKPPSSDVVAE	126
Tc85_N	GTGSSGRDSFVSPSLVSAGGVIAAFAEGRINAKNTSPTESTKPPSSDVVAE	100
Tc85_11	YIDSAWEWSTLVEKVKKKEWRARTVLGKAEGNESFD VVV RHPTTIMKGNK	176
Tc85_N	YIDSAWEWSTLVEKVKKKEWRARTVLGKAEGNESFD VV RHPTTIMKGNK	149
Tc85_11	VFLLVGSTALSVVNESWKEGSLEIKLVVGEVTKPTDSEPSKRIEWGEINS	226
Tc85_N	VFLLVGSTALSVVNESWKEGSLEIKLVVGEVTKPTDSEPSKRIEWGEINS	199
Tc85_11	PLNGSTLAAHKGKLTECLASGGSGVLMEDG AL VFSMAVNEKNDGVYSMI	276
Tc85_N	PLNGSTLAAHKGKLTECLASGGSGVLMEDG TL VFSMAVNEKNDGVYSMI	249
Tc85_11	IYSKDNGSTWALSED M SPANCTDPRITEWEGSLLMIVDCENEQRVYESCD	326
Tc85_N	IYSKDNGSTWALSED L SPANCTDPRITEWEGSLLMIVDCENEQRVYESCD	299
Tc85_11	MGKTWTEAIGTLPGVVNSQSEDYPEGVLRVDALITASIEDRKVMLYTQR	376
Tc85_N	MGKTWTEAIGTLPGVVNSQSEDYPEGVLRVDALITASIEDRKVMLYTQR	349
Tc85_11	GYASGGEAERALYLWVTDNNRSFFVGPVGMDNAVSGDLTSSLLYSDGKLH	426
Tc85_N	GYASGGEAERALYLWVTDNNRSFFVGPVGMDNAVSGDLTSSLLYSDGKLH	399
Tc85_11	LLQRRGNSERSVISLSRLTEELST	450
Tc85_N	LLQRRGNSERSVISLSRLTEELST	423

B)

Tc85-N	30...VELPQ GVD LFVPQTT...44	131...NESFD VV RHPTT...142
SA85-1.1	55...VEGLQR V DLFVPQTT...69	166...KGILD VV RHPTT...178
Tc85-11	56...VELPQ ESI LFVPQTT...70	157...NESFD VVV RHPTT...169

Figura 11: Alinhamento entre a proteína Tc85-11 e o domínio Tc85-N.

Alinhamento completo (**A**) e parcial (**B**), mostrando a identidade (em verde) da Tc85-N com a SA85-1.1 de *T. cruzi* (GenBank AAA30245.1).

A)

Tc85_11	ASGDTWNDEYLCLNATVKNA TKVKDGFQL	QEPDSRAIWPVNTQGDNRHI	533
Tc85_C	ASGDTWNDEYLCLNATVKNA TKVKDGFQL	TEPDSRAIWPVNTQGDNRHI	50
Tc85_11	SLSHNFTLVASVTIEEAPSEKTLTAVLGNTPEPPYIMRLSYTADNKWETM		583
Tc85_C	SLSHNFTLVASVTIEEAPSEKTLTAVLGNTPEPPYIMRLSYTADNKWETM		100
Tc85_11	LKDEKTTRRSTWELKKEYQVALMLQGNKRSVYVDGELLGEEEVPLTGETP		633
Tc85_C	LKDEKTTRRSTWELKKEYQVALMLQGNKRSVYVDGELLGEEEVPLTGETP		150
Tc85_11	LEPFGFCFGACGEDDDGEEPSPEEIGKKPRVTVTNVFLYNRPLNSTEMTA		683
Tc85_C	LEPFGFCFGACGEDDDGEEPSPEEIGKKPRVTVTNVFLYNRPLNSTEMTA		200

B)

Tc85-C	24...DGFQL	TEPDSRA...35
SA85-1.1	504...DGFQL	TEPDSRA...516
Tc85-3	69...DGFQL	TEPSSRV...80
Tc85-11	507...DGFQL	QEPDSRA...518

Figura 12: Alinhamento entre a proteína Tc85-11 e o domínio Tc85-C.

Alinhamento completo (A) e parcial (B), mostrando a identidade (em verde) da Tc85-C com a SA85-1.1 de *T. cruzi* (GenBank AAA30245.1) e Tc85-3, um dos clones obtidos para a família das Tc85 no nosso laboratório (Giordano, dados não publicados).

Para descartar a hipótese de que as diferenças encontradas na região amino terminal sejam artefatos da amplificação por PCR, esta região foi amplificada a partir de um outro vetor, o pET21a-Tc85-2. A análise de sequenciamento de dois clones obtidos em reações independentes de PCR, mostrou a mesma sequência, confirmando as diferenças observadas com a sequência descrita inicialmente para a proteína Tc85-11 (dados não mostrados). A possível causa destas discrepâncias de sequência pode estar na interpretação da sequência da Tc85-11 (reportada no GenBank com número de acesso AF085686), obtida por sequenciamento manual. Contudo as diferenças detectadas são mínimas.

4.2.2. Clonagem no vetor de expressão pAE

A subclonagem dos amplificadores no vetor pAE, se realizou nos sítios de restrição XhoI e KpnI. O corte do pAE com estas enzimas gera a linearização do vetor (2,8 Kpb). Os plasmídeos pGEM-N e pGEMC digeridos com as mesmas enzimas gera dois fragmentos, o maior de 3 Kpb corresponde ao vetor pGEM-T-Easy, e fragmentos de aproximadamente 1,3 Kpb e 0,6 Kpb correspondentes a pGEM-N e pGEM-C, respectivamente. Os fragmentos correspondentes ao vetor pAE e aos insertos foram recuperados do gel de agarose e ligados. Células competentes DH5 α foram transformadas com a reação de ligação, e se analisou o pDNA de 10 colônias transformantes, digerindo com as enzimas XhoI e HindIII, que libera o fragmento clonado (figura 13). As novas construções de expressão, denominadas pAE-Tc85-N e pAE-Tc85-C, foram seqüenciadas usando o primer T7 confirmando que a fase de leitura estava correta.

Figura 13: Análise de restrição dos plasmídeos de expressão para os domínios amino e carboxila da proteína Tc85-11.

M.- 1 Kbp protein ladder; **N.-** pAE-Tc85-N/XhoI+HindIII e **C.-** pAE-Tc85-C/XhoI+HindIII.

4.3. Expressão e purificação de proteínas recombinantes

Para saber qual cepa bacteriana é a mais apropriada para a expressão da proteína Tc85-N, se realizou uma seleção entre as seguintes cepas: BL21 (DE3), BL21start(DE3), BL21-Codon plus (DE3)-RIL, BL21-Codon plus (DE3)-RP. Prepararam-se células competentes pelo método “colony transformation” (Kurien e Scofield 1995) e se realizou a indução da expressão da proteína recombinante em pequena escala (3ml). Amostras correspondentes à cultura não induzida e induzida foram analisadas por SDS-PAGE (figura 14A) e Western-blot com anticorpo monoclonal contra a cauda de 6xHis (figura 14B).

O tamanho esperado para proteína Tc85-N expressa no vetor pAE com a fusão de 6xHis era de 47 kDa, que corresponde a uma proteína de 434 aminoácidos, porém a proteína recombinante expressa tem uma migração pouco acima do marcador de 35 kDa. A análise dos seqüenciamentos não mostrou existência de codons de terminação que estariam causando a expressão de uma proteína de menor tamanho, pelo que assumimos que esta proteína apresenta uma migração anômala e formação de dímeros por pontes de dissulfeto intermoleculares, uma vez que acrescentado ditioneitol (DTT), é possível observar apenas uma banda (ver figura 16B). Note-se também que nesse sistema, há síntese da proteína recombinante mesmo na ausência de IPTG, o que acontece freqüentemente no sistema da cepa BL21 (DE3) (Donahue e Bebee, 1999).

Para a expressão em maior escala da proteína Tc85-N se escolheu a cepa de *Escherichia coli* BL21-Codon plus (DE3)-RIL, embora não haja diferenças flagrantes de expressão entre as cepas. Esta escolha foi baseada no fato de que esta contém cópias adicionais dos genes para os tRNAs “raros” de arginina (AGA, AGG), isoleucina (ATA) e leucina (CTA) e que a seqüência da Tc85-N contém 7 codons “raros” para arginina, 2 para isoleucina e 1 para leucina, de um total de 423 codons. A elevada expressão da proteína recombinante em cepas convencionais, como a BL21 (DE3), resulta na depleção destes tRNAs resultando na queda de tradução da proteína de interesse.

Figura 14: Seleção de cepas bacterianas para a expressão da proteína Tc85-N.

A). SDS-PAGE 12.5%, **B)** Western blot utilizando o anticorpo anti-His-tag. **NI.**- Não induzido, **I.**- Induzido com 1 mM de IPTG. **RIL.**- BL21-codon plus (DE3)-RIL, **RP.**- BL21-codon plus (DE3)-RP, **Star.**- BL21 star (DE3), e **DE3.**- BL21 (DE3).

Não se conseguiu expressar a proteína Tc85-C em nenhuma das cepas contendo o fago Lambda DE3, pois após a transformação com o plasmídeo pAE-Tc85-C não houve crescimento celular. Talvez a proteína Tc85-C ocasione a lise bacteriana. A expressão da proteína Tc85-C só foi possível usando a cepa BL21-SI, induzida por NaCl (onde a proteína recombinante só é expressa na presença do indutor) e a expressão dos genes está sob o controle do promotor do fago T7 e não do sistema com o fago Lambda DE3 (Donahue e Bebee, 1999).

Na figura 15 mostra-se uma análise por Western blot da indução de expressão do domínio carboxila na cepa BL21-SI. Pode-se observar no material não induzido não há proteína recombinante, como no caso da BL21 Codon plus (DE3) RIL (figura 14B). No material induzido se observa uma banda abaixo do marcador de 20 kDa, quando esperávamos obter uma proteína de aproximadamente 23 kDa (correspondente a uma proteína de 211 aminoácidos). Uma migração anômala novamente poderia explicar esses resultados. Além disso, podemos observar a formação de multímeros, provavelmente resultantes de ligações por pontes dissulfeto intermoleculares, mas o tratamento da amostra com 10mM de DTT não reduziu nesse caso o número de bandas observado (não mostrado).

Figura 15: Western blot da expressão da proteína Tc85-C na cepa BL21-SI.

NI.- Não induzido, **I.-** Induzido com 300 mM de NaCl. A proteína recombinante foi detectada com o anticorpo anti-His-tag.

As proteínas recombinantes foram purificadas a partir de corpúsculo de inclusão (Tc85-N) e fração solúvel (Tc85-C), conforme descrito em “Materiais e Métodos”. No caso da proteína Tc85-N se realizou um processo de “refolding” antes da eluição. As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e dializadas contra tampão PBS ou 10 mM de

tampão fosfato de sódio, pH 7,4. A pureza de proteína foi monitorada por SDS/PAGE e Western blot.

Na figura 16 mostra-se a purificação da proteína Tc85-N, com um rendimento final de 10 mg de proteína por Litro de cultura. Na figura 17 se mostra a de purificação da proteína Tc85-C, obtendo-se 5 mg de proteína por Litro de cultura. A banda da proteína recombinante que aparece próxima do marcador de 20 kDa no material induzido, não foi detectada durante a purificação e só se consegue purificar formas de maior migração no gel.

Figura 16: Purificação por IMAC da proteína Tc85-N, expressa na cepa B121-Codon plus (DE3)-RIL.

A) Processo de purificação analisado por Western blot com o anticorpo anti-His-tag. **NI.**- Não induzido, **I.**- Induzido (1 mM IPTG), **S.**- Fração solúvel, **CI.**- Corpúsculo de inclusão, **FT.**- flowthrough, **E.**- Material eluído com 0,5 M imidazol. **B)** Análise eletroforético da proteína purificada na presença e ausência de 10mM DTT.

Figura 17: Western blot do processo de purificação por IMAC da proteína Tc85-C, expressa na cepa BL21-SI.

NI.- Não induzido, **I.-** Induzido (300 mM NaCl), **S.-** Fração solúvel, **CI.-** Corpúsculo de inclusão, **FT.-** flowthrough, **E.-** Material eluído com 0,5 M imidazol. Proteína recombinante detectada com o anticorpo anti-His-tag.

4.4. Análise das proteínas recombinantes por Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) das proteínas recombinantes obtidos a 20°C usando 2,5 μ M de proteína em 10 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,4, estão apresentados na figura 18A. As duas proteínas Tc85-N e Tc85-C mostraram espectros de CD típicos de proteínas com estrutura β , com um banda negativa no comprimento de onda de 216 nm, característico da estrutura β (Figura 18B) Estes resultados estão de acordo com o modelo estrutural proposto. Pelo modelo, o domínio amino terminal possui uma estrutura de β -propeller e o domínio carboxila, β -sandwich, ambos com predominância de estruturas β . Estes resultados mostram que o processo de “refolding” realizado para a proteína Tc85-N foi adequado.

Figura 18: Análise de estrutura por dicroísmo circular.

- A) Espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes Tc85-N e Tc85-C.
- B) Espectros de Dicroísmo Circular típico para os distintos tipos de estrutura secundária (Mulkerrin, 1996).

4.5. Mapeamento de sítios de adesão celular no domínio amino terminal da Tc85-11 utilizando peptídeos sintéticos

Para identificar possíveis sítios de adesão celular na proteína Tc85-11, realizaram-se experiências de adesão com peptídeos sintéticos que abrangem o domínio amino terminal, α -hélice e a parte da carboxila terminal da Tc85-11, como descrito em “Materiais e Métodos”. Dos 52 peptídeos testados, somente 5 pertencentes ao domínio amino terminal promoveram adesão das células LLC-MK₂ acima de 20%, quando comparados com os controles BSA (0%) e com o soro fetal bovino (100% de adesão) (Tabela II, figura 19). As porcentagens de adesão dos peptídeos também foram comparadas com a proteína de fusão Tc85-N e com o peptídeo J, este último correspondente ao domínio carboxila (Magdesian *et al.*, 2001). Como pode ser observado na figura 19, as maiores porcentagens de adesão foram obtidas com os peptídeos 485E (65%, praticamente a mesma de Tc85-N), 485D (48%) e 485A (51%). Em menor proporção, houve adesão aos peptídeos 476G (26 %), 485G (21 %). O peptídeo 510H embora com baixo índice de adesão (10%) foi considerado para as experiências posteriores. As seqüências correspondentes aos peptídeos foram localizadas na estrutura da Tc85-11 (figura 26). Os peptídeos 476G, 485A, 485D, 485E e 485G estão agrupados na segunda e terceira “lâmina” (blade), enquanto que o peptídeo 510H esta na sexta “lâmina” na estrutura β -propeller da Tc85-11 (ver figura 7).

Figura 19: Localização do sítio de ligação da proteína Tc85-11 na célula hospedeira.

Um total de 52 peptídeos sintéticos foram testados e são apresentados aqueles que mostraram capacidade de adesão maior que 10% a células LLC-MK₂, quando comparadas com o BSA (0%) e soro fetal bovino (100%). As barras representam a média de determinações em triplicata mais o desvio padrão.

Tabela II: Seqüência dos peptídeos que promoveram adesão das células LLC-MK₂.

Peptídeo	Seqüência de aminoácidos
476G	167 HPTTIMKGNKVFLLVGSTALL 186
485A	187 SVVNESWKEGSLEIKLVVGE 206
485D	217 KRIEWGEINSPLNGSTLAAH 236
485E	227 PLNGSTLAAHKGKLTECLAS 246
485G	247 GGSGVLMEDGALVFSLMAVN 266
510H	417 SLLYSDGKLHLLQRRGN SER 436

4.6. Inibição da Infecção do *T. cruzi* na célula de mamífero pelos peptídeos sintéticos

Para determinar se os peptídeos que têm capacidade de adesão celular são capazes de inibir a infecção destas células pelo parasita foram realizados experimentos de infecção, os núcleos dos parasitas e das células LLC-MK₂ foram evidenciados com ajuda da cromomicina A como descrito em “Materiais e Métodos”. Como controle, o ensaio foi feito na presença de 2% DMSO e nas condições usuais de infecção (DME e 2% FBS). Como todos os peptídeos foram dissolvidos em DMSO, para o cálculo de inibição de invasão se tomou como 0% de inibição o experimento que foi realizado apenas na presença de DMSO. Na figura 20 podem-se observar os núcleos corados do parasita circundando o núcleo da célula infectada. Foram contadas células infectadas e não infectadas de um número representativo de campos visuais e os valores de infecção (número de células infectadas / número total de células) foi comparado com os controles, como descrito em “Materiais e Métodos”. Analisando os dados obtidos das imagens (Figura 21A), observou-se que todos os peptídeos que aderiram à célula hospedeira também inibem a invasão do parasita. No entanto o menor nível de inibição correspondeu ao peptídeo 485E, que mostrou bom índice de adesão da célula hospedeira (65%, figura 19). Além disso, os peptídeos 485G e 510H, com baixo índice de adesão inibem significativamente a invasão pelo *T. cruzi*. Pode-se também observar que o DMSO “*per se*” diminui o nível de infecção de 87% para 50% quando comparado com o controle sem peptídeo nem DMSO. As porcentagens de inibição, calculadas tomando a infecção em presença de DMSO como 0% de inibição (para subtrair o efeito do DMSO nas experiências com peptídeos) são mostradas na figura 21B. Experimentos independentes mostraram o mesmo perfil de inibição da invasão da célula hospedeira pelo parasita na presença dos peptídeos selecionados.

Figura 20: Infecção de células LLC-MK₂ pelo *T. cruzi* na presença de peptídeos.

As células foram incubadas previamente com os peptídeos sintéticos que mostraram capacidade de adesão celular (476G, 485A, 485D, 485E, 485G, 510H), na presença de DMSO e na ausência de peptídeo (controle). Após infecção pelo *T. cruzi*, as células foram coradas com cromomicina A e fixadas como descrito em “Materiais e Métodos”.

Figura 21: Efeito inibitório dos peptídeos sintéticos na invasão de celular pelo *T. cruzi*.

A). Percentual da infecção do parasita a células LLC-MK₂. **B).** Porcentual de Inibição da infecção pelos peptídeos, tomando como referência a experiência na presença de DMSO. As barras representam a média de 3 experiências, com o desvio médio respectivo.

4.7. Ligação da Tc85-N a laminina

4.7.1. ELISA

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório foi determinado que a Tc85-11 se liga a laminina de modo específico (Giordano *et al.*, 1999) pelo que foi então denominada de glicoproteína ligadora de laminina (laminin binding glycoprotein, LBG). Com o intuito de esclarecer qual dos domínios da proteína Tc85-11 se liga a laminina, a laminina imobilizada em placas de ELISA, foi incubada com cada uma das duas proteínas recombinantes, correspondentes aos domínios amino e carboxila. A ligação destas proteínas foi determinada pela incubação com anticorpos anti-6xHis tag e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, como está descrito em “Matérias e Métodos” (figura 22). Nesta figura se pode observar que a proteína Tc85-N se liga 10 vezes mais a laminina do que BSA (usada como controle negativo), enquanto que a ligação da proteína Tc85-C a laminina é apenas duas vezes maior que BSA. Sendo que ambas as proteínas contem cauda de 6xHis, podemos excluir a participação desta cauda na interação do domínio N com a laminina. Por outro lado é importante ressaltar que a participação do domínio C-terminal da Tc85-11 na adesão da laminina não pode ser totalmente excluída. Além da ligação apresentada na figura 22, dados preliminares indicavam que a região carboxila terminal se ligava a laminina, porém com baixa afinidade (Giordano *et al.*, dados não publicados).

Em seguida se comparou a ligação da proteína Tc85-N a laminina, fibronectina (outra molécula de matriz) e BSA, incubando estas moléculas, previamente fixadas, com quantidades crescentes da proteína recombinante. Na figura 23 se pode observar que o domínio N da proteína Tc85-11 se liga de maneira saturável e específica a laminina, quando comparada com sua ligação a fibronectina e BSA usadas como controle. Este resultado é consistente com dados obtidos anteriormente, que indicavam que a proteína Tc85-11 não se liga a fibronectina (Giordano *et al.*, 1999).

Utilizando-se Tc85-N marcada com ^{125}I calculou-se sua afinidade a laminina como sendo ordem de $1.9 \times 10^{-7} \text{ M}$ (dados não mostrados).

Figura 22: Ligação dos domínios amino e carboxila da proteína Tc85-11 a laminina.

Laminina e BSA (100 μ l de 0,05 μ M) foram imobilizadas e incubadas com as proteínas Tc85-N e Tc85-C (100 μ l de 0,4 μ M) e reveladas com anticorpo anti-6xHis-tag e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os resultados representam o desvio padrão de três experimentos.

Figura 23: Ligação da proteína Tc85-N a laminina.

Ligação de quantidades crescentes da proteína Tc85-N (100 μ l / well de 0 - 1 μ M) a laminina, fibronectina e BSA (100 μ l de 0,05 μ M de cada proteína), segundo o descrito em “Materiais e Métodos”. Cada ponto representa o desvio padrão de dois experimentos.

4.7.2. “Laminin overlay”

Para confirmar a interação laminina-Tc85-N, fez-se uso da técnica denominada “far western” ou “protein overlay”, usada por vários autores para a caracterização de proteínas que ligam laminina, como por exemplo a proteína prion celular PrPC (Graner *et al.*, 2000) e as proteínas S4 e S5 de *Mycobacterium tuberculosis* (Pethe *et al.*, 2002).

A Tc85-N purificada foi submetida a eletroforese, transferida para a membrana de nitrocelulose, incubada com laminina e após lavagens, a laminina ligada na membrana através de interação com a TC85-N foi detectada fazendo uso de anticorpos monoclonais, anti-laminina, como descrito em “Materiais e Métodos”. A figura 24 mostra o resultado desta experiência.

Figura 24: Análise de interação de proteínas por “LN-overlay”.

A proteína de levedura YHR034p (Rfmp1, Gonzales *et al.*, submetido) com cauda de 6xHIs foi usada como controle negativo.

O ensaio de ligação (“Laminin overlay”) apresentado na figura 24 confirmou que a laminina é capaz de interagir especificamente com a proteína recombinante Tc85-N (terceira canaleta a partir a esquerda). Deve-se notar a reatividade com uma banda de mais alto peso molecular provavelmente devida à agregação da Tc85-N. Como controle utilizou-se uma proteína não relacionada, com cauda de 6xHis (6xHis-YHR034p, proteína de nucléolo de levedura, gentilmente cedida pela Dra. Carla Columbano Oliveira do IQ-USP). Deve-se notar que a proteína Tc85-N não reagiu com o anticorpo anti-laminina (segunda canaleta da esquerda). Com estes resultados confirmamos a interação existente entre a Tc85-N e a laminina, sendo que esta interação é específica e independente da cauda de 6xHis.

4.8. Mapeamento do sítio de ligação da Tc85-N a laminina utilizando peptídeos sintéticos

Para identificar as seqüências da Tc85-N que poderiam mediar sua interação com a laminina, foram testados 42 peptídeos sintéticos que abrangem todo o domínio amino terminal da Tc85-11 na sua capacidade de inibir a ligação da Tc85-N com a laminina. Resultados de duas experiências independentes realizadas cada uma em triplicata confirmam o efeito inibidor marcante dos peptídeos 485A e 485E, e em menor grau o peptídeo 485D. Os peptídeos 476G, 485G e 510H não inibiram a interação entre a Tc85-N e a laminina (dados não apresentados).

Para determinar se a inibição da ligação de Tc85-N com laminina pelos peptídeos 485A, 485E e 485D é específica, foram realizadas experiências de inibição com quantidades crescentes dos peptídeos, usando como controle o peptídeo 485G, que não mostrou efeito inibitório. Os resultados são mostrados na figura 25. Observa-se no experimento que os peptídeos 485A e 485E inibem a interação da Tc85-N com a laminina de maneira dose dependente. O peptídeo 485D inibe a interação destas proteínas independentemente da sua concentração, o que poderia indicar inespecificidade. O peptídeo 485A e 485E poderiam ser responsáveis pela ligação de laminina na Tc85-11. No modelo da proteína Tc85-11, a seqüência dos peptídeos, 485A, 485D e 485E estão próximos, formando um cluster (figura 26A). Desta forma, a seqüência de sobreposição dos peptídeos 485D e 485E (vermelho na figura 26A) estaria auxiliando na ligação à laminina da seqüência correspondente ao peptídeo 485A (em verde). O peptídeo 485G, que promove adesão da célula hospedeira e inibe a

invasão de *T. cruzi* (figuras 18 e 20) não inibiu a interação laminina-Tc85-N em nenhuma das concentrações testadas, pelo que este peptídeo, juntamente com 476G e 510H, poderiam representar outros sítios de ligação a superfície de células LLC-MK₂. Curiosamente estes peptídeos (476G, 485G, e 510H) formam um agrupamento no modelo estrutural da proteína Tc85-11 (magenta, roxo, e azul, respectivamente na figura 26B).

Figura 25: Inibição da ligação da TC85-N a laminina na presença de peptídeos sintéticos.

A proteína Tc85-N (0.4 μ M) foi incubada com a laminina previamente fixada (100 μ l/well de 0.05 μ M) na presença de quantidades crescentes dos peptídeos testados (0-40 μ M). A ligação foi quantificada como descrito em “Materiais e Métodos”. Mostra-se a média e o desvio de três experimentos para cada ponto experimental.

Figura 26: Diagramas de superfície e “ribbons” da estrutura do domínio amino da proteína Tc85-11 mostrando a posição dos peptídeos selecionados.

A: vista lateral do β -propeller, girada 90° para frente em relação estrutura mostrada na figura 7A. **B:** vista superior do β -propeller, na mesma orientação que a estrutura mostrada na figura 7. Os peptídeos estão representados nas cores seguintes: 476G-magenta, 485A-verde, a sobreposição entre os peptídeos 485D e 485E em vermelho (as seqüências restantes do 485D e 485E estão em laranja e amarelo, respectivamente), 485G-roxo e 510H azul.

4.9. Análise dos peptídeos sintéticos por Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) dos peptídeos que mostraram alguma atividade biológica foram obtidos a 20°C usando de 20 a 80 μM de peptídeo em água ou em trifluoroetanol (TFE).

Os peptídeos diferem entre si quanto à sua solubilidade em água, o que levou ao uso de concentrações diferentes. O peptídeo 485G é insolúvel em água. Na figura 27, mostram-se os espectros de CD dos peptídeos em água, indicando as concentrações usadas para cada um. Os valores estão normalizados em $[\theta]$ (θ molar), conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Com exceção do peptídeo 485A (em vermelho) que mostra uma conformação β , todos os peptídeos neste meio têm uma estrutura predominantemente aleatória (random coil). Desta forma, em água, apenas o peptídeo 485A teria a conformação que foi predita pela modelagem da proteína Tc85-11 (estrutura β).

Figura 27: Espectros de dicroísmo circular de peptídeos em água.

O fato de que os peptídeos 476G, 485D, 485E e 510H não tenham a estrutura esperada em solução aquosa, não invalida seu uso nas experiências realizadas. Sabe-se que os peptídeos tendem a adotar conformações específicas dependendo do meio em que se

encontrem. No contexto da proteína, estas seqüências não estão completamente expostas ao meio, mas estão em contato com regiões não polares na proteína, o que estabiliza sua conformação. Neste sentido, a estrutura dos peptídeos foi caracterizada em solução de 30% de TFE. O TFE é um solvente orgânico que proporciona um meio não polar e é capaz de induzir conformações, em peptídeos, para as quais suas seqüências primárias têm propensão a adotar (Roccatano *et al.*, 2002). Todos os peptídeos são solúveis neste meio. Como se mostra na figura 28, todos os peptídeos adquirem conformação em α -hélice, com exceção do peptídeo 485D (em azul) que mantém estrutura em random coil.

Figura 28: Espectros de dicroísmo circular de peptídeos em 30% de TFE.

Estes resultados indicam a flexibilidade dos peptídeos para adquirir conformações distintas, dependendo do meio. Algumas destas conformações deve favorecer a interação com o possível receptor. Como se mostra em vários trabalhos, procedimentos que restringem a flexibilidade dos peptídeos para assegurar uma conformação específica (como no caso dos peptídeos cíclicos) incrementam a estabilidade da interação com seus receptores (Vranken *et al.*, 1996).

4.10. Efeito da Tc85-N na expressão de laminina

Trypanosoma cruzi libera continuamente várias proteínas ao meio de cultura. Pinho e colaboradores (2002) demonstraram que alguns componentes deste material são absorvidos na superfície celular e induzem a expressão de laminina e outras proteínas de matriz extracelular. Como membros da super família das trans-sialidases de *T. cruzi*, incluindo a Tc85, são liberados ao meio de cultura, (Gonçalves *et al.*, 1991) fomos verificar se a Tc85-11 teria algum papel na indução da expressão de laminina. Para tanto, células LLC-MK₂ foram tratadas com a proteína recombinante Tc85-N, conforme descrito em Materiais e Métodos. Na Figura 29 se mostra por imunocitoquímica, que tanto Tc85-N quanto o material liberado pelo parasita aumentam o conteúdo de laminina em células LLC-MK₂, indicando que a Tc85-N poderia ser um dos responsáveis pelo fenômeno observado. Resta determinar se esse aumento de expressão de laminina é observado pelo tratamento das células com os peptídeos da Tc85-11 ligantes de laminina. É interessante observar que em camundongos nas fases tardia e crônica da infecção com *T. cruzi*, foram observadas alterações na matriz extracelular, com diminuição de fibronectina e aumento do depósito de laminina e colágeno de tipo III e IV (Andrade, 1989). Essas alterações tem sido atribuídas ao processo inflamatório decorrente da infecção, mas um papel ativo do parasita não pode ser descartado.

Figura 29: Detecção de laminina na superfície das células LLC-MK₂.

Células não tratadas (A) ou tratadas com a proteína recombinante Tc85-N (B) ou com antígenos liberados pelo parasita (C). A laminina foi revelada como descrito em “Materiais e Métodos”. Aumento original 400X

5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

No presente trabalho foi deduzido o modelo estrutural para a proteína Tc85-11 de *T. cruzi* (figura 7) que contem um domínio com estrutura de β -propeller, correspondente ao domínio catalítico na trans-sialidase. Esta estrutura consta de repetições estruturais dispostas radialmente e está presente em proteínas com diversas funções como enzimas, proteínas estruturais, mediadores de sinalização, receptores e mediadores de interação proteína-proteína (Springer, 1998; ter Haar *et al.*, 2000). Dentre os exemplos de proteínas com estrutura β -propeller com capacidade de interação proteína-proteína podem-se citar o domínio N da Clatrina (ter Haar *et al.*, 2000) que participa na mobilização de vesículas no citoplasma de células eucarióticas, a proteína bacteriana TolB (Carr *et al.*, 2000), a qual é componente de um complexo envolvido na invasão celular, o segmento extracelular da integrina (Takagi e Springer 2000), o receptor para LDL (Low Density Lipoprotein, (Rudenko *et al.*, 2002) e o domínio G3 do nidogen que interage com a laminina (γ 1) (Timpl e Brown 1996).

A proteína Tc85-11 também mostra um domínio na região carboxila que corresponde ao domínio da trans-sialidase, denominado “lectin-like”. A topologia deste domínio é de “ β -sandwich”, presente em outras moléculas de superfície celular com capacidade de interação proteína-proteína, como por exemplo, os domínios tipo III de fibronectina (Fn3) e os domínios LG das lamininas, os quais apresentam sítios de ligação para integrinas (Hohenester e Engel, 2002).

A proteína Tc85-11 foi caracterizada como uma glicoproteína ligadora de laminina (Laminin Binding Glycoprotein, Giordano *et al.*, 1999) e no presente trabalho, fazendo uso de proteínas recombinantes, mostramos que o sítio de ligação para laminina está contido no domínio amino terminal desta proteína, sendo a constante de dissociação da interação Tc85-N-laminina de $1,9 \times 10^{-7}$ M. Integrina (Zhang *et al.*, 1999) e nidogênio (Takagi *et al.*, 2003) são outras proteínas com estrutura β -propeller descritas que se ligam a laminina.

Em ensaios de adesão utilizando peptídeos sintéticos, somente cinco peptídeos mostraram ter capacidade de se ligar a célula LLC-MK₂ (figura 19, tabela II). Todos eles estão localizados no domínio amino terminal (figura 26), e inibiram parcialmente a infecção de células LLC-MK₂ por *T. cruzi*, embora deva-se notar que não se observou uma relação direta entre peptídeos que promovem adesão de células de cultura e peptídeos que inibem invasão pelo parasita. Destes peptídeos apenas o 485A e 485D e 485E foram capazes inibir a

interação Tc85-N-laminina, mas somente o 485A e o 485E foram capazes de inibir a interação Tc85-N-laminina especificamente, indicando que o sítio de ligação a laminina está localizado na região correspondente a estes peptídeos os quais, formam um “cluster” na estrutura do domínio amino da Tc85-11 (figure 26A). Os três peptídeos restantes, 476G, 485G e 510H, se encontram formando um outro “cluster” na superfície da Tc85-11 (figura 26B), o que sugere que esta proteína poderia conter um outro sítio de ligação para moléculas de superfície celular, o que concorda com a hipótese sobre as propriedades multi-adesivas desta proteína (Giordano *et al.*, 1999).

Vários autores têm sugerido que antígenos liberados pelo *Trypanosoma cruzi* poderiam estar envolvidos no estabelecimento da inflamação, sensibilização de células não infectadas, ativação da resposta imune contra antígenos do parasita assim, como a modulação da expressão dos componentes de matriz extracelular que mediam interações célula-célula ou parasita-célula (Ribeiro e Hudson, 1980; Andrade, 1989; Pinho *et al.*, 2002; Marino *et al.*, 2003). Estes efeitos estariam sendo mediados por proteínas do parasita com capacidade de interagir com componentes da matriz extracelular, como fibronectina, trombospondina, heparina sulfato e laminina. Estas moléculas representam potenciais alvos para a inibição da invasão da célula hospedeira pelo parasita. Vale ressaltar que aptâmeros de RNA que inibem a interação de *T. cruzi* com laminina também diminuem a infecção de células por este parasita (Ulrich *et al.*, 2002), e poderiam ser utilizados como agentes terapêuticos *in vivo*.

Dentre as proteínas liberadas pelo tripomastigota no meio de cultura temos as proteínas Tc85 (Gonçalves *et al.*, 1991). O domínio N-terminal (Tc85-N), com capacidade de ligar laminina, ocasiona um incremento da expressão de laminina nas células LLC-MK₂, como foi estabelecido no presente trabalho por imunocitoquímica. Esta observação corrobora os resultados obtidos por Pinho e colaboradores (2002), que utilizaram proteínas totais liberadas pelo parasita que levaram a esse efeito e avança na definição dos efetores do fenômeno. São desconhecidos, no entanto, os mecanismos que levam a um aumento da expressão dos componentes da matriz extracelular no miocárdio durante a infecção com *T. cruzi*. Marino e colaboradores (2003) sugerem que provavelmente fatores solúveis como citocinas, quimocinas e fatores de crescimento produzidos pelas células infectadas pelo parasita, assim como por células sensibilizadas pelos antígenos liberados pelo *T. cruzi*, possam contribuir para as alterações da matriz extracelular durante a infecção, dando lugar à formação de fibrose do miocárdio típica da doença de Chagas. Outros grupos de pesquisa também sugerem que produtos de células inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e quimocinas) detectados tanto em pacientes chagásicos, quanto em coração e sistema nervoso de animais de

experimentação infectados com *T. cruzi*, poderiam estar contribuindo ao incremento da expressão dos componentes da matriz extracelular, promovendo assim na manutenção da miocardite crônica. Por outro lado, a proteólise de moléculas da matriz extracelular por ação de proteases secretadas pelo parasita, por leucócitos ou mesmo produtos do processamento natural (caso das lamininas) podem expor ou ativar sítios cripticos na molécula nativa, facilitando a invasão de células alvo pelo parasita ou influenciando outros fenômenos biológicos. Por exemplo, Ouaiissi e colaboradores (1992) mostraram que fragmentos de clivagem da fibronectina promovem a diferenciação de tripomastigota para amastigotas.

A regulação da biossíntese de laminina e colágeno tipo IV ainda não é bem conhecida. Como foi revisto por Ekblom e colaboradores (2003), em distintas células a síntese de laminina-1 e colágeno IV é correlacionada com a ativação da serina/treonina proteína kinase Akt/PKB pela proteína kinase PI3K (uma proteína kinase ativada pelo fosfoinositol-3-fosfato). Distintos tipos de receptores foram implicados na ativação desta via, como integrinas e receptores de FGF (fibroblast growth factor). A via da Akt/PKB ativa reguladores da transcrição e deste modo modularia a expressão gênica de alguns componentes da membrana basal, incluindo laminina-1 e colágeno IV.

Recentemente Chuenkova et al. (2001) mostraram que a trans-sialidase de *T. cruzi* estimula a sobrevivência de células neuronais via PI3K-Akt/PKB. Por outro lado, estas proteína kinases são importantes reguladores da invasão de *T. cruzi* em células não-fagocíticas profissionais assim como em macrófagos (revisto em Burleigh e Woolsey, 2002).

E possível que a Tc85-11 ao ligar-se a laminina, a través do domínio N-terminal, desencadeie um sinal –possivelmente através de integrinas- para a ativação de uma via de sinalização que induziria a expressão de genes para componentes da matriz celular, como a laminina. O papel fisiológico do incremento na expressão de moléculas da matriz não é claro, mas poderia ser uma estratégia do parasita que leva a um aumento de substrato onde fragmentos de clivagem das moléculas da matriz, que de algum modo possam facilitar sua sobrevivência na célula hospedeira.

Por último, é interessante o fato de que moléculas com estrutura semelhante como a trans-sialidase e a proteína Tc85-11 de *T. cruzi* tenham evoluído para funções distintas. Os genes que compõem a superfamília das trans-sialidasas provavelmente possuem um ancestral comum que deu origem a proteínas com distintas atividades. Dentre esses genes os mais numerosos e com maior variação de sequência correspondem aos codificantes das trans-sialidase símile (Frash 2000). Para conhecer se as proteínas codificadas por estes genes

também compartilham semelhanças estruturais, realizamos alinhamento das seqüências de aminoácidos de trans-sialidase, sialidase e alguns membros sem atividade enzimática, mas implicados em processos de adesão/invasão celular (tabela III). Na Figura 30 é mostrado o alinhamento parcial de seqüências de amino ácidos com indicações de estrutura secundária (baseado na trans-sialidase de *T. cruzi*). Aqui podemos observar que os maiores “gaps” estão localizados nas alças (loops), o que não comprometeriam as características estruturais das moléculas. Uma destas alças está localizada depois da α - hélice 1, a qual é a maior na trans-sialidase e na CRP. É importante ressaltar que não existem coordenadas estruturais para parte desta seqüência, ausente na trans-sialidase, Tc85-11 e outras proteínas (indicado com setas nas figuras 2 e 7). As seqüências que correspondem aos ASP-boxes (seqüências repetitivas conservadas em sialidases bacterianas) e a seqüência conservada VTVXNVXLYNR estão também localizadas em posições estruturais idênticas. No alinhamento das seqüências completas das proteínas (dados não mostrados) foi notado que algumas variações de tamanho no extremo amino podem ser devidas a diferenças na localização do códon de iniciação nos cDNAs, assim como de seqüências sinal. A única seqüência com o extremo amino substancialmente reduzida é a gp82 e portanto com o primeiro “blade” da estrutura β -propeller reduzida. Isto não implica necessariamente em perda desta estrutura. Assim, por exemplo, o receptor do bacteriófago PRD1 possui uma estrutura de β -propeller incompleta denominada pseudo- β -propeller, determinada através de cristalografia (Hewat, 2003).

As maiores diferenças encontram-se na região de carboxi--terminal, que segue as seqüências mostradas no alinhamento da Figura 30. Algumas proteínas não possuem estas seqüências adicionais (trans-sialidases tipo TS-e), algumas proteínas possuem as repetições SAPA (trans-sialidases tipo TS-I) e em outras proteínas têm seqüências ricas em prolina no lugar de repetições SAPA (trans-sialidases símile, Tc-85). Pelo alto conteúdo de prolina, esta região poderia ter estrutura randômica ou coiled-coil, as quais não foram caracterizadas por cristalografia.

Em geral, o alinhamento das seqüências destes membros da superfamília das trans-sialidases mostra que eles têm estrutura semelhante. Esta semelhança estrutural já havia sido proposta, com base na homologia de seqüências (Olafson *et al.*, 1984). Deve-se notar, no entanto a grande variação de seqüência entre blocos relativamente conservados da família. Os dados sugerem os membros da super-família das trans-sialidases representariam um caso de Expansão Linage-Específica (LSE, Lineage Specific Expansion) no *Trypanosoma cruzi*. Mediante o LSE, novas proteínas paralogas são formadas o que serve de material para a

adaptação do organismo a condições específicas e desenvolver novas funções (Lespinet *et al.*, 2002).

Figura 30: Alinhamento parcial de seqüências de membros da superfamília das trans-sialidases.

As características das proteínas selecionadas para comparação estão na tabela III. A cor dos aminoácidos corresponde a identidade (vermelho) e conservação (verde e azul). No quadrado vermelho estão ressaltados os resíduos da trans-sialidase que não têm coordenadas estruturais. A posição da ponte dissulfeto nesta região da TS também é indicada. Em verde estão marcados os ASP-boxes (SXD_XGXTW) e em azul a seqüência conservada VTVXNVXLYNR no domínio C-terminal.

Tabela III: Membros da superfamília das trans-sialidases escolhidas para o alinhamento.

Proteína	Numero de acesso no GenBank	Propriedades	Referencias
Trans-sialidase (TS)	gb AAA99444.1	Trans-sialidase	Cremona <i>et al.</i> , 1995
Sialidase (SA)	gb AAA30246.1	Sialidase	Kahn <i>et al.</i> , 1991
Tc85-11	gb AAD13347.1	Ligação a laminina e citoqueratina	Giordano <i>et al.</i> , 1999; Magdesian <i>et al.</i> , 2000
gp82	gb AAF02477.1	Adesão celular e sinalização por Ca^{2+}	Manque <i>et al.</i> , 2003
gp90	gb AAM47176.1	Infectividade	
SA85-1.1	sp P18269	Antígeno para células T	Málaga e Yoshida 2001
CRP	gb AAB49414.1	Proteína Reguladora do Complemento	Millar e Kahn, 2000
			Norris <i>et al.</i> , 1997

CONCLUSÕES:

- ◆ A Tc85-11 apresenta dois domínios: o amino terminal que mostra conformação β -propeller e o domínio carboxila terminal que apresenta conformação β -Sandwich, ambos conectados por uma α hélice.
- ◆ O sítio de ligação da laminina na Tc85-11 foi identificado no domínio amino terminal.
- ◆ Cinco peptídeos sintéticos correspondentes à região N-terminal da proteína Tc85-11, mostraram capacidade de adesão à superfície das células LLC-MK₂.
- ◆ Estes peptídeos inibiram a invasão de tripomastigotas de *T. cruzi* a células LLC-MK₂.
- ◆ Destes, o peptídeo 485A e o peptídeo 485E inibem a interação da Tc85-N com a laminina de forma dose dependente.
- ◆ O tratamento de células LLC-MK₂ com o domínio N da Tc85-11 incrementa a quantidade de laminina na superfície destas células.
- ◆ A proteína Tc85-11 de *T. cruzi* é uma molécula multi-adesiva que possui sítios de ligação para diferentes receptores na superfície das células LLC-MK₂ e para proteínas da matriz extracelular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuin, G., Colli, W., de Souza, W., Alves, M.J. (1989) A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol Biochem Parasitol.* 35:229-237.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell.* 3a Ed., Garland publishing. Inc, NY.
- Allen, B.L., Hook, M. (2002) Isolation of a putative laminin binding protein from *Streptococcus anginosus*. *Microb Pathog.* 33:23-31.
- Almeida-de-Faria, M, Freymuller E, Colli W, Alves, MJ. (1999) *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol.* 92:263-74.
- Alves, M.J.M. (1996). Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are adhesion proteins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:831-833
- Alves, M.J.M., Abuin, G., Kuwijima, V.J., 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.
- Andrews, N.W., Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* 14, 447-451.
- Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L., Griffiths, G. A T. (1990) cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 61:1277-87.
- Amaya, M. F.; Buschiazso, A.; Nguyen, T. & Alzari, P. M. (2003) The high resolution structures of free and inhibitor-bound *Trypanosoma rangeli* sialidase and its comparison with *T. cruzi* trans-sialidase. *J. Mol. Biol.* 325:773-784.
- Andrade, S.G., Grimaud, J.A., Stocker-Guerret, S. (1989) Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and

- evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 40:252-60.
- Bandyopadhyay, K., Karmakar, S., Ghosh, A., Das, P.K. (2002) High affinity binding between laminin and laminin binding protein of *Leishmania* is stimulated by zinc and may involve laminin zinc-finger like sequences. Eur. J. Biochem. 269:1622-1629.
- Belkin, A.M., Stepp, M.A. (2000) Integrins as receptors for laminins. Microsc Res Tech. 51:280-301.
- Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Netto, M. (2000) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Burleigh, B.A., Wellsm, C.W., Clarke, M.W., Gardiner, P.R. (1993) An integral membrane glycoprotein associated with an endocytic compartment of *Trypanosoma vivax*: identification and partial characterization. J Cell Biol. 120:339-52.
- Burleigh, B.A., Woolsey, A.M. (2002) Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion Cell Microbiol. 4:701-11
- Buschiazso, A., Campetella, O., Frasch, A.C. (1997) *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. Glycobiology 7:1167-73.
- Buschiazso, A., Cremona, M.L., Campetella, O., Frasch, A.C., Sanchez, D.O. (1993) Sequence of a *Trypanosoma rangeli* gene closely related to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. Mol Biochem Parasitol. 62:115-6.
- Buschiazso, A., Tavares, G.A., Campetella, O., Spinelli, S., Cremona, M.L., Paris, G., Amaya, M.F., Frasch, A.C., Alzari, P.M. (2000) Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. EMBO J. 19:16-24.
- Buschiazso, A.; Amaya, M. F.; Cremona, M. L.; Frasch, A. C. & Alzari, P. M. (2002) The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. Mol. Cell 10:757-768.
- Carr, S., Penfold, C.N., Bamford, V., James, R., Hemmings, A.M. (2000). The structure of TolB, an essential component of the tol-dependent translocation system, and its

- protein-protein interaction with the translocation domain of colicin E9. *Structure Fold Des.* 8:57-66
- Chammas, R., Veiga, S.S., Line, S., Potocnjak, P., Brentani, R.R. (1991) Asn-linked oligosaccharide-dependent interaction between laminin and gp120/140. An alpha 6/beta 1 integrin. *J Biol Chem.* 266:3349-3355.
- Chuenkova, E.V., Furnari, F.B., Cavenee, W.K., Pereira, M.A. (2001) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:9936-9941.
- Colli, W. (1993) Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 7:1257-1264.
- Colognato, H., Yurchenco, P.D. (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 218:213-234.
- Cremona, M.L., Campetella, O., Sanchez, D.O., Frasch, A.C. (1999) Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. *Glycobiology.* 9:581-7.
- Cremona, M.L., Sanchez, D.O., Frasch, AC., Campetella, O. (1995) A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. *Gene.* 160:123-128.
- DiPersio CM, Hodivala-Dilke KM, Jaenisch R, Kreidberg JA, Hynes RO. (1997) alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol.* 137:729-42.
- Donahue, R.A., Bebee, R.L. (1999) BL21-SI competent cells for protein expression in E. coli. *FOCUS (Life Technologies).* 21:49-51.
- Dvorak, J.A., Howe, C.L. (1976) The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells in vitro. *J Protozool.* 23:534-7.
- Egima, C.M., Briones, MR, Freitas Junior, L.H., Schenkman, R.P., Uemura, H., Schenkman, S. (1996) Organization of trans-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 77:115-25.

- Ekblom, P., Lonai, P., Talts, J.F. (2003) Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol.* 22:35-47.
- Fernandez, M.A., Munoz-Fernandez, M.A., Fresno, M. (1993) Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. *Eur J Immunol.* 23:55255-7.
- Frasch, A.C. (2000) Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 16:282-6.
- Fujiwara, H., Kikkawa, Y., Sanzen, N., Sekiguchi, K. (2001) Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6beta1 integrins. *J Biol Chem.* 276:17550-17558.
- Garcia, G.A., Joensen, L.G., Bua, J., Ainciart, N., Perry, S.J., Ruiz, A.M., (2003) *Trypanosoma cruzi*: molecular identification and characterization of new members of the Tc13 family. Description of the interaction between the Tc13 antigen from Tulahuen strain and the second extracellular loop of the beta(1)-adrenergic receptor. *Exp Parasitol.* 103:112-9.
- Giordano, R., Chammas, R., Veiga, S.S., Colli, W., Alves, M.J.M. (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.* 65:85-94.
- Giordano, R., Fouts, D., Tewari, D., Colli, W., Manning, J., 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.* 274:3461-3468.
- Gonçalves, M.F., Umezawa, E.S., Katzin, A.M., de Souza, W., Alves, M.J., Zingales, B., Colli, W. (1991) *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol.* 72:43-53.
- Gonzales, F. A., Zanchin, N. I. T., Luz, J. S. Oliveira, C. C. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Rmfp1, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in the early steps of pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Research* (submetido)

- Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V.R., Brentani, R.R. (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol. Brain. Res.* 76:85-92.
- Gruber, A., Zingales, B. (1995) Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques.* 19:28-30.
- Hakamori, S., M., Fukuda, K., Sekiguchi, Carter, W. G. (1984). Fibronectin, laminin, and other extracellular glycoproteins. In K. A. Picz and A. H. Reddi (eds.), *Extracellular Matrix Biochemistry*. Elsevier, New York, pp. 229–276.
- Hewat, E. (2003) The Bacteriophage PRD1 Uses a Pseudo-beta Propeller to Bind to Its Cellular Receptor. *Structure (Camb).* 11:239-40.
- Hohenester, E. and Engel, J., (2002) Domain struture and organization in extracelular matrix proteins. *Matrix Biology* 21:115-128
- Inoue, H., Hojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28.
- Kahn, S., Colbert, T.G., Wallace, J.C., Hoagland, N.A., Eisen, H. (1991) The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88:4481-5.
- Kikkawa, Y., Sanzen, N., Sekiguchi, K. (1998) Isolation and characterization of laminin-10/11 secreted by human lung carcinoma cells. laminin-10/11 mediates cell adhesion through integrin alpha3 beta1. *J Biol Chem.* 273:15854-15859.
- Kurien, B.T., Scofield, R.H. (1995) Polyethylene glycol-mediated bacterial colony transformation. *Biotechniques.* 18, 1023-1026. Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26:283-291.
- Laskowski, R.A., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* 20:1049-67.
- Lespinet, O., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Aravind, L. (2002) The role of Lineage-Specific Gene Family Expansion in the Evolution of Eukaryotes. *Genome Res.* 12:1048-1059.

- Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V., Andrews, N.W. (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J. Exp. Med. 171:401-13.
- Lima, M.F., Villalta, F. (1989) *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. Mol. Biochem. Parasitol. 33:159-70.
- Magdesian, M.H., Giordano, R., Ulrich, H., Juliano, M.A., Juliano, L., Schumacher, R.I., Colli, W., Alves, M.J.M. (2001) Infection by *Trypanosoma cruzi*: identification of a parasite ligand and its host-cell receptor. J. Biol. Chem. 276:19382-19389.
- Málaga, S., Yoshida, N. (2001) Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. Infect Immun. 69:353-9.
- Manque, P.M., Neira, I., Atayde, V.D., Cordero, E., Ferreira, A.T, da Silveira, J.F., Ramirez, M., Yoshida, N. (2003) Cell adhesion and Ca²⁺ signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. Infect Immun. 71:1561-5.
- Marino, A.P., Silva, A.A., Pinho, R.T., Lannes-Vieira, J. (2003) *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. Braz J Med Biol Res. 36:1121-33.
- Marques, M.A., Antonio, V.L., Sarno, E.N., Brennan, P.J., Pessolani, M.C. (2001) Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. J. Med. Microbiol. 50:23-28.
- Miles, M.A., Feliciangeli, M.D., de Arias, A.R., (2003) American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular. Epidemiology in guiding control strategies B.M.J. 28:444-8.
- Millar, A.E., Kahn, S.J. (2000) The SA85-1.1 protein of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen. Infect Immun. 68:3574-80
- Moncayo, A. (1999) Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. Mem Inst. Oswaldo Cruz. 94 Suppl 1:401-4.

- Moody, T.N., Ochieng, J., Villalta, F. (2000) Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS Lett.* 470:305-308.
- Mortara, R.A. (1991) *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp. Parasitol.* 73:1-14.
- Mulkerrin, M.G. (1996) Protein Structure Analysis Using Circular Dicroism, in "Spectroscopic methods for determining protein structure in solution" (Ed. By Havel, H.A.) VCH Publishers, Inc. New York, pp. 5-24.
- Nomizu, M., Otaka, A., Utani, A., Roller, P.P., Yamada, Y. (1994) Assembly of synthetic laminin peptides into a triple-stranded coiled-coil structure. *J. Biol. Chem.* 269:30386-92.
- Norris KA, Schrimpf JE, Szabo MJ. (1997). Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. *Infect. Immun.* 65, 349-57.
- Norris, K.A. (1998) Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect. Immun.* 66:2460-5.
- Olafson, R. W., Clarke, M. W., Kielland, S. L., Pearson, T. W., Barbet, A. F., McGuire, T. C. (1984) Amino terminal sequence homology among variant surface glycoproteins of African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 12:287-98.
- 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* 18:411-21.
- Ouaissi, 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.* 59:68-79.
- Ouaissi, M.A., Afchain, D., Capron, A., Grimaud, J.A. (1984) Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* 22:380-382.

- Ouaissi, M.A., Cornette, J., Capron, A. (1986) Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19:201-11.
- Pereira, M.E., Mejia, J.S., Ortega-Barria, E., Matzilevich, D., Prioli, R.P. (1991) The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. *J. Exp. Med.* 174:179-91.
- Pethe, K., Bifani, P., Drobecq, H., Sergheraert, C., Debie, A.S., Loch, C., Menozzi, F.D. (2002) Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:10759-10764
- Pinho, R.T., Vannier-Santos, M.A., Alves, C.R., Marino, A.P., Castello Branco, L.R., Lannes-Vieira, J. (2002) Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. *Acta Trop.* 83:103-15.
- Pontes-de-Carvalho, L.C., Tomlinson, S., Nussenzweig, V. (1993) *Trypanosoma rangeli* sialidase lacks trans-sialidase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62:19-25.
- Pöschl, E., Mayer, U., Stetefeld, J., Baumgartner, R., Holak, T.A., Huber, R., Timpl, R. (1996) Site-directed mutagenesis and structural interpretation of the nidogen binding site of the laminin gamma1 chain. *EMBO J.* 15:5154-9.
- Quiagen (1997) The QIAexpressionist: A handbook for expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Third edition, 199.
- Ramirez, M.I., Ruiz, R.C., Araya, J.E., Da Silveira, J.F., Yoshida, N. (1993) Involvement of the stage-specific 82 KDa adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect. Immun.* 61:3636-3641.
- Ramos, C.R., Figueredo, R.C., Pertinhez, T.A., Vilar, M.M., do Nascimento, A.L., Tendler, M., Raw, I., Spisni, A., Ho, P.L. (2003) Gene structure and M20T polymorphism of the *Schistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein. Molecular, functional and immunoprotection analysis. *J. Biol. Chem.* 278:12745-51.

- Ramsey, J.M., Schofield, C.J. (2003) Control of Chagas disease vectors. *Salud Publica Mex.* 45:123-8.
- Ribeiro Dos Santos, R., Hudson, L. (1980) *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin. Exp. Immunol.* 40:36-41.
- Roccatano D, Colombo G, Fioroni M, Mark AE. (2002). Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:12179-84.
- Romaña, C. (1935) Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnostico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquistotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad) *Public MEPR* 22:16-28
- Roskelley, C. D., Desprez, P.Y., Bissell, M.J. (1994). Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12378-12382.
- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Deisenhofer, J. (2002) Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science.* 298:2353-8.
- Ruiz, R., Rogoni, V.L. Gonzales, J., Yoshida, N. (1993) The 35/50 KDa Surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, and adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasit. Immunol.* 15:121-125.
- Šali, A. & Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234:779-815.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1998) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York USA.
- Santana, J.M., Grellier, P., Schrevel, J., Teixeira, A.R. (1997) A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem. J.* 325:129-37.

- Sasaki, M., Kato, S., Kohno, K., Martin, G.R., Yamada, Y. (1987) Sequence of the cDNA encoding the laminin B1 chain reveals a multidomain protein containing cysteine-rich repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84:935-9.
- Sasaki, M., Yamada, Y. (1987) The laminin B2 chain has a multidomain structure homologous to the B1 chain. *J Biol Chem.* 262:17111-7.
- Sasaki, M., Kleinman, H.K., Huber, H., Deutzmann, R., Yamada, Y. (1988) Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J. Biol. Chem.* 263:16536-44.
- Schenkman, S., Eichinger, D. (1993) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol. Today* 9:218-222.
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M.E., Nussenzweig, V. (1994) Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol.* 48:499-523.
- Silva, A.A., Roffe, E., Lannes-Vieira, J. (1999) Expression of extracellular matrix components and their receptors in the central nervous system during experimental *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz. J. Méd. Biol. Res.* 32:593-600.
- Silva-Barbosa, S.D., Savino, W. (2000) The involvement of laminin in anti-myocardial cell autoimmune response in murine Chagas disease. *Dev. Immunol.* 7:293-301.
- Soeiro Mde N, Paiva MM, Barbosa HS, Meirelles Mde N, Araujo-Jorge TC. A. 1999 Cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. *Cell Struct. Funct.* 24:39-49.
- Soto, G.E., Hultgren, S.J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181:1059-1071.
- Springer, T.A. (1998) An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J. Mol. Biol.* 283:837-62.

- Stephens, L.E., Sutherland, A.E., Klimanskaya, I.V., Andrieux, A., Meneses, J., Pedersen, R.A., Damsky, C.H. (1995) Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev.* 9:1883-95.
- Takagi, J., Yang, Y., Liu, J.H., Wang, J.H., Springer, T.A. (2003) Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic beta-propeller interface. *Nature.* 424:969-74.
- ter Haar, E., Harrison, S.C., Kirchhausen, T. (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:1096-100.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22:4673-4680.
- Timpl, R., Brown, J.C., (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18:123-132
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R. (1979) Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254:9933-7.
- Timpl, R., Tisi, D., Talts, J.F., Andac, Z., Sasaki, T., Hohenester, E. (2000) Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol.* 19:309-17.
- Turner, D.C., Flier, L.A., Carbonetto, S. (1989) Identification of a cell-surface protein involved in PC12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen. *J. Neurosci.* 9:3287-3296.
- Ulrich, H., Magdesian, M.H., Alves, M.J, Colli, W. (2002) In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J. Biol. Chem.* 277:20756-62.
- Valkonen, K.H., Wadstrom, T., Moran, A.P. (1997) Identification of the N-acetylneuraminylactose-specific laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 65:916-923.
- Vranken, W.F., Budesinsky, M., Martins, J.C., Fant, F., Boulez, K., Gras-Masse, H., Borremans, F.A. (1996) Conformational features of a synthetic cyclic peptide

- corresponding to the complete V3 loop of the RF HIV-1 strain in water and water/trifluoroethanol solutions. *Eur. J. Biochem.* 236:100-108.
- Weston, D., Patel, B., Van Voohis, W.C. (1999) Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. *Biochem. Parasitol.* 98:105-16.
- WHO (2002) Control of Chagas disease. Second Edition. WHO: Technical Report series 905. Geneva.
- Williamson, R.A., Henry, M.D., Daniels, K.J., Hrstka, R.F., Lee, J.C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Campbell, K.P. (1997) Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum. Mol. Genet.* 6:831-41.
- Yoshida, N., Mortara, R.A., Araguth, M.F., Russo, M. (1998) Metacyclic neutralizing effect monoclonal antibody 10D8 directed to the 35 and 30 kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infct. Immun.* 57:1663-67.
- Yurchenco, P.D., Cheng, Y.S. (1994) Laminin self-assembly: a three-arm interaction hypothesis for the formation of a network in basement membranes. *Contrib. Nephrol.* 107:47-56.
- Yurchenco, P.D., Schittny, J.C. (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4:1577-90.
- Zhang, L., Leggatt, G.R., Kalinna, B.H., Piva, T.J., Mc Manus, D.P. (1997) Cloning and expression of a cDNA encoding a nonintegrin laminin-binding protein from *Echinococcus granulosus* with localization of the laminin-binding domain. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87:183-192
- Zhang, X.P., Puzon-McLaughlin, W., Irie, A., Kovach, N., Prokopishyn, N.L., Laferte, S., Takeuchi, K., Tsuji, T., Takada, Y. (1999) Alpha 3 beta 1 adhesion to laminin-5 and invasin: critical and differential role of integrin residues clustered at the boundary between alpha 3 N-terminal repeats 2 and 3. *Biochemistry.* 26:14424-31
- Zingales, B., Colli, W. (1985) *Trypanosoma cruzi* interaction with host cells. In: *The Biology of Trypanosomes* (Hudson, L, ed.), pp. 129-152. Springer Verlag, Berlin.