

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia**

MARIANA SANTOS CARDOSO

**Caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* envolvidos na
via de biossíntese de glicosilfosfatidilinositol**

Orientadora: Profa. Dra. Santuza Maria Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

**Belo Horizonte – MG
2013**

MARIANA SANTOS CARDOSO

**Caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* envolvidos na
via de biossíntese de glicosilfosfatidilinositol**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências: Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Santuza Maria Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Belo Horizonte – MG
Agosto de 2013**



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANA SANTOS CARDOSO. Aos vinte e seis dias do mês de agosto de 2013 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* envolvidos na via de biossíntese de glicosilfosfatidilinositol” requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão, Profa. Santuza Maria Ribeiro Teixeira após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Norton Heise da Universidade Federal do Rio de Janeiro, aprovada; Dr. Sérgio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo, aprovada; Dr. Alexandre Ferreira Marques da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Carlos Renato Machado da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de agosto de 2013.

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (UFMG)

Dr. Sérgio Schenkman (Universidade Federal de São Paulo)

Dr. Norton Heise (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Dr. Alexandre Ferreira Marques (UFMG)

Dr. Carlos Renato Machado (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz
Coordenador de Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

*"Concentra-te e faze como o escultor
faz à obra que quer aformosear. Tira o
supérfluo, aclara o obscuro, difunde a
luz por tudo e não largues o cinzel."*

Michelangelo

*Ao meu marido e amigo, Marco Polo,
por todo amor e incentivo.*

*Aos meus pais, Darkson e Eloísa,
pelo apoio e torcida.*

Agradecimentos

A Deus por iluminar a minha vida, guiar os meus passos em todos os momentos e por me dar força para superar as dificuldades e sabedoria para escolher os melhores caminhos.

Ao Marco pelo amor, carinho, amizade, incentivo e dedicação em todos os momentos. Por compreender as inúmeras vezes que não pude estar presente, devido a viagens ou ao trabalho até tarde e nos fins de semana. Por estar sempre disposto a aprender sobre biologia molecular, âncora GPI e todo o resto, só para poder discutir ideias e dar sugestões. Por me dar esperança e me fazer rir nos momentos mais difíceis. Enfim, por fazer as dificuldades parecerem pequenas e os sonhos se tornarem reais. Não conseguiria sem você!

Aos meus pais, Darkson e Eloísa, pelo apoio e confiança, pelos conselhos e orações nos momentos de dificuldades e por torcerem sempre pelo meu sucesso. O apoio de vocês foi fundamental!

Às minhas irmãs, Isabel e Lívia, pela amizade, torcida e compreensão pelos momentos de ausência.

À minha família e amigos por sempre torcerem por mim.

À Profa. Santuza Teixeira pela orientação, oportunidade de trabalho e aprendizado e por ter me recebido em seu laboratório.

Ao Prof. Ricardo Gazzinelli pela coorientação e pelas sugestões ao longo deste trabalho.

Aos Profs. Lucia e José Osvaldo Previato por me receberam tão bem em seu laboratório, por todos os ensinamentos, pelas sugestões e pela confiança.

À Dra. Cristiana Macedo pelo apoio, amizade e por todos os ensinamentos.

À Dra. Caroline Junqueira pelo auxílio com os experimentos de citometria e pela realização dos experimentos de infecção.

Aos Profs. Dawidson Gomes e Greg Kitten pelo auxílio com os experimentos de microscopia de fluorescência e por todos os ensinamentos.

À Profa. Patrícia Martinelli pelo auxílio com os experimentos de microscopia eletrônica e pelas sugestões.

Ao Dr. Ralph Schwarz e ao Dr. Hosam Shams-Eldin pelas leveduras utilizadas neste trabalho.

Ao Ricardo Trigueiro por ter iniciado este trabalho e ter deixado tudo tão organizado.

À Profa. Patiu por sempre estar disposta a nos ouvir e por me abrir as portas do seu laboratório.

Aos amigos do laboratório, Vivi, Rita, Gabi, Juli, Bruna, Fê, Isabella, Brenda, Júlia, Jarina, Bah, Nina, Nati, Lu, Rondon, Taís, Mara, Camila, Gabriela e Lucas, pelo incentivo, aprendizado e por torcerem sempre por mim. E aos amigos que já saíram do laboratório há mais tempo e que me receberam quando cheguei a UFMG. Sentirei saudades de todos!

Ao Elimar pela ajuda, amizade, apoio e por todos os ensinamentos de como cuidar bem dos equipamentos do laboratório.

À Isabella pela ajuda e contribuição na execução de parte dos experimentos.

Aos amigos de Viçosa que vieram fazer doutorado na Bioquímica, Dani, Jerusa, Ju, Pri, Rita e Rubens, pelos momentos que passamos juntos, pelas conversas de corredor, pelo incentivo, apoio e companheirismo, pelo aprendizado nas disciplinas de Bases I e II.

Aos amigos dos outros laboratórios do departamento e do ICB por ajudarem tão prontamente todas as vezes que precisei.

Aos funcionários, Jamil, Eneida e Celise, pela presteza e auxílio sempre com boa vontade.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xvi
1. Introdução	1
1.1. O parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	1
1.2. A superfície de <i>T. cruzi</i> e seus principais glicoconjugados	5
1.3. A estrutura e a biossíntese das âncoras GPI.....	8
1.4. A enzima inositolfosforilceramida sintase	14
1.5. Vias de biossíntese de âncoras GPI como alvos para o desenvolvimento de drogas contra parasitos	16
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. Material e métodos.....	23
3.1. Cultivo de <i>T. cruzi</i>	23
3.2. Análises <i>in silico</i> de genes de <i>T. cruzi</i>	24
3.3. Extração de DNA de <i>T. cruzi</i>	24
3.4. Amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase).....	25
3.5. Clonagem dos genes de <i>T. cruzi</i> em vetores de expressão de bactérias e leveduras	29
3.6. Transformação de bactérias competentes e análise dos transformantes	30
3.7. Obtenção do DNA plasmidial e clivagem do DNA por enzimas de restrição	31
3.8. Sequenciamento de DNA	32
3.9. Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	33
3.10. Extração de RNA de <i>T. cruzi</i>	34

3.11. Northern blot	35
3.12. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e <i>Southern blot</i>	36
3.13. Síntese de cDNA e amplificação por RT-PCR (transcrição reversa- reação em cadeia da polimerase).....	37
3.14. Transfecção de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	38
3.15. Localização celular no parasito de proteínas em fusão com GFP	39
3.16. Interrupção de genes da via de biossíntese de GPI em <i>T. cruzi</i>	41
3.17. Microscopia eletrônica de <i>T. cruzi</i>	42
3.18. Obtenção de fração de membranas de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e ensaios de imunoblot	43
3.19. Citometria de fluxo de <i>T. cruzi</i>	44
3.20. Infecção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	45
3.21. Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e meios de cultura	46
3.22. Transformação de mutantes condicionalmente letais de <i>S. cerevisiae</i>	47
3.23. Extração de RNA de <i>S. cerevisiae</i>	48
3.24. SDS-PAGE e fluorografia de proteínas de leveduras marcadas com [2- ³ H]myo-inositol.....	48
3.25. Cromatografia em camada delgada (TLC).....	50
4. Resultados	52
4.1. Análise <i>in silico</i> dos genes de <i>T. cruzi</i> envolvidos na via de biossíntese de GPI.....	52
4.2. Análise da expressão de mRNA de genes da via GPI de <i>T. cruzi</i>	63
4.3. Localização celular das enzimas envolvidas na biossíntese de GPI em <i>T.</i> <i>cruzi</i>	64
4.4. Complementação heteróloga dos mutantes condicionalmente letais de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	67
4.5. Expressão, em <i>E. coli</i> , de proteínas recombinantes da via de biossíntese de GPI de <i>T. cruzi</i>	79
4.6. Geração de parasitos nocautes para os genes da via de biossíntese de GPI de <i>T. cruzi</i>	83
4.7. Análise dos níveis de mRNA de mutantes de GPI8 de <i>T. cruzi</i>	92
4.8. Análise de possíveis eventos de recombinação do gene <i>TcGPI8</i> em mutantes de <i>T. cruzi</i>	95

4.9. Análises morfológicas dos mutantes de <i>GPI8</i> de <i>T. cruzi</i>	97
4.10. Análises das glicoproteínas mucinas presentes na membrana celular de mutantes de <i>GPI8</i> de <i>T. cruzi</i>	99
4.11. Análise da capacidade de infecção, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , de mutantes de <i>GPI8</i> de <i>T. cruzi</i>	102
5. Discussão.....	104
6. Perspectivas.....	117
7. Referências bibliográficas	118
8. Anexo	132

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 2: Estrutura da âncora GPI de <i>T. cruzi</i>	9
Figura 3: Esquema geral da via de biossíntese de GPI de leveduras e mamíferos.....	11
Figura 4: Via de biossíntese da âncora GPI no retículo endoplasmático de <i>T. cruzi</i>	56
Figura 5: Expressão de mRNA de genes que codificam enzimas da via de biossíntese de GPI de <i>T. cruzi</i>	64
Figura 6: Localização celular de enzimas da via de biossíntese de GPI de <i>T. cruzi</i>	66
Figura 7: Complementação de mutantes de <i>S. cerevisiae</i> pelos genes que codificam enzimas da via de biossíntese de GPI de <i>T. cruzi</i>	70
Figura 8: Análises da expressão de mRNA por RT-PCR dos mutantes de levedura transformados com os genes da via GPI de <i>T. cruzi</i>	74
Figura 9: SDS-PAGE e fluorografia das proteínas ancoradas a GPI sintetizadas pelas leveduras mutantes, expressando os genes de <i>T. cruzi</i>	76
Figura 10: Cromatografia em camada delgada (TLC) dos glicolipídios das leveduras mutantes complementadas com os genes da via GPI de <i>T. cruzi</i>	78
Figura 11: Expressão das proteínas da via de biossíntese de GPI de <i>T. cruzi</i> em bactéria.....	81
Figura 12: Avaliação da solubilidade das proteínas da via de biossíntese de GPI de <i>T. cruzi</i> após indução em bactéria.....	82
Figura 13: Construções usadas para a geração de parasitos nocautes para o gene <i>TcGPI3</i>	85
Figura 14: Construções usadas para a geração de parasitos nocautes para o gene <i>TcGPI10</i>	86
Figura 15: Geração de mutantes heterozigotos do gene <i>TcGPI8</i>	87

Figura 16: Geração de mutantes duplo resistentes do gene <i>TcGPI8</i>	90
Figura 17: Níveis de expressão de mRNA de mutantes de <i>TcGPI8</i>	93
Figura 18: Amplificação por RT-PCR de sequências de <i>TcGPI8</i>	94
Figura 19: Translocação do gene <i>TcGPI8</i> em mutantes de <i>T. cruzi</i>	96
Figura 20: Morfologia da membrana celular de mutantes <i>GPI8</i> de <i>T. cruzi</i>	98
Figura 21: Mucinas na membrana celular de mutantes de <i>GPI8</i> de <i>T. cruzi</i>	100
Figura 22: Mudança na capacidade de infecção de mutantes <i>GPI8</i> de <i>T. cruzi</i>	103

Lista de tabelas

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.....	27
Tabela 2: Genes de <i>T. cruzi</i> que codificam enzimas da via de biossíntese de GPI.....	53
Tabela 3: Porcentagem de identidade entre as proteínas da via de biossíntese de GPI de <i>T. cruzi</i> e de outros organismos.....	55
Tabela 4: Complementação funcional de mutantes condicionalmente letais de <i>S. cerevisiae</i> pelos genes da via GPI de <i>T. cruzi</i>	72

Lista de abreviaturas

aa	aminoácido
AEP	aminoetilfosfonato
β Gal f	β -D-galactofuranose
β Gal p	β -D-galactopiranosose
cDNA	DNA complementar
C-terminal	carboxi-terminal
EtBr	brometo de etídio
EtNP	etanolamina-fosfato
g	grama
GIPL	glicoinositolfosfolipídio
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GlcNAc-PI	N-acetilglucosaminil-fosfatidilinositol
GPI	glicosilfosfatidilinositol
h	hora
<i>Hyg^R</i>	gene de resistência a higromicina
IPC	inositolfosforilceramida
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilo bases
L	litro
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i>
μ	micro
m	mili
M	molar
Man	manose
Mb	mega bases
min	minuto
mRNA	RNA mensageiro
n	nano
<i>Neo^R</i>	gene de resistência a G418
nt	nucleotídeos

N-terminal	amino-terminal
OD	densidade ótica
P	fosfato
pb	pares de base
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PE	fosfatidiletanolamina
PI	fosfatidilinositol
RE	retículo endoplasmático
rpm	rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT	transcriptase reversa
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sódio
SL	<i>spliced leader</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
T _m	temperatura de fusão (<i>melting temperature</i>)
U	unidade de enzima
UTR	região não traduzida (<i>untranslated region</i>)
UV	ultravioleta
WT	tipo selvagem (<i>wild type</i>)

Resumo

Glicosilfosfatidilinositol (GPI) é a estrutura predominante das âncoras utilizadas pelo *Trypanosoma cruzi* para expressar proteínas em sua superfície, muitas delas essenciais para a virulência do parasito ou para seu escape da resposta imune do hospedeiro. Além disso, âncoras GPI de *T. cruzi* exercem atividades imunoestimulatórias e regulatórias, incluindo a indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos do hospedeiro. Portanto, os genes codificadores de enzimas e outros fatores envolvidos na biossíntese de âncoras GPI de *T. cruzi* são alvos potencialmente atrativos para o desenvolvimento de novas drogas contra a doença causada pelo parasito, conhecida como doença de Chagas. Assim, o objetivo desse projeto foi investigar a via de biossíntese das âncoras GPI, por meio da caracterização bioquímica e funcional dos genes que codificam os componentes dessa via. Para isso, as sequências desses genes, obtidas em bancos de dados do genoma do *T. cruzi*, foram analisadas e os produtos desses genes avaliados por (i) complementação heteróloga em mutantes condicionalmente letais de *Saccharomyces cerevisiae*, (ii) ensaios de expressão gênica bem como de localização celular no parasito e (iii) análise do fenótipo de parasitos nocautes para alguns desses genes. As análises *in silico* das sequências disponíveis no banco de dados do genoma do *T. cruzi* (TriTrypDB) resultaram na identificação de 18 genes que codificam proteínas da via de biossíntese de GPI, bem como do gene da inositolfosforilceramida sintase (IPCS). Sequências correspondentes aos genes *TcDPM1*, *TcGPI3* e *TcGPI12* de *T. cruzi*,

expressas em epimastigotas em fusão com GFP, apresentaram uma localização celular compatível com o retículo endoplasmático. Análises dos níveis de RNA de *TcGPI8* e *TcGPI10* indicaram um aumento da expressão em epimastigotas e amastigotas, os dois estágios proliferativos do parasito. Análises de leveduras deficientes em vários genes da via biossintética de GPI e transformadas com os respectivos genes de *T. cruzi* mostraram que os genes *TcDPM1*, *TcGPI10* e *TcGPI12* foram capazes de restaurar o crescimento desses mutantes em condições não permissivas, indicando que essas proteínas são homólogas às de leveduras. Proteínas recombinantes foram também obtidas em bactérias com o objetivo de desenvolver estudos sobre suas estruturas. Para investigar o papel de proteínas ancoradas a GPI de *T. cruzi*, o gene *TcGPI8*, que codifica a subunidade catalítica do complexo que catalisa a última etapa da via, foi deletado. Apesar de terem sido gerados parasitos apresentando um dos alelos deletados, nos quais a diminuição nos níveis de expressão dos mRNAs de *TcGPI8* foi observada, várias tentativas de deletar o segundo alelo de *TcGPI8* resultaram em parasitos com a inserção dos genes de resistência a droga nos dois alelos, mas que apresentavam rearranjos no genoma e, em consequência, ainda expressavam o mRNA de *GPI8*. A caracterização desses parasitos mutantes de *TcGPI8* indicou que, apesar deles apresentarem somente pequenas alterações na composição do glicocálix, os efeitos dessas alterações na sua capacidade infectiva foram bastante evidentes. Dessa forma, além de aprofundar o conhecimento sobre os componentes da via de biossíntese de âncoras GPI, que parece ser essencial para a sobrevivência do parasito, o presente trabalho possibilitou a geração de

mutantes de leveduras complementados com genes ortólogos de *T. cruzi*, os quais se tornam valiosas ferramentas a serem utilizadas em ensaios de *screening* em larga escala para a descoberta de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas.

Abstract

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) is the predominant structure that *Trypanosoma cruzi* uses to anchor proteins on its surface, many of them essential for the virulence of the parasite or its escape from the host immune response. Furthermore, *T. cruzi* GPI anchors exert immunostimulatory and regulatory activities, including the induction of pro-inflammatory cytokines synthesis by host macrophages. Therefore, genes encoding enzymes and other factors involved in the *T. cruzi* GPI biosynthetic pathway are potentially attractive targets for the development of new drugs against the disease caused by parasite, known as Chagas disease. The aim of this project was to investigate the *T. cruzi* GPI biosynthetic pathway, through biochemical and functional characterization of genes encoding components of this pathway. Thus, DNA sequences obtained from *T. cruzi* genome database were analyzed and their gene products evaluated by (i) heterologous complementation in conditional lethal mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, (ii) gene expression assays as well as cellular localization in the parasite, and (iii) analysis of the phenotype of knockout parasites for some of these genes. *In silico* analyses of sequences available in the *T. cruzi* genome database (TriTrypDB) resulted in the identification of 18 genes encoding GPI biosynthesis proteins as well as inositol phosphorylceramide synthase gene (*IPCS*). *T. cruzi* sequences corresponding to *TcDPM1*, *TcGPI3*, and *TcGPI12* genes, expressed in epimastigotes as GFP-fusion proteins, showed a cellular localization compatible with the endoplasmic reticulum. Analyses of RNA levels of *TcGPI8* and

TcGPI10 showed increased expression in epimastigotes and amastigotes, the two proliferative stages of the parasite. Yeasts defective in various genes of the GPI biosynthetic pathway, transformed with the respective *T. cruzi* genes were analyzed. We showed that *TcDPM1*, *TcGPI10*, and *TcGPI12* genes were able to restore the growth of yeast mutants in non-permissive conditions, indicating that these proteins are homologous to yeast proteins. Recombinant proteins were also obtained in bacteria with the objective of developing studies about their structures. To investigate the role of GPI anchored proteins of *T. cruzi*, we disrupt the *TcGPI8* gene, which encodes the complex catalytic subunit that catalyzes the last step of the pathway. Although we were able to generate parasites presenting one *TcGPI8* allele deleted, in which *TcGPI8* mRNA levels were reduced, several attempts to delete the second *TcGPI8* allele resulted in parasites with the insertion of drugs resistance genes in the two alleles, but showing genome rearrangements and, consequently, still expressing the *TcGPI8* mRNA. The characterization of these *TcGPI8* mutant parasites showed that, although they present only minor changes in the glycolyx composition, the effects of these changes on their infective capacity were quite evident. Therefore, besides deepening the knowledge about the components of the GPI anchors biosynthesis, which appears to be essential for the parasite survival, this work resulted in the generation of yeast mutants complemented with *T. cruzi* orthologous genes, which now became valuable tools to be used in high throughput screening assays that may led to the discovery of new drugs for the treatment of Chagas disease.

1. Introdução

1.1. O parasito *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, um importante patógeno humano, é o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada, que afeta cerca de oito milhões de pessoas e causa aproximadamente dez mil mortes anualmente no mundo (www.who.int/topics/chagas_disease/en/). Essa tripanossomíase era confinada à América Latina, mas atualmente espalhou-se para outros continentes, sendo considerada um problema de saúde pública mundial. Devido à migração, o número de casos está aumentando na Europa e nos Estados Unidos, o que aumenta os riscos adicionais de transmissão através de transfusão de sangue e transplante de órgãos (Coura e Viñas, 2010; Schmunis e Yadon, 2010).

O parasito *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, caracterizada pela presença de um flagelo, que se origina de uma abertura, conhecida como bolsa flagelar, e do cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de grandes quantidades de DNA, localizado no interior da mitocôndria única e ramificada que se estende por todo o corpo do protozoário (Brenner et al., 2000). Os membros desta família estão entre os parasitos com maior distribuição geográfica e mais bem sucedidos evolutivamente. Apesar de separados por milhões de anos de evolução, outros parasitos relacionados pertencem à mesma família, como por exemplo, o *Trypanosoma brucei*, causador da tripanossomíase africana, que aflige a

população e afeta a economia da África subsaariana, e várias espécies do gênero *Leishmania* spp., responsáveis por diversas formas de leishmaniose (Stevens et al., 2001; Barrett et al., 2003).

O *T. cruzi* alterna entre três formas no seu ciclo de vida, que ocorre em dois tipos de hospedeiro: no inseto vetor, as formas epimastigotas (replicativas e não infectivas) se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (não replicativas e infectivas), que são transmitidas ao hospedeiro mamífero, após o repasto sanguíneo (Figura 1). Neste hospedeiro, as formas metacíclicas podem invadir diversos tipos de células nucleadas, transformando-se em amastigotas que sofrem vários ciclos de divisão binária no citoplasma celular. Após 3-5 dias, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberadas no sangue ou nos tecidos adjacentes e podem iniciar um novo ciclo de infecção das células hospedeiras (Brenner, 1973; Barrett et al., 2003). Além da transmissão mediada por diferentes espécies de insetos triatomíneos popularmente conhecidos como “barbeiros”, a infecção por *T. cruzi* também pode ocorrer por meio de transfusão sanguínea (Young et al., 2007), transplante de órgãos, transmissão vertical (Gurtler et al., 2003) e por ingestão de comida ou bebida contaminada com o inseto infectado com o *T. cruzi* ou com as fezes do mesmo (Benchimol Barbosa, 2006).

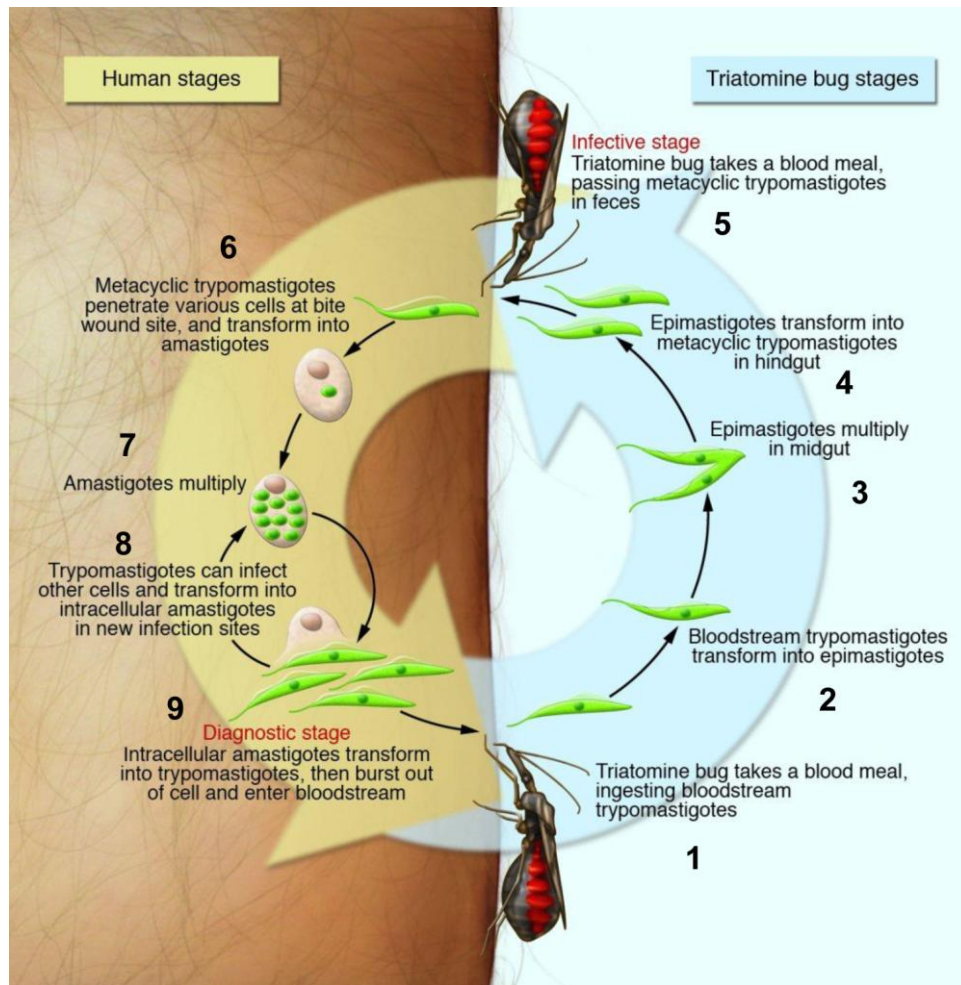


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) O inseto vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas quando se alimenta de um indivíduo infectado. (2) As formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas que (3) se multiplicam por divisão binária no intestino médio do inseto. (4) No intestino posterior, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, (5) que são liberadas nas fezes durante o repasto sanguíneo do barbeiro e penetram no hospedeiro mamífero através de aberturas na pele ou na mucosa, podendo invadir uma variedade de células. Em seguida, as formas tripomastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas (6), que multiplicam (7), diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas e rompem a célula, podendo desta forma, invadir novos tecidos (8, 9) (Stuart et al., 2008).

Os repetidos ciclos de infecção celular desencadeiam a fase aguda ou inicial da doença de Chagas, caracterizada por alta parasitemia sanguínea, amplo parasitismo tecidual e uma forte resposta imune do hospedeiro. Na maioria dos casos, é assintomática. Os casos sintomáticos podem apresentar sinais de porta de entrada (chagoma cutâneo ou sinal de Romaña), febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos graves. A fase crônica aparece depois que o sistema imune do hospedeiro consegue controlar a parasitemia, mas é incapaz de eliminar completamente o parasito. Nesta fase, a maioria dos indivíduos desenvolve a forma indeterminada (assintomática) da doença. Mas pode também evoluir para a forma cardíaca ou digestiva (megaesôfago e megacólon), ou ainda uma associação das formas cardíacas e digestivas, podendo levar à morte ou incapacitação do indivíduo (revisado por Coura e Borges-Pereira, 2010).

Cento e quatro anos após a descoberta da doença, do agente etiológico e do ciclo de vida completo do parasito por Carlos Chagas (1909), nenhuma vacina está disponível para o tratamento ou prevenção da doença de Chagas (Vázquez-Chagoyán et al., 2011; Dumonteil et al., 2012) e as drogas disponíveis, o Nifurtimox e o Benzonidazol, são ainda inadequadas pois apresentam efeitos colaterais indesejáveis e são mais eficazes apenas na fase aguda da doença. Além disso, um número crescente de linhagens de *T. cruzi* resistente a essas drogas tem sido relatado (Urbina e Docampo, 2003; Wilkinson et al., 2008). Portanto, há uma necessidade urgente de identificação de novos alvos terapêuticos e novos compostos contra o *T. cruzi*.

Entender como se dá o escape do parasito do sistema imune do hospedeiro e os mecanismos envolvidos na invasão celular dependem também do estudo das interações metabólicas entre a célula do parasito e a célula parasitada. Por meio de informações obtidas com o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005), assim como de dados do genoma de outros organismos, é possível estudar diferentes vias metabólicas, enfocando aquelas essenciais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro humano. Portanto, estudos bioquímicos e moleculares desse parasito são fundamentais, pois poderão promover informações a respeito de possíveis alvos para o desenvolvimento de novas drogas ou tratamentos.

1.2. A superfície de *T. cruzi* e seus principais glicoconjugados

O *T. cruzi* expressa uma grande quantidade de proteínas e glicoconjugados na sua superfície celular. Estas moléculas estão envolvidas em dois aspectos fundamentais da interação parasito-hospedeiro, a invasão de células e a evasão da resposta imune do hospedeiro (Yoshida, 2006; Alves e Colli, 2008). Para sobreviver aos diferentes ambientes, que variam do trato intestinal do inseto ao citoplasma da célula de mamífero, passando pelo sangue do hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* deve ser capaz de se adaptar. Portanto, diferenças na composição da membrana plasmática ocorrem entre os diversos estágios do parasito (Colli e Alves, 1999).

Além das proteínas que possuem regiões transmembrana na sua sequência de aminoácidos, uma grande quantidade de proteínas de superfície do *T. cruzi* é ancorada por um complexo glicolipídico, denominado glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ferguson, 2000). As proteínas ancoradas ao GPI são expressas em todos os estágios de desenvolvimento do parasito e são codificadas por aproximadamente 12% dos genes de *T. cruzi* (Nakayasu et al., 2009). Este número é muito superior quando comparado com outros organismos estudados (Poisson et al., 2007). Entre os principais componentes da superfície de *T. cruzi* estão duas famílias de glicoproteínas GPI ancoradas, denominadas *trans*-sialidases e mucinas. Além dessas, os glicoconjugados glicosilinositolfosfolipídios (GIPLs) livres, possuem a mesma estrutura básica do GPI, mas não têm uma cadeia polipeptídica ligada e podem apresentar substituições adicionais como adição de galactose (Previato et al., 2004).

A *trans*-sialidase (TS) catalisa a transferência de ácido siálico a partir de glicoconjugados do hospedeiro para moléculas aceptoras na membrana plasmática do parasito, principalmente para glicoproteínas como mucinas. A sialilação da superfície do tripomastigota afeta a interação do parasito com o hospedeiro, particularmente durante a adesão e a invasão celular e o escape do vacúolo parasitóforo (Acosta-Serrano et al., 2001; Rubin-de-Celis et al., 2006; Dc-Rubin e Schenkman, 2012). A TS pertence ao grupo I da superfamília TcS (Freitas et al., 2011), que inclui mais de 1.400 genes e é a maior família multigênica de *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005). Essa enzima é expressa nos estágios do parasito que ocorrem no inseto e no hospedeiro mamífero. A TS possui um domínio catalítico na região N-terminal e um domínio repetitivo de 12

aminoácidos na região C-terminal, conhecido como repetições SAPA (*shed acute phase antigen*). Em tripomastigotas, a TS é uma proteína ancorada a GPI na superfície do parasito e libertada no meio extracelular (Giorgi e de Lederkremer, 2011; De-Rubin e Schenkman, 2012). Diferente de tripomastigotas, a TS expressa em epimastigotas não possui o domínio repetitivo SAPA e não é GPI ancorada, mas apresenta atividade de transferência de ácido siálico (Briones et al., 1995).

Por sua vez, as mucinas são membros de uma família de glicoproteínas de superfície ricas em treonina, contendo oligossacarídeos sialilados O-ligados à proteína. Em contraste às mucinas de mamíferos, os oligossacarídeos são O-ligados via resíduos de N-acetilglucosamina, ao invés da típica N-acetilgalactosamina. O ácido siálico é adicionado ao terminal β Galp dos oligossacarídeos das mucinas pela enzima *trans*-sialidase. As formas epimastigotas e tripomastigotas infectivas apresentam um número similar de moléculas de mucinas em sua superfície (Acosta-Serrano et al., 2001; Giorgi e de Lederkremer, 2011). As mucinas de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas são glicoproteínas de menor peso molecular, com uma estrutura oligossacarídica mais simples (Previato et al., 1994), e são altamente resistentes a proteases, atuando na proteção do parasito contra a ação de enzimas digestivas no intestino de inseto. Em tripomastigotas sanguíneas, as mucinas apresentam maior peso molecular e possuem O-oligossacarídeos complexos (Almeida et al., 1994). A presença de ácido siálico ligado a mucinas em tripomastigotas resulta em uma camada carregada negativamente envolvendo a superfície do parasito. Essa cobertura de mucinas protege o

parasito da lise mediada por anticorpos, proteases e agentes oxidantes (Pereira-Chioccola et al., 2000). A âncora lipídica das mucinas também é variável. Enquanto que em epimastigotas, é formada por alquil-acil-fosfolipídios, em tripomastigotas metacíclicas, a âncora lipídica contém ceramida e, em tripomastigotas sanguíneas, os ácidos graxos são insaturados (Serrano et al., 1995).

Mucinas ancoradas a GPI e GIPLs são agonistas de receptores do tipo Toll (TLR) capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células da imunidade inata do hospedeiro. GPI-mucinas são agonistas de TLR2/6, enquanto que GIPLs são agonistas de TLR4 (Almeida e Gazzinelli, 2001; Junqueira et al., 2010). A estrutura da GPI-mucinas de tripomastigotas contém resíduos adicionais de galactose e ácidos graxos insaturados na posição *sn*-2 do componente alquil-acil-glicerolipídio, que conferem a capacidade de atuar como um potente agente pró-inflamatório (Almeida et al., 2000). Devido ao seu papel na ativação da resposta imune, GPI-mucinas e GIPLs estão sendo utilizados como adjuvantes em protocolos de imunização (Junqueira et al., 2012).

1.3. A estrutura e a biossíntese das âncoras GPI

As âncoras GPI são ubíquas entre eucariotos, tendo sido descritas em *Trypanosoma* (Serrano et al., 1995; Ferguson, 1999; Heise et al., 1995), *Plasmodium* (Delorenzi et al., 2002), *Leishmania* (McConville et al., 1990;

Ilgoutz et al., 1999) e *Toxoplasma* (Tomavo et al., 1989), bem como em leveduras e mamíferos (revisado por Pittet e Conzelmann, 2007; Orlean e Menon, 2007). Os GPIs possuem uma estrutura principal conservada entre todas as espécies de eucariotos (McConville e Ferguson, 1993). Entretanto, são observadas variações nas cadeias laterais que podem ser adicionadas às âncoras GPI, dependendo da espécie e da proteína ancorada (Figura 2) (Fujita e Kinoshita, 2010).

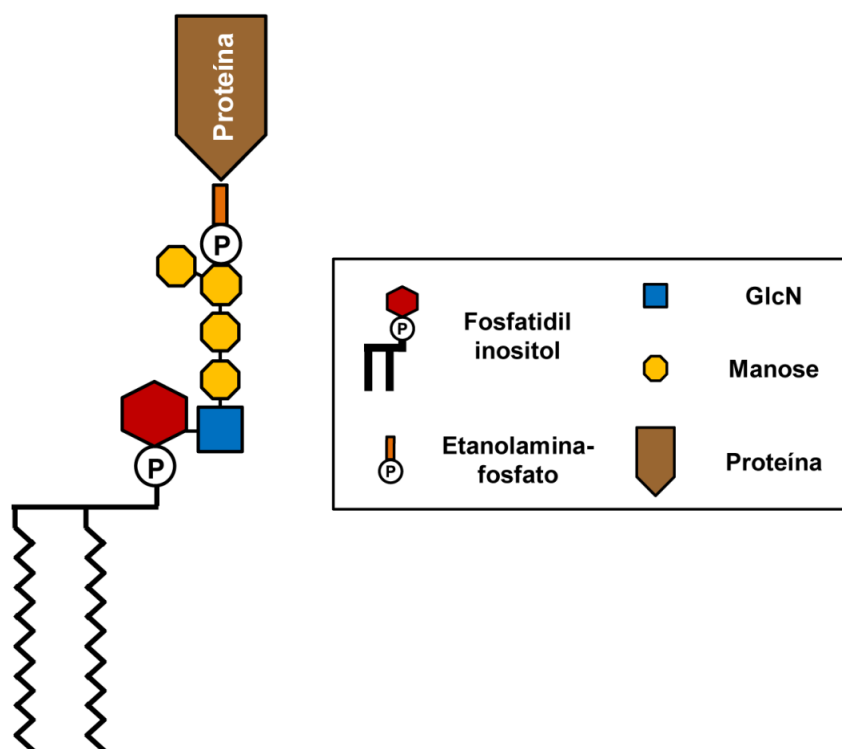


Figura 2: Estrutura da âncora GPI de *T. cruzi*. Neste parasito, um quarto resíduo de manose é adicionado ao núcleo glicano conservado entre as espécies de eucariotos. Além disso, a âncora GPI de *T. cruzi* pode apresentar variações na estrutura, como adição de β Gal f , 2-aminoetilfosfonato (2-AEP) e modificações na composição lipídica, dependendo da cepa ou do estágio de vida do parasito. Adaptada de Previato et al. (1995).

A via de biossíntese de GPI é um processo que envolve múltiplas etapas, organizadas em várias reações bioquímicas e complexos enzimáticos (Eisenhaber et al., 2003), sendo detalhadamente estudada em vários organismos desde leveduras a mamíferos (Orlean e Menon, 2007; Fujita e Kinoshita, 2010). As âncoras GPIs são sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) e a via começa com a transferência de uma molécula de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a partir de UDP-GlcNAc para fosfatidilinositol (PI) (Figura 3). Após a adição de moléculas de manose, usando dolicol-P-manose como doador, ocorre a transferência de etanolamina-fosfato (EtNP) para o terceiro resíduo de manose. A âncora GPI pode então ser exportada para a superfície celular como molécula livre ou ser transferida para as proteínas que têm um sinal de adição a GPI predito na extremidade C-terminal, em uma reação catalisada pelo complexo GPI transamidase (Kinoshita e Inoue, 2000). Sinais de ancoramento a GPI são compostos de um domínio hidrófobo C-terminal, o qual é separado por um pequeno espaçador hidrofílico do sítio de clivagem e ligação da proteína (Pittet e Conzelmann, 2007).

O núcleo glicano do GPI pode ainda ser substituído por açúcares, fosfatos e outras etanolamina-fosfatos, em uma espécie ou de maneira tecido-específica. Os ácidos graxos de GPI podem ser saturados ou insaturados, contendo diacilglicerol, alquil-acil-glicerol, monoalquil-glicerol ou ceramidas, com adição de um grupo acil no anel de inositol, variando entre C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1} e C_{18:2} (Orlean e Menon, 2007). Muitas dessas modificações iniciam-se no RE e continuam no complexo de Golgi, sugerindo que as estruturas de GPI são remodeladas durante a biossíntese e após a ligação às proteínas

(Fujita e Kinoshita, 2010). A importância das diferenças estruturais entre os GPIs ainda não está totalmente clara, embora estudos sobre a toxicidade de GPI demonstraram diferenças funcionais importantes entre GPIs com diferentes composições de ácidos graxos (Camargo et al., 1997; Almeida et al., 2000).

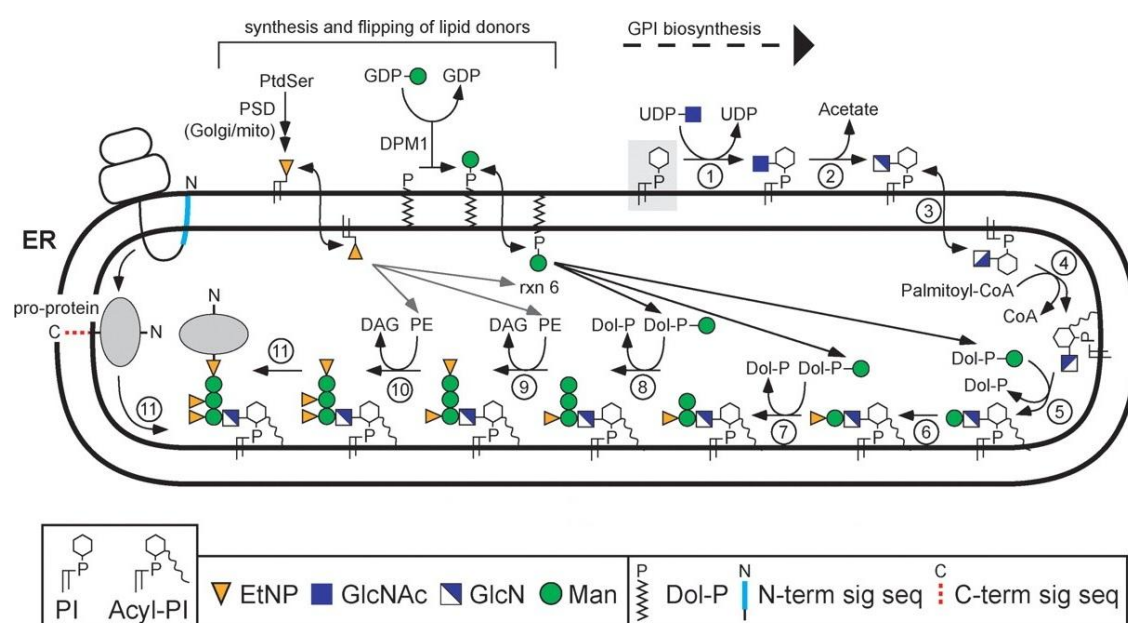


Figura 3: Esquema geral da via de biossíntese de GPI de leveduras e mamíferos. A biossíntese de GPI começa com a glicosilação do fosfatidolinositol (PI) para gerar o GlcNAc-PI no lado citoplasmático do retículo endoplasmático (RE) (passo 1). O GlcNAc-PI é de-N-acetilado (passo 2) para obter o GlcN-PI, que é transportado para o lado luminal do RE (passo 3), onde ocorre a adição de um grupo acil ao inositol (passo 4), seguida da adição de resíduos de manose e etanolamina-fosfatos (EtNP) (passos 5 a 10). Proteínas que apresentam sinal de ligação a GPI na extremidade C-terminal são transferidas para a âncora através de uma reação de transaminação (passo 11) (Orlean e Menon, 2007).

A biossíntese do GPI é essencial em mamíferos apenas na embriogênese (Kawagoe et al., 1996). Ocasionalmente em mamíferos, um quarto resíduo de manose pode estar ligado através de uma ligação α 1-2 ao terceiro resíduo de manose. Muitas proteínas ancoradas a GPI possuem uma cadeia acil saturada (ácido esteárico), na posição *sn*-2 da porção lipídica, enquanto que o fosfatidilinositol livre e o precursor completo têm um ácido graxo insaturado na posição *sn*-2. Todas as GPI-proteínas de mamíferos têm uma cadeia lateral de EtNP ligada à primeira manose (Orlean e Menon, 2007; Fujita e Kinoshita, 2010). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a âncora GPI é essencial para o crescimento e a viabilidade desse organismo e é crítica para a manutenção da morfologia celular normal (Pittet e Conzelmann, 2007). A levedura apresenta ainda uma manose adicional ligada à terceira manose, assim como EtNP adicionada a primeira e segunda manoses. Em protozoários parasitos, a biossíntese de GPI é importante para o ancoramento de proteínas e glicoconjugados na superfície e é essencial em certas fases do ciclo de vida (Ferguson, 2000; Delorenzi et al., 2002).

Após duas décadas de muito trabalho, os genes necessários para a adição de todos os diferentes elementos estruturais da âncora GPI foram identificados para leveduras e mamíferos (Pittet e Conzelmann, 2007; Orlean e Menon, 2007), mas novas subunidades e elementos reguladores das enzimas identificadas precisam ser descobertos. A maioria desses genes codificam proteínas transmembrana e algumas delas estão organizadas em complexos. Grande parte das enzimas e etapas de montagem de GPI são altamente conservadas entre eucariotos.

Os genes que codificam enzimas envolvidas na via GPI de vários organismos, incluindo protozoários parasitos, tais como *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana* e *Plasmodium falciparum*, foram clonados e seus produtos caracterizados por complementação funcional de células de mamíferos e de leveduras GPI-deficientes, permitindo a identificação de vários ortólogos desses genes em diferentes espécies (Ferguson, 1999; Nagamune et al., 2000; Hilley et al., 2000; Delorenzi et al., 2002). Em alguns estudos, o fenótipo nocaute para alguns desses genes foi analisado. Por exemplo, o nocaute do gene *GPI10* de *T. brucei*, que codifica uma enzima envolvida na transferência do terceiro resíduo de manose para a âncora GPI, mostrou que ele é essencial para o crescimento da forma sanguínea do parasito. *TbGPI10* restabeleceu a biossíntese de GPI em uma célula murina, deletada para o gene *PIG-B* e complementou a deleção do gene *GPI10* de *S. cerevisiae*, indicando que *TbGPI10* é o ortólogo de *PIG-B/GPI10* (Nagamune et al., 2000). Em outro estudo, o gene *GPI8*, que codifica uma das subunidades da enzima responsável pela adição da âncora GPI à proteína nascente, foi deletado em *T. brucei* e resultou em parasitos viáveis em cultura, no entanto, incapazes de estabelecerem infecções no inseto vetor. Nas formas sanguíneas, as proteínas GPI-ancoradas são essenciais para a viabilidade da forma sanguínea do *T. brucei* (Lillico et al., 2003). Parasitos procíclicos nocautes para o gene *GPI12*, que codifica a enzima responsável pela de-N-acetilação de GlcNAc-PI, são viáveis em cultura, mas são incapazes de colonizar o intestino do inseto vetor (Güther et al., 2006).

1.4. A enzima inositolfosforilceramida sintase

Um alvo extremamente promissor para o desenvolvimento de novas terapias para a doença de Chagas é a enzima inositolfosforilceramida (IPC) sintase, encontrada em plantas, fungos, *T. cruzi* e outros protistas cinetoplastídeos, mas ausente em células de mamíferos (de Lederkremer et al., 2011; Koeller e Heise, 2011). Essa enzima catalisa a transferência do inositol fosfato a partir do fosfatidilinositol para o grupo 1-hidroxil da ceramida para formar inositolfosforilceramida. Ao contrário de mamíferos, o *T. cruzi* pode apresentar IPC ao invés de glicerolipídios como componente da âncora lipídica de glicoproteínas e de GPIs (Previato et al., 2004; de Lederkremer et al., 2011). Nesses casos, ocorre um remodelamento da estrutura lipídica da âncora após a sua ligação às proteínas (Reggiori et al., 1997; de Lederkremer et al., 2011). Esta mudança na porção lipídica da âncora ocorre durante a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas (Serrano et al., 1995). A presença da IPC foi também observada em membros da família multigênica de *trans*-sialidases de tripomastigotas que são liberados em cultura (Agusti et al., 1997) e na glicoproteína Ssp4 de amastigotas (Bertello et al., 1996).

Assim, um bloqueio na síntese do IPC poderia prejudicar a expressão de inúmeros glicoconjugados de superfície ancorados a GPI, podendo levar à incapacidade do parasito de evadir o sistema imune do hospedeiro ou à incapacidade de dividir ou infectar e sobreviver dentro da célula (Figueiredo et al., 2005; Koeller e Heise, 2011). Portanto, a substituição

de glicerolípido por IPC torna a enzima IPC sintase um alvo muito atraente para o desenvolvimento de drogas que podem inibir especificamente este parasito.

A caracterização da IPC sintase de *T. cruzi* tem sido descrita em conjunto com os estudos que mostram que rustimicina e aureobasidina A, inibidores potentes da IPC sintase de fungos, não têm efeito contra a enzima de *T. cruzi* (Figueiredo et al., 2005). Em fungos, a IPC sintase é codificada pelo gene *AUR1*, identificado pela primeira vez em *S. cerevisiae* (Heidler e Radding, 1995). Com base em análises de genética funcional e bioinformática, Denny et al. (2006) identificaram o ortólogo de *AUR1* em *Leishmania major* e duas sequências proximamente relacionadas em *T. cruzi* e propuseram que as proteínas dos tripanosomas definem uma nova classe de esfingolípido sintases eucarióticas. Interessantemente, o genoma de *T. brucei* apresenta um arranjo linear de quatro genes ligados em tandem, altamente similares, que codificam esfingolípido sintases (*TbSLS1-4*) essenciais para a viabilidade do estágio sanguíneo do parasito em humano. Utilizando um sistema livre de células para síntese de proteínas de membrana, Sevova et al. (2010) identificaram a função das quatro enzimas: TbSLS1 é uma inositolfosforilceramida sintase, TbSLS2 é uma etanolamina-fosforilceramida (EPC) sintase, e TbSLS3 e TbSLS4 são enzimas bifuncionais, contendo atividade de esfingomielina e EPC sintases. Os resultados encontrados neste estudo também indicaram que TbSLS1 é exclusivamente responsável pela síntese de IPC na fase procíclica desses parasitos (Sevova et al., 2010).

1.5. Vias de biossíntese de âncoras GPI como alvos para o desenvolvimento de drogas contra parasitos

Pesquisas realizadas nas últimas duas décadas têm mostrado que, embora a estrutura principal do GPI (núcleo glicano) seja conservada em todos os organismos, existem muitas diferenças em passos da via biossintética e em modificações adicionais à estrutura GPI entre diferentes espécies de protozoários, assim como entre GPIs de protozoários e de suas células hospedeiras (Sharma et al., 1999; Previato et al., 2004; Fujita e Kinoshita, 2010; de Lederkremer et al., 2011). Adicionalmente, diferenças na composição lipídica da âncora GPI entre os parasitos e o hospedeiro mamífero também foram relatadas (Koeller e Heise, 2011). Estudos *in vitro* e *in vivo* usando análogos de substratos e açúcares, bem como, compostos naturais têm mostrado que é possível a interferência na biossíntese da via GPI em diferentes passos de maneira espécie-específica (de Macedo et al., 2003). Já foi demonstrado que as enzimas envolvidas nos passos básicos comuns da biossíntese de GPI de protozoários e de células hospedeiras apresentam diferentes sensibilidades a vários inibidores (Sütterlin et al., 1997; Smith et al., 1997; 1999; 2001; 2002; Morita et al., 2000). Assim, a inibição específica da biossíntese de GPI dos protozoários patogênicos pode ser considerada uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas quimioterapias contra esses parasitos.

Ao longo das últimas décadas, ensaios de *screening* em larga escala têm se tornado uma das mais importantes estratégias para a descoberta de

novas drogas. Esta técnica permite que um grande número de compostos sejam rapidamente testados e avaliados quanto à capacidade de inibir enzimas essenciais para a sobrevivência do parasito (Norcliffe et al., 2013).

Em geral, os ensaios de *screening* em larga escala podem ser divididos em dois tipos: ensaios bioquímicos *in vitro* e ensaios utilizando células. Apesar de serem bem sucedidas, ambas as metodologias possuem limitações. Ensaio bioquímico *in vitro* requerem proteínas purificadas, ativas e solúveis e devem produzir um sinal facilmente detectável e quantificável. No entanto, neste método não há contexto celular e as drogas selecionadas podem não ter o mesmo efeito quando testadas no organismo. Em contraste, as plataformas que utilizam células não necessitam de uma proteína alvo purificada e podem identificar compostos que são citotóxicos ou que apresentem problemas com a estabilidade ou a solubilidade *in vivo*. Além disso, neste método o composto é analisado em um contexto celular que se assemelha mais de perto ao cenário *in vivo*, sendo ideal para a análise de inibidores que necessitem atravessar a membrana plasmática para atingir um alvo intracelular. Para reproduzir as condições fisiológicas mais exatas possíveis, ensaios utilizando células devem preferencialmente ser realizados usando o parasito de interesse. No entanto, os requerimentos nutricionais necessários para cultivo e o ciclo de vida complexo fazem com que parasitos nem sempre sejam ideais para ensaios de *screening* em larga escala de drogas utilizando procedimentos automatizados (Barberis et al. 2005; Norcliffe et al., 2013).

Uma alternativa mais viável é a utilização de sistemas baseados em leveduras, que apresentam uma melhor relação custo-benefício para estudar e triar proteínas alvo de uma maneira direta dentro de um contexto celular eucariótico (Norcliffe et al., 2013). Por mais de três décadas, a levedura *S. cerevisiae* tem sido utilizada com sucesso como um veículo para a expressão de proteínas heterólogas, com o objetivo de compreender suas funções, produzir níveis elevados de proteínas recombinantes ou estudar o efeito de drogas sobre alvos definidos (Hughes, 2002). A levedura apresenta alto grau de conservação entre os seus processos celulares e os de células humanas, o que a torna um modelo ideal para pesquisas em biologia molecular e celular. Aliada a essa característica, vantagens técnicas, como crescimento rápido, meios de cultura de baixo custo e preparo simples, além da disponibilidade de uma variedade de ferramentas genéticas para análises de funções biológicas, expandiram a aplicação da levedura como ferramenta em ensaios de *screening* para a descoberta de drogas (Barberis et al., 2005).

Leveduras utilizadas em ensaios de *screening* são geralmente geradas pela substituição de um gene essencial por um ortólogo a partir do organismo de interesse. Para isso, leveduras condicionalmente letais são construídas pela troca do promotor endógeno do gene de interesse na levedura pelo promotor GAL1, que é induzido na presença de galactose, mas é fortemente reprimido na presença de glicose (Johnston e Davis, 1984). Em seguida, as leveduras mutantes são transformadas com um plasmídeo contendo o gene de interesse a partir de outro organismo, como, por exemplo, um parasito. Este gene ortólogo poderá complementar a função do gene

endógeno da levedura, que teve sua expressão reprimida pela presença de glicose no meio. Dessa forma, este sistema permite a identificação de drogas que atuam especificamente sobre a enzima do parasito expressa em levedura, uma vez que o seu efeito sobre os mutantes de levedura transformados com genes ortólogos, que crescem em meio permissivo e não permissivo, podem ser comparados (Norcliffe et al., 2013). Esta técnica tem sido largamente utilizada no estudo de parasitos (Sibley et al., 1997; Bilsland et al., 2011)

Uma importante vantagem dessa técnica é a seleção de compostos especificamente contra enzimas de parasitos e não contra homólogos do hospedeiro, permitindo assim a eliminação precoce de compostos com potenciais efeitos colaterais. Isso é possível, devido à utilização de uma linhagem controle que expressa o alvo humano e que é incluída no *screening* para excluir compostos que não discriminam entre as enzimas do hospedeiro e do parasito. Adicionalmente, Bilsland et al. (2013) desenvolveram um sistema de *screening* que permite múltiplos alvos do parasito serem testados em paralelo, através da expressão de genes ortólogos, marcados com diferentes fluorescências, em leveduras mutantes, permitindo realizar múltiplas leituras a partir de um único poço.

Vários trabalhos têm sido recentemente desenvolvidos utilizando leveduras em ensaios de *screening* de drogas contra parasitos (Bilsland et al. 2011; 2013; revisado por Norcliffe et al. 2013). *S. cerevisiae* também tem sido utilizada no estudo da enzima IPC sintase de *Leishmania*, que é um promissor alvo para o desenvolvimento de droga anti-protozoários (Denny et al., 2006). Norcliffe et al. (2013) desenvolveram e implementaram um ensaio de *screening*

em larga escala, baseado em leveduras mutantes complementadas com o ortólogo funcional de *AUR1* de *Leishmania*, em que mais de um milhão de compostos foram testados. Na triagem primária, foram identificados mais de 500 compostos potentes e seletivos contra a IPC sintase de *Leishmania*. Uma triagem secundária está em andamento para seleção dos melhores compostos.

No entanto, como todas as plataformas de ensaio de *screening* em larga escala, o uso de leveduras tem suas limitações. Sobretudo, a geração dessas leveduras complementadas depende da preservação da função da proteína entre eucariotos distantemente relacionados. Além disso, a espessura da parede celular de levedura pode servir como uma barreira para os compostos em um *screening* e a presença de bombas de efluxo de drogas altamente expressas podem excluir estes compostos, diminuindo a sensibilidade de um determinado ensaio. Para minimizar este problema, o gene da principal bomba de efluxo de drogas, *PDR5*, foi deletado, tornando estas leveduras mais sensíveis a uma grande variedade de compostos (Bilsland et al., 2013).

Portanto, o estudo detalhado das relações entre estrutura e função das enzimas da via de biossíntese de GPI em *T. cruzi* poderá permitir, além de aprofundar o nosso conhecimento sobre essas importantes moléculas do parasito e seu papel na infecção, a identificação de novos alvos para quimioterapias específicas contra o *T. cruzi*, possibilitando a utilização desses alvos potenciais em estudos voltados para o desenvolvimento de fármacos contra a doença de Chagas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar os genes codificadores de proteínas de *T. cruzi* envolvidas na via de biossíntese de âncoras GPI, de maneira a compreender melhor o papel dessas moléculas na infecção e desenvolver estratégias alternativas para a obtenção de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar os genes codificadores de enzimas e outros fatores envolvidos na biossíntese das âncoras GPI em *T. cruzi*;
2. Determinar a expressão de mRNA de genes da via GPI nos diferentes estágios de vida do parasito;
3. Determinar a localização subcelular de enzimas envolvidas na biossíntese de âncoras GPI em *T. cruzi*;
4. Testar a atividade dos genes da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi* por meio de ensaios de complementação e caracterização de mutantes condicionalmente letais de *S. cerevisiae* para alguns genes dessa via;

5. Obter a expressão, em *Escherichia coli*, de proteínas recombinantes codificadas por genes da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi* para a realização de análises estruturais dessas proteínas;
6. Obter e caracterizar parasitos nocautes para genes da via de biossíntese de GPI;
7. Analisar a morfologia da membrana celular e a expressão de mucinas na superfície de parasitos mutantes de genes da via GPI de *T. cruzi*;
8. Analisar a capacidade de infecção, *in vitro* e *in vivo*, de parasitos selvagens e mutantes para genes da via GPI.

3. Material e métodos

3.1. Cultivo de *T. cruzi*

Neste estudo foi utilizado o clone CL Brener de *T. cruzi*, cedido pelo Dr. Egler Chiari, do Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG. Parasitos foram mantidos a 28 °C em sua forma epimastigota e em fase logarítmica em meio LIT (10 g/L de infuso de fígado; 4 g/L NaCl; 400 mg/L KCl; 8 g/L Na₂HPO₄; 1 g/L glicose; 5 g/L triptose; 10 mL de hemina a 0,2% em NaOH (p/v); pH 7,2), suplementado com 10% de soro fetal bovino (previamente inativado a 56°C por 30 min), penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL finais (Camargo, 1964). As passagens das culturas para novo meio de cultivo foram feitas a cada quatro dias. Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos, com modificações apenas para os experimentos de transfecção, nos quais após a eletroporação, os parasitos eram transferidos para o meio LIT completo, suplementado com 200 µg/mL do antibiótico adequado para a seleção das culturas transfectadas. Após o processo de seleção, as culturas foram mantidas na presença do antibiótico. Tripomastigotas metacíclicas foram obtidas depois da metaciclogênese em meio LIT, observada após 15-20 dias de cultura e foram usadas para infectar células Vero (Camargo, 1964). Amastigotas intracelulares e tripomastigotas derivadas de cultura de tecidos foram obtidas a partir de células Vero crescidas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37 °C e 5% de CO₂ (Teixeira et al., 1995).

3.2. Análises *in silico* de genes de *T. cruzi*

As análises de sequências foram realizadas utilizando o banco de dados do genoma de *T. cruzi* (www.tritrypdb.org) para identificar todos os genes ortólogos envolvidos na biossíntese de GPI do parasito. Sequências de proteínas da via GPI de diferentes organismos, como *S. cerevisiae*, *T. brucei* e *P. falciparum* (Pittet e Conzelmann, 2007; Fujita e Kinoshita, 2010; Delorenzi et al., 2002), foram utilizadas para identificação de sequências homólogas em *T. cruzi*, usando o algoritmo BLASTP (Altschul et al., 1990). Análises de identidade entre as sequências de proteínas preditas de *T. cruzi* e sequências homólogas presentes em outros organismos foram realizadas a partir de alinhamentos múltiplos, utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994). Análises de domínios presentes nas proteínas foram realizadas utilizando o banco de dados do Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (Punta et al., 2012).

3.3. Extração de DNA de *T. cruzi*

Culturas de parasitos, em fase logarítmica de crescimento, totalizando 10^8 células, foram utilizadas para a extração do DNA genômico. Após centrifugação a 2.000xg, por 10 min, os parasitos foram lavados duas vezes com tampão PBS 1x (132 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2) e a extração foi realizada utilizando o *Illustra Blood*

GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro ($A_{260\text{nm}}$) e a sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. O padrão de bandas foi visualizado em transluminador de luz UV e fotografado.

3.4. Amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase)

A partir das análises *in silico*, foram selecionados sete genes da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi* para caracterização neste estudo. Esses genes, bem como os respectivos ortólogos de *S. cerevisiae*, foram isolados por PCR, utilizando os iniciadores indicados na Tabela 1, e clonados no plasmídeo pCR2.1-TOPO (Life Technologies) e no vetor de expressão de levedura pRS426Met25 (Christianson et al., 1992), pelo ex-aluno de doutorado, Ricardo Trigueiro, para serem usados nos experimentos de complementação funcional heteróloga em mutantes de *S. cerevisiae*. Adicionalmente, para isolar o gene da IPC sintase (*TcIPCS*) de *T. cruzi*, foram construídos oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1), a partir de sequências disponíveis no banco de dados do TriTrypDB (www.tritrypdb.org). Aos iniciadores direto e reverso foram acrescentados sítios de restrição, que foram utilizados para a clonagem do gene da IPC sintase no plasmídeo pRS426Met25 (Christianson et al., 1992). O

plasmídeo pRS426Met25 contendo o gene *ScAUR1* de levedura foi gentilmente cedido pelo Dr. Paul Denny, da Durham University (Reino Unido).

Para expressão de proteínas recombinantes em bactérias, iniciadores específicos (Tabela 1) foram construídos para amplificar os fragmentos dos genes *TcDPM1*, *TcGPI3*, *TcGPI8* e *TcGP12*, excluindo a sequência de nucleotídeos que codificam a porção transmembrana destas proteínas. Os produtos obtidos nas reações de amplificação foram utilizados para clonagem no vetor pCR2.1-TOPO (Life Technologies) e no vetor de expressão de *Escherichia coli*, pET-21a(+) (Novagen).

O DNA do clone CL Brener de *T. cruzi* ou de levedura da linhagem YPH499 (WT) foi empregado como molde nas amplificações por PCR. As reações de PCR foram feitas em um volume total de 20 µL, utilizando-se 100 ng de DNA do parasito ou da levedura; 0,5 µM de cada iniciador (Tabela 1); 0,2 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2 µL de tampão IB Pht 10X (Phoneutria); 0,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria); água para completar o volume. As reações foram incubadas no termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.), utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento variando de 50-60 °C (dependo da T_m dos iniciadores) por 1 min e extensão a 72°C variando de 30 s a 2 min (dependendo do tamanho do fragmento a ser amplificado); além de uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE 1X, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, e visualizados em luz UV.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho. O sentido de anelamento dos iniciadores está indicado pelas letras F (direto) e R (reverso). As bases sublinhadas indicam os sítios para as enzimas de restrição.

Iniciadores	Sequências
Transformação de leveduras mutantes	TcDPM1/ <i>Bam</i> HI F: 5' <u>CGGATCC</u> ATGCCAATCAGCTACAC 3'
	TcDPM1/ <i>Hind</i> III R: 5' <u>AAGCTT</u> CTACACGACCTGTTTCAC 3'
	TcGPI3/ <i>Bam</i> HI F: 5' <u>GGGATCC</u> ATGGGAAGACACCGCGTG 3'
	TcGPI3/ <i>Hind</i> III R: 5' <u>AAAGCTT</u> TCAAACACCCTTCTCAAGAG 3'
	TcGPI8/ <i>Sma</i> I F: 5' <u>CCCGGG</u> ATGAAGCGTCAGATGGG 3'
	TcGPI8/ <i>Hind</i> III R: 5' <u>CAAGCTT</u> CTACAGCAGGTCATATTG 3'
	TcGPI10/ <i>Eco</i> RI F: 5' GGG <u>GAAATC</u> ATGTCTCCTTGTATTGTATTGTTT 3'
	TcGPI10/ <i>Xho</i> I R: 5' GGGCTCGAGTTAATTGGCCTGAACAACATTTCGTA 3'
	TcGPI12/ <i>Bam</i> HI F: 5' <u>GGGATCC</u> ATGTCCGTTTTTTTCGCTG 3'
	TcGPI12/ <i>Hind</i> III F: 5' TAAAGCTTCTAGGACGCCTTCAGTTC 3'
	TcGPI14/ <i>Eco</i> RI F: 5' GGG <u>GAAATC</u> ATGCCGTGCCAGTCAGATTGTTTCG 3'
	TcGPI14/ <i>Xho</i> I R: 5' GGGCTCGAGCTACGCGAATTTGGTCATCTTTTTTCC 3'
	TcGAA1/ <i>Bam</i> HI F: 5' <u>GGATCC</u> ATGTTCGATTGCCTTTTGC 3'
	TcGAA1/ <i>Hind</i> III R: 5' <u>AAGCTT</u> ACATTGTTGGTAAACTGATC 3'
	TcIPCS/ <i>Eco</i> RI F: 5' GGG <u>GAAATC</u> ATGGTTTTAATGGGGCCTCATTC 3'
	TcIPCS/ <i>Xho</i> I R: 5' TCTCTCGAGTCACCAGTGTCCAAAATTCCCAC 3'
	ScDPM1/ <i>Spe</i> I F: 5' GGG <u>ACTAGT</u> ATGAGCATCGAATACTCTGT 3'
	ScDPM1/ <i>Bam</i> HI R: 5' GGG <u>GATCC</u> TTAAAAGACCAAATGGTATAG 3'
	ScGPI3/ <i>Spe</i> I F: 5' GGG <u>ACTAGT</u> ATGGGCTTCAATATAGCGTATGTC 3'
	ScGPI3/ <i>Xho</i> I R: 5' CCC <u>CTCGAG</u> AGTTTCTCTTGCTTCCTTCGTCTC 3'
	ScGPI8/ <i>Bam</i> HI F: 5' TTT <u>GATCC</u> ATGCGTATAGCGATGCATCT 3'
	ScGPI8/ <i>Hind</i> III R: 5' GGCA <u>AGCTT</u> TTAATTAGTGTACAGGTCATA 3'
	ScGPI10/ <i>Spe</i> I F: 5' GGG <u>ACTAGT</u> ATGGCTCACGAGGTTTCATAGAATAA 3'
	ScGPI10/ <i>Xho</i> I R: 5' GGGCTCGAGAAATATCTGCCGCTGGAATATCGCTA 3'
	ScGPI12/ <i>Spe</i> I F: 5' GGG <u>ACTAGT</u> ATGAAGATGTTGAGGCGTACAAAGG 3'
	ScGPI12/ <i>Xho</i> I R: 5' GGGCTCGAGATATGTATAAACATCAAATTCATTAA 3'
	ScGPI14/ <i>Spe</i> I F: 5' GGG <u>ACTAGT</u> ATGACTGGCGAAGAATGGGGCTTGA 3'
	ScGPI14/ <i>Xho</i> I R: 5' GGGCTCGAGGTTGTTCTTTTTGTTGGAAACTGTG 3'
	ScGAA1/ <i>Bam</i> HI F: 5' TTT <u>GATCC</u> ATGGCCTTATTGGAGAAGTT 3'
	ScGAA1/ <i>Hind</i> III R: 5' GGCA <u>AGCTT</u> CTAACTTTGCTTTTCTTTCGA 3'

	ScAUR1/Spel F: 5' TCTACTAGTATGGCAAACCCTTTTTTCGAGATG 3'
	ScAUR1/HindIII R: 5' GCGAAGCTTTTAAGCCCTCTTTACACCTAGTG 3'
RT-PCR de leveduras mutantes	TcGPI8 F: 5' CTCGAATTCATGAGCAACAAAACAAAGACAAAC 3' TcGPI8 R: 5' GCTCTCGAGCAGCAGGTCATATTGTACATC 3' TcIPCS F: 5' GGGGAATTCATGGTTTTAATGGGGCCTCATTG 3' TcIPCS R: 5' TCTCTCGAGTCACCAAGTGTCCAAAATCCCCAC 3' TcGPI3 F: 5' TTTGAATTCATGAGCTTTCCGCTGTTGAGG 3' TcGPI3 R: 5' TCTCTCGAGAACACCCTTCTCAAGAGCATT 3' TcDPM1 F: 5' CTCGAATTCATGCCAATCAGCTACACCATA 3' TcDPM1 R: 5' TATCTCGAGATAAAGTGCCCGCAGGTG 3' ScGPI8 F: 5' TTTGGATCCATGCGTATAGCGATGCATCT 3' ScGPI8 R: 5' GGCAAGCTTTTAATTAGTGTACAGGTCATA 3' ScAUR1 F: 5' TCTACTAGTATGGCAAACCCTTTTTTCGAGATG 3' ScAUR1 R: 5' GCGAAGCTTTTAAGCCCTCTTTACACCTAGTG 3' 26S rRNA F: 5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3' 26S rRNA R: 5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'
RT-PCR de parasitos	GPI8int 5'R2: 5' ATGAGAGTTTTTCATCCGTGTTGAG 3' (cDNA) GPI8int 5'R: 5' GGCGTATATTAAAGAAGTAGCGTGA 3' (PCR) TcSL: 5' ACAGTTTCTGTACTATATTG 3' (PCR)
Expressão de proteínas recombinantes em bactérias	DPM1ptn/EcoRI F: 5' CTCGAATTCATGCCAATCAGCTACACCATA 3' DPM1ptn/XhoI R: 5' TATCTCGAGATAAAGTGCCCGCAGGTG 3' GPI3ptn/EcoRI F: 5' TTTGAATTCATGAGCTTTCCGCTGTTGAGG 3' GPI3ptn/XhoI R: 5' TCTCTCGAGAACACCCTTCTCAAGAGCATT 3' GPI8ptn/EcoRI F: 5' CTCGAATTCATGAGCAACAAAACAAAGACAAAC 3' GPI8ptn/XhoI R: 5' GCTCTCGAGCAGCAGGTCATATTGTACATC 3' GPI12ptn/EcoRI F: 5' TTTGAATTCATGCGGCCACGTATACTTGGG 3' GPI12ptn/XhoI R: 5' TTTCTCGAGGGACGCCTTCAGTTCCTCTAG 3'
Localização celular em <i>T. cruzi</i>	pTREX DPM1/XbaI F: 5' GGGTCTAGAATGCCAATCAGCTACACCATAG 3' pTREX DPM1/EcoRI R: 5' CCCGAATTCCACGACCTGTTTCACAGCCC 3' pTREX GPI3/XbaI F: 5' GGGTCTAGAATGGGAAGACACCGCGTGGCAC 3' pTREX GPI3/EcoRI R: 5' CCCGAATTCAACACCCTTCTCAAGAGCATT 3' pTREX GPI12/XbaI F: 5' GGGTCTAGAATGTCCGTTTTTTTCGCTGTGAC 3' pTREX GPI12/EcoRI R: 5' CCCGAATTCCGACGCCTTCAGTTCCTCTAG 3'
Deleção de genes de <i>T. cruzi</i>	GPI3/SacI 5'F: 5' GGGGAGCTCTTGGACTGGTGTCTTTTCAGCTAC 3' GPI3/Spel 5'R: 5' GGA ~~ACTAGT~~ AACTATGAACTATTATTCTCCAG 3' GPI3/XhoI 3'F: 5' CTC ~~CTCGAG~~ GTA ~~CTG~~ CGCCAAACATGCTGC 3' GPI3/XbaI 3'R: 5' GGGT ~~CTAGAG~~ CATTAAGCTTCTCGCGATTTC 3'

GPI10/SacI 5'F1: 5' GCTGAGCTCTTGTGTGTGTATTTGCCTTTCC 3'
GPI10/SacI 5'F2: 5' GTTGAGCTCGATTCCCATTATTGCGTGTG 3'
GPI10/SpeI 5'R: 5' GGCAGTAGTGCGGTCTGGATGCTTACACT 3'
GPI10/XhoI 3'F: 5' GCTCTCGAGATTGTTACACGATGTTATGCG 3'
GPI10/XbaI 3'R: 5' GGCTCTAGATTTTCGTACCCACATTTCATG 3'
GPI8/SacI 5'F1: 5' GGTGAGCTCTGGGGAGTGAGGGTGGCTGCGAG 3'
GPI8/SpeI 5'R1: 5' GGGAGTAGTAACTCTCCTATGATGTCGTCTTTG 3'
GPI8/XhoI 3'F1: 5' GGTCTCGAGCATGCAAAGTGTGAAGTCGGACC 3'
GPI8/XbaI 3'R1: 5' CTCCTCTAGATTCCTTGTTGCTTTGCTCTTATC 3'
GPI8/KpnI 5'F2: 5' TTTGGTACCCTTGTACATGCCATTTTCCA 3'
GPI8/SpeI 5'R2: 5' GGGAGTAGTGCAGAGATGGTAAATTGTCACT 3'
GPI8/EcoRV 3'F2: 5' GGGGATATCCTCACGCTGGTCACTTGAATC 3'
GPI8/XhoI 3'R2: 5' TTTCTCGAGTGAGCTGCATGCTTCCAAGC 3'

Verificação da	GPI8 ext 5'F: 5' GTAACACAATCGTTTTTAGGCTGTG 3' (Iniciador 1F)
integração e deleção	GPI8 ext 3'R: 5' CAGATGAGGAAAGAGACGAACAG 3' (Iniciador 2R)
de genes no genoma	GPI8 int 5'R: 5' GCGTATATTAAAGAAGTAGCGTGA 3' (Iniciador 7R)
de <i>T. cruzi</i>	GPI8 int 5'R2: 5' ATGAGAGTTTTTCATCCGTGTTGAG 3' (Iniciador 8R)
	Neo F: 5' CGACCCTGCAGCCAATATGGGATC 3' (Iniciador 3F)
	Neo R: 5' TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG 3' (Iniciador 3R)
	Neon20 F: 5' GGATTCATCGACTGTGGCCGGC 3' (Iniciador 2F)
	Neon11 R: 5' CGGCCGGAGAACCTGCGTGCAA 3' (Iniciador 1R)
	Hyg F: 5' ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGC 3' (Iniciador 6F)
	Hyg R: 5' TCAGAAGAACTCGTCCGGCCACA 3' (Iniciador 6R)
	Hygn20 F: 5' ACCGATGGCTGTGTAGAAGTAC 3' (Iniciador 5F)
	Hygn11 R: 5' GAGCTGCATCAGGTCGGAGACGC 3' (Iniciador 4R)

3.5. Clonagem dos genes de *T. cruzi* em vetores de expressão de bactérias e leveduras

Para clonagem, os produtos obtidos nas reações de amplificação (item 3.4) foram excisados dos géis e purificados, utilizando o *Illustra GFX PCR*

DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a purificação, os fragmentos foram ligados no plasmídeo pCR2.1-TOPO, utilizando-se o kit *TOPO TA Cloning* (Life Technologies). As reações de ligação foram feitas em um volume final de 6 µL, empregando-se 1-4 µL do produto de PCR, 1 µL de solução salina (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂), 1 µL do vetor TOPO (10 ng), contendo a enzima topoisomerase I covalentemente ligada, e água para completar o volume. A incubação foi feita a 25 °C durante 30 min.

As subclonagens dos fragmentos nos plasmídeos pRS426Met25 e pET-21a(+) foram feitas mediante clivagem do vetor pCR2.1-TOPO com enzimas de restrição específicas, seguida de purificação e ligação dos insertos nos vetores de expressão. As reações de ligação foram feitas em um volume final de 10 µL, empregando-se 1 µL de T4 DNA ligase (Promega), 1 µL de tampão 10X da ligase (300 mM Tris-HCl, pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 10 mM ATP), 100 ng do vetor, 500 ng do produto purificado e água para completar o volume. As reações foram incubadas a 15 °C durante 16 horas.

3.6. Transformação de bactérias competentes e análise dos transformantes

As células competentes de *Escherichia coli* XL1 Blue e BL21-AI (Life Technologies) foram transformadas por choque térmico de acordo com

Sambrook et al. (2001). Foram adicionados 10 µL da reação de ligação a 100 µL de células competentes em um microtubo e este foi incubado no gelo por 20 min. O choque térmico foi realizado a 42 °C por 50 s, seguido de uma incubação no gelo por 2 min. Para a recuperação das células, foram adicionados 400 µL de meio 2xYT (1,6% de bacto-triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,4) e a cultura foi incubada a 37 °C por 1 h a 150 rpm. Após esse período, as células foram plaqueadas em meio 2xYT sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) e as placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

Para a análise dos transformantes, foram selecionadas algumas colônias crescidas nas placas e a confirmação da transformação foi feita por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos construídos para amplificar cada um dos fragmentos de interesse (Tabela 1). As colônias que apresentaram a amplificação do produto esperado foram inoculadas em meio 2xYT líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 16h sob agitação de 180 rpm. Após o crescimento, as bactérias foram aliqüotadas em glicerol 25% e armazenadas a -80 °C.

3.7. Obtenção do DNA plasmidial e clivagem do DNA por enzimas de restrição

Para a obtenção de DNA plasmidial, colônias bacterianas foram inoculadas em 5 mL de meio 2xYT, contendo 100 µg/mL de ampicilina, e incubados a 37 °C por 16 horas sob agitação de 180 rpm. A extração de DNA

foi feita em pequena escala (miniprep), utilizando o *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), ou em larga escala (maxiprep), usando o *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN), conforme instruções dos fabricantes. Os DNAs plasmidiais purificados foram quantificados em espectrofotômetro ($A_{260\text{nm}}$) e a sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As amostras de DNA foram utilizadas em ensaios de PCR, em reações de restrição enzimática e em reações de sequenciamento para a confirmação da clonagem.

As reações de clivagem foram realizadas usando 1 a 5 µg de DNA, 1 a 10 U de cada enzima de restrição (Promega), 3 µL de tampão 10x sugerido pelo fabricante, em um volume final de 30 µL e incubadas por 16 h a 37 °C. Ao final de todas as digestões, a endonuclease era inativada a 75°C por 15 minutos. Após a digestão de DNA, as reações foram aplicadas em gel de agarose de 1,0%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

3.8. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA dos clones recombinantes contendo os genes de *T. cruzi* ou *S. cerevisiae* foi realizado em sequenciador automático *MegaBACE 1000* (GE Healthcare), usando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram baseadas na técnica de sequenciamento por terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (ddNTPs), descrita por Sanger

et al. (1977). Cada fita do DNA foi sequenciada, no mínimo, três vezes, empregando-se os iniciadores universais M13 F e M13 R, para o plasmídeo pCR2.1-TOPO (Life Technologies), T7 F e T7 R, para o vetor pET-21a(+) (Novagen), ou os oligonucleotídeos específicos construídos para amplificar os genes clonados no plasmídeo pRS426 Met25 (Christianson et al., 1992).

As sequências de DNA obtidas foram comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) e a busca por similaridades foi feita usando o algoritmo BLASTN e BLASTX (Altschul et al., 1990).

3.9. Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Clones de bactérias *E. coli* BL21-AI (Life Technologies), contendo o vetor pET-21a(+) (Novagen) com os fragmentos dos genes de *TcDPM1*, *TcGPI3*, *TcGPI8* ou *TcGPI12*, foram cultivados em 5 mL de meio líquido 2xYT com ampicilina (100 µg/mL), a 37 °C sob agitação por 16 h. As culturas foram diluídas 1:20 em 20 mL de 2xYT com ampicilina (100 µg/mL) e mantidas sob agitação a 37 °C. Ao atingir a densidade ótica (OD₆₀₀) entre 0,4 e 0,6, alíquotas de 1 mL foram coletadas antes de iniciar a indução (0 h) e, no restante da cultura, foram adicionados IPTG (Life Technologies), na concentração final de 1 mM, e L-arabinose (Sigma), na concentração final de 0,2%, para induzir a expressão das proteínas recombinantes. Após incubação a 37 °C por 4 h sob

agitação, as amostras foram centrifugadas a 2.000xg por 10 min e parte dos precipitados de bactérias foram ressuspensos em tampão de amostra de Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% de glicerol; 2% de SDS; 5% de β -mercaptoetanol; 0,002% de azul de bromofenol). As amostras foram fervidas por 5 minutos e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), para confirmação da indução da proteína de interesse. Após a confirmação, o restante do precipitado de bactérias foi ressuspensionado em PBS 1x e lisado utilizando o homogeneizador de alta pressão EmulsiFlex-C3 (Avestin, Inc.). Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 12.000xg por 10 min e uma alíquota do sobrenadante e do precipitado, ressuspensionado em PBS 1x, foi analisada por SDS-PAGE 12,5% para verificar em qual fração as proteínas recombinantes estavam presentes. O sobrenadante e o sedimento obtidos foram estocados para serem utilizados nas etapas posteriores de purificação. Estes experimentos foram realizados em colaboração com a estudante de iniciação científica, Isabella Barony Macedo.

3.10. Extração de RNA de *T. cruzi*

O RNA total foi isolado a partir 10^9 células, em fase logarítmica de crescimento, de formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, utilizando *RNeasy Mini kit* (QIAGEN), de acordo com instruções do fabricante. O método de extração consiste na lise de células em condições desnaturantes e da purificação do RNA por cromatografia de afinidade, utilizando água como

eluente. Após quantificação em espectrofotômetro a 260 nm, foi feita a análise dos RNAs por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão MOPS pH 7,0 (20 mM MOPS; 5 mM acetato de sódio; 1 mM EDTA) e 5% de formaldeído (Teixeira et al., 1995). A cada amostra foram adicionados 2,5 µL de tampão de amostra (MOPS 1x; 50% de formamida; 17% de formaldeído; 5% de glicerol; 0,25% de azul de bromofenol). Após incubação por 15 min a 65 °C, foi adicionado às amostras 1 µL de brometo de etídio (1,0 mg/mL) antes da aplicação no gel. A eletroforese foi realizada a 100 V durante 45 min à temperatura ambiente.

3.11. Northern blot

Para as análises de *Northern blot*, 10 µg de RNA total foram separados em géis de agarose 1,2% em tampão MOPS pH 7,0, contendo 5% de formaldeído, por 2 h. Após a eletroforese, os géis foram tratados SSC 10x (1,5 M NaCl; 150 mM citrato de sódio, pH 7,0) por 20 min. Os RNAs foram transferidos por capilaridade, em SSC 10x, para membranas de nylon *Hybond-N* (GE Healthcare). Após a transferência, as membranas foram lavadas em SSC 6x e os RNAs foram imobilizados por irradiação com luz UV no aparelho *Stratalinker UV Crosslinker 2400* (Stratagene). A hibridação foi realizada como descrito previamente por Ausubel et al. (1995). Brevemente, as membranas foram pré-hibridadas por 3 h, a 42 °C, sob rotação, em solução de 50% de formamida, SSC 6x, Denhardt's 10x, 0,2% de SDS e 75 µg/mL de DNA de

esperma de salmão (Life Technologies). Posteriormente, as membranas foram hibridadas por 16 h a 42 °C com 100 ng de sonda purificada, previamente marcada com [α -³²P]-dCTP, usando o kit *Amersham Ready-To-Go DNA Labelling Beads* (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. Após a hibridação, as membranas foram lavadas 2 vezes com solução de lavagem (SSC 2x; 0,2% de SDS) a 60 °C por 30 min e reveladas à temperatura ambiente por intervalos variados de tempo usando o sistema de fotodocumentação STORM 820 Phosphorimager (GE Healthcare).

3.12. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e *Southern blot*

O DNA genômico extraído a partir de epimastigotas e incluído em bloco de agarose foi separado em bandas cromossômicas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), utilizando o *Gene Navigator System* (Pharmacia), tal como descrito por Cano et al. (1995), com as seguintes modificações: a separação foi feita em gel de agarose 0,8%, utilizando um programa com cinco fases de pulsos homogêneos (norte/sul, leste/oeste), com interpolação por 135 h a 83 V. A fase 1 teve um tempo de pulso de 90 s (tempo de corrida de 30 h); fase 2, 120 s (30 h); fase 3, 200 s (24 h); fase 4, 350 s (25 h); fase 5, 800 s (26 h). Os cromossomos de *S. cerevisiae* (Bio-Rad) foram utilizados como padrões de peso molecular. Os cromossomos separados foram transferidos para membranas de nylon *Hybond-N* (GE Healthcare) e hibridados

com sondas marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$, conforme descrito previamente (item 3.11).

3.13. Síntese de cDNA e amplificação por RT-PCR (transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)

Para as reações de RT-PCR, todas as amostras de RNA total, isoladas a partir de mutantes de leveduras e de *T. cruzi*, foram tratadas com DNase I (Life Technologies), conforme as recomendações do fabricante. Foram adicionados 3 μg de cada amostra de RNA, tampão DNase 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 2 mM MgCl_2 ; 50 mM KCl), 3 U da enzima DNase I e água livre de RNase para completar o volume para 30 μL . As reações foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente e, em seguida, a enzima foi inativada pela adição de 3 μL de EDTA (25 mM) e incubação por 10 min a 65 °C. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e analisadas em gel de agarose 1,2%.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o kit *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA tratado (1 μg) foram incubadas com 1 μL de oligo (dT)₁₈ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou olinucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1) e 1 μL de dNTPs (10 mM cada) a 65 °C por 5 min e, em seguida, incubadas no gelo. Posteriormente, foram adicionados 4 μL do tampão *First-Strand* 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl_2), 2 μL de DTT 0,1 M e 200 U

da enzima transcriptase reversa *Superscript II*. As reações foram incubadas a 42 °C por 50 min e, em seguida, a enzima foi inativada a 70 °C por 15 min. Para cada amostra foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes exceto a enzima transcriptase reversa. Para remover o RNA complementar a fita de cDNA, foram adicionadas 2 U da enzima RNase H de *E. coli* em cada amostra e incubadas a 37 °C por 20 min.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o cDNA sintetizado a partir de RNA de *T. cruzi* e de leveduras mutantes, como molde, e os iniciadores descritos na Tabela 1. As condições de amplificação foram indicadas no item 3.4.

3.14. Transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*

A transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada conforme descrito por DaRocha et al. (2004). Brevemente, cerca de 4×10^7 células epimastigotas, em fase logarítmica de crescimento, foram utilizadas em cada sistema de transfecção. Os parasitos foram coletados por centrifugação a 2.000xg, por 10 min, a 4 °C, lavados duas vezes com tampão PBS 1x e ressuspensos em 400 µL de tampão de eletroporação (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM K₂HPO₄; 25 mM Hepes; 2 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; pH 7,6) para uma concentração final de parasitos de 10⁸/mL. Foram adicionados às cuvetas de 0,2 cm (Gene Pulser BioRad) 50-100 µg de DNA em 50 µL de volume final, com exceção das culturas controles (*mock*), nas quais foram adicionados 50 µL

de água. Após adição dos parasitos, as cuvetas foram mantidas em gelo durante 15 min. Em seguida, cada cuveta foi individualmente colocada no eletroporador *Gene Pulser II* (Bio-Rad) e as amostras foram submetidas a 2 pulsos de 0,3 kV a 500 μ F, com 10 s de intervalo entre eles. Após a eletroporação, as células foram transferidas para garrafas de 25 cm² estéreis, contendo 5 mL de meio LIT suplementado com 10% de SFB inativado e incubadas a 28 °C. Vinte e quatro horas após a transfecção, 200 μ g/mL de antibiótico G418 ou higromicina foi adicionado às culturas de epimastigotas. A população selecionada foi obtida em aproximadamente 30 dias após a transfecção.

3.15. Localização celular no parasito de proteínas em fusão com GFP

Sequências codificadoras dos genes *TcDPM1*, *TcGPI3* e *TcGPI12* foram previamente clonadas no vetor de expressão de *T. cruzi* pTREXnGFP (DaRocha et al., 2004), em fusão com o gene da proteína verde fluorescente (GFP). As sequências dos genes foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de epimastigotas de *T. cruzi*, usando oligonucleotídeos iniciadores direto e reverso, contendo sítios de restrição para *Xba*I e *Eco*RI, respectivamente (Tabela 1). Os produtos amplificados foram ligados ao vetor no sítio de clivagem das enzimas *Xba*I e *Eco*RI, gerando as construções pTREX-TcDPM1-GFP, pTREX-TcGPI3-GFP e pTREX-TcGPI12-GFP. Essas construções foram geradas pelo ex-aluno de doutorado Ricardo Trigueiro.

Um total de 100 µg de cada construção foi utilizado para transfectar epimastigotas de *T. cruzi*, como descrito por DaRocha et al. (2004) (item 3.14). Vinte e quatro horas após a transfecção, a cultura de parasitos foi centrifugada a 2.000xg, por 10 min, a 25 °C, lavada uma vez com tampão PBS 1x e ressuspensa em 4% de paraformaldeído em PBS. Os parasitos foram depositados em lâminas de vidro e, após incubação por 40 min a 4 °C para fixação, foram lavados novamente com PBS. As células fixadas foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 5 min, a temperatura ambiente, bloqueadas com 5% de soro fetal bovino em PBS por 20 min a 4 °C e, em seguida, lavadas com PBS 1x. A marcação do retículo endoplasmático foi feita pela adição às lâminas do anticorpo primário anti-BiP de *T. brucei* (Bangs et al., 1993; gentilmente cedido pelo Dr. Renato Mortara, Universidade Federal de São Paulo), gerado em coelho e diluído 1:1000, seguido de incubação por 16 h a 4 °C. Após lavagem com PBS, o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 555 (Life Technologies), diluído 1:1000, foi incubado por 1 h a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas e o núcleo e o cinetoplasto dos parasitos foram corados com 1 µg/mL de DAPI (Life Technologies) por 5 min a temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com 90% de glicerol, 10% de 1 M Tris-HCl, pH 9,0, e 2,3% de DABCO (Sigma) e cobertas por uma lamínula. Imagens foram obtidas com o microscópio confocal 5 Live (Zeiss) e com o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti, do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.16. Interrupção de genes da via de biossíntese de GPI em *T. cruzi*

As construções para transfecção e deleção, por recombinação homóloga, dos genes de *T. cruzi* foram feitas a partir da amplificação por PCR das regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR) dos alelos de cada gene, utilizando como molde o DNA do clone CL Brener e oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada região (Tabela 1). Para os genes *TcGPI8* e *TcGPI10* foram utilizados iniciadores diferentes para cada alelo, devido à grande diferença nas UTR desses genes. As reações de PCR e as condições de amplificação foram descritas no item 3.4.

Após amplificação, os fragmentos foram purificação, utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante, e os amplicons referentes às regiões 5' e 3' de cada um dos genes foram clonados sequencialmente nos sítios de restrição correspondentes nos plasmídeos TOPO-Neo e TOPO-Higro, através de transformação de *E. coli* por choque térmico (item 3.6). Os genes de resistência aos antibióticos G418 e higromicina B foram previamente clonados no vetor TOPO (Life Technologies) e foram obtidos a partir dos vetores pROCK-GFP-Neo e pROCK-GFP-Higro, respectivamente (DaRocha et al., 2004).

Antes da transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*, todos os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *SacI* e *XbaI*, exceto o plasmídeo contendo a construção para a deleção do segundo alelo de *TcGPI8*, no qual foram utilizadas as enzimas *KpnI* e *XhoI*. Os fragmentos correspondentes às construções nocautes foram purificados a partir do gel e

utilizados na transfecção de epimastigotas de acordo com DaRocha et al. (2004) (item 3.14).

Para a caracterização dos parasitos nocautes para o gene *TcGPI8*, o DNA total dos mutantes foi extraído e utilizado como molde em reações de PCR, usando oligonucleotídeos iniciadores que permitem a verificação da integração do gene de resistência e a deleção do gene *TcGPI8* (Tabela 1).

3.17. Microscopia eletrônica de *T. cruzi*

Epimastigotas foram fixadas com 5% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, e processadas conforme protocolo padrão (de Souza, 2007), incluindo pós-fixação com tetróxido de ósmio, seguida de contrastação em bloco com acetato de uranila e inclusão em resina do tipo Epon. As seções ultrafinas foram contrastadas com citrato de chumbo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin da FEI - 120 kV, localizado no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.18. Obtenção de fração de membranas de epimastigotas de *T. cruzi* e ensaios de imunoblot

Aproximadamente 10^9 epimastigotas, em fase logarítmica de crescimento, foram coletadas por centrifugação a 2.000xg, por 10 min, lavadas duas vezes com tampão PBS 1x e ressuspensas em 3 mL de tampão de lise [20 mM Hepes; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 250 mM sacarose; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; coquetel inibidor de protease 1x (Amresco)]. Após a lise celular com 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C, uma alíquota correspondente ao extrato de proteína total (T) foi coletado. O lisado total de células foi centrifugado a baixa velocidade (2.000xg) por 10 min e o sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação (100.000xg) por 1 h a 4 °C. O sobrenadante resultante foi coletado e analisado como fração citoplasmática solúvel (C), enquanto que o sedimento, correspondente à fração de membrana (M), foi ressuspensão em 200 µL de tampão de lise. A concentração protéica das amostras foi determinada segundo o método quantitativo de Bradford (1976), através da absorbância obtida no espectrofotômetro a 595 nm, utilizando concentrações conhecidas de BSA (soro albumina bovina) como padrão. Os volumes correspondentes a 20 µg de proteínas a partir do lisado total de parasito (T), das frações citoplasmáticas (C) e de membrana (M), misturados com tampão de amostra de Laemmli, foram fervidos por 5 min e as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% por 1 h, conforme descrito por Ausubel et al. (1995). Os géis foram corados com *Coomassie Blue* para visualização das bandas de proteínas.

Para análises dos extratos protéicos totais e das frações ciplasmática e de membrana por imunoblot, as amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 12,5%, transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond ECL* (GE Healthcare) por 3 horas a 4°C. Para verificar a eficiência da transferência, as membranas foram posteriormente coradas com solução de Ponceau S (0,1% de Ponceau S em 5% de ácido acético glacial) e descoradas com água. As membranas foram bloqueadas por 16 h, a 4 °C, com TBS-T (20 mM de Tris, 200 mM de NaCl e 0,1% de Tween-20), contendo 5% de leite em pó desnatado, e incubadas com o anticorpo primário anti-mucina 2B10 (Mortara et al., 1992; gentilmente cedido pela Dra. Nobuko Yoshida, Universidade Federal de São Paulo), diluído 1:200 em TBS-T com 5% de leite em pó. Após a incubação por 4 h, a temperatura ambiente, com o anticorpo primário, as membrana foram lavadas três vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (GE Healthcare), diluído 1:2.000 em TBS-T com 5% de leite em pó, por 1 h a temperatura ambiente, e posteriormente lavadas 3 vezes com TBS-T. As membrana foram reveladas com o reagente *ECL Plus* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

3.19. Citometria de fluxo de *T. cruzi*

Epimastigotas crescidas a uma densidade celular de 1×10^7 parasitos/mL foram lavadas com PBS 1x e incubadas com o anticorpo primário

anti-mucina 2B10 (diluição 1:450). Após incubação por 1 h a 4 °C, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 30 min a 4 °C com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies), diluído 1:1.000. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson). Para cada amostra, foram adquiridos dados referentes a cem mil eventos para realização da análise quantitativa.

3.20. Infecção *in vitro* e *in vivo*

Para determinar o número de amastigotas intracelulares ou tripomastigotas liberadas no sobrenadante, células Vero foram plaqueadas em uma densidade de 10^4 células/poço em uma placa de 24 poços e infectadas com 10^5 tripomastigotas metacíclica de parasitos tipo selvagem (WT) ou mutantes. Cinco dias após a infecção, as células foram fixadas e coradas pelo método de coloração panótico e o número de amastigotas por célula foram determinados. O número total de tripomastigotas libertadas no sobrenadante a partir de células infectadas foi determinado do sétimo ao décimo dia após a infecção. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

Para os experimentos de infecção *in vivo*, camundongos BALB/c fêmeas foram inoculados por via intraperitoneal com 10^5 tripomastigotas metacíclicos de WT ou de mutantes. A parasitemia foi observada ao longo de 30 dias após a inoculação a partir de 5 µL de sangue coletado do plexo orbital

dos animais. Esses dados foram gerados pela Dra. Caroline Junqueira do Centro de Pesquisas René Rachou. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Prisma 5.0. e os métodos usados foram One way ANOVA e Bonferroni's Multiple Comparison como pós teste. $P < 0,01$ e $P < 0,001$ foram considerados significantes.

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz e foram realizados sob as diretrizes da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e seguida rigorosamente a legislação brasileira para “Procedimentos para o uso científico de animais” (11.794/2008).

3.21. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* e meios de cultura

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* usadas neste trabalho foram: a linhagem YPH499 (Mat α ; *ura3-52*; *lys2-801amber*; *ade2-101ochre*; *trp1-63*; *his3-200*; *leu2-1*) (Stratagene), usada como controle (WT), e as leveduras mutantes condicionalmente letais para a biossíntese de GPI (YPH499-HIS-GAL-DPM1, YPH499-HIS-GAL-GPI3, YPH499-HIS-GAL-GPI8, YPH499-HIS-GAL-GPI10, YPH499-HIS-GAL-GPI12, YPH499-HIS-GAL-GPI14, YPH499-HIS-GAL-GAA1 e YPH499-HIS-GAL-AUR1), que foram geradas pela substituição do promotor endógeno da levedura pelo promotor regulado de GAL1 (Mazhari-Tabrizi et al., 1999). Estes mutantes foram gentilmente cedidos

pelo laboratório do Dr. Ralph Schwarz do Instituto de Virologia da Philipps-Universität Marburg (Alemanha). As leveduras foram mantidas sob agitação vigorosa a 30 °C em meio YPGR (1% de extrato de levedura; 2% de bacto-peptona; 2% de galactose; 1% de rafinose) ou meio SD (0,17% de base de nitrogênio para levedura; 0,5% de sulfato de amônio; 2% de glicose; e suplementos nutricionais necessários para complementar as amostras auxotróficas ou permitir a seleção dos transformantes). Antes da complementação, os clones de levedura foram cultivados em meio SGR (4% de galactose; 2% de rafinose; 0,17% de base de nitrogênio para levedura; 0,5% de sulfato de amônio), em que a glicose foi substituída pela galactose/rafinose como fonte de carbono.

3.22. Transformação de mutantes condicionalmente letais de *S. cerevisiae*

A transformação das leveduras mutantes com o plasmídeo pRS426Met25, contendo os genes da via GPI de *T. cruzi* ou de *S. cerevisiae*, foi realizada de acordo com o protocolo de acetato de lítio descrito por Gietz et al. (1995). As leveduras YPH499 tipo selvagem ou mutante foram crescidas a 30 °C, sob agitação, em meio YPGR até atingirem a densidade de 2×10^7 células/mL. Após centrifugação de 10^8 células por transformação a 2.000xg, durante 5 min, o sedimento celular foi lavado com água destilada esterilizada e centrifugado novamente sob as mesmas condições. Posteriormente, o sedimento foi suspenso em 360 µL de solução de transformação (10% de LiAc

1 M; 35% de PEG 3500; 100 µg/µL de DNA de espermatozoides de salmão; 1 µg do DNA plasmidial) e, após homogeneização em vortex, a mistura foi incubada a 42 °C por 40 min. A amostra foi então centrifugada a 16.000xg, durante 1 min, e as células foram ressuspensas em 400 µL de água e plaqueadas em meio mínimo SD ou SGR, ausente de histidina, e incubadas a 30 °C.

3.23. Extração de RNA de *S. cerevisiae*

O RNA total de leveduras foi isolado a partir 10^8 células, em fase logarítmica de crescimento, utilizando *RNeasy Mini kit* (QIAGEN), de acordo com instruções do fabricante. A parede celular das leveduras foi lisada, após incubação das células por 3 h a 30 °C, com 250 U da enzima litase (Sigma) em tampão Y1 (1 M sorbitol; 100 mM EDTA, pH 8,0; 0,1% de β-mercaptoetanol). Após quantificação em espectrofotômetro a 260nm, foi feita a análise dos RNAs por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão MOPS pH 7,0, como descrita no item 3.10.

3.24. SDS-PAGE e fluorografia de proteínas de leveduras marcadas com [2-³H]myo-inositol

Células controle YPH499 (WT), leveduras mutantes (YPH499-HIS-GAL) e leveduras mutantes carregando o plasmídeo pRS426Met25, contendo

genes de *T. cruzi* ou levedura, foram cultivadas em meio SGR a 30 °C até a saturação. Após lavagem com PBS 1x, as células foram incubadas em meio SD, durante cerca de 16 h a 30 °C. Em seguida, as células (1×10^8) foram lavadas duas vezes em meio SD sem inositol, ressuspensas em 1 mL deste mesmo meio e esgotadas de inositol, durante 20 min, antes da adição de 30 μ Ci de [2- ^{3} H]myo-inositol (American Radiolabeled Chemicals). As células foram marcadas durante 1 h, a 30 °C sob agitação. A extração de proteínas foi feita de acordo com Damasceno et al. (2007) com as seguintes modificações: as células marcadas radioativamente foram coletas, lavadas duas vezes em PBS 1x e ressuspensas em 100 μ L de tampão de lise de levedura [50 mM fosfato de sódio, pH 7,4; 1 mM EDTA; 5% de glicerol; 1 mM PMSF; coquetel inibidor de protease 1x (Amresco)]. As células de levedura foram lisadas pela adição de pérolas de vidro lavadas com ácido (425-600 μ m), vortexadas durante 1 min, com intervalos de 1 min no gelo, repetido 20 vezes. O lisado foi centrifugado a 2.000xg por 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. O sedimento restante contendo os detritos celulares e as pérolas de vidro foi ressuspenso em 50 μ L de tampão de lise de levedura, contendo 2% de SDS, por vórtex durante 1 min com intervalos de 1 min no gelo, repetido cinco vezes. Depois de remover os restos celulares por centrifugação, os lisados foram combinados e, em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. As bandas de proteína contendo inositol marcados foram detectadas por fluorografia, utilizando o reagente EN ^{3} HANCE (PerkinElmer).

3.25. Cromatografia em camada delgada (TLC)

Células controle YPH499 (WT) e mutantes de *S. cerevisiae*, complementados com os genes da via GPI de *T. cruzi* e de *S. cerevisiae*, foram crescidos até atingir valores de OD₆₀₀ entre 1-2 (fase exponencial precoce) e coletados por centrifugação a 2.000xg durante 10 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 2 mL de meio SD, contendo 60 µCi de [2-³H]myo-inositol para marcação dos lipídios. Após agitação por 1 h e 30 min a 30 °C, as culturas foram lavadas com água Milli-Q e centrifugadas a 2.000xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas à extração dos glicolipídios.

Para a extração dos glicolipídios foi utilizada uma mistura de clorofórmio/metanol/água cuja proporção final foi 10:10:3 (v/v/v). A suspensão foi sonicada por 5 min e centrifugada a 20.000xg por 5 min. O sobrenadante foi coletado e o sedimento foi extraído duas vezes com 1 mL de clorofórmio/metanol/água (C:M:A 10:10:3). Os extratos em C/M/A foram combinados e evaporados em Speed-Vac. Para remover os contaminantes solúveis em água, o extrato C/M/A foi submetido a repetidas lavagens Folch. O extrato lipídico foi ressuspenso em clorofórmio/metanol (2:1) e a separação de fase foi induzida pela adição de 1/5 volumes de MgCl₂ 4 mM, seguida pela centrifugação a 20.000xg por 5 min. A fase inferior, contendo os lipídios, foi lavada duas vezes com 1/2 volume de fase artificial superior (C/M/A/1 M MgCl₂ 6:96:94:0.336) e seca sob corrente de N₂. Em seguida, os lipídios foram solubilizados em butanol saturado com água e separados pela adição de água

e centrifugação a 20.000xg por 5 min. A fase superior (butanol) foi coletada, lavada com água e centrifugada novamente sob as mesmas condições. A fase inferior (água) foi coletada, combinada com a primeira fase de água e lavada com butanol saturado com água. As fases superiores (butanol) foram combinadas e uma alíquota desse material foi utilizada para determinação da radioatividade na fase orgânica pela contagem em cintilador. Posteriormente, os extratos de butanol foram secos em Speed-Vac e os lipídios foram suspensos em clorofórmio/metanol (1:1).

Amostras dos extratos de lipídios, radiomarcados com [2-³H]myo-inositol, foram analisadas por TLC em placas de sílica gel 60, utilizando a mistura de clorofórmio/metanol/água na proporção 4:4:1. As placas de TLC foram expostas a um filme BioMax MS (Eastman Kodak) durante 2 meses usando o TranScreen-LE (Kodak).

4. Resultados

4.1. Análise *in silico* dos genes de *T. cruzi* envolvidos na via de biossíntese de GPI

Foram identificados 18 genes de *T. cruzi*, envolvidos em 8 etapas da via de biossíntese de GPI, com base na similaridade de sequências de leveduras, mamíferos, *Trypanosoma brucei* e *Plasmodium falciparum* (Pittet e Conzelmann, 2007; Kinoshita e Inoue, 2000; Ferguson, 1999; Delorenzi et al, 2002) com sequências anotadas no banco de dados do genoma de *T. cruzi* do clone CL Brener (Tabelas 2 e 3). Para a maioria destes genes anotados como possíveis ortólogos de *T. cruzi* no TriTrypDB (www.tritrypdb.org), ambos os alelos, pertencentes aos dois haplótipos de CL Brener, foram identificados. Como CL Brener é uma cepa híbrida, como descrito por El-Sayed et al (2005), os dois haplótipos correspondentes aos dois genomas ancestrais que originaram o genoma de CL Brener, chamados *Esmeraldo-like* e *non-Esmeraldo-like*, foram separados durante a montagem do genoma do clone CL Brener de *T. cruzi*. Para todos os genes indicados na Tabela 2, as identidades de aminoácidos entre os dois alelos foram superiores a 94%. Com base na presença destas sequências no genoma de *T. cruzi* e na estrutura conhecida da âncora GPI neste parasito (Figura 2; Previato et al., 1995), foi proposto que a via de biossíntese de GPI de *T. cruzi* ocorre no retículo endoplasmático (RE), de acordo com o esquema mostrado na Figura 4.

Tabela 2: Genes de *T. cruzi* que codificam enzimas da via de biossíntese de GPI.

Gene (*)	Produto gênico	Nº de acesso (TriTryp)	Nº de amino ácidos	TM **	Identidade entre proteínas ***
<i>DPM1</i> (P)	Dolicol-fosfato manose sintase	TcCLB.506581.10	260 aa	1	96%
<i>DPM1</i> (S)		TcCLB.508169.60	260 aa	1	
<i>GPI1</i> (P)	N-acetilglucosamina transferase (GlcNAc-PI) componente Gpi1	TcCLB.510329.200	827 aa	6	100%
<i>GPI1</i> (S)		ni	‡	-	
<i>GPI2</i> (P)	N-acetilglucosamina transferase (GlcNAc-PI) componente Gpi2	TcCLB.503781.20	336 aa	7	98%
<i>GPI2</i> (S)		TcCLB.507639.100	336 aa	7	
<i>GPI3</i> (P)	N-acetilglucosamina transferase (GlcNAc-PI) componente Gpi3	TcCLB.509215.16	455 aa	1	100%
<i>GPI3</i> (S)		TcCLB.510259.18	455 aa	1	
<i>GPI15</i> (P)	N-acetilglucosamina transferase (GlcNAc-PI) componente Gpi15	TcCLB.511655.10 #	307 aa	2	97%
<i>GPI15</i> (S)		TcCLB.509779.4 #	307 aa	2	
<i>GPI19</i> (P)	N-acetilglucosamina transferase (GlcNAc-PI) componente Gpi19	ni	‡	-	100%
<i>GPI19</i> (S)		TcCLB.508307.100 #	142 aa	2	
<i>DPM2</i> (P)	N-acetilglucosamina transferase (GlcNAc-PI) componente Dpm2	TcCLB.510043.29 #	100 aa	2	98%
<i>DPM2</i> (S)		TcCLB.506579.119 #	99 aa	2	
<i>DPM2</i> (S)		TcCLB.504881.14 #	99 aa	2	
<i>GPI12</i> (P)	GlcNAc-PI de-N-acetilase	TcCLB.511481.40	252 aa	1	96%
<i>GPI12</i> (S)		TcCLB.504005.20	252 aa	1	
<i>GPI14</i> (P)	α -1,4-Manosiltransferase I	TcCLB.511507.50	472 aa	10	95%
<i>GPI14</i> (S)		TcCLB.503909.100	430 aa	9	
<i>GPI18</i> (P)	α -1,6-Manosiltransferase II	TcCLB.503521.89	529 aa	10	■
<i>GPI18</i> (S)		TcCLB.506359.30 #	529 aa	8	
<i>GPI10</i> (P)	α -1,2-Manosiltransferase III	TcCLB.510299.50	584 aa	9	95%
<i>GPI10</i> (S)		TcCLB.503527.40	608 aa	9	
<i>GPI13</i> (P)	Etanolamina fosfotransferase	TcCLB.503979.10	691 aa	10	▲
<i>GPI13</i> (S)		TcCLB.507667.11 #§	308 aa	1	
<i>GAA1</i> (P)	GPI transamidase componente Gaa1	TcCLB.504069.60	462 aa	7	97%
<i>GAA1</i> (S)		TcCLB.511145.49	487 aa	7	
<i>GPI8</i> (P)	GPI transamidase componente Gpi8	TcCLB.511277.450	325 aa	1	▲
<i>GPI8</i> (S)		TcCLB.507993.5 #§	87 aa	0	
<i>GPI16</i> (P)	GPI transamidase componente Gpi16	TcCLB.503923.50 §	483 aa	1	◆
<i>GPI16</i> (S)		TcCLB.510877.180	684 aa	2	
<i>TTA1</i> (P)	GPI transamidase componente Tta1	TcCLB.510435.40	387 aa	1	97%
<i>TTA1</i> (S)		TcCLB.511545.190	436 aa	2	
<i>TTA2</i> (P)	GPI transamidase componente Tta2	TcCLB.508661.60	414 aa	6	▲
<i>TTA2</i> (S)		TcCLB.510293.79 §	276 aa	4	
<i>GPIdeAc2</i> (P)	GPI-inositol deacilase	TcCLB.508153.1040 #	804 aa	10	94%
<i>GPIdeAc2</i> (S)		TcCLB.506691.22 #	804 aa	9	
<i>IPCS</i> (P)	Inositolfosforilceramida sintase	TcCLB.510729.290	335 aa	5	95%
<i>IPCS</i> (S)		TcCLB.506885.124	335 aa	5	

O gene que codifica a proteína α -1,2-manosiltransferase IV não foi identificado.

* Haplótipos *non*-Esmeraldo-like (P) e Esmeraldo-like (S)

** Número de domínios transmembrana (TM)

*** Identidade entre proteínas codificadas pelos alelos *non*-Esmeraldo-like e Esmeraldo-like.

ni: não identificado

‡ Alelos *non*-Esmeraldo-like e Esmeraldo-like foram agrupados durante a montagem do genoma

Proteína hipotética

§ Sequência truncada

■ Alelo Esmeraldo-like apresenta códons de parada dentro da sequência

▲ Sequência do alelo Esmeraldo-like está truncada

◆ Sequência do alelo *non*-Esmeraldo-like está truncada

Tabela 3: Porcentagem de identidade entre as proteínas da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi* e de outros organismos.

Passo	Gene de <i>T. cruzi</i> (*)	Identidade com proteínas (**)		
		Levedura	Humano	<i>T. brucei</i>
Dolicol-fosfato manose sintase	<i>DPM1</i>	50% (DPM1)	31% (DPM1)	71% (DPMS)
N-acetilglucosamina transferase (GlcNAc-PI) (Passo 1)	<i>GPI1</i>	15% (GPI1)	16% (PIG-Q)	45% (GPI1)
	<i>GPI2</i>	14% (GPI2)	32% (PIG-C)	59% (GPI2)
	<i>GPI3</i>	41% (GPI3)	49% (PIG-A)	81% (GPI3)
	<i>GPI15</i>	12% (GPI15)	18% (PIG-H)	33% (GPI15)
	<i>GPI19</i>	10% (GPI19)	27% (PIG-P)	57% (GPI19)
	<i>DPM2</i>	–	17% (DPM2)	–
GlcNAc-PI de-N-acetilase (Passo 2)	<i>GPI12</i>	31% (GPI12)	32% (PIG-L)	52% (GPI12)
α -1,4-Manosiltransferase I (Passo 3)	<i>GPI14</i>	30% (GPI14)	30% (PIG-M)	63% (GPI14)
α -1,6-Manosiltransferase II (Passo 4)	<i>GPI18</i>	17% (GPI18)	20% (PIG-V)	55% (GPI18)
α -1,2-Manosiltransferase III (Passo 5)	<i>GPI10</i>	21% (GPI10)	24% (PIG-B)	59% (GPI10)
α -1,2-Manosiltransferase IV (?) (Passo 6)	<i>ni</i>	– (SMP3)	– (PIG-Z)	–
Etanolamina fosfotransferase (Passo 7)	<i>GPI13</i>	15% (GPI13)	21% (PIG-O)	49% (GPI13)
GPI transamidase (Passo 8)	<i>GAA1</i>	10% (GAA1)	13% (GAA1)	53% (GAA1)
	<i>GPI8</i>	31% (GPI8)	29% (PIG-K)	63% (GPI8)
	<i>GPI16</i>	8% (GPI16)	9% (PIG-T)	49% (GPI16)
	<i>TTA1</i>	–	–	45% (TTA1)
	<i>TTA2</i>	–	–	56% (TTA2)
GPI-inositol deacilase	<i>GPIdeAc2</i>	9% (BST1)	12% (PGAP1)	28% (GPIdeAc2)
Inositolfosforilceramida sintase	<i>IPCS</i>	10% (AUR1)	–	45% (SLS1)

(*) Os genes de *T. cruzi* utilizados para comparação de identidade referem-se ao alelo do haplótipo *non-Esmeraldo-like*, exceto para *TcGPI16* e *TcGPI19*, para os quais somente o alelo *Esmeraldo-like* foi identificado.

(**) Os nomes dos ortólogos de levedura, humano e *T. brucei* estão indicados entre parênteses.

ni: não identificado

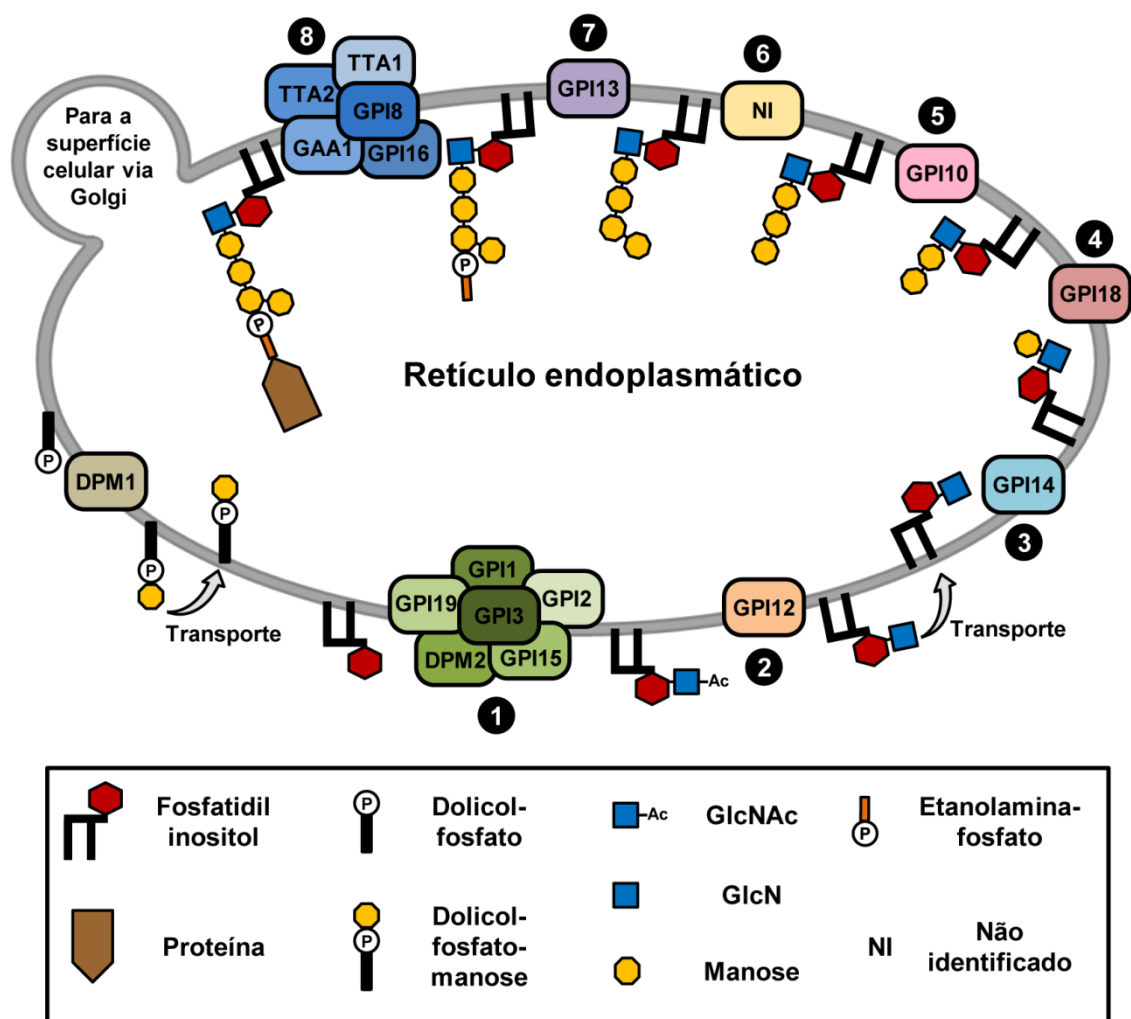


Figura 4: Via de biossíntese da âncora GPI no retículo endoplasmático de *T. cruzi*. No passo 1, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) é adicionada ao fosfatidilinositol e, nos passos seguintes, ocorrem a deacetilação e a adição de quatro resíduos de manose. Após a adição da etanolamina-fosfato na terceira manose (passo 7), ocorre a transferência da âncora GPI completa para a extremidade C-terminal da proteína (passo 8). O dolicol-fosfato manose atua como doador de manose para as quatro reações de manosilação, que são parte da biossíntese da âncora GPI. Apesar de não indicado na figura, glicoinositolfosfolipídios livres (GIPLs), também presentes na membrana de *T. cruzi*, são provavelmente subprodutos da mesma via de biossíntese de GPI.

O dolicol-fosfato manose sintase (DPM1), também denominado dolicol-fosfato- β -D-manosiltransferase, catalisa a transferência de uma manose a partir do GDP-manose para o dolicol-fosfato (Dol-P), gerando Dol-P-manose, um precursor essencial para a síntese da âncora GPI, utilizado como doador em todas as quatro reações de manosilação que ocorrem no lado luminal do RE e são parte da via de biossíntese de GPI (Orlean, 1990; Maeda e Kinoshita, 2008). Os dois ortólogos de *T. cruzi* apresentaram 50%, 31% e 71% de identidade de sequência com as proteínas de levedura, humano e *T. brucei*, respectivamente (esses números referem-se ao alelo *non-Esmeraldo-like*). Comparações entre DPM1 de vários organismos inicialmente resultaram em uma classificação em dois grupos baseadas nas suas estruturas de proteínas (Tomita et al., 1998; Colussi et al., 1997), porém, mais recentemente Shams-Eldin et al. (2008) propuseram a divisão do clado DPM em seis subgrupos principais. Junto com *S. cerevisiae*, *T. brucei* e *Leishmania mexicana* (Ilgoutz et al., 1999) e em contraste a DPM1 de *P. falciparum*, DPM1 de *T. cruzi* pertence a um grupo que inclui enzimas monoméricas, que tem uma região C-terminal hidrofóbica.

O complexo de glicosiltransferase, que é responsável pela transferência de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a partir de UDP-GlcNAc para fosfatidilinositol (PI) para gerar N-acetilglucosaminil-PI (GlcNAc-PI), tem seis e sete proteínas, respectivamente, em células de leveduras e mamíferos (Kinoshita e Inoue, 2000). *TcGPI3* foi identificado como o gene que codifica a subunidade catalítica do complexo de glicosiltransferase de *T. cruzi*, uma vez que compartilha 41% e 49% de identidade de sequência com as proteínas

GPI3 de levedura e PIG-A de mamífero, respectivamente. Similar às proteínas de mamíferos e de levedura, GPI3 de *T. cruzi* contém um domínio de glicosiltransferase grupo 1 presente em muitas glicosiltransferases de especificidades amplamente diferentes (Pfam PF00534), bem como um segundo domínio (Pfam PF08288), que é compartilhado entre enzimas que transferem GlcNAc à PI (Pittet e Conzelmann, 2007). Entre os outros cinco componentes do complexo de glicosiltransferase presentes em levedura, foram identificados os ortólogos de *T. cruzi* de GPI1, GPI2, GPI15 e GPI19 (nomeados de PIG-Q, PIG-C, PIG-H e PIG-P em mamíferos). Em células de mamíferos, DPM2, uma subunidade não catalítica do complexo de dolicol-fosfato manose sintase, está fisicamente associada com as proteínas PIG-A, PIG-C e PIG-Q e aumenta a atividade de transferência de GlcNAc (Watanabe et al., 2000). Foi identificado um gene de *T. cruzi* que codifica uma proteína com 17% de identidade com DPM2 de humano, contendo dois domínios transmembrana e um domínio DPM2, que provavelmente atua como um componente regulatório do complexo de N-acetilglucosamina transferase. Apenas um componente deste complexo, nomeado de ERI1 em levedura (Sobering et al., 2004) e PIG-Y em mamífero (Murakami et al., 2005), não foi identificado no genoma de *T. cruzi*. Como ortólogos desse gene também não foram identificados em *P. falciparum* e em *T. brucei*, pode-se especular que, em protozoários, este componente pode não ser requerido para a atividade do complexo de glicosiltransferase em *T. cruzi*.

Foi também identificado em *T. cruzi* um ortólogo de GPI12 de levedura, chamado de PIG-L em mamíferos (Watanabe et al., 1999), que

codifica a enzima responsável pela de-N-acetilação de GlcNAc-PI. A proteína de *T. cruzi* possui 252 aminoácidos e um domínio transmembrana e apresenta 52% de identidade de sequência com a proteína GPI12 de *T. brucei*.

Como representado na Figura 4, as duas primeiras reações da via de biossíntese de GPI ocorrem no citoplasma da célula do parasito, enquanto que as reações de manosilação ocorrem no lúmen do RE. Depois da deacetilação, os precursores de GPI são transportados através da membrana do RE para o lúmen dessa organela, em um passo que requer distintas flipases (Sanyal et al., 2008). Em algumas células, a adição de resíduos de manose a GlcN-PI, depois de este precursor estar no lúmen do RE, requer a acilação do anel de inositol. Em células de mamífero e levedura, a adição de um grupo acil a GlcN-PI constitui o terceiro passo na biossíntese de GPI, precedendo a primeira manosilação, e, logo após a ligação de GPIs às proteínas, este grupo é removido (Murakami et al., 2003). Em contraste, a acilação do inositol em *T. brucei* ocorre apenas após a adição da primeira manose (Güther e Ferguson, 1995). Além disso, acredita-se que a acilação e a desacilação do inositol ocorre repetidamente durante a biossíntese, porque ambos os intermediários de GPI acilados e não acilados existem durante a transferência da Man2 e Man3 para intermediários de GPI (Hong et al., 2006a). Embora as análises de precursores de GPI de *T. cruzi*, sintetizados em sistemas livres de células, indicaram que este organismo também tem a capacidade para acilar o anel de inositol (Heise et al., 1996), as sequências que codificam a enzima responsável pela acilação do anel de inositol, chamada de *PIG-W* em mamíferos e *GWT1* em leveduras (Murakami et al., 2003; Umemura et al., 2003), não foram identificadas em *T.*

cruzi ou *T. brucei* (Fujita e Kinoshita, 2010). Apesar disso, os dois alelos que codificam o ortólogo da enzima responsável pela desacilação do inositol, nomeadas de BST1 em levedura, PGAP1 em humano e GPIdeAc2 em *T. brucei* (Tanaka et al., 2004; Hong et al., 2006a), foram encontrados no genoma de *T. cruzi* (Tabela 2).

Todos os três genes que codificam manosiltransferases, responsáveis pela adição do primeiro, segundo e terceiro resíduos de manose a GlcN-PI e nomeados de *TcGPI14* (α -1,4-manosiltransferase I), *TcGPI18* (α -1,6-manosiltransferase II) e *TcGPI10* (α -1,2-manosiltransferase III), foram identificados no genoma de *T. cruzi*. Todas as manosiltransferases preditas de *T. cruzi* têm múltiplos domínios transmembranas potenciais intercalados com pequenos *loops* hidrofílicos. É importante notar que nenhum ortólogo de *T. cruzi* que codifica a enzima responsável pela adição do quarto resíduo de manose (passo 6) foi identificado. Esta reação é catalisada por uma α -1,2-manosiltransferase, nomeada de SMP3 em levedura e PIG-Z em humano. Vale ressaltar que *TcGPI10* e *SMP3* de levedura e *PIG-Z* de humano têm o mesmo domínio funcional (Pfam PF03901). Como em *T. cruzi*, também não foi encontrado o ortólogo do gene *SMP3* em *P. falciparum*, embora a presença de um quarto resíduo de manose tenha sido identificada em estudos estruturais da âncora GPI em ambos os organismos (Previato et al., 2004; Delorenzi et al., 2002; Güther et al., 1992;). Adicionalmente, os genes que codificam um componente essencial do complexo de manosiltransferase I, chamado PBN1 em leveduras e PIG-X em mamíferos, não foram identificados em *T. cruzi* ou *T. brucei* (Ashida et al., 2005; Kim et al., 2007). Uma vez que as proteínas

preditas de *T. cruzi* apresentam identidades de sequências com as proteínas de humano e levedura, variando de 17% a 30%, para alguns destes genes, ensaios funcionais são necessários para confirmar estas predições.

A adição de etanolamina-fosfato (EtNP) ao terceiro resíduo de manose a partir de fosfatidiletanolamina (PE) (passo 7) resulta na estrutura em que a proteína será ligada a GPI. As principais diferenças entre células de levedura, mamíferos e protozoários são encontradas no número de EtNP que são incorporadas nos resíduos de manose. Em mamíferos e leveduras, existem três enzimas que adicionam EtNP a manoses: PIG-N/MCD4 (adição de EtNP a Man1), PIG-G/GPI7 (Man2) e PIG-O/GPI13 (Man3) (Fujita e Kinoshita, 2010). Em *T. cruzi*, *T. brucei* e *P. falciparum*, a adição de EtNP ocorre apenas no terceiro resíduo de manose (Fujita e Kinoshita, 2010; Delorenzi et al., 2002) e, como esperado, somente o ortólogo *GPI13* de *T. cruzi* foi identificado. Entretanto, também tem sido demonstrado em diferentes linhagens de *T. cruzi*, que as proteínas ligadas a GPI, bem como GIPLs livres, têm 2-aminoetilfosfanato (AEP) substituindo a EtNP no terceiro resíduo manose e que um AEP adicional está ligada ao GlcN em âncoras GPI de *T. cruzi* (Previato et al., 1995; Nakayasu et al., 2009; Buscaglia et al., 2004; de Lederkremer e Agusti, 2009).

Depois de completamente montada, a âncora GPI é transferida para o C-terminal de proteínas, em uma reação mediada pelo complexo transamidase que cliva o peptídeo sinal de ligação a GPI da proteína nascente. Em humano e levedura, este complexo é composto por cinco proteínas de membrana do RE, PIG-K/GPI8, PIG-T/GPI16, PIG-S/GPI17, PIG-U/GAB1 e

GAA1 (Orlean e Menon, 2007), em que GPI8 é considerada a subunidade catalítica do complexo (Kinoshita e Inoue, 2000; Benghezal et al., 1996). GPI8, bem como GPI16, tem um grande domínio luminal e um único domínio transmembrana. GPI16 está ligado a GPI8 através de uma ponte de dissulfeto (Ohishi et al., 2001; 2003). GAA1 codifica uma proteína com vários domínios transmembrana, que é requerida para ligar o substrato lipídico de GPI ao complexo transamidase (Ohishi et al., 2000). GPI17/PIG-S não tem função conhecida. GAB1 (também chamado CDC91) pode estar envolvida no reconhecimento do sinal de ligação a GPI ou da porção lipídica de GPI (Hong et al., 2003). Como indicado na Tabela 2, os ortólogos de *GPI8*, *GAA1* e *GPI16* de *T. cruzi* foram identificados. Embora ortólogos de *GPI17* e *GAB1* não foram identificadas em outros tripanosomatídeos, os genes que codificam para outros dois componentes do complexo de transamidase, conhecidos como tripanosomatídeo transamidase 1 (*TTA1*) e *TTA2*, também foram encontrados em *T. cruzi* (Nagamune et al., 2003).

Além das diferenças no núcleo glicano, em âncoras GPI de *T. cruzi*, o fosfatidilinositol pode ser substituído por inositolfosforilceramida (IPC), uma molécula presente em plantas e fungos, mas ausente em mamíferos (de Lederkremer et al., 2011). Esta mudança na porção lipídica da âncora ocorre principalmente durante a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas (Serrano et al., 1995). Embora não seja considerada parte da via de biossíntese de GPI, a IPC sintase de *T. cruzi* é considerada um alvo altamente atrativo para o desenvolvimento de drogas (Figueiredo et al., 2005). Baseado nessa premissa, Denny et al. (2006) identificaram o ortólogo de

AUR1, que codifica o gene da IPC sintase de levedura (Heidler e Radding, 1995), em *Leishmania major* e duas sequências proximamente relacionadas de *T. cruzi*, que codificam proteínas que compartilham 52-53% de identidade com a IPC sintase de *Leishmania*. Nossas análises confirmaram que as duas sequências descritas por Denny et al. (2006) correspondem aos dois alelos do gene de IPC sintase (*TcIPCS*) de *T. cruzi*, que apresenta sintonia com os ortólogos de *L. major* e *T. brucei*.

4.2. Análise da expressão de mRNA de genes da via GPI de *T. cruzi*

Para determinar os níveis de expressão de mRNA de genes da via de biossíntese de GPI em diferentes estágios de vida do parasito, sequências que codificam as enzimas TcGPI8 e TcGPI10 foram utilizadas como sondas em hibridações de *Northern blot*, usando RNA total purificado a partir de formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do parasito. As membranas contendo o RNA total também foram hibridadas com uma sonda para o rRNA 24S α , como controle da quantidade de RNA aplicado no gel.

Como indicado na Figura 5, os transcritos com 1.300 nt e 2.100 nt, aproximadamente, correspondendo aos mRNAs de *TcGPI8* e *TcGPI10* foram detectados em todos os três estágios do ciclo de vida do parasito. Como esperado, níveis elevados de ambos os transcritos foram encontrados nos dois estágios proliferativos, epimastigota e amastigota, em comparação ao estágio não proliferativo e infectivo, tripomastigota.

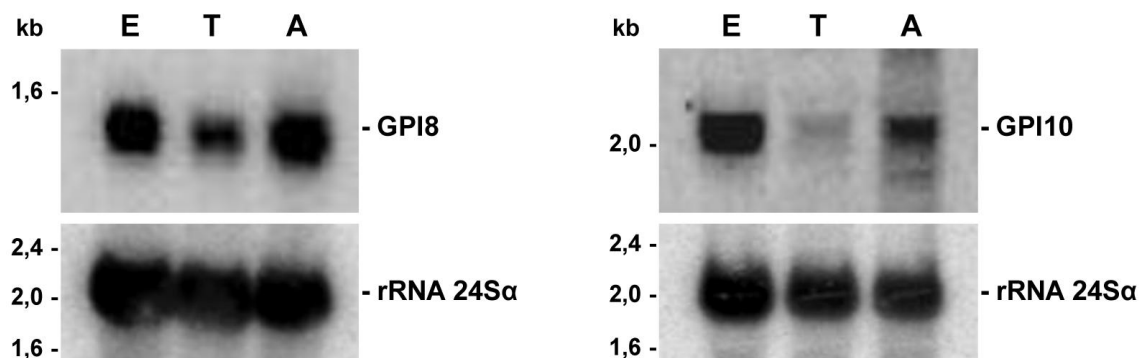


Figura 5: Expressão de mRNA de genes que codificam enzimas da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi*. O RNA total extraído a partir de formas epimastigotas (E), tripomastigotas (T) e amastigotas (A) foram separados em géis de agarose, transferidos para membranas de *nylon* e hibridados com sondas marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ específicas para os genes *TcGPI8* e *TcGPI10*. A porção inferior da figura mostra a hibridação com uma sonda para rRNA 24S α , usado como controle de carregamento. Os tamanhos das bandas de RNA ribossomal estão indicados à esquerda.

4.3. Localização celular das enzimas envolvidas na biossíntese de GPI em *T. cruzi*

Para fornecer uma evidência adicional do papel das proteínas codificadas pelos genes de *T. cruzi*, identificados através da análise *in silico* como componentes da via de biossíntese de GPI, foi determinada a localização subcelular de três destas proteínas fusionadas ao N-terminal de GFP em epimastigotas de *T. cruzi*. As regiões codificantes dos genes *TcDPM1* (793 pb), *TcGPI3* (1.368 pb) e *TcGPI12* (759 pb) foram previamente clonadas no vetor

de expressão em *T. cruzi* pTREXnGFP (DaRocha et al., 2004) e, após a transfecção em epimastigotas, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. Para verificar a localização dessas proteínas no RE, foi utilizado o anticorpo anti-BiP de *T. brucei* para marcar o retículo endoplasmático de *T. cruzi*. A proteína BiP (*binding protein*) é um membro da família de proteínas hsp70 e encontra-se solúvel no lúmen do retículo endoplasmático (Bangs et al., 1993). O anticorpo primário anti-BiP foi reconhecido pelo anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 555 e o núcleo e o cinetoplasto do parasito foram marcados com DAPI. Em seguida, as células foram examinadas por microscopia de fluorescência e microscopia confocal.

Conforme mostrado na Figura 6, as três proteínas em fusão com GFP colocalizaram com BiP nos parasitos transfectados, indicando uma localização compatível com o retículo endoplasmático do parasito. Diferente do controle, no qual parasitos transfectados com o pTREXnGFP apresentaram uma fluorescência verde dispersa em todo o citoplasma do parasito. Resultados semelhantes foram obtidos com análises de microscopia confocal, confirmando assim que estas enzimas são parte da via biossintética de GPI.

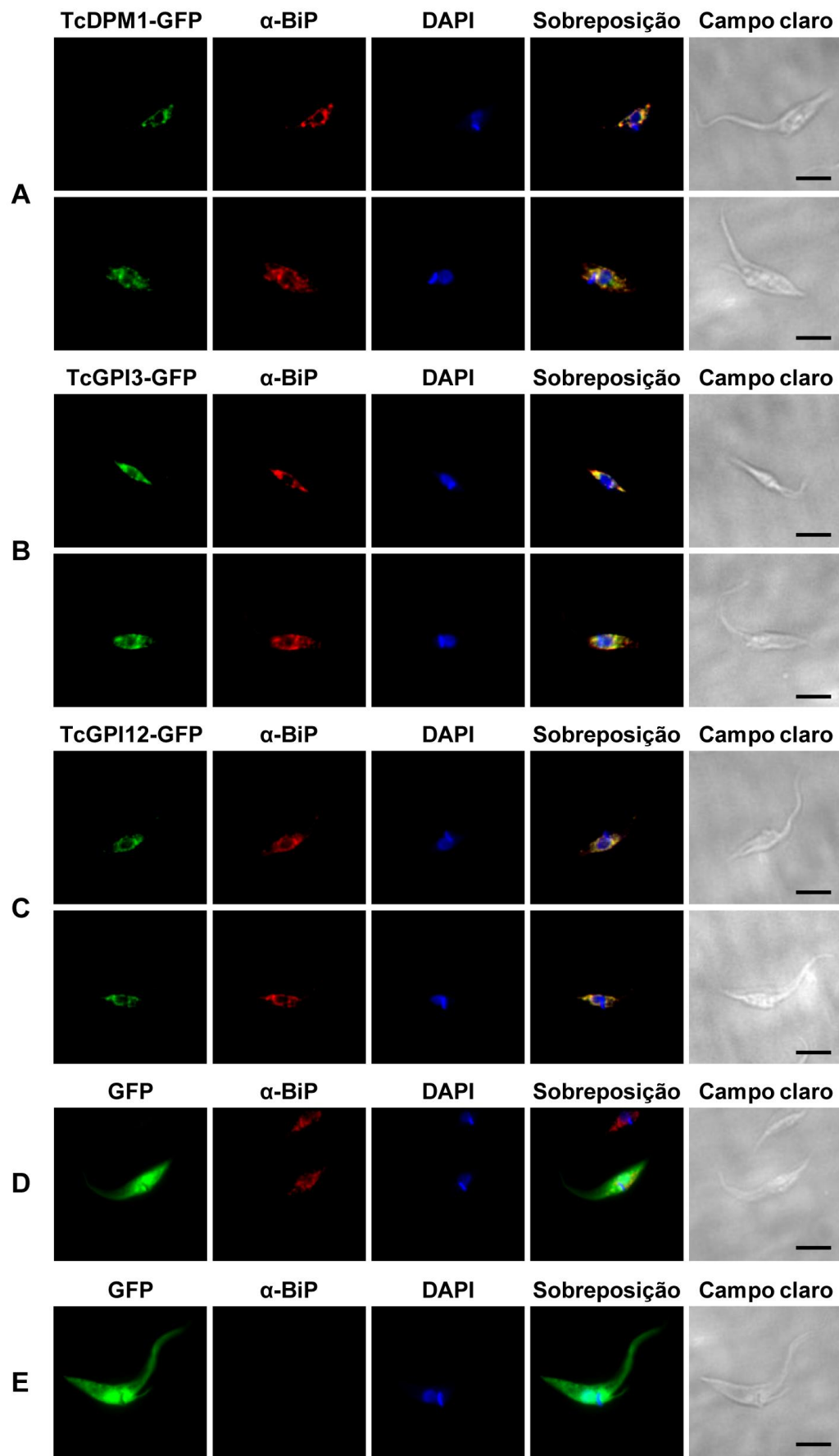


Figura 6: Localização celular de enzimas da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi*. Epimastigotas foram transientemente transfectadas com os plasmídeos pTREX-TcDPM1-GFP (A), pTREX-TcGPI3-GFP (B), pTREX-TcGPI12-GFP (C) ou pTREXnGFP, como controle, (D) e (E). Parasitos transfectados foram fixados e incubados com o marcador de retículo endoplasmático anti-BiP e com o anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 555. As células também foram coradas com DAPI, marcando o DNA nuclear e o cinetoplasto. Como controle negativo (E), os parasitos não foram incubados com o anticorpo primário anti-BiP. Barras de escala: 5 µm.

4.4. Complementação heteróloga dos mutantes condicionalmente letais de *S. cerevisiae*

Um dos principais objetivos deste trabalho é desenvolver uma estratégia para o *screening* em larga escala de drogas capazes de inibir de forma específica as enzimas envolvidas na via de biossíntese de GPI de *T. cruzi*. *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizada para expressar proteínas heterólogas a partir de diversos parasitos, incluindo *Leishmania* spp. e *T. brucei* (Bilsland et al., 2011). Portanto, não somente para verificar a função dos genes de *T. cruzi*, mas também para obter células de levedura, expressando enzimas alvo de *T. cruzi*, para futuros ensaios de *screening* de drogas, experimentos de complementação heteróloga de mutantes condicionalmente letais de leveduras com os genes de *T. cruzi* foram realizados.

Mutantes de leveduras deficientes para cada gene da via de biossíntese de GPI, obtidos como descrito a seguir, foram transformados com o vetor de expressão pRS426Met25, contendo as sequências que codificam os genes *TcDPM1*, *TcGPI3*, *TcGPI12*, *TcGPI14*, *TcGPI10*, *TcGAA1*, *TcGPI8* e *TcIPCS* de *T. cruzi* e seus respectivos ortólogos em *S. cerevisiae*, utilizados como controle positivo. As células transformadas foram estriadas em placas em meio mínimo sem histidina, contendo galactose (SGR) ou glicose (SD), e incubadas a 30 °C.

Estes mutantes foram construídos pela substituição do promotor endógeno de cada um dos genes de GPI pelo promotor GAL1, resultando em linhagens de células de levedura que somente podem crescer na presença de galactose (Mazhari-Tabrizi et al., 1999). Ao inibir a expressão dos genes endógenos de GPI em meio contendo glicose, a complementação de células de levedura com os genes de *T. cruzi* pode ser facilmente verificada através da comparação do crescimento das colônias transformadas em meio contendo glicose e galactose.

Foram testados oito genes de *T. cruzi* para os quais mutantes condicionalmente letais de leveduras estavam disponíveis. Três desses genes, *TcDPM1*, *TcGPI10* e *TcGPI12*, quando transformados em levedura, restauraram o crescimento em condições não permissivas (meio contendo glicose), indicando que essas proteínas são homólogas às proteínas de leveduras (Figura 7 e Tabela 4). Para todos os mutantes de leveduras testados, foi verificado que a transformação com plasmídeos contendo os genes ortólogos de levedura permitiam o crescimento em meio contendo glicose. Na

Figura 7, as placas contendo galactose e uracila (meio não restritivo) são os controles positivos do experimento, na qual todas as leveduras (mutantes e complementadas) crescem devido à expressão do GPI-endógeno, exceto as leveduras tipo selvagem (WT), que têm deficiência de histidina, portanto, não crescem em meio ausente deste aminoácido. As placas contendo glicose e uracila são um controle adicional ao experimento, para comprovar que o crescimento das leveduras transformadas com os genes de *T. cruzi* foi devido a complementação da função pelos genes do parasito e não devido a transformação com o plasmídeo pRS426Met25, que possui o gene *ura3* que codifica para uma enzima da via de biossíntese da uracila.

Os genes *TcGPI3*, *TcGPI14*, *TcGAA1*, *TcGPI8* e *TcIPCS* foram incapazes de restaurar o crescimento dos respectivos mutantes de leveduras em condições não permissivas, indicando que as diferenças nas sequências nucleotídicas entre os genes ortólogos da levedura e do parasito podem estar diretamente envolvidas nas funções específicas desencadeadas por essas proteínas nos dois organismos. Com o objetivo de verificar se, nesses mutantes, a expressão dos genes heterólogos ocorreu como previsto, foram realizadas análises de RT-PCR que possibilitam detectar a presença dos mRNAs específicos para esses genes nas leveduras.

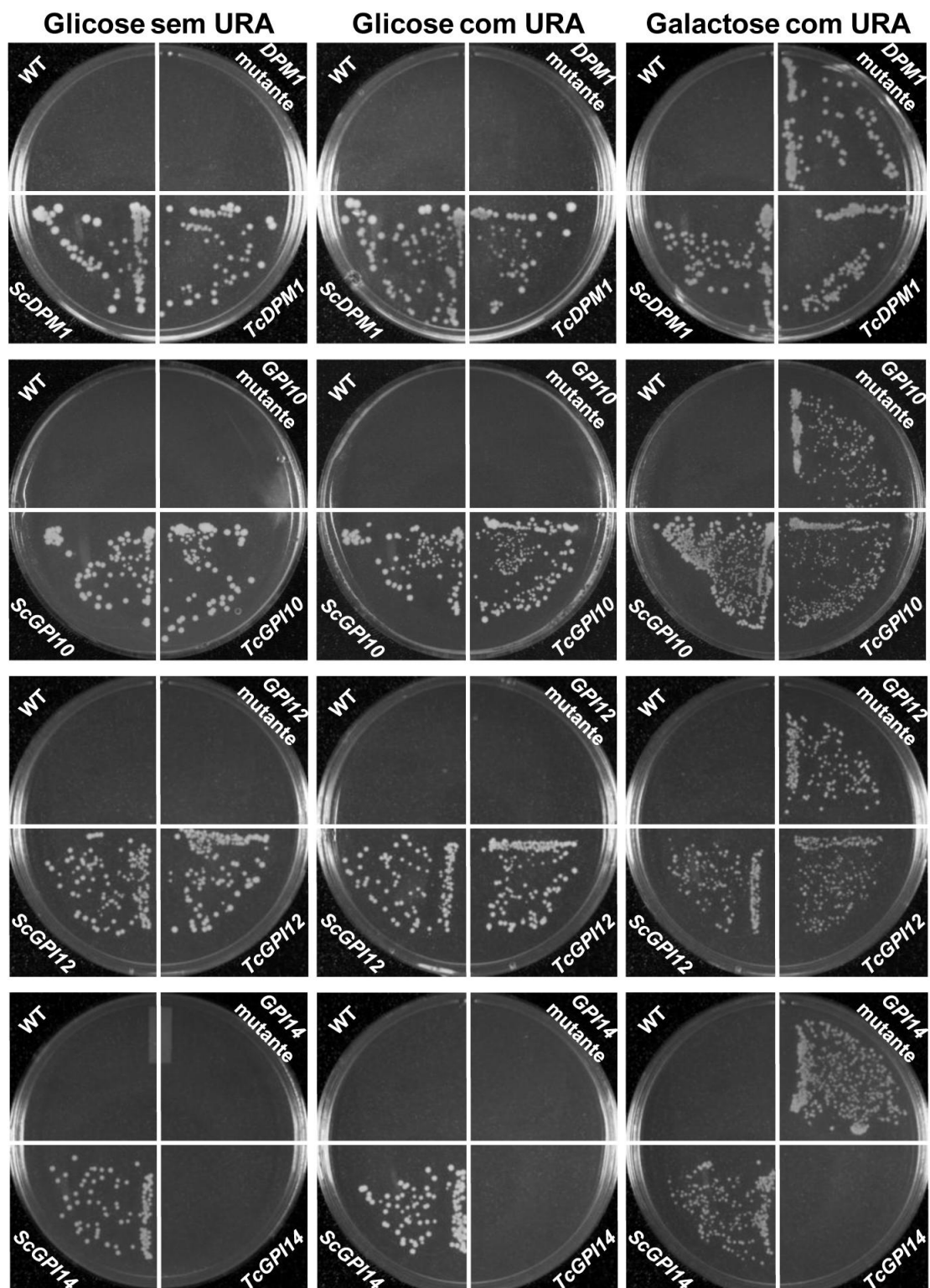


Figura 7: Complementação de mutantes de *S. cerevisiae* pelos genes que codificam enzimas da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi*. Mutantes condicionalmente letais de leveduras foram transformados com plasmídeos pRS426Met25, carregando genes de *T. cruzi* ou de *S. cerevisiae*, que codificam as enzimas DPM1, GPI10 e GPI12. Os genes de *S. cerevisiae* foram usados como controle da complementação. Leveduras tipo selvagem (WT), mutantes não transformados ou mutantes transformados com os genes de *T. cruzi* (Tc) ou de *S. cerevisiae* (Sc) foram plaqueados em meio contendo glicose, com ou sem uracila, ou meio contendo galactose (com uracila) e incubados a 30 °C. Na parte inferior da figura, estão mostradas as leveduras mutantes para o gene *GPI14* transformadas com o plasmídeo pRS426Met25 contendo o gene de *T. cruzi* (*TcGPI14*), que não foi capaz de restaurar o crescimento celular dessas leveduras.

Tabela 4: Complementação funcional de mutantes condicionalmente letais de *S. cerevisiae* pelos genes da via GPI de *T. cruzi*.

Mutantes de levedura	pRS Tc
YPH 499 DPM1	+
YPH 499 GPI3	-
YPH 499 GPI12	+
YPH 499 GPI14	-
YPH 499 GPI10	+
YPH 499 GAA1	-
YPH 499 GPI8	-
YPH 499 AUR1	-

O símbolo (+) indica a habilidade dos mutantes transformados crescerem em meio não permissivo contendo glicose e o símbolo (-) indica a ausência de crescimento.

A expressão de três genes de *T. cruzi* (*TcGPI8*, *TcIPCS* e *TcGPI3*) transformados em mutantes de levedura, para os quais não se observou a complementação, ou seja, que as leveduras não cresceram em meio não permissivo, mostrou que nesses mutantes os genes de *T. cruzi* foram expressos como esperado. Como controle positivo, foi analisada a expressão de *TcDPM1* em leveduras mutantes nas quais a complementação com o gene de *T. cruzi* foi observada. Como mostrado na Figura 8, transcritos derivados dos genes de *TcGPI8*, *TcIPCS*, *TcGPI3* ou *TcDPM1* de *T. cruzi*, bem como a partir dos genes ortólogos de levedura (*ScGPI8* e *ScAUR1*), foram detectados nas leveduras mutantes correspondentes que crescem em meio contendo

galactose, exceto, a levedura complementada com *TcDPM1*, que cresceu em meio não permissivo, contendo glicose. Desse modo, as análises por RT-PCR indicaram que a incapacidade desses mutantes de crescerem na presença de glicose não é devido à ausência de expressão dos genes de *T. cruzi* nas leveduras transformadas.

Para avaliar se a expressão das enzimas de *T. cruzi* em levedura resultou na síntese correta da âncora GPI pelos mutantes complementados, análises de SDS-PAGE e fluorografia de proteínas de leveduras contendo [2-³H]myo-inositol foram realizadas. Como indicado na Figura 9, após 1 h de crescimento em meio contendo glicose e [2-³H]myo-inositol, um padrão complexo de proteínas é visualizado por fluorografia em células tipo selvagem (WT), bem como em mutantes de levedura que expressam os genes de *T. cruzi*. Os padrões de proteínas em leveduras mutantes, que expressam os genes *TcDPM1*, *TcGPI10* e *TcGPI12*, crescidos em meio contendo glicose, foram indistinguíveis do padrão observado com as moléculas sintetizadas por leveduras WT ou mutantes transformadas com os genes ortólogos de levedura. Apenas um sinal muito mais fraco foi detectado em mutantes de levedura não transformados, indicando que a expressão dos ortólogos de *T. cruzi*, que codificam enzimas da via de biossíntese de GPI, restaurou a capacidade dos mutantes de sintetizar moléculas de GPI.

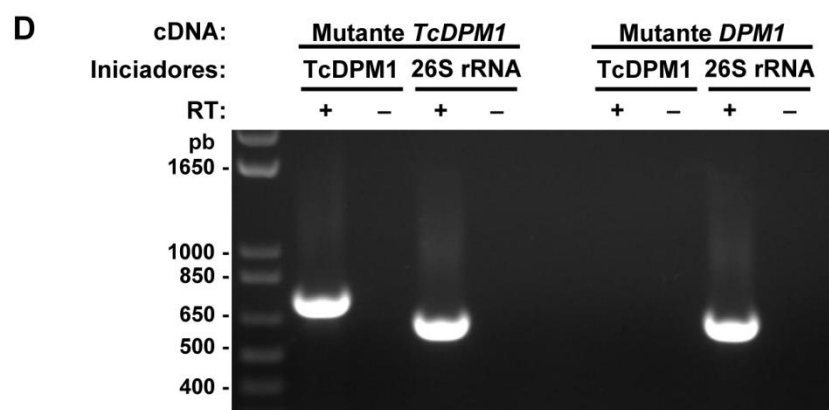
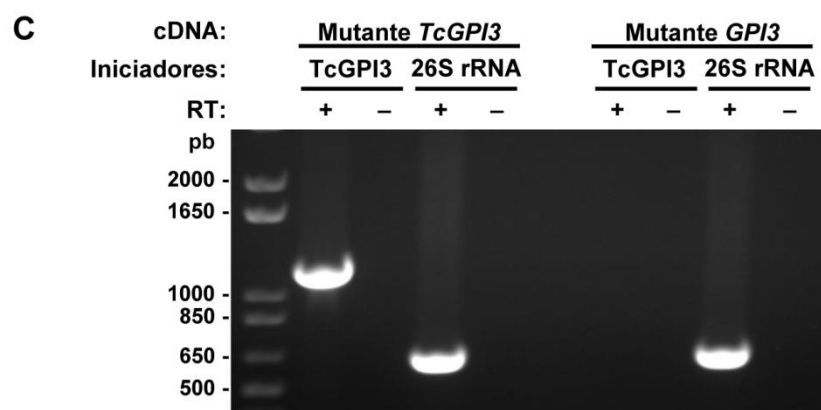
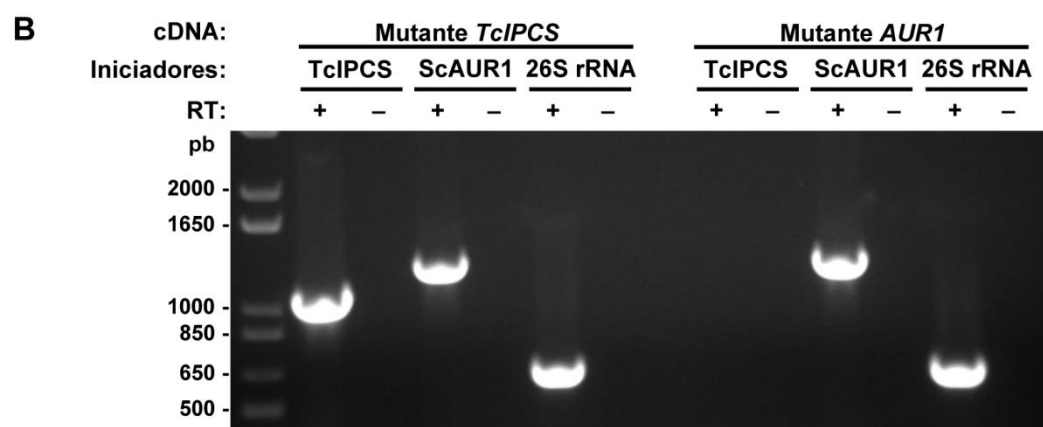
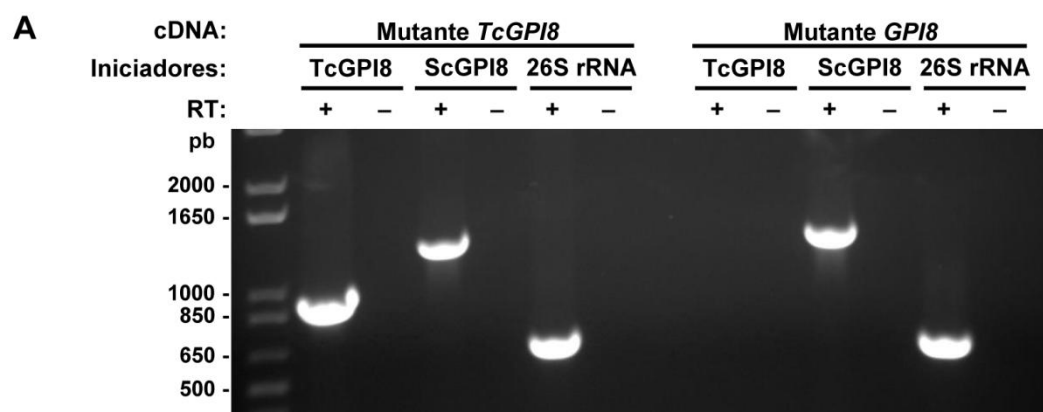


Figura 8: Análises da expressão de mRNA por RT-PCR dos mutantes de levedura transformados com os genes da via GPI de *T. cruzi*. Transcrição reversa e amplificação por PCR (RT-PCR) do RNA total isolado, a partir de mutantes de levedura não transformados (mutantes *GPI8*, *AUR1*, *GPI3* e *DPM1*) ou mutantes de leveduras transformados com os genes de *T. cruzi* (mutantes *TcGPI8*, *TcIPCS*, *TcGPI3* e *TcDPM1*), foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. Os mutantes não transformados ou transformados com os genes de *T. cruzi* foram cultivados em meio contendo galactose, exceto os mutantes transformados com o gene de *TcDPM1*, que cresceram em meio contendo glicose e foram utilizados como controle positivo. Para cada amostra de RNA, os pares de iniciadores utilizados para a amplificação do cDNA são indicados acima de cada canaleta do gel. Foi também indicado se os fragmentos amplificados foram gerados na presença (+) ou na ausência (-) da enzima transcriptase reversa (RT). Marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

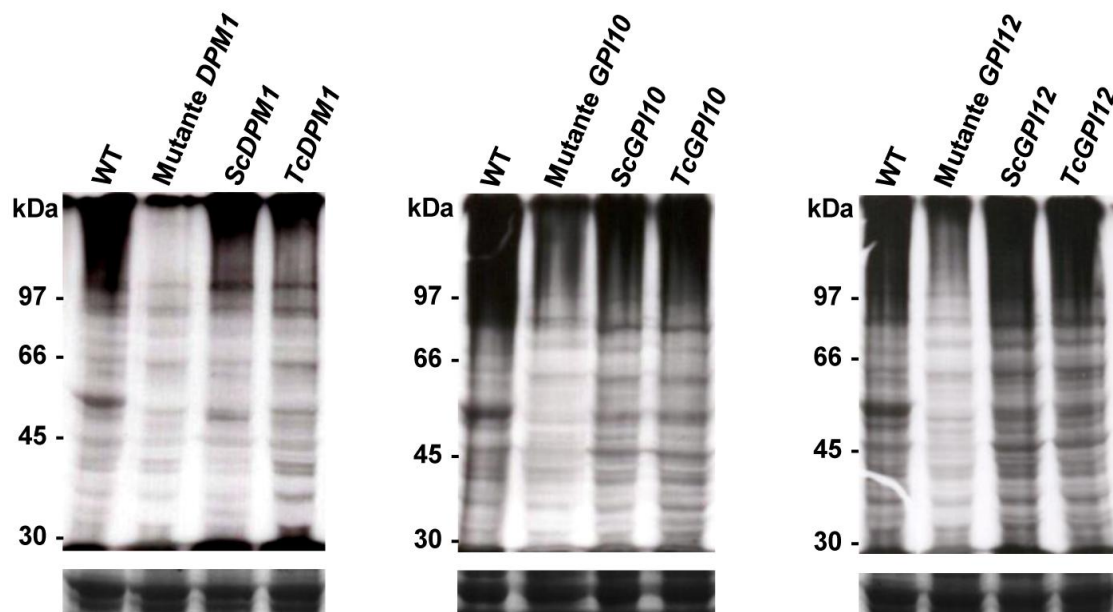


Figura 9: SDS-PAGE e fluorografia das proteínas ancoradas a GPI sintetizadas pelas leveduras mutantes, expressando os genes de *T. cruzi*.

Leveduras tipo selvagem (WT), mutantes de levedura não transformados e transformados com os plasmídeos contendo os correspondentes genes de levedura (*ScDPM1*, *ScGPI10* ou *ScGPI12*) ou os genes de *T. cruzi* (*TcDPM1*, *TcGPI10* ou *TcGPI12*), foram cultivadas em meio contendo glicose na presença de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{myo}$ -inositol, durante 1 h. O extrato total de proteínas foi carregado no gel de poliacrilamida 10% e as proteínas marcadas foram visualizadas por fluorografia (porção superior da figura). Como controle de carregamento, os géis contendo quantidades equivalentes de proteínas totais foram corados com *Coomassie Blue* (porção inferior da figura). Mutantes *DPM1*, *GPI10* e *GPI12* não transformados foram cultivados na presença de galactose, durante 2 dias e, em seguida, transferidos para um meio contendo glicose, durante 16 horas antes da adição de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{myo}$ -inositol. Marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

Adicionalmente, para verificar a presença da âncora GPI nos mutantes de leveduras complementados com os genes de *T. cruzi*, cromatografia em camada delgada (TLC) de glicolipídios marcados com [2-³H]myo-inositol foi realizada. Leveduras WT e mutantes complementados com os genes de *T. cruzi* e de *S. cerevisiae* foram crescidas em meio contendo glicose na presença de [2-³H]myo-inositol por 1 h e 30 min. Após extração dos glicolipídios, as amostras foram separadas por TLC e expostas a filmes autorradiográficos. Conforme indicado na Figura 10, o precursor completo (CP2) da âncora GPI foi detectado tanto nas leveduras WT, como nos mutantes complementados com os genes de *T. cruzi* e de *S. cerevisiae*, confirmando que a expressão das enzimas de *T. cruzi* resgataram a capacidade dos mutantes de sintetizar a âncora GPI. O precursor completo corresponde à âncora completamente formada, mas sem proteínas ancoradas. No entanto, outras moléculas aparecem marcadas na autorradiografia, pois o inositol está presente em outros lipídios e não apenas na âncora GPI (Fraering et al., 2001; Imhof et al., 2000; Sipos et al., 1994). Para confirmar esses resultados, o experimento de TLC deve ser repetido e um controle negativo, utilizando leveduras mutantes não transformadas, cultivadas em meio restritivo, deve ser adicionado. Tratamentos químicos, como hidrólise alcalina, e enzimáticos, como clivagem com fosfatidilinositol-fosfolipase C (PI-PLC) ou fosfolipase D (PLD), podem também ser realizados para confirmar as identidades das moléculas correspondentes às bandas presentes na radiografia da TLC.

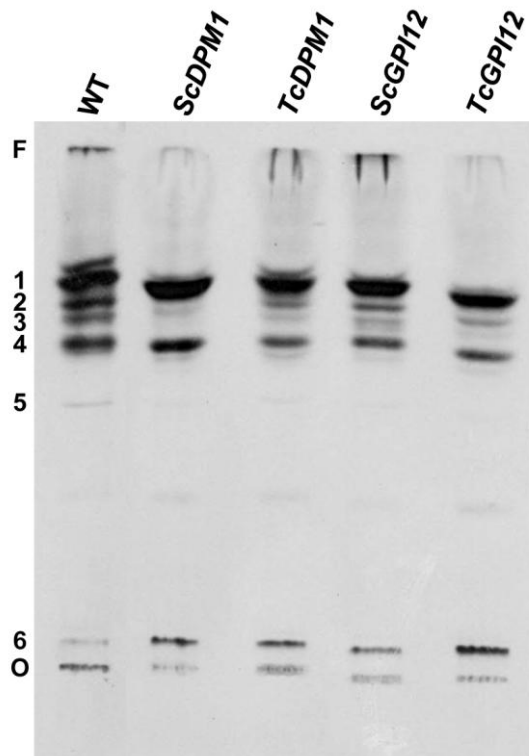


Figura 10: Cromatografia em camada delgada (TLC) dos glicolipídios das leveduras mutantes complementadas com os genes da via GPI de *T. cruzi*. Leveduras tipo selvagem (WT) e mutantes transformados com os plasmídeos contendo os genes de levedura (*ScDPM1* ou *ScGPI12*) ou de *T. cruzi* (*TcDPM1* ou *TcGPI12*), foram cultivadas em meio contendo glicose na presença de [2-³H]*myo*-inositol, durante 1 h e 30 min. Após extração, os glicolipídios marcados com [2-³H]*myo*-inositol foram analisados por TLC em placas de sílica, utilizando a mistura de solventes clorofórmio/metanol/água (4:4:1). Após exposição das placas a filmes autorradiográficos, as bandas observadas foram: (1) fosfatidilinositol (PI); (2) inositolfosforilceramida (IPC); (3) manosil-inositolfosforilceramida (MIPC); (4) lisofosfatidilinositol (LysoPI); (5) manosil-diinositolfosforilceramida (M(IP)₂C); (6) precursor completo de GPI (CP2). (O) indica a origem e (F) a frente do solvente.

4.5. Expressão, em *E. coli*, de proteínas recombinantes da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi*

A partir de análises das sequências dos genes presentes no banco de dados de *T. cruzi* (TriTypDB), foram selecionados 4 genes da via de biossíntese de GPI do clone CL Brener que continham baixo número de domínios transmembrana para a clonagem em vetores de expressão bacterianos. Oligonucleotídeos iniciadores específicos, contendo em suas extremidades sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, foram construídos e fragmentos dos genes *TcDPM1* (717 pb), *TcGPI3* (1.140 pb), *TcGPI8* (915 pb) e *TcGPI12* (696 pb) foram amplificados por PCR, purificados e clonados no vetor pRC2.1TOPO (Life Technologies). Em seguida, esses plasmídeos foram digeridos com *EcoRI* e *XhoI* e os insertos foram subclonados no vetor para expressão em *E. coli*, pET-21a(+) (Novagen), que possibilita a expressão de proteínas contendo uma cauda de histidinas na porção C-terminal.

Após sequenciamento dos plasmídeos para confirmação da correta inserção do gene no vetor em fusão com a cauda de histidinas, as células competentes de *E. coli*, linhagem BL21-AI, foram transformadas e a indução da expressão das proteínas recombinantes foi realizada pela adição de L-arabinose e IPTG. A expressão da T7 RNA polimerase na bactéria BL21-AI é induzida pela L-arabinose e a indução do promotor T7, que comanda a expressão de genes clonados no vetor pET-21a(+), é realizada pelo IPTG ao se ligar no repressor *lac*, sintetizado a partir do gene *lacI*.

As alíquotas de extratos protéicos das culturas de bactérias expressando as proteínas recombinantes foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%. Após coloração do gel com *Coomassie Blue*, podem ser observadas as bandas de indução das proteínas TcDPM1, TcGPI3 e TcGPI12 com tamanho aproximado de 27, 43 e 26 kDa, respectivamente (Figura 11). Não foi possível induzir a expressão de TcGPI8, utilizando os sistemas de expressão BL21-AI e BL21 Star (DE). Portanto, novos experimentos, variando as condições de indução, como tempo e temperatura, além do sistema de expressão, são necessários para a obtenção da proteína recombinante TcGPI8.

Após a verificação da indução das proteínas recombinantes por SDS-PAGE, as bactérias foram lisadas e uma alíquota do sobrenadante e do precipitado, ressuspendido em PBS, foi analisada por SDS-PAGE 12,5% para verificar em qual fração as proteínas recombinantes estavam presentes. Como mostrado na Figura 12, as proteínas TcGPI3 e TcGPI12 encontram-se na porção insolúvel do lisado celular. Portanto, testes de solubilidade utilizando diferentes concentrações de ureia, bem como a indução em bactérias que não formam corpos de inclusão são alternativas para gerar proteínas solúveis.

Posteriormente, as proteínas recombinantes produzidas serão purificadas por cromatografia de afinidade utilizando colunas de níquel capazes de ligar às caudas de histidinas fusionadas às proteínas. Uma vez purificadas, essas proteínas serão utilizadas para a produção de anticorpos assim como para a realização de análises estruturais, por meio de métodos cristalográficos e de difração de raios X.

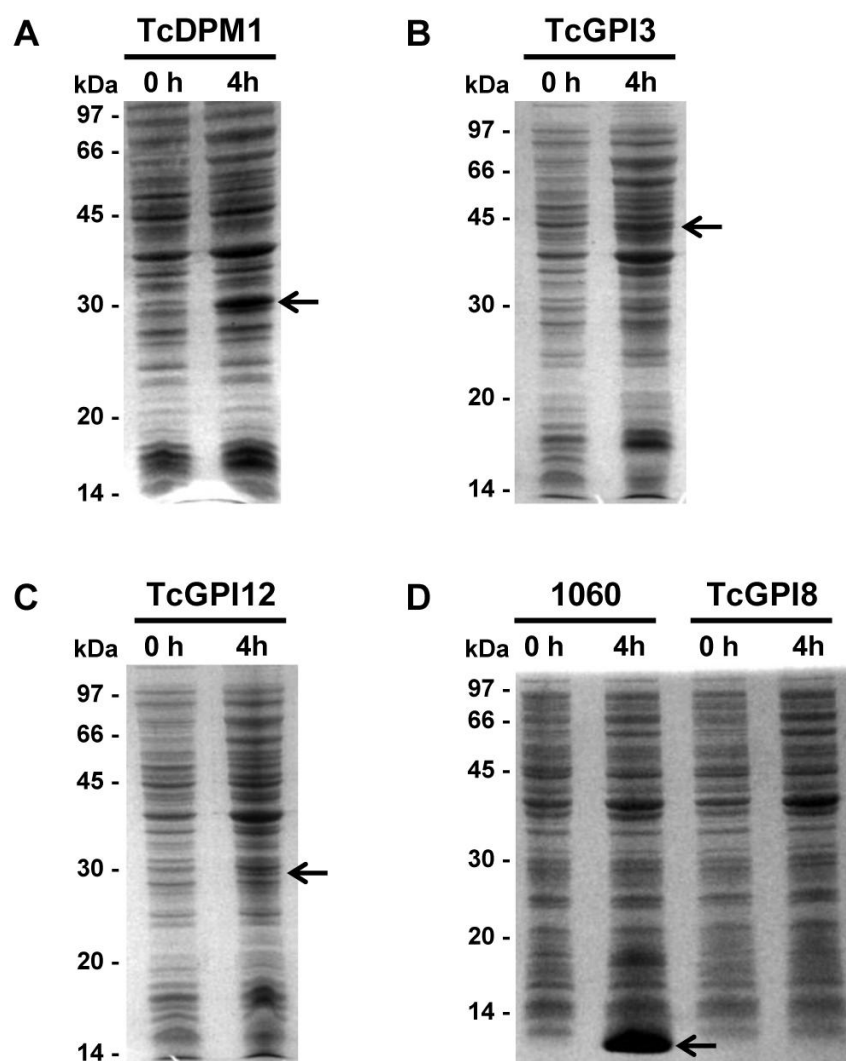


Figura 11: Expressão das proteínas da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi* em bactéria. Análise eletroforética dos géis de poliacrilamida 12,5%, sob condições desnaturantes, corados com *Coomassie Blue*, dos extratos bacterianos, contendo os plasmídeos pET-21a(+) com genes da via de biossíntese de GPI em fusão com caudas de histidina, antes (0 h) e após (4 h) a indução com L-arabinose e IPTG. Indução das proteínas: **(A)** TcDPM1, com peso molecular teórico de 27 kDa; **(B)** TcGPI3, com peso molecular teórico de 43 kDa; e **(C)** TcGPI12, com peso molecular teórico de 26 kDa. Uma das tentativas de indução da proteína TcGPI8, com peso molecular teórico de 35

kDa, está indicada em **(D)**. A proteína 1060 de *L. braziliensis* foi utilizada como controle positivo da indução. Os marcadores de peso molecular são indicados à esquerda. As setas indicam as bandas de indução nos géis.

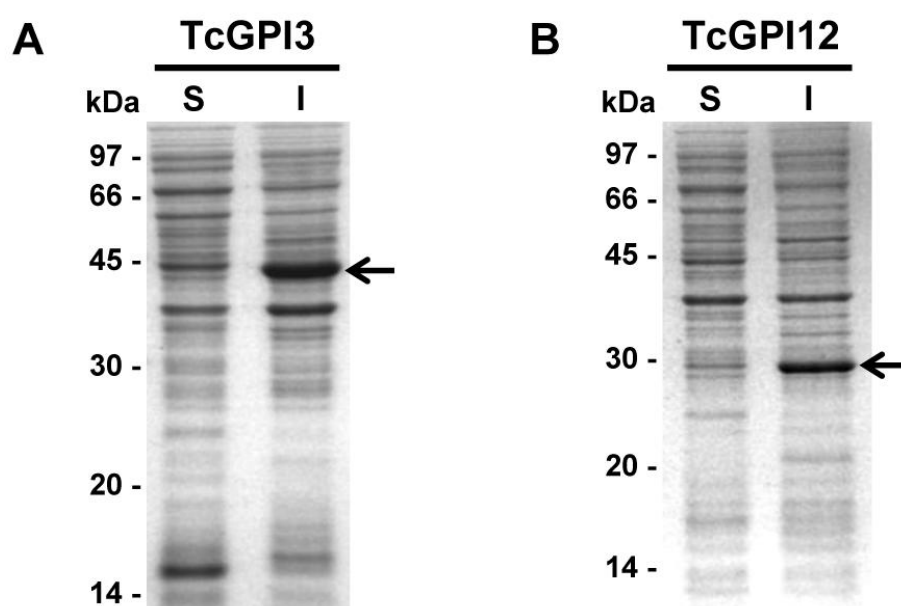


Figura 12: Avaliação da solubilidade das proteínas da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi* após indução em bactéria. As culturas de bactérias expressando as proteínas recombinantes TcGPI3 **(A)** e TcGPI12 **(B)** foram lisadas e as frações solúveis (S) e insolúveis (I) foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%, corados com *Coomassie Blue*. Os marcadores de peso molecular são indicados à esquerda. As setas indicam as bandas das proteínas recombinantes nos géis.

4.6. Geração de parasitos nocautes para os genes da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi*

Para investigar o papel das âncoras GPI e de proteínas GPI ancoradas em *T. cruzi*, nós tentamos gerar parasitos em que ambos os alelos dos genes de *TcGPI3*, *TcGPI10* e *TcGPI8* fossem deletados.

As construções foram geradas a partir da amplificação por PCR das regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR) de cada gene e, em alguns casos, contendo também uma porção da região codificadora. Os produtos amplificados foram clonados sequencialmente nos sítios de restrição *SacI/Spel* e *XhoI/XbaI* do vetor TOPO-Neo e TOPO-Higro, que contém, além do marcador de resistência, a sequência da 3'UTR do gene *GAPDH*, que possui um eficiente sinal de poliadenilação e confere uma maior estabilidade aos mRNAs (Figuras 13A, 14A e 15A). Para confirmar a construção dos plasmídeos para deleção dos genes *TcGPI3*, *TcGPI10* e *TcGPI8*, foram feitas reações de clivagem utilizando as enzimas de restrição *SacI* e *XbaI* e os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 0,8% (Figuras 13B, 14B e 15B). As construções nocautes foram purificadas a partir do gel e utilizadas na transfecção de epimastigotas, que foram selecionados com 200 µg/mL de G418 ou higromicina.

Foi possível gerar parasitos heterozigotos, contendo um gene de resistência à droga inserido em cada um dos alelos de *TcGPI8*. O DNA total desses parasitos foi isolado e a caracterização dos mutantes foi realizada por PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1 e Figura 15A), que

confirmou a integração dos genes de resistência aos antibióticos e a deleção de um dos alelos do gene *TcGPI8* (Figura 15C). No entanto, as transfecções com as construções contendo as sequências de *TcGPI3* e *TcGPI10*, que flanqueiam os genes de resistência à G418 e à higromicina, não resultaram em parasitos resistentes aos antibióticos, sugerindo que a interrupção de até mesmo um alelo de um gene envolvido nas etapas iniciais da via de biossíntese de GPI resultou em parasitos não viáveis.

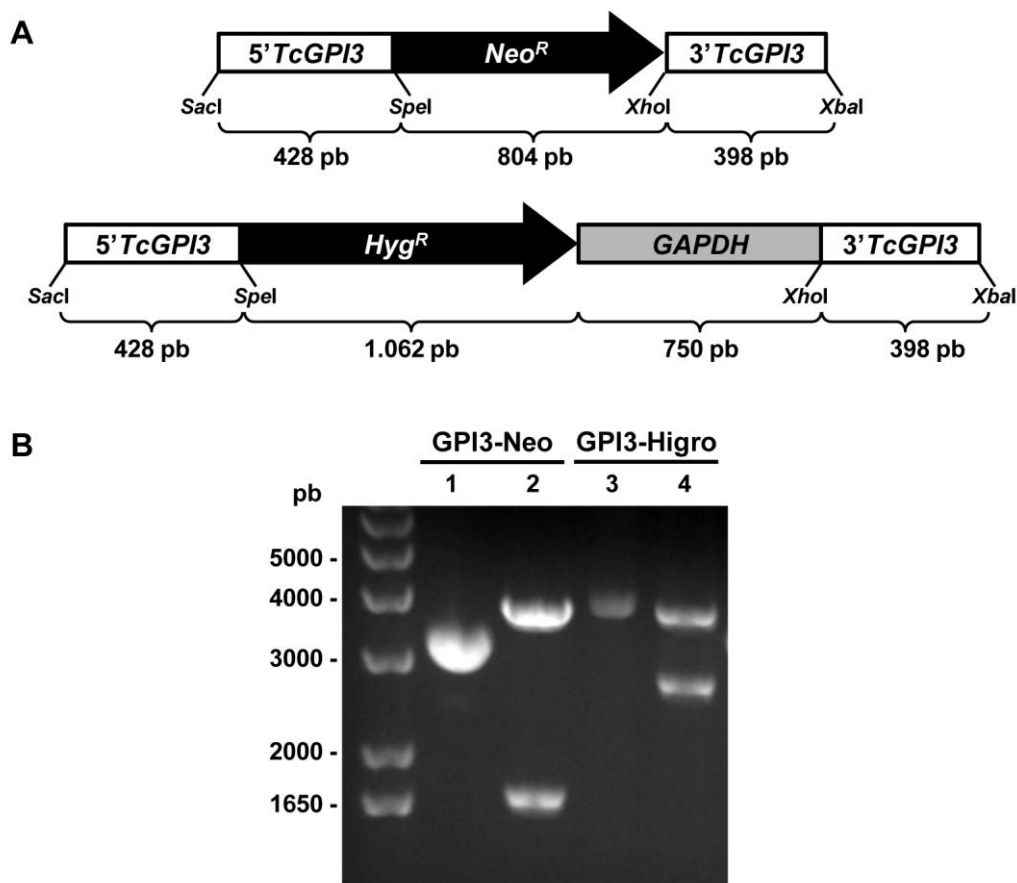


Figura 13: Construções usadas para a geração de parasitos nocautes para o gene *TcGPI3*. **(A)** Esquema indicando os sítios das enzimas de restrição e os tamanhos das 5' e 3' UTR utilizadas nas construções para deleção do gene *TcGPI3*. **(B)** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos plasmídeos TOPO-GPI3-Neo (1) e Topo-GPI3-Higro (3) não clivados; (2) e (4) plasmídeos clivados com as enzimas de *SacI* e *XbaI*. Foi observada a presença das bandas de DNA correspondentes ao vetor TOPO (3.900 pb) e às construções GPI3-Neo (1.630 pb) e GPI3-Higro (2.638 pb). Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

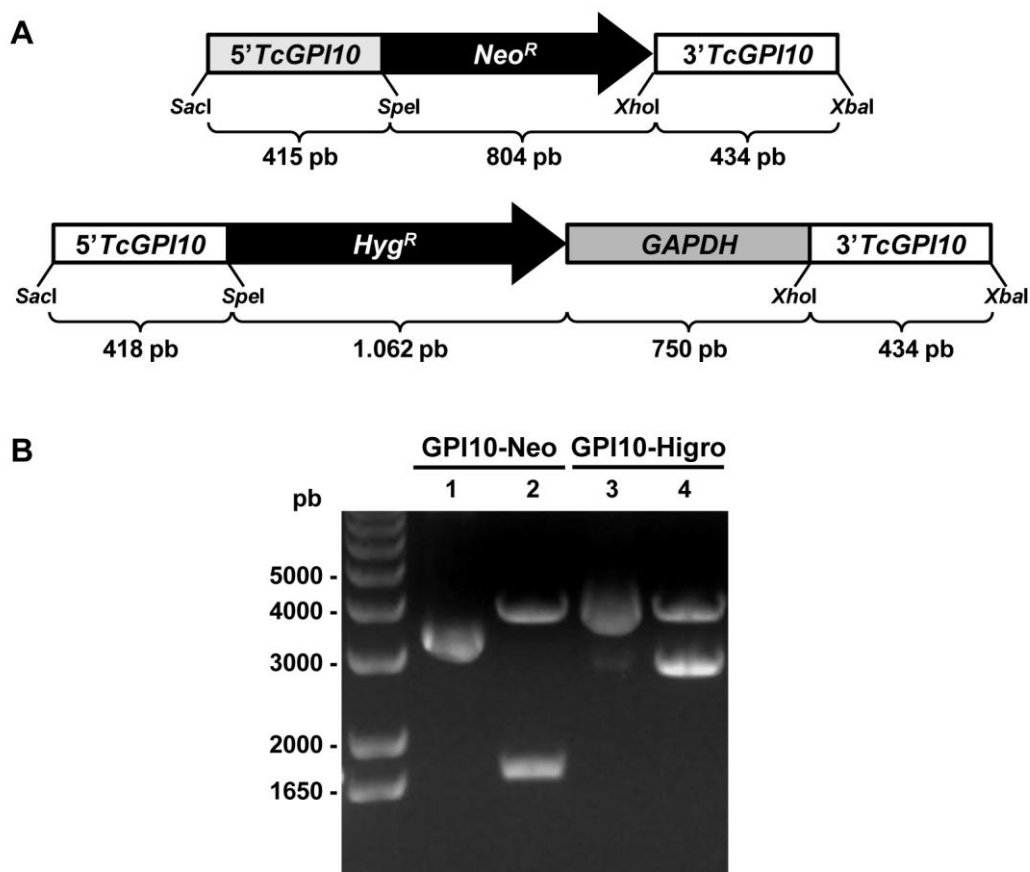


Figura 14: Construções usadas para a geração de parasitos nocautes para o gene *TcGPI10*. **(A)** Esquema indicando os sítios das enzimas de restrição e os tamanhos das regiões 5' e 3' do gene, utilizadas nas construções para deleção do *TcGPI10*. **(B)** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos plasmídeos TOPO-GPI10-Neo (1) e Topo-GPI10-Higro (3) não clivados; (2) e (4) plasmídeos clivados com as enzimas de *SacI* e *XbaI*. Foi observada a presença das bandas de DNA correspondentes ao vetor TOPO (3.900 pb) e às construções GPI10-Neo (1.653 pb) e GPI10-Higro (2.664 pb). Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

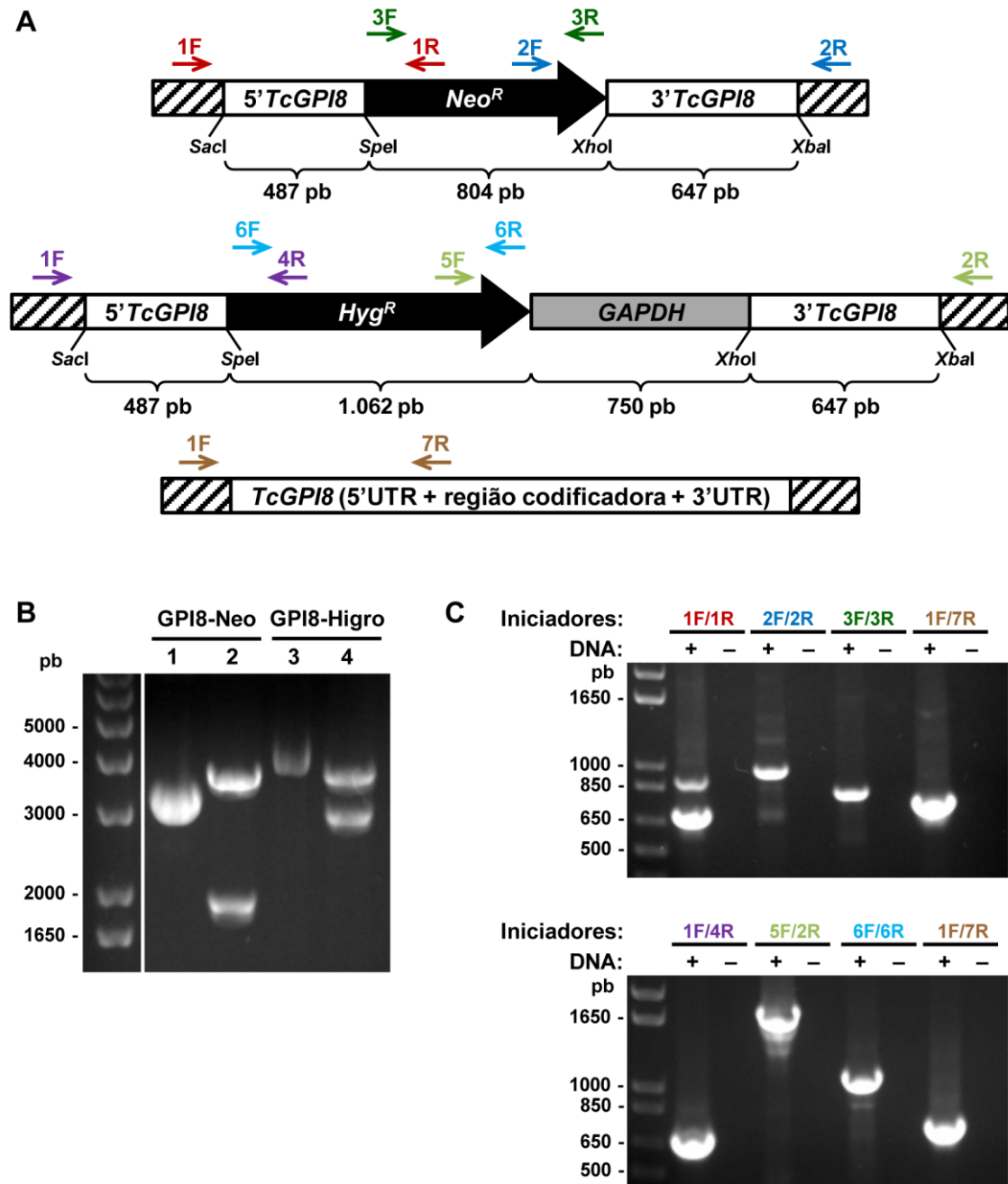


Figura 15: Geração de mutantes heterozigotos do gene *TcGPI8*. (A) Construções de DNA geradas para deleção de ambos os alelos de *TcGPI8*, indicando os sítios das enzimas de restrição e os tamanhos das regiões 5' e 3' de *TcGPI8*, que flanqueiam os genes *Neo^R* e *Hyg^R*. O DNA total isolado a partir de parasitos resistentes à G418 ou à higromicina foi analisado por PCR, usando os iniciadores indicados pelas setas. (B) Análise eletroforética em gel

de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos plasmídeos TOPO-GPI8-Neo (1) e Topo-GPI8-Higro (3) não clivados; (2) e (4) plasmídeos clivados com as enzimas de *SacI* e *XbaI*. Foi observada a presença das bandas de DNA correspondentes ao vetor TOPO (3.900 pb) e às construções GPI8-Neo (1.938 pb) e GPI8-Higro (2.946 pb). **(C)** Análises eletroforéticas de géis de agarose 1% dos produtos das amplificações por PCR, que foram obtidos a partir do DNA isolado de epimastigotas transfectadas com as construções de GPI8-Neo (gel à direita) e GPI8-Higro (gel à esquerda), usando os oligonucleotídeos iniciadores mostrados em A. Os amplicons gerados por PCR utilizando o par de iniciadores 1F/7R, que amplificam um alelo de *TcGPI8* não deletado, são mostrados. As canaletas indicadas por (-) correspondem ao controle negativo de cada reação de PCR, na qual não foi adicionado DNA. Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

Várias tentativas de gerar parasitos duplo nocautes para o gene *TcGPI8* foram realizadas, mas em nenhum dos experimentos foi possível obter parasitos viáveis, resistentes a ambas as drogas. Então, para aumentar a eficiência de expressão do gene de resistência aos antibióticos, foram preparadas construções em que o gene de resistência foi flanqueado por sinais de *trans-splicing* e poliadelinação dos genes que codificam a proteína ribossomal TcP2 β (HX1) e o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *T. cruzi*, respectivamente (Figura 16A). Após transfecção de epimastigotas com as construções nocautes para ambos os alelos de *TcGPI8*, parasitos duplo resistentes foram selecionados aumentando gradualmente as concentrações de antibióticos até 200 μ g/mL. Análises de PCR dos poucos clones de epimastigotas duplo resistentes gerados indicaram que os genes de resistência à G418 e à higromicina foram inseridos em ambos os alelos de *TcGPI8*. No entanto, amplificações por PCR também indicaram que sequências adicionais correspondentes ao gene *TcGPI8* ainda estavam presentes, provavelmente em um local diferente no genoma dos parasitos duplo resistentes (Figura 16A-B).

Portanto, os resultados obtidos sugerem que, em contraste com o *T. brucei*, para o qual foi possível gerar parasitos nocautes para os genes *GPI8*, *GPI10* e *GPI16* (Lillico et al., 2003; Nagamune et al., 2000; Hong et al., 2006b), e *L. mexicana*, para a qual foi gerada linhagem nocaute para *GPI8* (Hilley et al., 2000), a biossíntese de GPI pode ser uma via essencial em epimastigotas de *T. cruzi* e, portanto, não é possível obter parasitos nocautes desses genes.

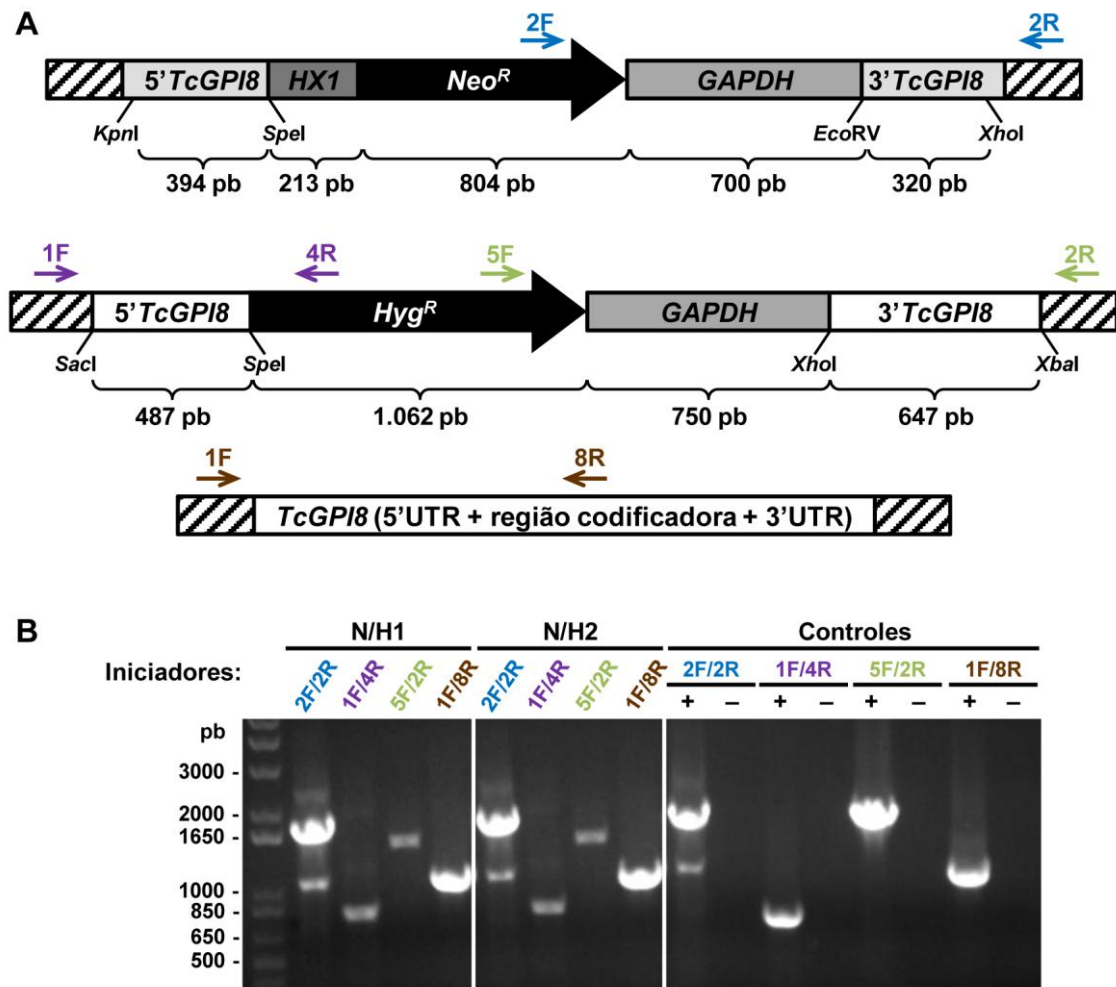


Figura 16: Geração de mutantes duplo resistentes do gene *TcGPI8*. (A) Construções de DNA geradas para a deleção de ambos os alelos de *TcGPI8*, indicando os sítios das enzimas de restrição e os tamanhos das 5' e 3' UTR, que flanqueiam os genes *Neo^R* e *Hyg^R*, além dos sinais de adição do *spliced leader* e poliadenilação a partir dos genes *TcP2β* (HX1) e *gapdh*. **(B)** Análises eletroforéticas de géis de agarose 1% dos produtos das amplificações por PCR, que foram obtidos a partir do DNA isolado de clones de epimastigotas transfectadas sequencialmente com as construções contendo os genes *Neo^R* e *Hyg^R* (mutantes duplo resistentes, N/H), usando os iniciadores indicados em A. O produto de amplificação gerado usando os iniciadores 2F/2R indicou a

integração do gene *Neo^R* em um dos alelos de *TcGPI8*, enquanto que os amplicons gerados com os iniciadores 1F/4R e 5F/2R indicaram a integração da sequência de *Hyg^R* no outro alelo de *TcGPI8*. A amplificação por PCR usando os iniciadores 1F/8R indicaram que parasitos duplo resistente ainda mantiveram pelo menos uma cópia do gene *TcGPI8*. Como controles positivos, DNA de parasitos heminocautes para *TcGPI8*, contendo o gene *Neo^R* (para os iniciadores 2F/2R), *Hyg^R* (para os iniciadores 1F/4R e 5F/2R), e parasitos WT (para os iniciadores 1F/8R) foram usados. Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

4.7. Análise dos níveis de mRNA de mutantes de GPI8 de *T. cruzi*

Para determinar os níveis de expressão de mRNA de mutantes de *TcGPI8*, a região codificadora desse gene foi utilizada como sonda em hibridações de *Northern blot*, usando RNA total purificado a partir de formas epimastigotas de parasitos heminocautes e duplo resistentes para *TcGPI8*. Após separação em géis de agarose, o RNA foi transferido para membranas de *nylon* e hibridado com sondas marcadas com [α - ^{32} P]. As membranas contendo o RNA total também foram hibridadas com uma sonda para o rRNA 24S α , como controle da quantidade de RNA aplicado no gel.

As análises de *Northern blot* revelaram que ambos os mutantes heterozigotos de *TcGPI8*, contendo resistência à G418 ou à higromicina, apresentam redução de aproximadamente 40% na expressão de mRNA de *TcGPI8* (Figura 17A). No entanto, as análises do mRNA de parasitos mutantes de *TcGPI8*, duplo resistentes, indicaram a expressão de uma população de mRNA anômala de *TcGPI8*, provavelmente resultante de eventos de recombinação no genoma de *T. cruzi* (Figura 17B).

Para verificar se esta população de mRNA de *TcGPI8*, transcrita em mutantes duplo resistentes, apresentava mRNAs maduros que sofreram *trans-splicing*, foram realizados ensaios de RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para sequências do gene *TcGPI8* e do *spliced leader* de *T. cruzi*. Após extração de RNA dos parasitos WT e dos mutantes de *TcGPI8*, foi sintetizada a primeira fita de cDNA utilizando um iniciador que se liga ao gene *TcGPI8*. Um produto amplificado de 258 pb, contendo a sequência do

spliced leader, foi observado em todos os parasitos, indicando que o gene *TcGPI8* ainda está ativo nestes mutantes e que mRNAs funcionais são produzidos (Figura 18).

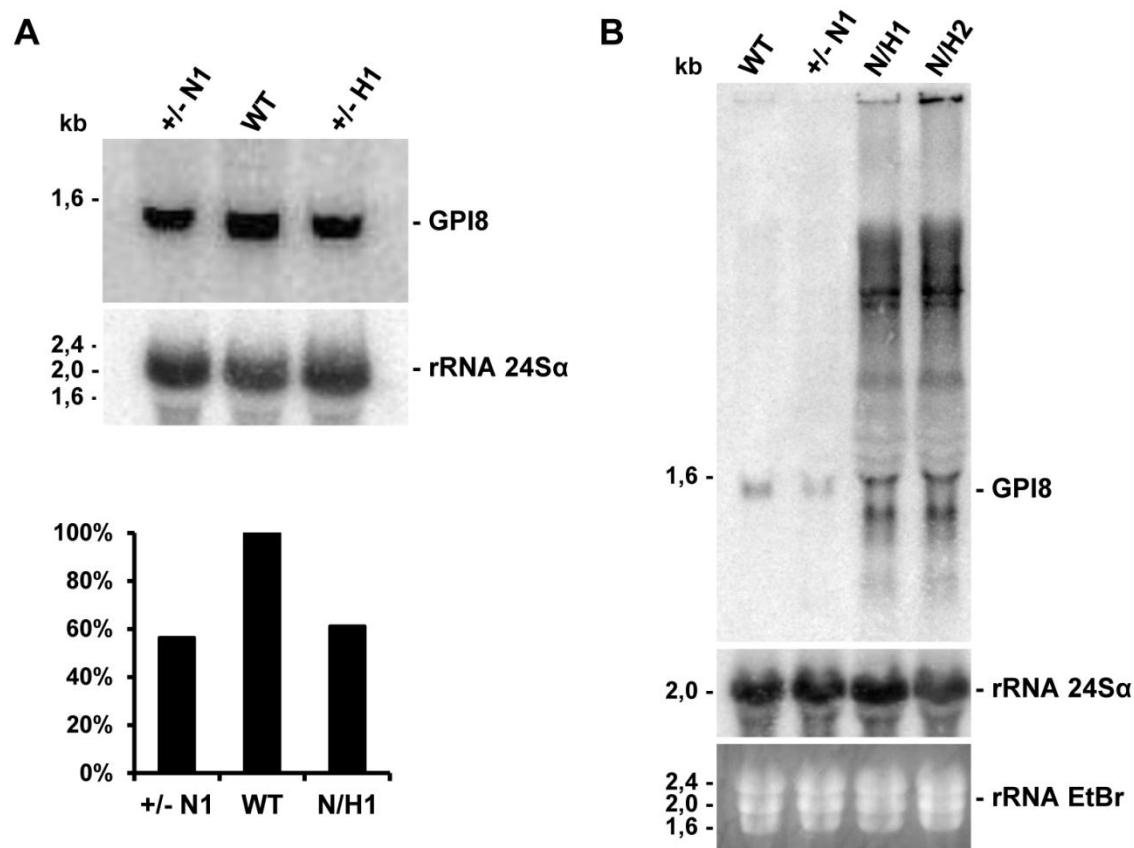


Figura 17: Níveis de expressão de mRNA de mutantes de *TcGPI8*. Os RNAs totais purificados a partir de epimastigotas foram hibridados com sondas marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$, específicas para o gene *TcGPI8* ou para o rRNA 24Sα, usado como controle de carregamento. **(A)** *Northern blot* de epimastigotas WT e heminocautes de cada alelo de *TcGPI8* interrompidos pelos os genes *Neo*^R ou *Hyg*^R (+/- N ou +/- H, respectivamente). O gráfico indica a quantificação dos sinais de mRNA de *TcGPI8* depois da normalização usando a sonda rRNA

24Sa. **(B)** *Northern blot* de epimastigotas de WT, heminocaute de *TcGPI8* interrompido pelo o genes *Neo^R* (+/- N1) e clones de parasitos duplo resistentes (N/H1 and N/H2). Na parte inferior da figura, estão indicadas as bandas do rRNA, coradas com brometo de etídio (EtBr). Os tamanhos das bandas de RNA ribossomal estão indicados à esquerda.

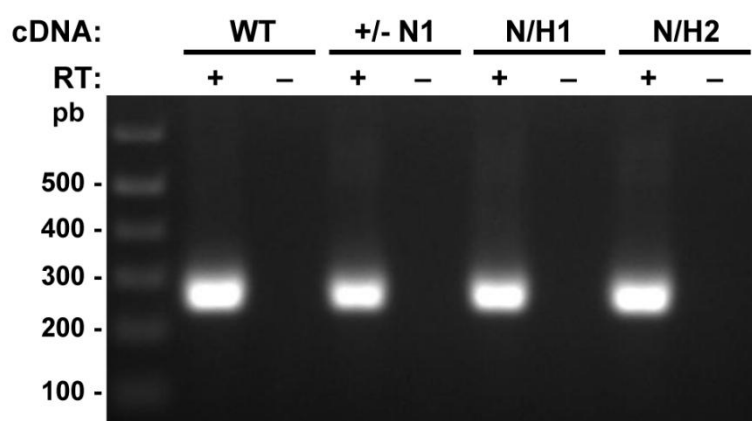


Figura 18: Amplificação por RT-PCR de sequências de *TcGPI8*. Os cDNAs obtidos a partir dos mRNAs de epimastigotas WT, heminocaute *Neo^R* (+/- N1) e dois clones duplos resistentes (N/H1 e N/H2), foram amplificados por PCR com os iniciadores, que anelam na sequência de *TcGPI8* e na sequência de *spliced leader* (SL) de *T. cruzi*. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com iniciadores complementares a *TcGPI8* na presença (+) ou ausência (-) da enzima transcriptase reversa (RT). Os produtos de PCR, separados em géis de agarose 1%, foram corados com brometo de etídio. Marcadores de peso molecular de DNA estão indicados à esquerda.

4.8. Análise de possíveis eventos de recombinação do gene *TcGPI8* em mutantes de *T. cruzi*

Para verificar a translocação do gene *TcGPI8* em mutantes duplo resistentes, que sofreram recombinação genômica, após a seleção de parasitos viáveis resistentes à G418 e higromicina, foram realizadas hibridações de *Southern blot* com as bandas cromossômicas de parasitos WT, mutantes heterozigotos e duplo resistentes. O DNA genômico extraído a partir desses parasitos foi separado em bandas cromossômicas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e os cromossomos separados foram transferidos para membranas de nylon e hibridados com sondas marcadas com [α - ^{32} P]. Na amostra selvagem, observa-se a presença de duas bandas cromossômicas contendo os dois alelos do gene de *TcGPI8*. Como a sonda utilizada corresponde à região codificadora completa do gene *TcGPI8*, essa sonda reconhece também os alelos interrompidos pelos genes de resistência aos antibióticos, uma vez que as construções nocautes possuem também uma porção da região codificadora do gene.

Como mostrado na Figura 19, análises da distribuição do gene *TcGPI8*, após os eventos de recombinação sofridos pelos mutantes duplo resistentes, sugerem que a amplificação de sequências de *TcGPI8* envolveu a produção de moléculas de DNA episomal, as quais podem formar concatâmeros de alto peso molecular. Este resultado difere do padrão observado para os parasitos WT e heminocautes, que apresentam apenas duas bandas de tamanho aproximado de 1,6 Mb e 1,4 Mb, referentes aos dois

cromossomos homólogos que contêm os dois alelos de *TcGPI8*. Diferenças significativas nos tamanhos de bandas de cromossomos homólogos de *T. cruzi* têm sido frequentemente descritas (Souza et al., 2011).

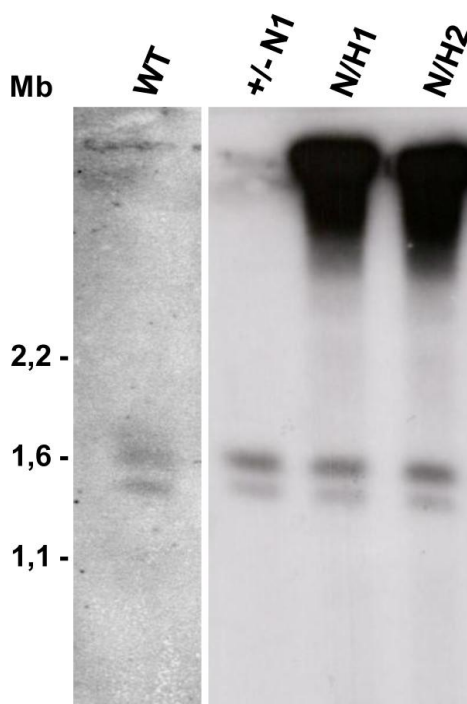


Figura 19: Translocação do gene *TcGPI8* em mutantes de *T. cruzi*. Bandas cromossômicas a partir de epimastigotas WT, um clone de heminocaute, contendo resistência à G418, e dois clones de parasitos duplo resistentes foram separadas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e, após transferência para membranas de *nylon*, foram hibridadas com sondas marcadas com [α - ^{32} P], correspondentes à região codificadora do gene *TcGPI8*. Os tamanhos das bandas dos cromossomos de levedura *S. cerevisiae* são indicados à esquerda.

4.9. Análises morfológicas dos mutantes de *GPI8* de *T. cruzi*

Para verificar se as alterações genômicas, observados por *Southern blot*, e as modificações no perfil de expressão de mRNA nos mutantes de *TcGPI8* levaram a alterações morfológicas, epimastigotas foram fixadas com 5% de glutaraldeído em tampão cacodilato e processadas para serem analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Embora não foram observadas alterações significativas no crescimento e na morfologia global dos mutantes de *TcGPI8*, a microscopia eletrônica de transmissão indicou alterações marcantes na espessura do glicocálix que cobre a superfície do parasito.

Como indicado na Figura 20, as membranas celulares de epimastigotas de mutantes heterozigotos de *TcGPI8* (clone +/- N1) apresentaram uma camada mais fina de glicocálix na superfície comparado com epimastigotas do tipo selvagem (WT). Em contraste, as membranas celulares a partir de parasitos duplo resistentes (clone N/H1), que podem ter sofrido eventos de recombinação envolvendo sequências de *TcGPI8*, apresentam um aumento da espessura do seu glicocálix comparado com os mutantes heterozigotos e com o WT (Figura 20).

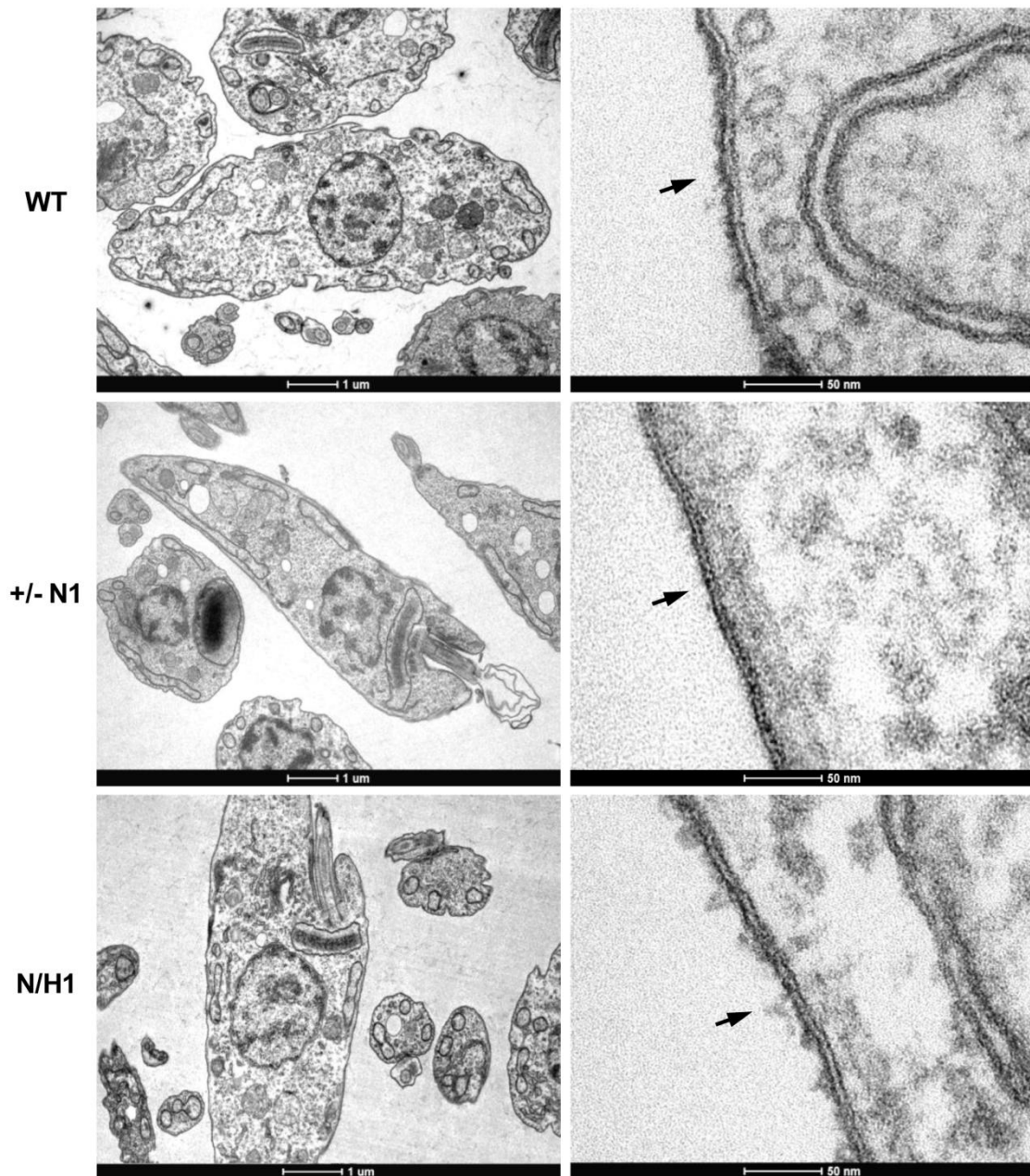


Figura 20: Morfologia da membrana celular de mutantes *GPI8* de *T. cruzi*. Microscopia eletrônica de transmissão indicando as membranas celulares de epimastigotas WT, de um clone de heminocaute de *TcGPI8* resistente à G418 (+/- N1) e de um clone de parasito duplo resistente (N/H1). O glicocálix presente na membrana dos parasitos está indicado por setas.

4.10. Análises das glicoproteínas mucinas presentes na membrana celular de mutantes de GPI8 de *T. cruzi*

Uma vez que foram observadas alterações na espessura do glicocálix da membrana plasmática de parasitos mutantes de *TcGPI8*, as glicoproteínas GPI-mucinas, um dos principais componentes da membrana celular de *T. cruzi*, foram analisadas para verificar se houve alteração no seu perfil de expressão na superfície. Foram realizados imunoblot das frações total, citoplasmática e de membrana de epimastigotas, utilizando o anticorpo anti-mucina 2B10. Este anticorpo reconhece os epítomos de galactopirranose presentes nas glicoproteínas de 35/50 kDa de *T. cruzi* (Mortara et al., 1992; Yoshida, 2006).

Embora não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de mucinas nos heminocautes, com o gene *Neo^R* interrompendo um dos alelos de *TcGPI8*, análises de imunoblot de proteínas da membrana de WT e de mutantes duplo resistentes de *TcGPI8*, utilizando o anticorpo monoclonal anti-mucina 2B10, indicaram um aumento da quantidade de glicoproteínas de 35/50 kDa expressas na superfície de epimastigotas dos clones duplo resistentes (Figura 21A). Uma banda de 90 kDa observada nos imunoblots é provavelmente resultado de ligações inespecíficas do anticorpo.

Para quantificar a expressão de mucinas, epimastigotas marcadas com anticorpos anti-mucina 2B10 foram analisadas por citometria de fluxo, indicando também um aumento da quantidade de mucinas na superfície dos parasitos duplo resistentes (Figura 21B).

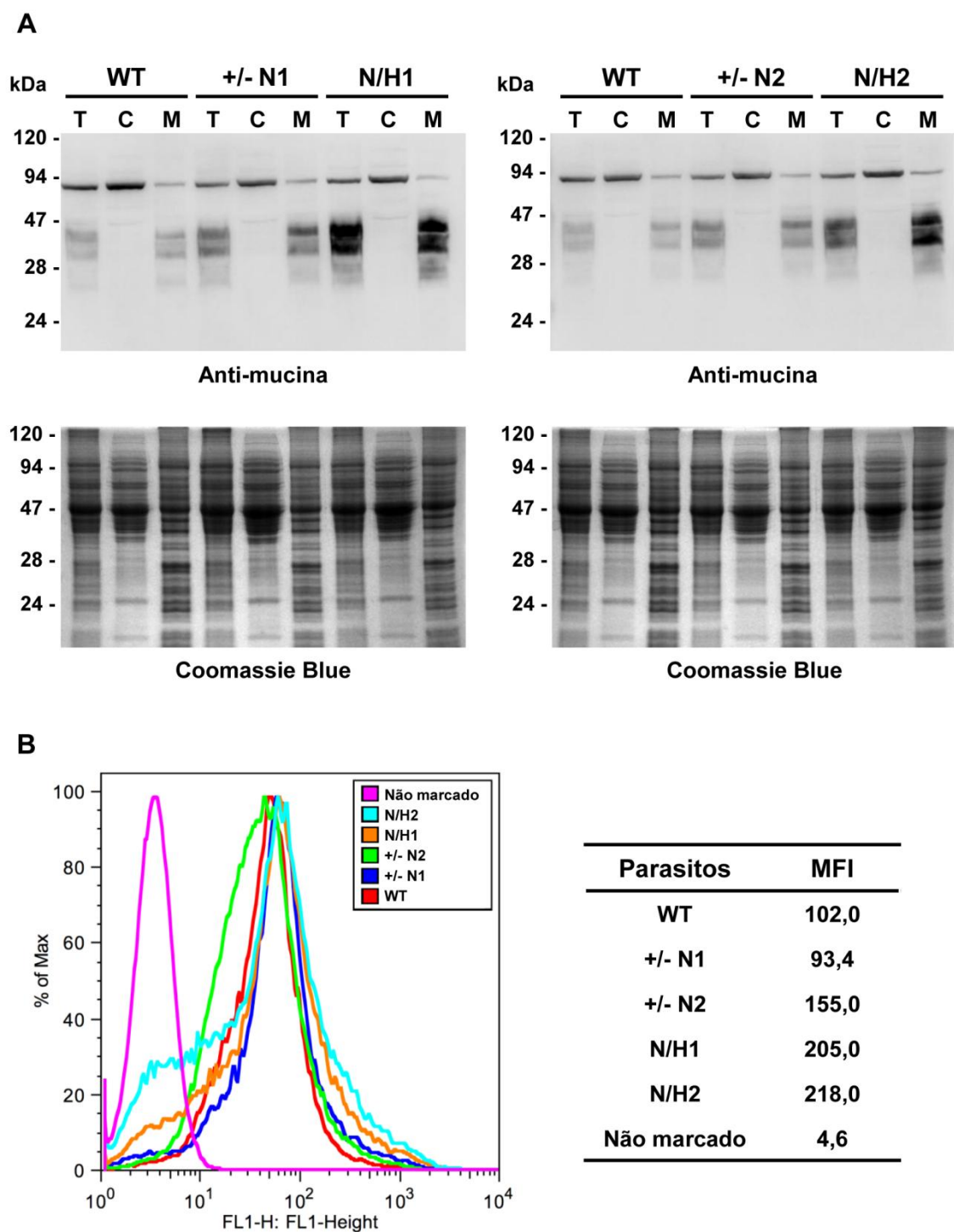


Figura 21: Mucinas na membrana celular de mutantes de *GPI8* de *T. cruzi*.

(A) Imunoblot das frações total (T), citoplasmática (C) e de membrana (M) de epimastigotas WT, dois clones de heminocautes, que tem o gene *Neo^R* integrado em um dos alelos de *TcGPI8* (+/- N1 e +/- N2), e dois clones de

parasitos duplo resistentes (N/H1 e N/H2). Quantidades equivalentes de proteína de cada fração, como mostrado pelas bandas do SDS-PAGE coradas com *Coomassie Blue*, foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos anti-mucina 2B10 (diluição 1:200) e reveladas com anticorpos secundários conjugados à peroxidase (1:2.000). **(B)** Análises de citometria de fluxo de epimastigotas WT e mutantes de *TcGP18*, que foram incubadas com o anticorpo primário anti-mucina 2B10 (diluição 1:450) e com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:1.000). Os valores de intensidade média de fluorescência (MFI) para cada parasito estão indicados à direita.

4.11. Análise da capacidade de infecção, *in vitro* e *in vivo*, de mutantes de GPI8 de *T. cruzi*

Uma vez que foram observadas diferenças na estrutura da membrana e no perfil de mucinas expressas na superfície dos mutantes duplo resistentes, foi investigado se essas mudanças poderiam ter afetado a capacidade de infecção *In vitro* e *in vivo* dos mutantes *TcGPI8*. Após a infecção de células Vero com tripomastigotas metacíclicas de parasitos WT e mutantes, com uma proporção de 1:10 (célula hospedeira: parasito), o número de amastigotas intracelulares e de tripomastigotas liberadas no sobrenadante da cultura foram determinados. Adicionalmente, foram realizadas infecções com 10^5 tripomastigotas metacíclicas em camundongos BALB/c fêmeas e a parasitemia foi acompanhada durante 30 dias.

Os resultados apresentados na Figura 22 indicam que estas alterações na estrutura da membrana celular afetaram a infecção por *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Enquanto que em culturas de células Vero infectadas com os mutantes heterozigotos de *TcGPI8*, o número de amastigotas intracelulares e tripomastigotas libertadas no sobrenadante foi aumentado em comparação as células infectadas com parasitos WT, células infectadas com parasitos duplo resistentes possuem poucas amastigotas e tripomastigotas no sobrenadante (Figura 22A-B). Além disso, um forte fenótipo atenuado dos mutantes duplo resistentes foi também observado quando foram realizadas infecções *in vivo*. Enquanto que camundongos infectados com os mutantes heterozigotos de *TcGPI8* tiveram a parasitemia reduzida, parasitos

duplo resistentes foram totalmente incapazes de produzir parasitemia (Figura 22C).

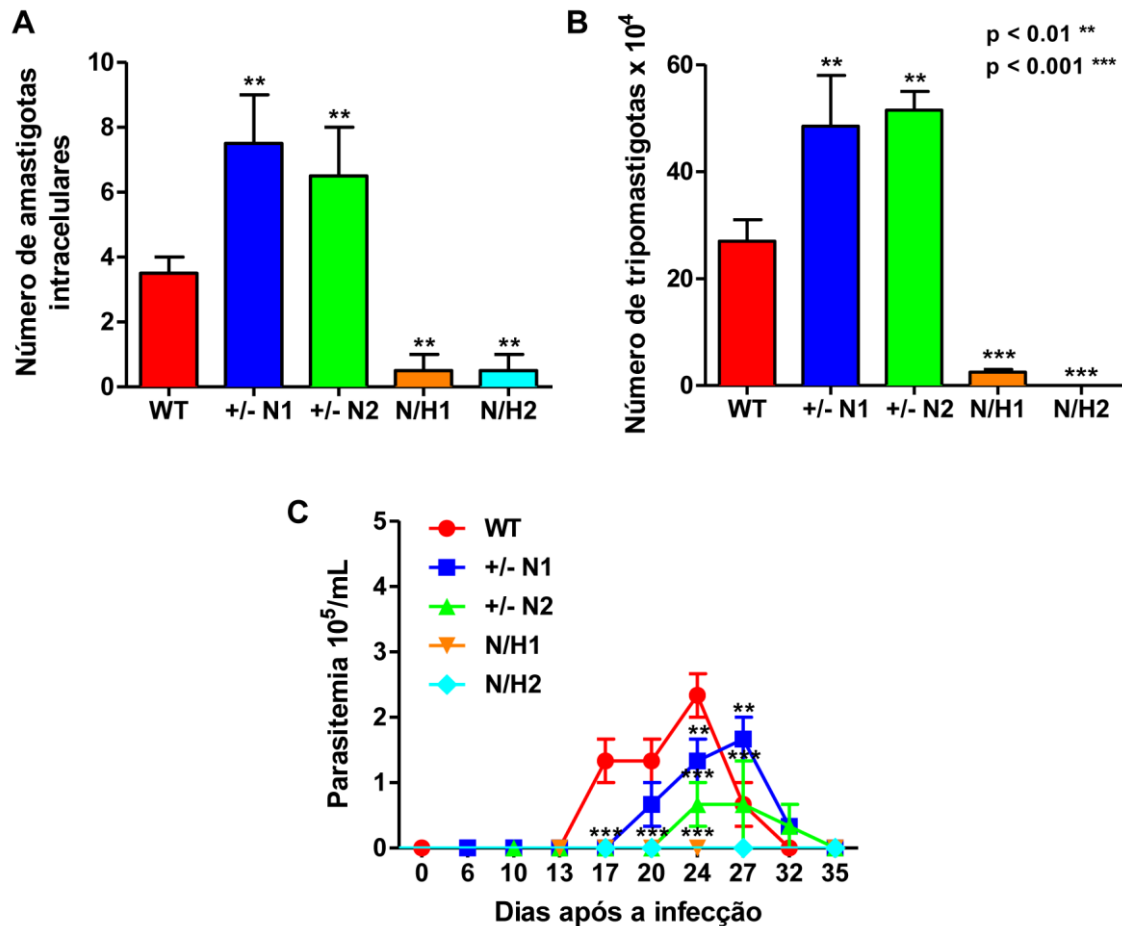


Figura 22: Mudança na capacidade de infecção de mutantes *GPI8* de *T. cruzi*. Células Vero foram infectadas com 10⁵ tripomastigotas metacíclica de WT ou de células mutantes. **(A)** No quinto dia após a infecção, as células foram fixadas e o número de amastigotas por célula foi determinado. **(B)** Do sétimo ao décimo dia após a infecção, o número total de tripomastigotas liberado no sobrenadante a partir de células infectadas foi determinado. **(C)** Camundongos BALB/c foram infectados com 10⁵ tripomastigotas metacíclica de WT e de células mutantes e a parasitemia foi avaliada durante 30 dias.

5. Discussão

Várias proteínas de superfície de *T. cruzi* que estão envolvidas no processo de infecção, sobrevivência ou no escape da resposta imune do hospedeiro são ancoradas à membrana do parasito através da ligação covalente à glicosilfosfatidilinositol (GPI). As âncoras GPI de *T. cruzi* são também moléculas com atividades pró-inflamatórias, com um crítico papel na modulação da resposta imune do hospedeiro contra o parasito. *T. cruzi* pertence a um grupo de parasitos responsáveis por várias doenças tropicais negligenciadas humanas, para as quais há uma urgente necessidade de desenvolvimento de novas drogas que sejam mais eficientes contra o parasito e menos tóxicas para o paciente. A elucidação das estruturas de moléculas que desempenham um papel direto na interação parasito-hospedeiro e o entendimento das vias de biossíntese que geram essas moléculas específicas de parasitos, como a via de biossíntese de âncoras GPI de *T. cruzi*, representam uma importante contribuição para este objetivo. Por meio da análise de similaridade de sequências com genes de levedura, mamíferos, *T. brucei* e *P. falciparum* previamente caracterizados, foram identificados 18 genes ortólogos que codificam os componentes da via de biossíntese de GPI presentes no banco de dados do genoma do clone CL Brener de *T. cruzi*. Além disso, o gene que codifica a IPC sintase em *T. cruzi* também foi identificado. Essa enzima sintetiza o esfingolípido inositolfosforilceramida, que é uma importante modificação que ocorre na porção lipídica da âncora principalmente durante o estágio tripomastigota metacíclico do parasito. Embora a maioria das

sequências estivessem corretamente anotadas no banco de dados do genoma de *T. cruzi* (TriTrypDB), alguns genes como *TcGPI15*, *TcGPI19*, *TcDPM2*, *TcGPI16* e *TcGPIdAc2* não haviam sido corretamente identificados. Por outro lado, genes codificadores de pelo menos três componentes que esperávamos encontrar como proteínas importantes dessa via não foram identificados. Deve-se notar, entretanto que, devido à montagem do genoma de CL Brener não estar completa, sequências correspondentes a alguns desses genes poderiam não ter sido incorporadas na montagem do genoma. Nesses casos, a amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores degenerados é uma ferramenta útil para identificar diretamente a sequência de um gene, a partir do DNA purificado do organismo. Os genes de *T. cruzi* que codificam um componente do complexo de manosiltransferase I, α -1,2-manosiltransferase IV ou a aciltransferase, responsável pela acilação do anel do inositol, precisam ser identificados.

Ao expressar esses genes em leveduras mutantes, nós não somente confirmamos a função de alguns dos genes identificados, mas também fomos capazes de gerar linhagens de levedura, que podem agora ser utilizadas em ensaios de *screening* de larga escala para drogas que tenham como alvo específico enzimas de *T. cruzi*. O uso de levedura como uma ferramenta para a *screening* de drogas contra parasitos é uma estratégia que tem sido empregada com sucesso por vários grupos (Hughes, 2002; Bilsland et al., 2011; 2013; Norcliffe et al., 2013). Este sistema permite a identificação de drogas que atuam especificamente sobre a enzima do parasito, uma vez que os seus efeitos sobre os mutantes de levedura transformados, que crescem em

meio permissivo e não permissivo, podem ser comparados (Norcliffe et al., 2013). Alternativamente, inibidores específicos podem ser descobertos utilizando ensaios em sistema livre de células, como foi mostrado para enzimas de *T. brucei* e *L. major* envolvidas com a de-N-acetilação de GlcNAc-PI, manosilação e acilação do inositol (Smith et al., 1997; 1999; 2001). É interessante notar que, para todos os genes que nós testados, foi observada a complementação funcional em leveduras apenas para aqueles cujos produtos não são parte de um complexo envolvendo mais de uma proteína, como foi o caso dos genes *TcDPM1*, *TcGPI10* e *TcGPI12*. Uma vez que todos os quatro resíduos de manose da âncora GPI são provavelmente transferidos a partir do dolicol-P-manose, o gene *DPM1*, que codifica a dolicol-fosfato manose sintase, é considerado um excelente candidato para ser alvo de estudos de teste de drogas. Em contraste ao *DPM1*, para o qual a proteína homóloga de *T. cruzi* tem alto nível de identidade de aminoácidos com a enzima de levedura, *TcGPI10* também foi capaz de complementar a mutação em levedura, apesar de ter apenas 21% de identidade com a enzima deste organismo. A enzima GPI12 também é considerada um bom alvo para o desenvolvimento de drogas contra tripanossomíases, uma vez que diferenças no reconhecimento de substrato entre essa enzima de mamíferos e de *T. brucei* foram descritas (Sharma et al., 1999). Por outro lado, a IPC sintase de *T. cruzi*, que também é um promissor alvo para a quimioterapia contra tripanossomíases, apresenta apenas 10% de identidade com a enzima de *S. cerevisiae* e não é funcional em leveduras. Este é um resultado inesperado, uma vez que foi demonstrado que a expressão do gene da IPC sintase de *L. major* (também conhecido como

gene *AUR1*) restaurou o crescimento de leveduras mutantes para o gene *AUR1* em meio não permissivo, contendo glicose (Denny et al., 2006). Nos casos onde não foi observada a complementação da mutação em leveduras, foi possível confirmar a expressão do gene de *T. cruzi* no mutante de levedura transformado por meio de ensaios de RT-PCR, indicando que a ausência de complementação ocorreu porque a enzima de *T. cruzi* é incapaz de atuar na maquinaria de biossíntese de GPI da levedura.

O papel destes genes também foi confirmado pelas análises da localização celular e da expressão de seus mRNAs. Como esperado, sequências correspondentes aos genes *TcDPM1*, *TcGPI3* e *TcGPI12*, expressos como proteínas em fusão com GFP em epimastigotas, indicaram uma localização celular compatível com o RE. De maneira também esperada, as análises dos níveis de mRNA de *TcGPI8* e *TcGPI10* indicaram que os componentes da via de biossíntese de GPI são produzidos de forma mais ativa nas duas fases proliferativas do ciclo de vida do parasito, ou seja, em epimastigotas e amastigotas, onde a biossíntese de âncoras GPI é necessária para a formação das membranas dos parasitos que se multiplicam.

A produção de proteínas recombinantes da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi*, a partir da indução em bactérias e posterior purificação por métodos cromatográficos, possibilitaria o seu uso na geração de anticorpos, assim como para a realização de análises estruturais, por meio de métodos cristalográficos e de difração de raios X. Estes estudos poderão desvendar a estrutura molecular tridimensional dessas proteínas, possibilitando o desenho de drogas específicas contra a doença de Chagas, que atuem exclusivamente

na via de biossíntese de GPI do parasito, diminuindo os efeitos colaterais sobre os pacientes. Entretanto, uma grande limitação na produção de proteínas em *E. coli*, para serem utilizadas em estudos estruturais, é a formação de agregados de proteínas insolúveis na sua forma inativa, conhecidos como corpos de inclusão. A recuperação da conformação nativa da proteína a partir de corpos de inclusão geralmente envolve métodos demorados, que podem levar à redução do rendimento das proteínas produzidas, além de ser difícil garantir que a conformação adquirida pela proteína seja similar àquela biologicamente ativa (Oganesyan et al., 2005). Apesar de ter sido possível expressar, mesmo que em pequenas quantidades, as proteínas TcGPI3 e TcGPI12 em *E. coli*, estas apresentaram-se insolúveis após sua indução nas bactérias transformadas com o plasmídeo pET-21a(+). Novos experimentos de indução, utilizando outras linhagens de bactéria ou mesmo de leveduras, como a *Pichia pastoris*, além de alterações nas condições de crescimento e indução, poderão ainda ser realizados. Como uma alternativa faremos a indução da produção dessas proteínas na bactéria *Arctic Express* (Agilent Technologies), que expressa proteínas solúveis a baixas temperaturas (12 °C), além de expressar chaperoninas Cpn60 e Cpn10 derivadas de bactérias psicrófilas que auxiliam no correto dobramento das proteínas recombinantes (Ferrer et al., 2003).

Para conhecer melhor o papel das âncoras GPI, bem como das proteínas ancoradas a GPI, foram feitas tentativas de geração de mutantes nulos de *T. cruzi* para alguns dos genes da via biossintética de GPI. Essa é uma estratégia especialmente interessante no caso do *T. cruzi*, visto que a

maioria das proteínas de superfície é codificada por grandes famílias multigênicas, o que impede a utilização da estratégia de nocaute para estes genes. Como um grande número dessas proteínas de *T. cruzi* sabidamente envolvidas em interações parasito-hospedeiro, tais como membros das famílias das *trans*-sialidase, mucina e MASP, é ancorada a GPI, a disponibilidade de linhagens celulares de *T. cruzi* com genes da via de biossíntese de GPI interrompidos poderia permitir a realização de estudos sobre o efeito da ausência dessas proteínas na superfície do parasito durante a infecção. Nós tentamos interromper os genes *TcGPI8*, que codifica a subunidade catalítica do complexo responsável pela transferência de âncora GPI para as proteínas, *TcGPI3*, subunidade catalítica do complexo de N-acetilglucosamina transferase, e *TcGPI10*, terceira manosiltransferase. A deleção do gene *TcGPI8* teria como resultado parasitos contendo apenas GIPLs na superfície, mas não as proteínas ancoradas a GPI. Por sua vez, a deleção dos genes *TcGPI3* e *TcGPI10*, resultaria em âncoras GPI incompletas, pois a biossíntese seria interrompida em um passo inicial e intermediário da via, respectivamente. Apesar da deleção de um único alelo de *TcGPI8* ter sido facilmente obtida por recombinação homóloga entre as sequências de cada alelo que flanqueavam os genes de resistência a G418 ou higromicina, a eliminação do segundo alelo não foi alcançada. Análises por PCR das sequências no genoma e de expressão de mRNA indicaram que em ambos os mutantes heterozigotos de *TcGPI8* os genes de resistência a G418 ou a higromicina foram corretamente integrados nos dois alelos de *TcGPI8* e tiveram os níveis de mRNA reduzidos.

Como várias tentativas para deleção do segundo alelo de *TcGPI8* não resultaram em parasitos viáveis, as construções de plasmídeos foram modificadas e o protocolo de seleção de droga foi conduzido de tal forma que as concentrações das drogas fossem aumentadas gradualmente. Foi possível, assim, obter algumas raras linhagens de células duplo resistentes. No entanto, estes parasitos parecem ter sofrido um grande rearranjo de genes envolvendo as sequências de *TcGPI8*. Embora frequentemente descrito em *Leishmania* spp., onde a amplificação gênica e a superexpressão de sequências foram observadas após tentativas de interrupção de genes essenciais (Cruz e Beverley, 1990; Ilgoutz et al., 1999; Boitz e Ullman, 2010), este fenômeno tem sido raramente relatado em *T. cruzi*. Li et al.(2011) mostraram que ao tentarem deletar ambos os alelos do gene que codifica uma aquaporina (*TcAQP1*), envolvida na resposta ao estresse osmótico de epimastigotas de *T. cruzi*, foram obtidos parasitos duplo resistentes, mas com apenas um alelo interrompido. A construção para interrupção do segundo alelo possivelmente foi integrada em outras regiões do genoma e não no *locus* de *TcAQP1*, ou levou à formação de moléculas episomais no parasito (Li et al., 2011). Juntamente com nossos resultados de análises de *Northern blot* e RT-PCR, os dados de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e as hibridações por *Southern blot* sugerem que a amplificação de sequências de *TcGPI8* envolveu a produção de moléculas de DNA episomal. Este fenômeno também foi descrito em *L. major* por Cruz e Beverley (1990), que ao tentarem deletar o gene essencial da dihidrofolato redutase-timidilato sintase (*dhfr-ts*) ocorreu a formação de DNA circular extracromossomal. Assim, a expressão anômala de sequências de

mRNA de *TcGPI8* a partir de localizações genômicas distintas, indicadas por um sinal de RNA de alto peso molecular no *Northern blot* e pela amplificação de mRNA de *TcGPI8* contendo a sequência *spliced leader*, permitiram o crescimento de mutantes nos quais ambos os alelos de *TcGPI8* foram interrompidos pelos marcadores de resistência à drogas.

É possível, portanto, especular que ao tentarmos deletar os dois alelos do gene *TcGPI8*, o qual parece ser um gene essencial para *T. cruzi*, ocorreu a amplificação do *locus* cromossomal de *TcGPI8*, por meio da formação de moléculas de DNA circular extracromossomal, concatenadas, de alto peso molecular. Portanto, nossos resultados sugerem que *T. cruzi* apresenta certa plasticidade genômica. Diferentes mecanismos podem gerar a amplificação de DNA em células de mamíferos e *Leishmania*. Em células de mamíferos em processo tumoral foi descrito um tipo de estrutura denominada cromossomos *double minute* (DM), que são gerados durante o processo de amplificação gênica (Nonet et al., 1993; Lin et al., 2001). Em *Leishmania*, DNA extracromossomal pode surgir espontaneamente ou como resultado da amplificação gênica durante a seleção por drogas. Um dos exemplos mais bem caracterizados é a geração de DNA extracromossomal depois da exposição de células de *Leishmania* a metotrexato, uma droga que inibe o metabolismo do ácido fólico (Beverley, 1991; Ouellette e Borst, 1991). Em *L. major*, Ubeda et al. (2008) mostraram que a amplificação do gene *dhfr-ts*, como um DNA circular extracromossomal, ocorreu através da recombinação homóloga entre sequências repetitivas não codificadoras que flanqueavam esse gene. No entanto, vários outros mecanismos podem estar envolvidos. Para entender o

mecanismo exato que levou a essa mudança no genoma de *T. cruzi*, experimentos adicionais são necessários.

Surpreendentemente, embora nenhuma alteração morfológica maior foi evidente, as análises de microscopia eletrônica de transmissão de estruturas da membrana celular de epimastigotas indicaram que mutantes de *TcGPI8* têm alterações em sua camada do glicocálix. Apesar de ter sido observada somente uma pequena redução na camada de glicocálix nos mutantes heterozigotos, essa alteração não pode ser correlacionada com mudanças nos níveis de mucinas, nos ensaios de imunoblot com frações de membrana e citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-mucina 2B10. Por outro lado, nos parasitos duplo resistentes foi observado um aumento da espessura do glicocálix, que foi confirmado nos ensaios de imunoblot e citometria. Esse pequeno aumento na quantidade das mucinas na superfície é provavelmente devido ao aumento na expressão das cópias translocadas do gene de *TcGPI8* nos mutantes duplo resistentes. Experimentos para confirmar essa hipótese utilizando anticorpos anti-*TcGPI8*, a serem gerados, deverão ser ainda realizados. As mucinas têm um papel crítico durante a infecção, pois são moléculas aceptoras de ácido siálico, que permitem a tripomastigotas possuir uma camada carregada negativamente que as protege da destruição por anticorpos anti- α -galactosil do hospedeiro (Pereira-Chioccia et al., 2000). Além disso, em epimastigotas, as mucinas formam uma camada protetora, que ajudam a proteger o parasito contra as condições adversas encontradas no intestino do inseto vetor, tais como a presença de enzimas digestivas proteolíticas e o estresse osmótico (Acosta-Serrano et al., 2001).

Apesar das alterações nos níveis de mucinas terem sido pequenas, a capacidade dos parasitos geneticamente modificados de invadir células de cultura de tecidos e de infectar camundongos foi profundamente comprometida. As alterações observadas na camada de glicocálix podem ter afetado a interação do parasito com as células hospedeiras e, por conseguinte, a capacidade de infecção destes mutantes *in vitro* e *in vivo*. Pode-se especular que os rearranjos genômicos que ocorreram nos mutantes duplo resistentes, embora resultando na expressão de *TcGPI8* a partir de uma diferente localização genômica, teria afetado a expressão de outras proteínas GPI ancoradas, além das mucinas, também envolvidas na capacidade de infecção do parasito. Experimentos realizados com tripomastigotas metacíclicas de cepas de *T. cruzi*, com diferentes capacidades de invasão celular, indicaram uma correlação inversa entre a infectividade de forma tripomastigotas metacíclicas e a expressão das glicoproteínas gp35/50 e gp90 (Ruiz et al., 1998; Yoshida, 2006). Cepas altamente invasivas não possuem gp90 na superfície e apresentam baixos níveis de expressão de gp35/50, enquanto que, cepas com baixa capacidade de infecção apresentam alta expressão dessas duas glicoproteínas. Gp35/50 correspondem a um grupo de mucinas ancoradas a GPI e são expressas tanto em epimastigotas, como em tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (Mortara et al., 1992). Por sua vez, a gp90, que pertence ao grupo II da superfamília TcS (Freitas et al., 2011), foi caracterizada como uma glicoproteína de superfície estágio-específica de tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, que modula negativamente a invasão de células do hospedeiro (Yoshida et al., 1990; Cortez et al., 2006). Esses dados estão de

acordo com os nossos resultados de imunoblot e citometria de fluxo, utilizando anti-mucina 2B10, que mostram que os parasitos mutantes de *TcGPI8*, duplo resistentes, possuem mais gp35/50 e apresentam menor capacidade de infecção. Para compreender melhor quais outros genes tiveram sua expressão afetada nos mutantes *TcGPI8*, experimentos de imunoblot e citometria de fluxo, utilizando outros anticorpos como por exemplo, anti-gp90, devem ser realizados. Além disso, análises proteômicas da superfície desses mutantes estão também sendo planejadas.

Foi também observado nos experimentos de infecção, que parasitos heterozigotos para o gene *TcGPI8* apresentaram capacidades de infecção *in vitro* e *in vivo* divergentes. Enquanto que em culturas de células Vero infectadas com os mutantes heterozigotos de *TcGPI8*, o número de amastigotas intracelulares e tripomastigotas libertadas no sobrenadante foi aumentado em comparação às células infectadas com parasitos WT, camundongos infectados com os mutantes heterozigotos tiveram a parasitemia reduzida. Esses resultados aparentemente divergentes podem ter ocorrido devido à existência de vários fatores que não estão presentes em condições de cultura *in vitro*, mas que podem atuar *in vivo*. É interessante notar que estudos realizados por Keiko Toma et al. (2000) não encontraram uma correlação entre a infectividade de cepas de parasitos *in vitro* e a parasitemia produzida em camundongos por *T. cruzi*.

Interessantemente, mutantes de *T. brucei* ausentes de *TbGPI8*, apesar de ser viável em cultura, resultaram na ausência de proteínas de superfície ancoradas a GPI, acúmulo de GPI não ligado a proteína e

incapacidade de formas procíclicas de estabelecer infecções no intestino da mosca tsé-tsé (Lillico et al., 2003; Nagamune et al., 2004). Em contraste, RNAi de *GPI8* em formas sanguíneas resultou no acúmulo de glicoproteína variante de superfície (VSG) não ancorada e morte celular com um fenótipo indicativo de bloqueio citocinese (Lillico et al., 2003). Entretanto, nocautes de *GPI8* de *L. mexicana*, embora deficientes de proteínas ancoradas a GPI, exibem um crescimento normal em cultura, são capazes de se diferenciarem em amastigotas e são capazes de infectar os camundongos (Hilley et al., 2000). Além de *GPI8*, formas procíclicas de *T. brucei* ausentes de *TbGPI12* e *TbGPI10* também foram obtidas. Embora incapazes de sintetizar estruturas GPI além GlcNAc-PI, parasitos nocautes para *TbGPI12* são viáveis em cultura, mas são incapazes de colonizar o intestino da mosca tsé-tsé (Güther et al., 2006). A deleção de *TbGPI10* também interfere com a capacidade de mutantes procíclicos de infectar as moscas tsé-tsé (Nagamune et al., 2000). Estes dados estão em contraste com os nossos resultados, que indicaram que a interrupção de apenas um alelo de um gene envolvido nos passos iniciais da via GPI, tais como *TcGPI3* ou *TcGPI10*, resultou em epimastigotas não viáveis de *T. cruzi*. Por outro lado, similar às alterações genômicas observadas em mutantes duplo resistentes de *TcGPI8* de *T. cruzi*, uma tentativa para criar um nocaute de *L. mexicana* pela deleção do gene que codifica a dolicol-fosfato manose sintase resultou na amplificação deste *locus* cromossômico (Ilgoutz et al., 1999). Uma possível explicação para esse contraste é que *T. cruzi* apresenta um número muito maior de genes que possivelmente codificam para proteínas GPI ancoradas (aproximadamente 12%), comparado com outros

tripanosomatídeos, como *T. brucei* e *L. major*, que apresentam menos de 1,5% das proteínas preditas ancoradas a GPI (Nakayasu et al., 2009; Poisson et al., 2007). Portanto, mutantes nocautes para genes da via GPI de *T. cruzi* poderiam levar a um prejuízo maior para as formas epimastigotas do parasito, tornando a sua sobrevivência sem a âncora GPI inviável. Como não existe uma metodologia eficiente para a transfecção de formas tripomastigotas ou amastigotas, tentativas de obtenção de nocautes utilizando essas outras formas do ciclo de vida do *T. cruzi* tornam-se inviáveis.

Adicionalmente, construções para deleção dos dois alelos do gene inositolfosforilceramida sintase (IPC sintase) de *T. cruzi* estão sendo geradas e a interrupção desse gene será obtida por recombinação homóloga. O nocaute dessa enzima poderá resultar em parasitos que apresentam apenas glicerolipídios como componente da âncora lipídica de GPI e GIPL, ao invés de ceramida. Como essa mudança na porção lipídica de GPI ligado à proteína ocorre principalmente durante a metaciclogênese, a obtenção de epimastigotas nocautes pode ser viável, o que nos permitiria estudar o efeito dessa modificação lipídica na infecção *in vitro* e *in vivo* de *T. cruzi*.

Assim, as nossas tentativas de geração de mutantes nocautes de genes envolvidos na biossíntese de GPI de *T. cruzi*, em comparação com estudos semelhantes descritos em *T. brucei* e *L. mexicana*, sugerem que, embora considerados organismos proximamente relacionados, os diferentes membros da família de tripanosomatídeos apresentam significativas peculiaridades que merecem análises detalhadas das principais vias bioquímicas em cada uma das espécies desses parasitos.

6. Perspectivas

- Testar inibidores de enzimas da via biossintética de GPI de *T. cruzi* em leveduras complementadas com os genes *TcDPM1*, *TcGPI10* e *TcGPI12*, objetivando descobrir novos alvos terapêuticos por meio de ensaios de *screening* de drogas em larga escala;
- Expressar proteínas recombinantes da via de biossíntese de GPI de *T. cruzi* em outras linhagens de bactérias e/ou leveduras;
- Produzir anticorpos anti-GPI8 de *T. cruzi* e verificar os níveis de expressão do gene *TcGPI8* nos parasitos mutantes;
- Realizar análises estruturais de proteínas da via GPI de *T. cruzi*, objetivando o desenho de drogas específicas contra a doença de Chagas;
- Verificar, por meio de análises proteômicas, a expressão de outras glicoproteínas, como por exemplo, gp90 e gp82, na superfície de parasitos mutantes para o gene *TcGPI8*;
- Gerar linhagens duplo nocaute do gene *TcIPCS* em *T. cruzi* e caracterizar o genótipo e o fenótipo desses mutantes.

7. Referências bibliográficas

- Acosta-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S (2001) The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol* 114: 143-150.
- Agusti R, Couto AS, Campetella OE, Frasch AC, de Lederkremer RM (1997) The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two different lipids. *Glycobiology* 7: 731-735.
- Almeida IC, Camargo MM, Procópio DO, Silva LS, Mehler A, Travassos LR, Gazzinelli RT, Ferguson MA (2000) Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J* 19: 1476-1485.
- Almeida IC, Ferguson MA, Schenkman S, Travassos LR (1994) Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 304: 793-802.
- Almeida IC, Gazzinelli RT (2001) Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol* 70: 467-477.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Alves MJ, Colli W (2008) Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcell Biochem* 47: 58-69.
- Ashida H, Hong Y, Murakami Y, Shishioh N, Sugimoto N, Kim YU, Maeda Y, Kinoshita T (2005) Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I. *Mol Biol Cell* 16: 1439-1448.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J A, Struhl K (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Bangs JD, Uyetake L, Brickman MJ, Balber AE, Boothroyd JC (1993) Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in *Trypanosoma*

- brucei. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. *J Cell Sci* 105: 1101-1113.
- Barberis A, Gunde T, Berset C, Audetat S, Luthi U (2005) Yeast as a screening tool. *Drug Discov Today* 2: 187-192.
- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S (2003) The trypanosomiases. *Lancet* 362: 1469-1480.
- Benchimol Barbosa PR (2006) The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol* 112: 132-133.
- Benghezal M, Benachour A, Rusconi S, Aebi M, Conzelmann A (1996) Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J* 15: 6575-6583.
- Bertello LE, Andrews NW, de Lederkremer RM (1996) Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 79: 143-151.
- Beverley SM (1991) Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 45: 417-444.
- Bilsland E, Pir P, Gutteridge A, Johns A, King RD, Oliver SG (2011) Functional expression of parasite drug targets and their human orthologs in yeast. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1320.
- Bilsland E, Sparkes A, Williams K, Moss HJ, de Clare M, Pir P, Rowland J, Aubrey W, Pateman R, Young M, Carrington M, King RD, Oliver SG (2013) Yeast-based automated high-throughput screens to identify anti-parasitic lead compounds. *Open Biol* 3: 120158.
- Boitz JM, Ullman B (2010) Amplification of adenine phosphoribosyltransferase suppresses the conditionally lethal growth and virulence phenotype of *Leishmania donovani* mutants lacking both hypoxanthine-guanine and xanthine phosphoribosyltransferases. *J Biol Chem* 285: 18555-18564.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brener Z (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 27: 347-382.
- Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (2000) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Briones MR, Egima CM, Schenkman S (1995) Trypanosoma cruzi trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms. *Mol Biochem Parasitol* 70: 9-17.
- Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas AC, De Marchi CR, Ferguson MA, Frasch AC, Almeida IC (2004) The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of Trypanosoma cruzi is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem* 279: 15860-15869.
- Camargo EP (1964) Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 93-100.
- Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT (1997) Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol* 159: 6131-6139.
- Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortés A, Levin MJ, González A, Degraeve W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requena JM, Franco da Silveira J (1995) Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the Trypanosoma cruzi genome project. *Mol Biochem Parasitol* 7: 273-278.
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110: 119-122.
- Colli W, Alves MJ (1999) Relevant glycoconjugates on the surface of Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 37-49.
- Colussi PA, Taron CH, Mack JC, Orlean P (1997) Human and Saccharomyces cerevisiae dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the enzyme, but both function in Schizosaccharomyces pombe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7873-7878.
- Cortez M, Silva MR, Neira I, Ferreira D, Sasso GR, Luquetti AO, Rassi A, Yoshida N (2006) Trypanosoma cruzi surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect* 8: 36-44.
- Coura JR, Borges-Pereira J (2010) Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 115: 5-13.

- Coura JR, Viñas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465: S6-S7.
- Cruz A, Beverley SM (1990) Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature* 348: 171-173.
- Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, Batt CA (2007) Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 381-389.
- DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SM (2004) Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res* 92: 113-120.
- Dc-Rubin SS, Schenkman S (2012) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. *Cell Microbiol* 14: 1522-1530.
- de Lederkremer RM, Agusti R (2009) Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 62: 311-366.
- de Lederkremer RM, Agusti R, Docampo R (2011) Inositolphosphoceramide metabolism in *Trypanosoma cruzi* as compared with other trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol* 58: 79-87.
- de Macedo CS, Shams-Eldin H, Smith TK, Schwarz RT, Azzouz N (2003) Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Biochimie* 85: 465-472.
- de Souza W (2007) Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia.
- Delorenzi M, Sexton A, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Speed T, Schofield L (2002) Genes for glycosylphosphatidylinositol toxin biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 70: 4510-4522.
- Denny PW, Shams-Eldin H, Price HP, Smith DF, Schwarz RT (2006) The protozoan inositol phosphorylceramide synthase: a novel drug target that defines a new class of sphingolipid synthase. *J Biol Chem* 281: 28200-28209.
- Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B, Heffernan MJ, Jones K, Valenzuela JG, Kamhawi S, Ortega J, Rosales SP, Lee BY, Bacon KM, Fleischer B, Slingsby BT, Cravioto MB, Tapia-Conyer R, Hotez PJ (2012) Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines* 11: 1043-1055.

- Eisenhaber B, Maurer-Stroh S, Novatchkova M, Schneider G, Eisenhaber F (2003) Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins. *Bioessays* 25: 367-385.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Wortley EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
- Ferguson MA (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 112: 2799-2809.
- Ferguson MA (2000) Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10673-10675.
- Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat Biotechnol* 21: 1266-1267.
- Figueiredo JM, Dias WB, Mendonça-Previato L, Previato JO, Heise N (2005) Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 387: 519-529.
- Fraering P, Imhof I, Meyer U, Strub JM, van Dorsselaer A, Vionnet C, Conzelmann A (2001) The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol Biol Cell* 12: 3295-3306.
- Freitas LM, dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Rodrigues TS, Gazzinelli RT, Teixeira SM, Fujiwara RT, Bartholomeu DC (2011) Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One* 6: e25914.
- Fujita M, Kinoshita T (2010) Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. *FEBS Lett* 584: 1670-1677.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355-360.

- Giorgi ME, de Lederkremer RM (2011) Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. *Carbohydr Res* 346: 1389-1393.
- Gürtler RE, Segura EL, Cohen JE (2003) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis* 9: 29-32.
- Güther ML, de Almeida ML, Yoshida N, Ferguson MA (1992) Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. The structure of the glycan core. *J Biol Chem* 267: 6820-6828.
- Güther ML, Ferguson MA (1995) The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 14: 3080-3093.
- Güther ML, Lee S, Tetley L, Acosta-Serrano A, Ferguson MA (2006) GPI-anchored proteins and free GPI glycolipids of procyclic form *Trypanosoma brucei* are nonessential for growth, are required for colonization of the tsetse fly, and are not the only components of the surface coat. *Mol Biol Cell* 17: 5265-5274.
- Heidler SA, Radding JA (1995) The AUR1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes dominant resistance to the antifungal agent aureobasidin A (LY295337). *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2765-2769.
- Heise N, de Almeida ML, Ferguson MA (1995) Characterization of the lipid moiety of the glycosylphosphatidylinositol anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. *Mol Biochem Parasitol* 70: 71-84.
- Heise N, Raper J, Buxbaum LU, Peranovich TM, de Almeida ML (1996) Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 271: 16877-16887.
- Hilley JD, Zawadzki JL, McConville MJ, Coombs GH, Mottram JC (2000) *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI): protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol Biol Cell* 11: 1183-1195.
- Hong Y, Nagamune K, Morita YS, Nakatani F, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T (2006a) Removal or maintenance of inositol-linked acyl chain in glycosylphosphatidylinositol is critical in trypanosome life cycle. *J Biol Chem* 281: 11595-11602.

- Hong Y, Nagamune K, Ohishi K, Morita YS, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T (2006b) TbGPI16 is an essential component of GPI transamidase in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* 580: 603-606.
- Hong Y, Ohishi K, Kang JY, Tanaka S, Inoue N, Nishimura J, Maeda Y, Kinoshita T (2003) Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Mol Biol Cell* 14: 1780-1789.
- Hughes, TR (2002) Yeast and drug discovery. *Functional and Integrative Genomics* 2, 199–211.
- Ilgoutz SC, Zawadzki JL, Ralton JE, McConville MJ (1999) Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*. *EMBO J* 18: 2746-2755.
- Imhof I, Canivenc-Gansel E, Meyer U, Conzelmann A (2000) Phosphatidylethanolamine is the donor of the phosphorylethanolamine linked to the alpha1,4-linked mannose of yeast GPI structures. *Glycobiology* 10: 1271-1275.
- Johnston M, Davis RW (1984) Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 4: 1440-1448.
- Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT (2010) The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 12: e29.
- Junqueira C, Guerrero AT, Galvão-Filho B, Andrade WA, Salgado AP, Cunha TM, Ropert C, Campos MA, Penido ML, Mendonça-Previato L, Previato JO, Ritter G, Cunha FQ, Gazzinelli RT (2012) *Trypanosoma cruzi* adjuvants potentiate T cell-mediated immunity induced by a NY-ESO-1 based antitumor vaccine. *PLoS One* 7: e36245.
- Kawagoe K, Kitamura D, Okabe M, Taniuchi I, Ikawa M, Watanabe T, Kinoshita T, Takeda J (1996) Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87: 3600-3606.
- Keiko Toma H, Penna Cerávolo I, Guerra HL, Steindel M, Romanha AJ (2000) *Trypanosoma cruzi*: parasitaemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. *Int J Parasitol* 30: 593-597.

- Kim YU, Ashida H, Mori K, Maeda Y, Hong Y, Kinoshita T (2007) Both mammalian PIG-M and PIG-X are required for growth of GPI14-disrupted yeast. *J Biochem* 142: 123-129.
- Kinoshita T, Inoue N (2000) Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 4: 632-638.
- Koeller CM, Heise N (2011) The sphingolipid biosynthetic pathway is a potential target for chemotherapy against Chagas Disease. *Enzyme Res* 2011: 648159.
- Li ZH, Alvarez VE, De Gaudenzi JG, Sant'Anna C, Frasch AC, Cazzulo JJ, Docampo R (2011) Hyperosmotic stress induces aquaporin-dependent cell shrinkage, polyphosphate synthesis, amino acid accumulation, and global gene expression changes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 286: 43959-43971.
- Lillico S, Field MC, Blundell P, Coombs GH, Mottram JC (2003) Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8. *Mol Biol Cell* 14: 1182-1194.
- Lin CT, Lyu YL, Xiao H, Lin WH, Whang-Peng J (2001) Suppression of gene amplification and chromosomal DNA integration by the DNA mismatch repair system. *Nucleic Acids Res* 29: 3304-3310.
- Maeda Y, Kinoshita T (2008) Dolichol-phosphate mannose synthase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1780: 861-868.
- Mazhari-Tabrizi R, Blank M, Mumberg D, Funk M, Schwarz RT, Eckert V (1999) Chromosomal promoter replacement in *Saccharomyces cerevisiae*: construction of conditional lethal strains for the cloning of glycosyltransferases from various organisms. *Glycoconj J* 16: 673-679.
- McConville MJ, Ferguson MA (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J* 294: 305-324.
- McConville MJ, Homans SW, Thomas-Oates JE, Dell A, Bacic A (1990) Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *J Biol Chem* 265: 7385-7394.
- Morita YS, Paul KS, Englund PT (2000) Specialized fatty acid synthesis in African trypanosomes: myristate for GPI anchors. *Science* 288: 140-143.

- Mortara RA, da Silva S, Araguth MF, Blanco SA, Yoshida N (1992) Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun* 60: 4673-4678.
- Murakami Y, Siripanyaphinyo U, Hong Y, Tashima Y, Maeda Y, Kinoshita T (2005) The initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-Y, a seventh component. *Mol Biol Cell* 16: 5236-5246.
- Murakami Y, Siripanyapinyo U, Hong Y, Kang JY, Ishihara S, Nakakuma H, Maeda Y, Kinoshita T (2003) PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor. *Mol Biol Cell* 14: 4285-4295.
- Nagamune K, Acosta-Serrano A, Uemura H, Brun R, Kunz-Renggli C, Maeda Y, Ferguson MA, Kinoshita T (2004) Surface sialic acids taken from the host allow trypanosome survival in tsetse fly vectors. *J Exp Med* 199: 1445-1450.
- Nagamune K, Nozaki T, Maeda Y, Ohishi K, Fukuma T, Hara T, Schwarz RT, Sutterlin C, Brun R, Riezman H, Kinoshita T (2000) Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10336-10341.
- Nagamune K, Ohishi K, Ashida H, Hong Y, Hino J, Kangawa K, Inoue N, Maeda Y, Kinoshita T (2003) GPI transamidase of *Trypanosoma brucei* has two previously uncharacterized (trypanosomatid transamidase 1 and 2) and three common subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10682-10687.
- Nakayasu ES, Yashunsky DV, Nohara LL, Torrecilhas AC, Nikolaev AV, Almeida IC (2009) GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Syst Biol* 5: 261.
- Nonet GH, Carroll SM, DeRose ML, Wahl GM (1993) Molecular dissection of an extrachromosomal amplicon reveals a circular structure consisting of an imperfect inverted duplication. *Genomics* 15: 543-558.
- Norcliffe JL, Alvarez-Ruiz E, Martin-Plaza JJ, Steel PG, Denny PW (2013) The utility of yeast as a tool for cell-based, target-directed high-throughput screening. *Parasitology*: 1-9.
- Oganesyan N, Kim SH, Kim R (2005) On-column protein refolding for crystallization. *J Struct Funct Genomics* 6: 177-182.

- Ohishi K, Inoue N, Kinoshita T (2001) PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *EMBO J* 20: 4088-4098.
- Ohishi K, Inoue N, Maeda Y, Takeda J, Riezman H, Kinoshita T (2000) Gaa1p and gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol Biol Cell* 11: 1523-1533.
- Ohishi K, Nagamune K, Maeda Y, Kinoshita T (2003) Two subunits of glycosylphosphatidylinositol transamidase, GPI8 and PIG-T, form a functionally important intermolecular disulfide bridge. *J Biol Chem* 278: 13959-13967.
- Orlean P (1990) Dolichol phosphate mannosyl synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10: 5796-5805.
- Orlean P, Menon AK (2007) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycosphospholipids. *J Lipid Res* 48: 993-1011.
- Ouellette M, Borst P (1991) Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res Microbiol* 142: 737-746.
- Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, Travassos LR, Schenkman S (2000) Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Cell Sci* 113 : 1299-1307.
- Pittet M, Conzelmann A (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1771: 405-420.
- Poisson G, Chauve C, Chen X, Bergeron A (2007) FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 5: 121-130.
- Previato JO, Jones C, Gonçalves LP, Wait R, Travassos LR, Mendonça-Previato L (1994) O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 301: 151-159.

- Previato JO, Jones C, Xavier MT, Wait R, Travassos LR, Parodi AJ, Mendonça-Previato L (1995) Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. *J Biol Chem* 270: 7241-7250.
- Previato JO, Wait R, Jones C, DosReis GA, Todeschini AR, Heise N, Mendonça-Previato L (2004) Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. *Adv Parasitol* 56: 1-41.
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 40: D290-301.
- Reggiori F, Canivenc-Gansel E, Conzelmann A (1997) Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 16: 3506-3518.
- Rubin-de-Celis SS, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S (2006) Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol* 8: 1888-1898.
- Ruiz RC, Favoreto S Jr, Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N (1998) Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J* 330: 505-511.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Sanyal S, Frank CG, Menon AK (2008) Distinct flippases translocate glycerophospholipids and oligosaccharide diphosphate dolichols across the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 47: 7937-7946.
- Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 115: 14-21.
- Serrano AA, Schenkman S, Yoshida N, Mehlert A, Richardson JM, Ferguson MA (1995) The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during

- parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J Biol Chem* 270: 27244-27253.
- Sevova ES, Goren MA, Schwartz KJ, Hsu FF, Turk J, Fox BG, Bangs JD (2010) Cell-free synthesis and functional characterization of sphingolipid synthases from parasitic trypanosomatid protozoa. *J Biol Chem* 285: 20580-20587.
- Shams-Eldin H, de Macedo CS, Niehus S, Dorn C, Kimmel J, Azzouz N, Schwarz RT (2008) *Plasmodium falciparum* dolichol phosphate mannose synthase represents a novel clade. *Biochem Biophys Res Commun* 370: 388-393.
- Sharma DK, Smith TK, Weller CT, Crossman A, Brimacombe JS, Ferguson MA (1999) Differences between the trypanosomal and human GlcNAc-PI de-N-acetylases of glycosylphosphatidylinositol membrane anchor biosynthesis. *Glycobiology* 9: 415-422.
- Sibley CH, Brophy VH, Cheesman S, Hamilton KL, Hankins EG, Wooden JM, Kilbey B (1997) Yeast as a model system to study drugs effective against apicomplexan proteins. *Methods* 13: 190–207.
- Sipos G, Puoti A, Conzelmann A (1994) Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: absence of ceramides from complete precursor glycolipids. *EMBO J* 13: 2789-2796.
- Smith TK, Crossman A, Borissow CN, Paterson MJ, Dix A, Brimacombe JS, Ferguson MA (2001) Specificity of GlcNAc-PI de-N-acetylase of GPI biosynthesis and synthesis of parasite-specific suicide substrate inhibitors. *EMBO J* 20: 3322-3332.
- Smith TK, Crossman A, Paterson MJ, Borissow CN, Brimacombe JS, Ferguson MA (2002) Specificities of enzymes of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Trypanosoma brucei* and HeLa cells. *J Biol Chem* 277: 37147-37153.
- Smith TK, Sharma DK, Crossman A, Brimacombe JS, Ferguson MA (1999) Selective inhibitors of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 18: 5922-5930.
- Smith TK, Sharma DK, Crossman A, Dix A, Brimacombe JS, Ferguson MA (1997) Parasite and mammalian GPI biosynthetic pathways can be distinguished using synthetic substrate analogues. *EMBO J* 16: 6667-6675.

- Sobering AK, Watanabe R, Romeo MJ, Yan BC, Specht CA, Orlean P, Riezman H, Levin DE (2004) Yeast Ras regulates the complex that catalyzes the first step in GPI-anchor biosynthesis at the ER. *Cell* 117: 637-648.
- Souza RT, Lima FM, Barros RM, Cortez DR, Santos MF, Cordero EM, Ruiz JC, Goldenberg S, Teixeira MMG, Silveira JF (2011) Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 6: e23042.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ Gibson W (2001) The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* 48: 1-56.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R.J (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Clin Invest* 118: 1301-1310.
- Sütterlin C, Horvath A, Gerold P, Schwarz RT, Wang Y, Dreyfuss M, Riezman H (1997) Identification of a species-specific inhibitor of glycosylphosphatidylinositol synthesis. *EMBO J* 16: 6374-6383.
- Tanaka S, Maeda Y, Tashima Y, Kinoshita T (2004) Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. *J Biol Chem* 279: 14256-14263.
- Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE (1995) Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 270: 22586-22594.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Tomavo S, Schwarz RT, Dubremetz JF (1989) Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol Cell Biol* 9: 4576-4580.
- Tomita S, Inoue N, Maeda Y, Ohishi K, Takeda J, Kinoshita T (1998) A homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Dpm1p is not sufficient for synthesis of dolichol-phosphate-mannose in mammalian cells. *J Biol Chem* 273: 9249-9254.
- Ubeda JM, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Tremblay MJ, Olivier M, Papadopoulos B, Ouellette M (2008) Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated

- with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol* 9: R115.
- Umemura M, Okamoto M, Nakayama K, Sagane K, Tsukahara K, Hata K, Jigami Y (2003) GWT1 gene is required for inositol acylation of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *J Biol Chem* 278: 23639-23647.
- Urbina JA, Docampo R (2003) Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495-501.
- Vázquez-Chagoyán JC, Gupta S, Garg NJ (2011) Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Adv Parasitol* 75: 121-146.
- Watanabe R, Murakami Y, Marmor MD, Inoue N, Maeda Y, Hino J, Kangawa K, Julius M, Kinoshita T (2000) Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2. *EMBO J* 19: 4402-4411.
- Watanabe R, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Kinoshita T (1999) Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem J* 339: 185-192.
- Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5022-5027.
- Yoshida N (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78: 87-111.
- Yoshida N, Blanco SA, Araguth MF, Russo M, González J (1990) The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 39: 39-46.
- Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E (2007) Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 47: 540-544.

8. Anexo

8.1. Artigo publicado na *PLoS Neglected Tropical Disease* (2013).

Cardoso MS, Junqueira C, Trigueiro RC, Shams-Eldin H, Macedo CS, Araújo PR, Gomes DA, Martinelli PM, Kimmel J, Stahl P, Niehus S, Schwarz RT, Previato JO, Mendonça-Previato L, Gazzinelli RT, Teixeira SMR (2013) Identification and functional analysis of *Trypanosoma cruzi* genes that encode proteins of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2369.

Identification and Functional Analysis of *Trypanosoma cruzi* Genes That Encode Proteins of the Glycosylphosphatidylinositol Biosynthetic Pathway

Mariana S. Cardoso¹, Caroline Junqueira², Ricardo C. Trigueiro¹, Hosam Shams-Eldin³, Cristiana S. Macedo⁴, Patrícia R. Araújo¹, Dawidson A. Gomes¹, Patrícia M. Martinelli⁵, Jürgen Kimmel³, Philipp Stahl³, Sebastian Niehus³, Ralph T. Schwarz³, José O. Previato⁴, Lucia Mendonça-Previato⁴, Ricardo T. Gazzinelli^{1,2}, Santuza M. R. Teixeira^{1*}

1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Institut für Virologie – AG Parasitologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany, **4** Instituto de Biofísica Carlos Chagas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Abstract

Background: *Trypanosoma cruzi* is a protist parasite that causes Chagas disease. Several proteins that are essential for parasite virulence and involved in host immune responses are anchored to the membrane through glycosylphosphatidylinositol (GPI) molecules. In addition, *T. cruzi* GPI anchors have immunostimulatory activities, including the ability to stimulate the synthesis of cytokines by innate immune cells. Therefore, *T. cruzi* genes related to GPI anchor biosynthesis constitute potential new targets for the development of better therapies against Chagas disease.

Methodology/Principal Findings: *In silico* analysis of the *T. cruzi* genome resulted in the identification of 18 genes encoding proteins of the GPI biosynthetic pathway as well as the inositolphosphorylceramide (IPC) synthase gene. Expression of GFP fusions of some of these proteins in *T. cruzi* epimastigotes showed that they localize in the endoplasmic reticulum (ER). Expression analyses of two genes indicated that they are constitutively expressed in all stages of the parasite life cycle. *T. cruzi* genes *TcDPM1*, *TcGPI10* and *TcGPI12* complement conditional yeast mutants in GPI biosynthesis. Attempts to generate *T. cruzi* knockouts for three genes were unsuccessful, suggesting that GPI may be an essential component of the parasite. Regarding *TcGPI8*, which encodes the catalytic subunit of the transamidase complex, although we were able to generate single allele knockout mutants, attempts to disrupt both alleles failed, resulting instead in parasites that have undergone genomic recombination and maintained at least one active copy of the gene.

Conclusions/Significance: Analyses of *T. cruzi* sequences encoding components of the GPI biosynthetic pathway indicated that they are essential genes involved in key aspects of host-parasite interactions. Complementation assays of yeast mutants with these *T. cruzi* genes resulted in yeast cell lines that can now be employed in high throughput screenings of drugs against this parasite.

Citation: Cardoso MS, Junqueira C, Trigueiro RC, Shams-Eldin H, Macedo CS, et al. (2013) Identification and Functional Analysis of *Trypanosoma cruzi* Genes That Encode Proteins of the Glycosylphosphatidylinositol Biosynthetic Pathway. PLoS Negl Trop Dis 7(8): e2369. doi:10.1371/journal.pntd.0002369

Editor: Paul W. Denny, Durham University, United Kingdom

Received: April 18, 2013; **Accepted:** July 1, 2013; **Published:** August 8, 2013

Copyright: © 2013 Cardoso et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), The Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas (INCTV, Brazil), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD, Germany) and Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Germany). MSC, JOP, LMP, RTG and SMRT are recipients of CNPq fellowships; PS is a recipient of fellowships from Alumni Medizin Marburg, Roland und Elfriede Schauer-Stiftung and Studien-stiftung des Deutschen Volkes (Germany). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: santuzat@icb.ufmg.br

Introduction

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) is an abundant component of the plasma membrane of protist parasites. In most eukaryotic cells, GPIs are found as free molecules or as lipid anchor for proteins that are bound to the cell surface [1]. They are complex molecules that are synthesized in the ER by sequential addition of sugar residues and other substituents, e.g. ethanolamine-phosphate, to the phosphatidylinositol (PI) precursor and transported to the

cell surface, as a free GPI also known as GIPL (glycoinositol-phospholipid) or linked to the C-terminus of a protein that contains a GPI signal sequence [2]. Numerous studies with different parasites clearly show that GIPLs and GPI-anchored proteins play important roles in different processes related to host-parasite interaction. Also, it has been suggested that, because of the existence of differences in the structure of GPI from several parasite species as well as between GPIs of the parasite and their host cells [2], [3], [4], these molecules

Author Summary

Chagas disease, considered one of the most neglected tropical diseases, is caused by the blood-borne parasite *Trypanosoma cruzi* and currently affects about 8 million people in Latin America. *T. cruzi* can be transmitted by insect vectors, blood transfusion, organ transplantation and mother-to-baby as well as through ingestion of contaminated food. Although *T. cruzi* causes life-long infections that can result in serious damage to the heart, the two drugs currently available to treat Chagas disease, benznidazole and nifurtimox, which have been used for more than 40 years, have proven efficacy only during the acute phase of the disease. Thus, there is an urgent need to develop new drugs that are more targeted, less toxic, and more effective against this parasite. Here we described the characterization of *T. cruzi* genes involved in the biosynthesis of GPI anchors, a molecule responsible for holding different types of glycoproteins on the parasite membrane. Since GPI anchored proteins are essential molecules *T. cruzi* uses during infection, besides helping understand how this parasite interacts with its host, this work may contribute to the development of better therapies against Chagas disease.

constitute promising targets for studies towards the development of new anti-microbial drugs [5].

Trypanosoma cruzi is a parasitic protist that causes Chagas disease, an illness not only prevalent in Latin America, where an estimated 8 million people are infected, but a worldwide health issue for which there is an urgent need for the development of new chemotherapeutic agents and more effective prophylactic methods (www.who.int/topics/chagas_disease/en/). The surface of *T. cruzi* is covered by a large amount of GPI-anchored proteins whose structure and chemical composition have been extensively studied [6] and are expressed in all developmental stages of the parasite life cycle [3], [7]. Analysis of the *T. cruzi* genome indicated that 12% of the parasite genes encode proteins anchored by GPI, a percentage that is much higher when compared with other organisms [8]. Many of these proteins play important roles in the invasion process and, since they show varying sequences, they could also participate in the processes responsible for evasion of the host immune response [9], [10]. Two main components of the *T. cruzi* surface, the *trans*-sialidases and mucins, which act, respectively, as enzymes responsible for the transfer and acceptors for sialic acid molecules, are GPI-anchored glycoproteins [11]. It has also been demonstrated that *T. cruzi* GPI-anchored mucins as well as free GPI anchors act as potent pro-inflammatory agents that are recognized by Toll like receptors [12] and, because of their role in activating the innate immune response, they have been used as adjuvants in immunization protocols [13].

In *Saccharomyces cerevisiae*, biosynthesis of GPI is essential for cell growth and occurs in eleven steps beginning with the transfer of a molecule of N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) from UDP-GlcNAc to PI [14], [15]. After the addition of mannose molecules using dolichol-P-mannose as a donor, followed by the transfer of ethanolamine-phosphate (EtNP) to the third mannose residue, GPI is transferred to proteins that have a predicted GPI addition signal at their C-terminal end, in a reaction catalyzed by the GPI-transamidase complex [16]. Genes encoding enzymes involved in GPI pathway from various organisms, including protist parasites such as *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana* and *Plasmodium falciparum* have been cloned and their products characterized by functional complementation in mammalian cells and in yeast

mutants [17], [18], [19], [20]. Although the main structure of GPI is conserved in all organisms, several studies have shown differences in the biosynthetic pathway and additional modifications to GPI structures present in mammalian and parasite cells [2], [3], [4]. Substrate analogues of enzymes of the GPI biosynthetic pathway showing trypanocidal activity have been described [21]. Since enzymes involved in the basic steps common to the biosynthesis of GPI in the different organisms have different sensitivities to various inhibitors [22], [23], [24], [25], [26], [27], we sought to characterize the genes involved in biosynthesis of GPI anchors in *T. cruzi*. Orthologous sequences of all genes involved in biosynthesis of *T. cruzi* GPI anchors were identified and, for three of them, we were able to show that they complement yeast conditional mutants of genes of this pathway. Unsuccessful attempts to generate *T. cruzi* knockouts for three of these genes suggest that GPI is an essential component of the parasite. Since specific inhibition of GPI biosynthesis may affect the expression of a large number of *T. cruzi* proteins that are essential for host-parasite interactions, targeting this pathway can be considered a promising strategy for the development of new chemotherapy against Chagas disease. The availability of yeast mutants expressing *T. cruzi* enzymes constitutes the first step in that direction.

Methods

Parasite cultures

Epimastigotes of the CL Brener clone of *T. cruzi* were maintained in logarithmic growth phase at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% fetal bovine serum as described by Camargo [28]. Metacyclic trypomastigotes were obtained after metacyclogenesis in LIT medium, observed after 15–20 days of culture [28] and were used to infect Vero cells. Intracellular amastigotes and tissue culture derived trypomastigotes were obtained from Vero cells grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum, at 37°C and 5% CO₂ as previously described [29].

In silico analysis of T. cruzi genes

Sequence analyses were conducted using the *T. cruzi* genome database (www.tritrypdb.org) to identify all orthologous genes involved in the parasite GPI biosynthesis. Sequences from different organisms, such as *T. brucei*, *P. falciparum* and *S. cerevisiae* [16], [20], were used as queries in Blastp analyses (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) and ClustalW (www.clustal.org/) for multiple alignments between the predicted *T. cruzi* protein sequences and homologous sequences present in other organisms.

DNA and RNA extraction, northern blot and RT-PCR assays

Total DNA was purified from 10⁹ *T. cruzi* epimastigotes that were harvested from exponentially growing cultures, according to previously described protocols [29]. Total RNA was isolated from epimastigotes, tissue culture derived trypomastigotes and amastigotes using the RNeasy kit (Qiagen). For northern blot analyses, 10 µg of total RNA/lane was separated in 1.2% agarose/MOPS/formaldehyde gel. The RNA was transferred to Hybond-N membrane (GE-Healthcare) and hybridized with GPI8, GPI10 and 24Sα rRNA probes previously labeled with [α -³²P]-dCTP using the Amersham Ready-to-Go DNA Labeling Beads (GE-Healthcare), according to the suppliers protocol. The hybridization was carried out as previously described [30] in 50% formamide buffer at 42°C. After washing twice with 2X SSC/0.2% SDS at 60°C for 20 min, the membranes were exposed to a

phosphor screen of the STORM 820 phosphor image (GE-Healthcare). Reverse-transcription amplifications (RT-PCR) were carried out with total RNA isolated from transfected yeast mutants and *T. cruzi* epimastigotes according to published protocols [30]. After first strand cDNA synthesis using oligo (dT)₁₈ or gene-specific primers (see primer sequences in supplementary material, Table S1) and the SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies), the cDNAs were amplified using Taq Polymerase (Promega) and primers specific for each gene and analyzed in 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

Yeast strains and culture media

The *S. cerevisiae* strain used in this work were: YPH499 (Mat a, *ura3-52*, *lys2-801amber*, *ade2-101ochre*, *trp1-63*, *his3-200*, *leu2-1*) (Stratagene), used as a control, and conditional lethal yeast mutants for GPI biosynthesis (YPH499-HIS-GAL-DPM1, YPH499-HIS-GAL-GPI3, YPH499-HIS-GAL-GPI8, YPH499-HIS-GAL-GPI10, YPH499-HIS-GAL-GPI12, YPH499-HIS-GAL-GPI14, YPH499-HIS-GAL-GAA1, and YPH499-HIS-GAL-AUR1), which were generated by replacement of the endogenous yeast promoter by a galactose regulated promoter, as described [31]. *S. cerevisiae* strains were grown in YPGR medium (1% w/v yeast extract, 2% w/v bacto-peptone, 2% w/v galactose, 1% w/v raffinose), or in SD medium (0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose, containing the nutritional supplements necessary to complement the auxotrophic samples or to allow selection of transformants). Before complementation, yeast clones were cultivated in SGR medium (4% galactose, 2% raffinose, 0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulfate) in which glucose is replaced by galactose/raffinose as a carbon source.

Transformation of conditional lethal *S. cerevisiae* mutants

Sequences encompassing the full-length coding regions of *TcDPM1*, *TcGPI3*, *TcGPI8*, *TcGPI10*, *TcGPI12*, *TcGPI14*, *TcGAA1*, and *TcIPCS* were PCR amplified from total DNA of *T. cruzi* epimastigotes prepared as described above, using primers specific for each gene (Table S1). The amplicons were inserted into the *S. cerevisiae* expression vector pRS426Met [32]. Full-length coding sequences corresponding to orthologous *S. cerevisiae* genes were also PCR amplified with specific primers (Table S1) and cloned into the same vector. Transformation of yeast mutants were carried out using the standard lithium acetate procedure [33]. Conditional lethal mutants were transformed with pRS426Met plasmids carrying either the *S. cerevisiae* (Sc) or the *T. cruzi* (Tc) genes and transformed cells were plated on minimal medium lacking histidine and uracil containing either galactose (SGR) or glucose (SD) and incubated at 30°C.

SDS-PAGE of [2-³H]myo-inositol labeled yeast proteins

Control YPH499 cells, mutant yeasts (YPH499-HIS-GAL) and mutant yeasts carrying pRS426Met containing yeast or *T. cruzi* genes were grown in SGR to saturation and used to inoculate SD (2% glucose), in which they were grown for about 16 h. Cells (1×10^8) were washed twice in SD without inositol medium (2% glucose), resuspended in 1 ml of SD without inositol (2% glucose) and depleted of inositol for 20 min before the addition of 30 μ Ci of [2-³H]myo-inositol (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA). Cells were labeled for 1 hour. Protein extraction was done according to Damasceno et al. [34] with the following modifications: radiolabeled cells were harvested, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS 1X) at pH 7.4, and resuspended in 100 μ l of Yeast Breaking Buffer [50 mM sodium phosphate, pH 7.4; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 1X prote-

ase inhibitor cocktail (Amresco, Solon, USA); 1 mM EDTA, and 5% (v/v) glycerol]. Yeast cells were lysed by the addition of acid-washed glass beads (425–600 μ m) vortexing for 1 min with 1 min intervals on ice, repeated twenty times. The lysate was centrifuged at $2,000 \times g$ for 5 min at 4°C and the supernatant was collected. The remaining pellet containing cell debris and glass beads was resuspended in 75 μ l of Yeast Breaking Buffer containing 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) by vortexing for 1 min with 1 min intervals on ice, repeated five times. After removing cellular debris by centrifugation, the lysates were combined and the proteins were then separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Protein bands containing labeled inositol were detected by fluorography.

Dol-P-Man synthase assays

Wild type and yeast mutant cell lysates were prepared as previously described [35]. Briefly, exponential-phase yeast cultures corresponding to 1.5×10^7 cells/ml of cells grown in glucose-containing medium (nonpermissive) or in galactose-containing medium (permissive medium) were lysed after incubation in 1.0 ml of 1 M sorbitol/1 mM EDTA containing Zymolyase at 37°C and glass beads for 30 min, harvested by centrifugation ($1800 \times g$, 10 min, 4°C) and resuspended in 200 μ l of TM buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, containing 5 mM MgCl₂ and 0.2% 2-mercaptoethanol). Ninety μ l for lysates (corresponding to 3×10^8 cells for each assay) were assayed directly for Dol-P-Man synthase activity as described [36]. Briefly, incubation mixtures contained 5 μ l of GDP-[³H]Man (1 μ Ci/ml), 1 μ l of Dol-P (5 mg/ml dispersed in 1.0% Triton X-100 by sonication) and water to give a final volume of 10 μ l. Amphomycin and tunicamycin (final concentrations 1 mg/ml) were added to some samples. After the addition of 90 μ l of cell lysates and incubation at 30°C for 30 min, the reactions were terminated by the addition of 1.5 ml of ice-cold chloroform/methanol (2:1, v/v). The reactions were centrifuged ($1500 \times g$, 5 min, 4°C) and the pellet extracted twice with 500 μ l of chloroform/methanol. Equivalent amounts of radiolabeled, chloroform/methanol extractable reaction products were analyzed by TLC on Silica 60 plates (Merck) with chloroform/methanol/acetic acid/water (25:15:4:2, by vol.) as solvent and Dol-P-Man as a reference. Plates were screened for radioactivity with a Berthold LB 2842 Automatic TLC-Linear Analyzer.

Parasite transfections and cellular localization of GFP fusion proteins

Full-length *TcDPM1*, *TcGPI3*, and *TcGPI12* coding sequences were PCR amplified from genomic DNA purified from cultures of the *T. cruzi* epimastigotes, using forward and reverse primers carrying *Xba*I and *Eco*RI restriction sites, respectively (Table S1). The amplicons were inserted into the *Xba*I-*Eco*RI sites of the *T. cruzi* expression vector pTREXnGFP [37], generating pTREX-*TcDPM1*-GFP, pTREX-*TcGPI3*-GFP, and pTREX-*TcGPI12*-GFP that contain *TcDPM1*, *TcGPI3* and *TcGPI12* genes fused to the N-terminus of the green fluorescent protein (GFP). A total of 100 μ g of each plasmid construction was used to transfect *T. cruzi* epimastigotes as previously described [37]. Twenty four hours post-transfection, parasites were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 4°C, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature and blocked with 5% fetal bovine serum in PBS (blocking solution) for 20 min at 4°C. Staining of the parasite ER was done with rabbit anti-*T. brucei* BiP antibody ([38]; kindly provided by Renato Mortara, Universidade Federal de São Paulo), at a 1:1000 dilution, and secondary goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 555 (1:1000 dilution) (Molecular Probes/Life Technologies). After nuclei staining with

1 µg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes/Life Technologies), cover slides were mounted with 90% glycerol, 10% 1 M Tris HCl pH 9.0, and 2.3% DABCO (Sigma). Images were obtained with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti) or with the 5 LIVE confocal microscope (Zeiss), both at the Center of Electron Microscopy (CEMEL), at the Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Transfections of HT1080 human fibrosarcoma cells were done with 1 µg of pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (Life Technologies) containing the different *T. cruzi* genes inserted in fusion with GFP (for primer sequences, see Table S1) and the FuGENE transfection reagent (Roche), following the manufacturer's instructions. All plasmids were co-transfected with pGAG-DsRed-ER, a mammalian expression vector that encodes the *Discooma* sp. red fluorescent protein (DsRed) in fusion with ER targeting sequences and the ER retention sequence, KDEL (Clontech).

Disruption of *T. cruzi* genes

DNA constructs designed to delete both *TcGPI8* alleles in the *T. cruzi* CL Brener genome by homologous recombination were prepared after PCR amplification of the 5' and 3' regions of the *TcGPI8* gene (for primer sequences, see Table S1). The generated PCR products (with 487 bp and 647 bp, respectively) were cloned sequentially into the *SacI/SpeI* and *XhoI/XbaI* sites of pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen), flanking the neomycin phosphotransferase (*Neo^R*) or hygromycin phosphotransferase (*Hyg^R*) resistance markers that were cloned into this vector. To improve mRNA expression in the parasite, the 3' UTR plus downstream intergenic sequences of the *T. cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) gene was inserted downstream from the *Hyg^R* marker. Similar constructs using 5' and 3' flanking sequences derived from *TcGPI3* and *TcGPI10* genes were generated. Epimastigote transfections were performed by electroporation with 50 µg DNA as described previously [37]. Twenty-four hours after transfection, 200 µg/ml of hygromycin B or G418 was added to the cultures and selected populations were obtained approximately 30 days after transfection. Cloned cell lines were obtained by plating on semisolid blood agar plates, after another 30 days of incubation at 28°C.

Electron microscopy analyses of *T. cruzi*

Epimastigotes were fixed in 5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 and processed following standard protocols, including post-fixation in osmium tetroxide followed by block counterstained with uranyl acetate and embedding in Epon resin. Ultrathin sections were counterstaining with lead citrate and analyzed in the Transmission Electron Microscope Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV located at the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Cell membrane preparation, immunoblot and flow cytometry analyses

Approximately 10⁹ epimastigotes were lysed in 20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, with five cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing at 37°C. Total cell lysate was centrifuged at a low speed (2,000×g) for 10 min and the supernatant was subjected to ultracentrifugation (100,000×g) for one hour. The resulting supernatant was analyzed as soluble, cytoplasmic fraction (C) whereas the pellet, corresponding to the membrane fraction (M) was resuspended in lysis buffer. Volumes corresponding to 20 µg of proteins from total parasite cell lysate (T), cytoplasmic (C) and

membrane (M) fractions were loaded onto a 12.5% SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose membranes, blocked with 5.0% non-fat dry milk and incubated with the anti-mucin antibody 2B10 (gently provided by Nobuko Yoshida, Universidade Federal de São Paulo), at 1:200 dilution followed by incubation with peroxidase conjugated anti-mouse IgG and the ECL Plus reagent (GE-Healthcare). For flow cytometric analysis, epimastigotes were stained with anti-mucin 2B10 (dilution 1:450) and Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibodies. Data were acquired on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

Results

In silico identification of *T. cruzi* genes involved in the GPI biosynthetic pathway

Eighteen *T. cruzi* genes involved in 8 steps of the GPI biosynthetic pathway were identified based on their similarities to the yeast, mammals, *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum* sequences [15], [16], [17], [20], (Table 1). For the majority of these genes, annotated as putative *T. cruzi* orthologs in the TriTrypDB (www.tritrypdb.org), both alleles, belonging to the two CL Brener haplotypes, were identified. Since CL Brener is a hybrid strain, as described by El-Sayed et al. [39], the two haplotypes corresponding to the two ancestral genomes that originated the CL Brener genome, named Esmeraldo-like and non-Esmeraldo-like, were separated during the *T. cruzi* genome assembly. In Table 1, the genes corresponding to the non-Esmeraldo haplotype were indicated by their identification numbers in the TriTrypDB database. For all listed genes, the amino acid identities between the two alleles were greater than 94%. Based on these sequences and the known structure of the GPI anchor in this parasite (Figure 1A) [3], we proposed that the *T. cruzi* GPI biosynthetic pathway occurs in the ER according to the diagram shown in Figure 1B.

Dolichol-phosphate mannose synthase (DPM1), also named dolichol-phosphate-β-D-mannosyltransferase, catalyses the transfer of a mannose residue from GDP-mannose to dolichol-phosphate (Dol-P) generating Dol-P-mannose, used as a donor for all mannosylation reactions that are part of the GPI biosynthetic pathway [40], [41]. Comparisons among DPM1 of various organisms [42], [43], [44] showed that, together with *S. cerevisiae*, *T. brucei*, and *Leishmania mexicana* [45] and in contrast to *P. falciparum* DPM1, *T. cruzi* DPM1 belongs to a group that includes monomeric enzymes that have a C-terminal hydrophobic tail. The glycosyltransferase complex that is responsible for transferring N-acetylglucosamine (GlcNAc) from UDP-GlcNAc to phosphatidylinositol (PI) to generate N-acetylglucosaminyl-PI (GlcNAc-PI) has six and seven proteins, respectively, in yeast and mammalian cells [16]. *TcGPI3* was identified as the gene encoding the catalytic subunit of the *T. cruzi* glycosyltransferase complex since it shares 41% and 49% of sequence identity with the yeast GPI3 and mammalian PIG-A, respectively. Among other components of the glycosyltransferase complex present in yeast, we identified the *T. cruzi* orthologs of GPI1, GPI2, GPI15, and GPI19. In mammalian cells, DPM2, a non-catalytic subunit of dolichol-P-mannose synthase, is physically associated with PIG-A, PIG-C and PIG-Q and enhances GlcNAc-PI transferase activity [46]. A *T. cruzi* gene encoding a protein with 17% identity to human DPM2 and containing a DPM2 domain, which probably acts as a regulatory component of the N-acetyl-glucosamine transferase complex, was also identified. Only one component of this complex, named ERI1 in yeast [47], and PIG-Y in mammals [48], was not identified either in *T. cruzi*, *P. falciparum* or *T. brucei*. The *T. cruzi* ortholog of yeast GPI12 (named PIG-L in mammals) [49], encoding the

Table 1. *T. cruzi* genes encoding enzymes of the GPI biosynthetic pathway.

Step	<i>T. cruzi</i> gene	Gene ID (TriTrypDB*)	Number of amino acids	% Identity at protein level (**)	
				Yeast	Human
Dolicholphosphate-mannose synthase	<i>DPM1</i>	Tc00.1047053506581.10	260 aa	50% (DPM1)	31% (DPM1)
N-acetyl-glucosamine transferase (GlcNAc-PI) (Step 1)	<i>GPI1</i>	Tc00.1047053510329.200	827 aa	15% (GPI1)	16% (PIG-Q)
	<i>GPI2</i>	Tc00.1047053503781.20	336 aa	14% (GPI2)	32% (PIG-C)
	<i>GPI3</i>	Tc00.1047053509215.16	455 aa	41% (GPI3)	49% (PIG-A)
	<i>GPI15</i>	Tc00.1047053511655.10	307 aa	12% (GPI15)	18% (PIG-H)
	<i>GPI19</i>	Tc00.1047053508307.100	142 aa	10% (GPI19)	27% (PIG-P)
	<i>DPM2</i>	Tc00.1047053510043.29	100 aa	–	17% (DPM2)
GlcNAc-PI de-N-acetylase (Step 2)	<i>GPI12</i>	Tc00.1047053511481.40	252 aa	31% (GPI12)	32% (PIG-L)
α -1,4-Mannosyltransferase I (Step 3)	<i>GPI14</i>	Tc00.1047053511507.50	472 aa	30% (GPI14)	30% (PIG-M)
α -1,6-Mannosyltransferase II (Step 4)	<i>GPI18</i>	Tc00.1047053503521.89	529 aa	17% (GPI18)	20% (PIG-V)
α -1,2-Mannosyltransferase III (Step 5)	<i>GPI10</i>	Tc00.1047053510299.50	584 aa	21% (GPI10)	24% (PIG-B)
α -1,2-Mannosyltransferase IV (?) (Step 6)	ni	ni		– (SMP3)	– (PIG-Z)
Ethanolamine phosphotransferase (Step 7)	<i>GPI13</i>	Tc00.1047053503979.10	691 aa	15% (GPI13)	21% (PIG-O)
GPI transamidase (Step 8)	<i>GAA1</i>	Tc00.1047053504069.60	462 aa	10% (GAA1)	13% (GAA1)
	<i>GPI8</i>	Tc00.1047053511277.450	325 aa	31% (GPI8)	29% (PIG-K)
	<i>GPI16</i>	Tc00.1047053510877.180	684 aa	8% (GPI16)	9% (PIG-T)
	<i>TTA1</i>	Tc00.1047053510435.40	387 aa	–	–
	<i>TTA2</i>	Tc00.1047053508661.60	414 aa	–	–
GPI-inositol deacylase	<i>GPIdeAc2</i>	Tc00.1047053508153.1040	804 aa	9% (BST1)	12% (PGAP1)
Inositol phosphorylceramide synthase	<i>IPCS</i>	Tc00.1047053510729.290	335 aa	10% (AUR1)	–

(*) Gene ID numbers refer to the non-Esmeraldo-like haplotype, except for *TcGPI16* and *TcGPI19*, for which only the Esmeraldo-like alleles were identified.

(**) Names for the yeast and human orthologs are shown in parentheses.

ni: not identified.

doi:10.1371/journal.pntd.0002369.t001

enzyme responsible for the de-N-acetylation of GlcNAc-PI, which has been well characterized in *T. brucei* [50], [51], was also identified. Since differences in substrate recognition among the mammal and *T. brucei* enzyme have been described [52], this enzyme has been considered as a suitable target for drug development.

As depicted in Figure 1B, the first two reactions of the GPI biosynthetic pathway occur on the cytoplasmic face of the ER, whereas mannosylation reactions occur in the ER lumen. After deacetylation, the GPI precursor is transported across the ER membrane to the ER lumen, a step that requires distinct flippases [53]. In yeast and mammalian cells, the addition of mannose residues to GlcN-PI after flipping this precursor into the ER lumen requires acylation of the inositol ring and, after mannosylation and the attachment of GPIs to proteins, this group is removed [54]. In contrast, in *T. brucei*, inositol acylation occurs after the addition of the first mannose residue [55] since both acylated and non-acylated GPI intermediates exist during transfer of the Man2 and Man3 to GPI intermediates [56]. Although analyses of GPI precursors synthesized in *T. cruzi* cell-free systems indicated that this organism also has the ability to acylate the inositol ring [57], sequences encoding an enzyme responsible for acylation of the

inositol ring, named *PIG-W* in mammals and *GWT1* in yeast [54], [58] were not identified either in *T. cruzi* or in *T. brucei* [2]. In spite of that, the two alleles encoding the ortholog of the enzyme responsible for inositol deacylation, named *GPIdeAc2* in *T. brucei* [56], were found in the *T. cruzi* genome (Tc00.1047053508153.1040 and Tc00.1047053506691.22).

All three genes encoding mannosyltransferases, responsible for the addition of the first, second and third mannose residues to GlcN-PI, named *TcGPI14* (α -1,4-mannosyltransferase), *TcGPI18* (α -1,6-mannosyltransferase) and *TcGPI10* (α -1,2-mannosyltransferase), were identified in the *T. cruzi* genome. Since the predicted *T. cruzi* proteins exhibit sequence identities with yeast and human proteins ranging from 17% to 30%, for some of these genes, functional assays are necessary to confirm these predictions. It is noteworthy that no *T. cruzi* ortholog encoding the enzyme responsible for the addition of the fourth residue of mannose (step 6), named SMP3 in yeast and PIG-Z in human, was identified. Similarly, no ortholog of the *SMP3* gene was found in *P. falciparum*, even though the presence of a fourth mannose residue has been shown by structural studies of the GPI anchor from both organisms [3], [20], [59]. Furthermore, genes encoding an essential component of the mannosyltransferase I complex named

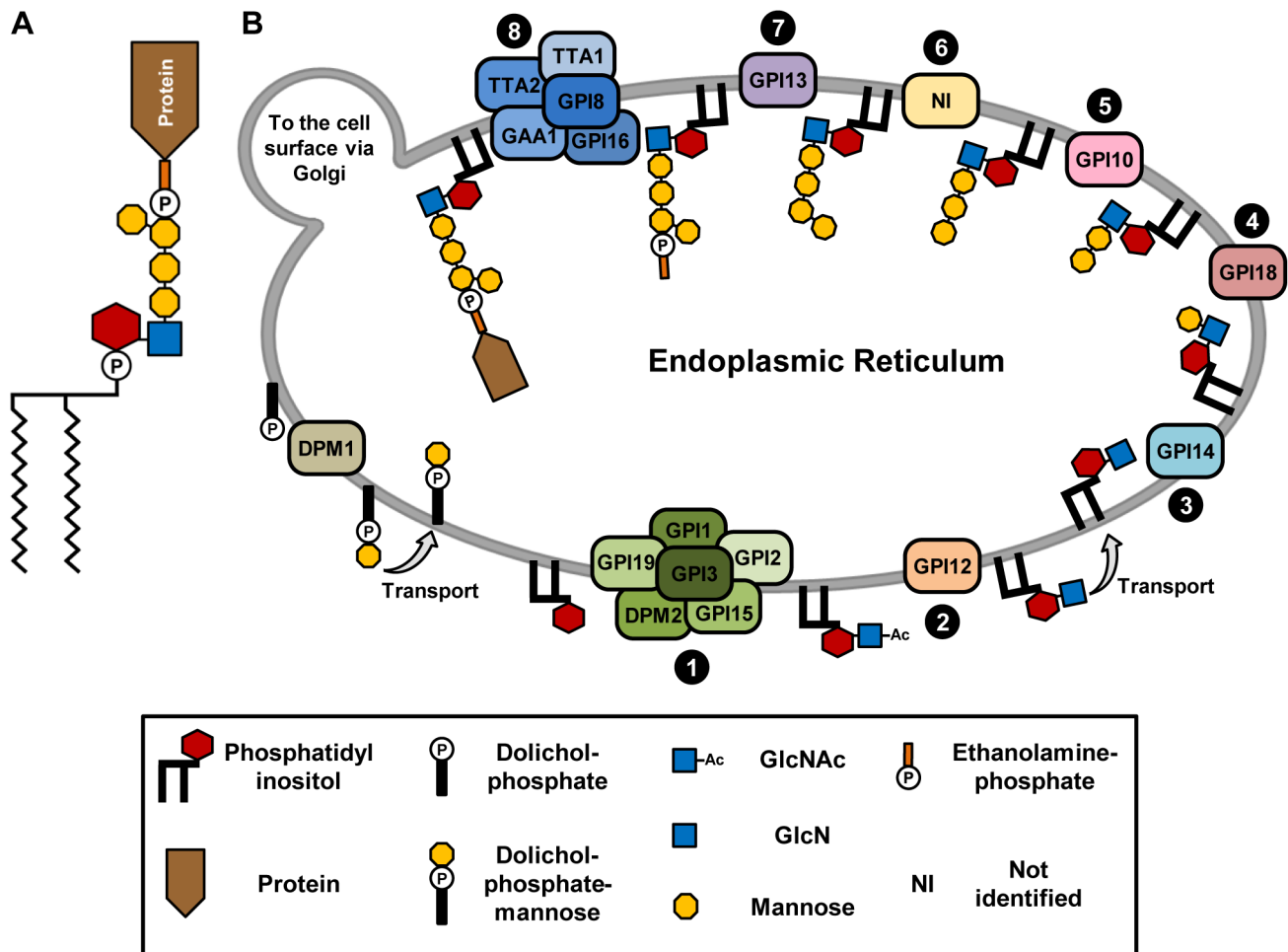


Figure 1. Structure and the biosynthesis of *T. cruzi* GPI anchors. (A) Structure of a *T. cruzi* GPI anchor, according to Prevato et al. [3]. (B) Proposed biosynthetic pathway of GPI anchor in the endoplasmic reticulum of *T. cruzi*. N-acetylglucosamine (GlcNAc) is added to phosphatidylinositol (PI) in step 1 and, during the following steps, deacetylation and addition of four mannose residues occur. The addition of ethanolamine-phosphate on the third mannose (step 7) enables the transferring of the completed GPI anchor to the C-terminal of a protein (step 8). Dolichol-P-mannose acts as a mannose donor for all mannosylation reactions that are part of the GPI biosynthesis. This pathway was based on the structure of the *T. cruzi* GPI and sequence homology of *T. cruzi* genes with genes known to encode components of this pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. Not shown in the figure, free glycoinositolphospholipids (GPIs), also present in the *T. cruzi* membrane, are likely to be by-products of the same GPI biosynthetic pathway. doi:10.1371/journal.pntd.0002369.g001

PBN1 in yeast and PIG-X in mammals, have not been identified either in *T. cruzi* or in *T. brucei* [60], [61].

In mammals and yeasts there are three enzymes that add ethanolamine-phosphate (EtNP) to different mannose residues: PIG-N/MCD4 (EtNP addition to Man1), PIG-G/GPI7 (Man2), and PIG-O/GPI13 (Man3) [2], resulting in the structure to which the protein will be linked. In *T. cruzi*, *T. brucei* and *P. falciparum*, EtNP addition occurs only at the third mannose [2], [20] and, as expected, only a *T. cruzi* GPI13 ortholog was identified. However, it has also been shown in different *T. cruzi* strains, that GPI-linked proteins as well as free GPIs have 2-aminoethylphosphonate (AEP) replacing EtNP at the third mannose residue and that an additional AEP is linked to GlcN in *T. cruzi* GPI anchors (for recent reviews, see [62], [63]).

After being assembled, the transfer of the GPI anchor to the C-terminal end of a protein is mediated by a transamidase complex that cleaves the GPI-attachment signal peptide of the nascent protein. In human and yeast, this complex consists of five ER membrane proteins, PIG-K/GPI8, PIG-T/GPI16, PIG-S/

GPI17, PIG-U/GAB1 and GAA1 [64] in which GPI8 is considered the catalytic subunit [16], [65]. As shown in Table 1, we identified *T. cruzi* GPI8, GAA1 and GPI16 orthologs. Although orthologs of GPI17 and GAB1 were not identified in other trypanosomatids, genes encoding two other components of the transamidase complex, known as trypanosomatid transamidase 1 (TTA1) and TTA2, were also found in *T. cruzi* [66].

Besides differences in the glycan core, in *T. cruzi* GPI anchors, the phosphatidylinositol (PI) is replaced by inositolphosphorylceramide (IPC), a molecule also present in plants, fungi but not present in mammals [4]. This change in the lipid portion of the anchor occurs during the differentiation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes [67] and is observed in members of the large family of *trans*-sialidases [68]. Although it may not be considered part of the GPI biosynthetic pathway, the *T. cruzi* IPC synthase (*TcIPCS*) is thought to be a highly attractive drug target [69]. Based on that, Denny and collaborators [70] identified the ortholog of *AURI*, that encodes the yeast IPC synthase [71], in *Leishmania major* and two closely related *T. cruzi* sequences encoding

proteins sharing 52–53% identity with the *Leishmania* IPC synthase [70]. Our analysis confirmed that the two sequences described by Denny and collaborators [70] correspond to the two alleles of the *T. cruzi* IPC synthase (*TcIPCS*) gene present in the CL Brener genome, which are syntenic with the *L. major* and *T. brucei* orthologs.

mRNA expression and subcellular localization analyses of *T. cruzi* enzymes

To verify whether the genes identified through the *in silico* analyses described above are expressed in *T. cruzi*, sequences encoding two enzymes of the GPI biosynthetic pathway were used as probes in northern blot hybridizations performed with total RNA purified from epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of the parasite. As shown in Figure 2, transcripts with 1,300 nt and 2,100 nt, approximately, corresponding to *TcGPI8* and *TcGPI10* mRNAs were detected in all three stages of the parasite life cycle. As expected, increased levels of both transcripts were found in the two proliferative stages, epimastigotes and amastigotes, compared to the infective, nonproliferative trypomastigote stage.

To provide further evidence for the role of the proteins encoded by the *T. cruzi* genes identified through *in silico* analyses as components of the GPI biosynthetic pathway, we determined the subcellular localization of three of these proteins expressed as GFP fusion in *T. cruzi* epimastigotes. The coding regions of *TcDPM1*, *TcGPI3* and *TcGPI12* genes were cloned in the *T. cruzi* expression vector pTREXnGFP and, after transfection into epimastigotes, the cells were examined by fluorescence microscopy. Figure 3 shows that all three fusion proteins in transfected parasites that were stained with anti-BiP antibodies [38] co-localize with BiP, a known ER marker. Similar results were obtained with confocal microscopy analyses (not shown), thus confirming that these enzymes are part of the GPI biosynthetic pathway. In addition, transfection of *T. cruzi* genes *TcDPM1*, *TcGPI3*, *TcGPI8* and *TcGPI12* in fusion with GFP in the HT1080 human fibrosarcoma cells also resulted in the expression of the GFP fusion *T. cruzi* proteins with a cellular localization compatible with the ER (Figure S1).

Functional analyses of *T. cruzi* genes expressed in yeast

One of the main goals of this work is to develop a strategy for high-throughput screening of drugs against *T. cruzi* enzymes involved in the GPI biosynthetic pathway. *S. cerevisiae* has been largely used as surrogate system to express heterologous proteins from diverse parasites including *Leishmania* spp and *T. brucei*.

Therefore, not only to assay for the functions of the *T. cruzi* genes but also to create yeast cells expressing *T. cruzi* target enzymes for future drug studies, conditional lethal yeast mutants were transformed with an expression vector containing the coding sequences for the *T. cruzi* genes *TcDPM1*, *TcGPI3*, *TcGPI12*, *TcGPI14*, *TcGPI10*, *TcGAA1*, *TcGPI8* as well as with the *TcIPCS*. These mutants were constructed by replacing the endogenous promoter of each one of the GPI genes by the GAL 1 promoter, resulting in yeast cell lines that could only grow in the presence of galactose [31]. By inhibiting the expression of the endogenous GPI genes in medium containing glucose, the complementation of yeast cells with the *T. cruzi* genes can be easily accessed by comparing the growth of transformed colonies in glucose and galactose-containing medium. As shown in Figure 4A and Table 2, we tested eight *T. cruzi* genes for which yeast mutants were available. Three of them, *TcDPM1*, *TcGPI10* and *TcGPI12*, once transformed into yeast, allowed the yeast mutants to grow on plates containing glucose as well as galactose. For all tested yeast mutants, we verified that transformation with plasmids containing the orthologous yeast gene allows them to grow on glucose-containing medium. Figure 4A also shows that, when the mutants were plated on glucose-containing medium supplemented with uracil, none of them were able to grow. As expected, wild type yeast, which has histidine deficiency, does not grow in minimum media lacking histidine. As an additional control, we verified, by RT-PCR analyses, the expression of two *T. cruzi* genes transformed into yeast mutants, for which we did not observed the complementation, i.e., that did not grow in nonpermissive media. Transcripts derived from the *T. cruzi* *TcGPI8* or *TcIPCS* genes, as well as from the orthologous yeast genes, were detected in the corresponding yeast mutants growing in galactose-containing media (Figure S2), indicating that the inability of these mutants to grow in the presence of glucose is not due to the lack of expression of the *T. cruzi* genes in the transfected yeasts.

To evaluate whether the expression of *T. cruzi* enzymes in yeast results in the correct synthesis of GPI anchor precursors by the complemented mutants, SDS-PAGE and fluorography analyses of yeast proteins containing [2-³H]myo-inositol were performed. As shown in Figure 4B, after 1 hour growing in medium containing glucose and [2-³H]myo-inositol, a complex pattern of proteins is visualized by fluorography in wild type cells as well as in yeast mutants expressing the *T. cruzi* genes. The protein patterns in yeast mutants expressing *TcDPM1* and *TcGPI12* genes growing in glucose-containing medium were indeed indistinguishable from the pattern observed with molecules synthesized by wild type yeasts or by mutants transformed with the orthologous yeast genes.

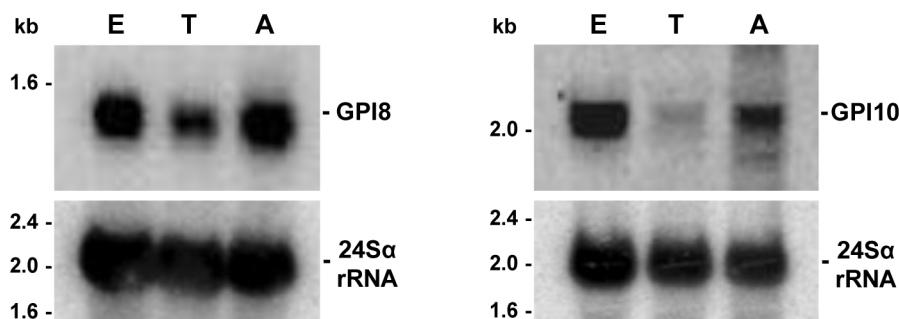


Figure 2. mRNA expression of *T. cruzi* genes encoding enzymes of the GPI biosynthetic pathway. Total RNA extracted from epimastigotes (E), trypomastigotes (T) and amastigotes (A) were separated in agarose gels, transferred to nylon membranes and hybridized with [α -³²P]-labeled probes specific for *TcGPI8* and *TcGPI10* genes. The bottom panel shows hybridization with a probe for 24S α rRNA, used as loading control. The size of ribosomal RNA bands are indicated on the left.
doi:10.1371/journal.pntd.0002369.g002

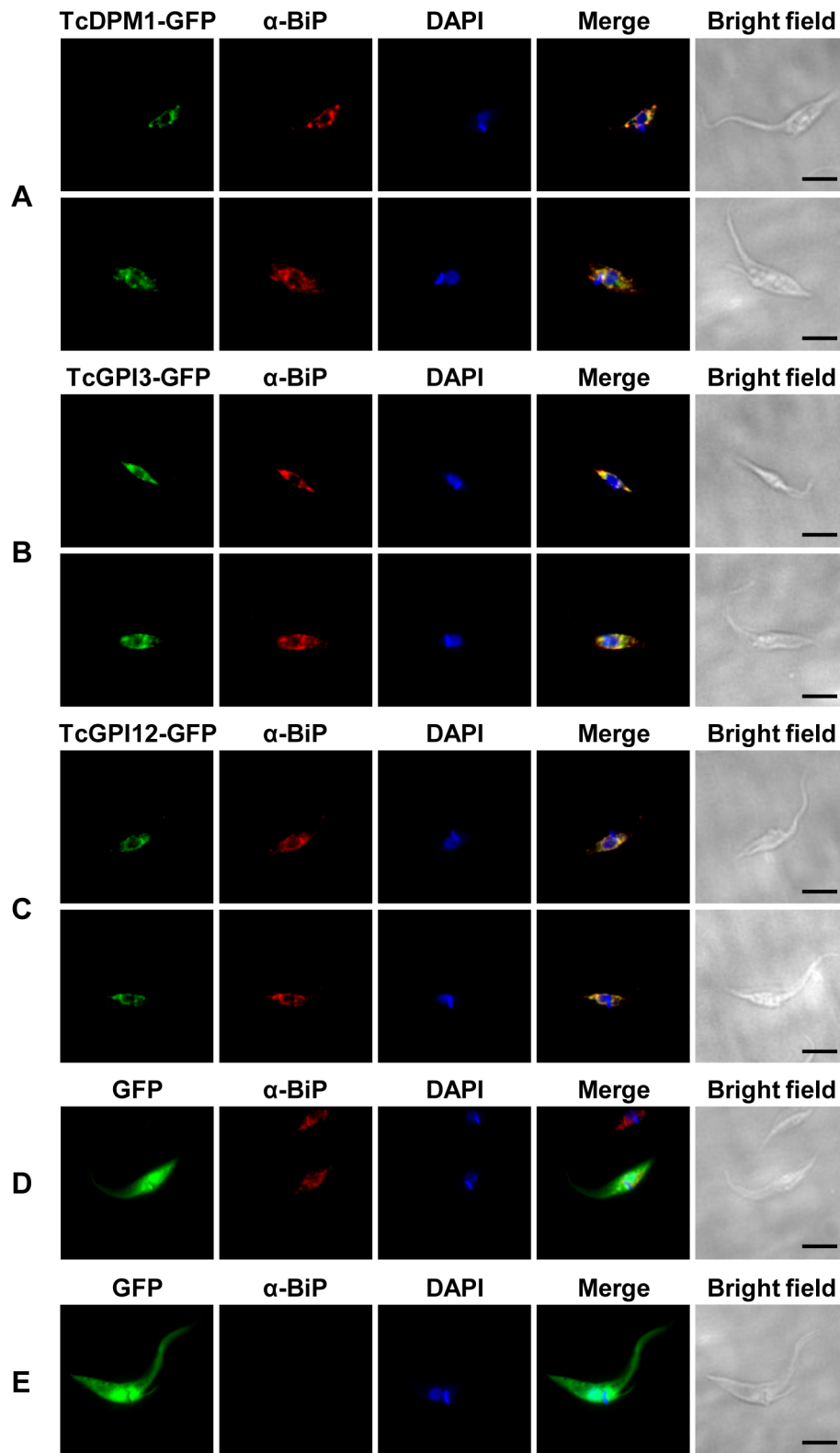


Figure 3. Cellular localization of *T. cruzi* enzymes of the GPI biosynthetic pathway. Epimastigotes were transiently transfected with the plasmids pTREX-TcDPM1-GFP (A), pTREX-TcGPI3-GFP (B), pTREX-TcGPI12-GFP (C) or pTREXnGFP as a control plasmid (D) and (E). Transfected parasites were fixed with 4% paraformaldehyde, incubated with the ER marker anti-BiP (1:1000) and the secondary antibody conjugated to Alexa 555 (1:1000). Cells were also stained with DAPI showing the nuclear and kinetoplast DNA. In panel E, parasites that were not incubated with the primary, anti-BiP antibody are shown as negative controls. Images were captured with the Nikon Eclipse Ti fluorescence microscope. Scale bars: 5 μ m. doi:10.1371/journal.pntd.0002369.g003

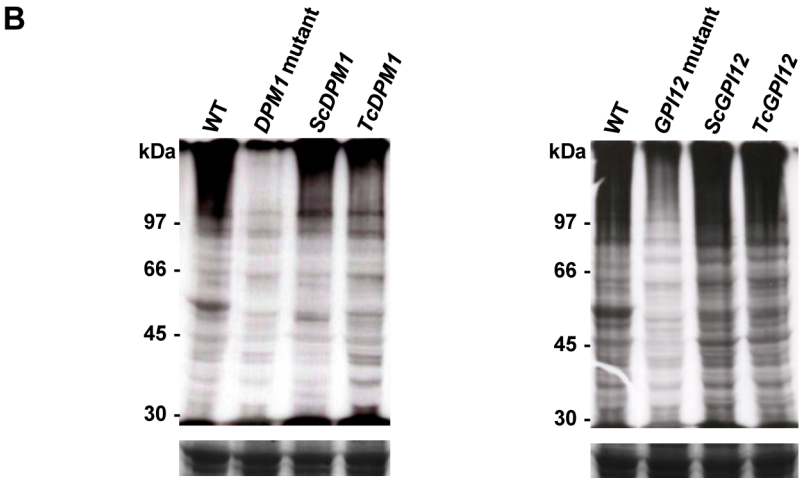
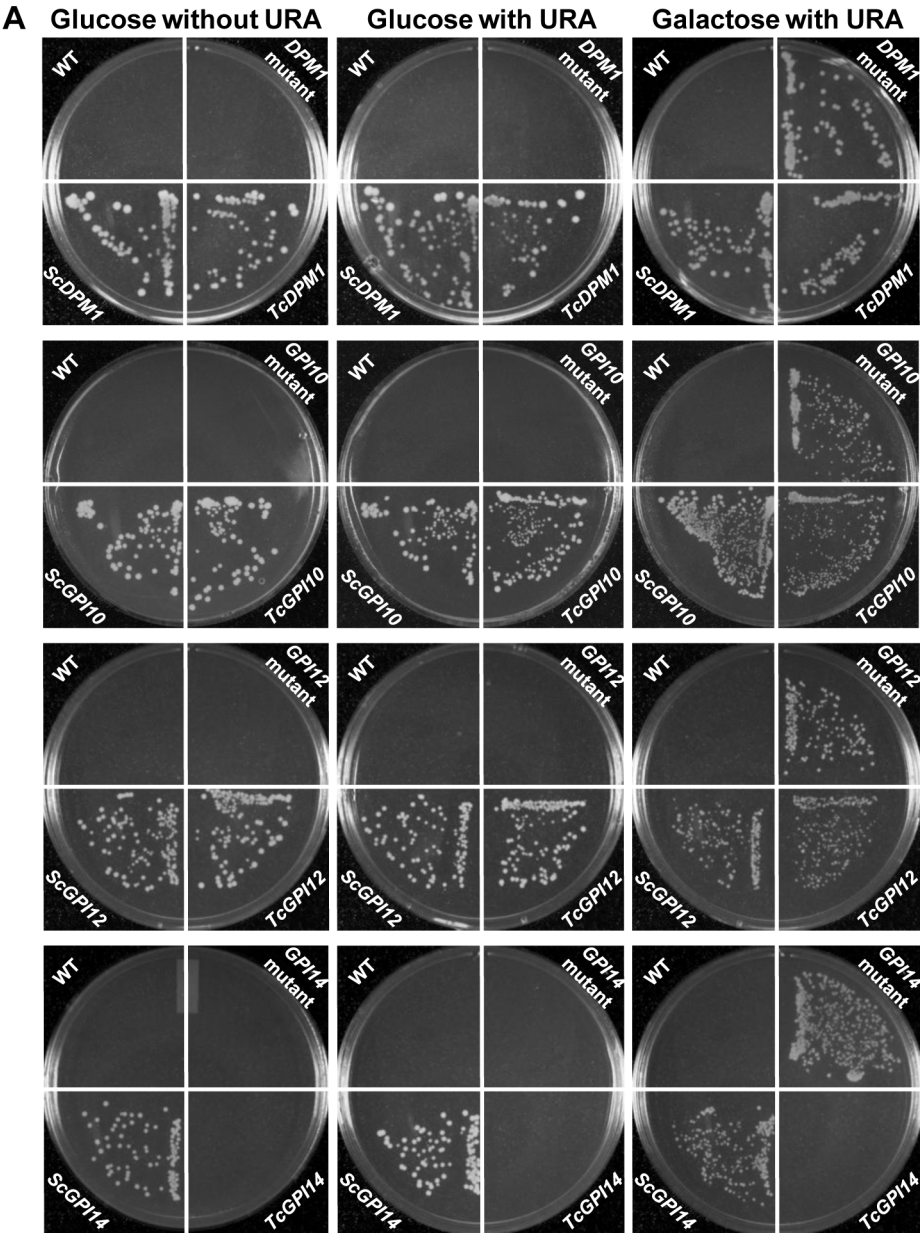


Figure 4. Yeast complementation with *T. cruzi* genes encoding enzymes of the GPI biosynthetic pathway. (A) *DPM1*, *GPI10* and *GPI12* yeast conditional lethal mutants (YPH499-HIS-GAL-DPM1, YPH499-HIS-GAL-GPI10 and YPH499-HIS-GAL-GPI12, respectively) were transformed with pRS426Met plasmids carrying either *T. cruzi* or *S. cerevisiae* genes encoding DPM1, GPI10 and GPI12 (*TcDPM1* or *ScDPM1*, *TcGPI10* or *ScGPI10*, and *TcGPI12* or *ScGPI12*, respectively). Wild-type (WT), non-transformed mutants and transformed yeast mutants were streaked onto plates with nonpermissive, glucose-containing SD medium lacking histidine, with or without uracil or in galactose-containing medium (with uracil) and incubated at 30°C for 3 days. In the bottom panel, yeast mutants (YPH499-HIS-GAL-GPI14) transformed with pRS426Met plasmid carrying *T. cruzi* gene (*TcGPI14*), which could not restore cell growth of GPI14 deficient yeast are shown. (B) GPI-anchored proteins synthesized by the conditional lethal yeast mutants expressing *T. cruzi* genes were separated by SDS-PAGE and analyzed after fluorography. Wild-type (WT), non-transformed yeast mutants and yeast mutants that were transformed with plasmids containing the corresponding yeast genes (*ScDPM1* or *ScGPI12*) or with the *T. cruzi* genes (*TcDPM1* or *TcGPI12*), were cultivated in medium glucose-containing in the presence of [2-³H]myo-inositol for 1 hour. Total protein extract corresponding to 1×10⁸ cells were loaded on each lane of a 10% SDS-PAGE and the labeled proteins were visualized by fluorography (top panels). As a loading control, Coomassie Blue stained gels prepared with equivalents amounts of total proteins are shown in the bottom panels. Untransformed *DPM1* and *GPI12* mutants were grown in the presence of galactose for 2 days and then switched to glucose-containing medium for 16 hours before addition of [2-³H]myo-inositol. Molecular weight markers (M) are shown on the left.
doi:10.1371/journal.pntd.0002369.g004

On the other hand, a much weaker signal was detected in non-transformed yeast mutants, indicating that the expression of *T. cruzi* orthologs encoding enzymes of the GPI biosynthetic pathway restores the mutants' ability to synthesize GPI molecules.

Corroborating the functional complementation of yeast mutants with the *TcDPM1* gene, thin layer chromatography (TLC) of yeast mutants expressing the *T. cruzi* gene or the yeast *ScDPM1* gene, as a positive control, showed the presence of dolichol-P-mannose. Yeast cell extracts were preincubated with dolichol-phosphate and labeled *in vitro* with GDP-[2-³H]mannose. Labeled dolichol-P-mannose was detected in wild type yeast cells as well as in *DPM1* mutants that were transfected with the *TcDPM1* or with the yeast *ScDPM1* gene, confirming that the expression of the *T. cruzi* enzyme rescues the mutant ability to synthesize dolichol-P-mannose (Figure S3).

T. cruzi GPI8 mutants have altered cell surface

Knockout parasites of *GPI8*, *GPI16* and *GPI10* were generated in *T. brucei* whereas a *GPI8* knockout was described in *L. mexicana* [18], [19], [72], [73]. To further investigate the role of GPI anchors in *T. cruzi*, we tried to generate parasite cell lines in which both alleles of *TcGPI3*, *TcGPI8* and *TcGPI10* genes were deleted by homologous recombination. Although we were able to generate heterozygote epimastigotes carrying a drug resistance marker inserted in each one of the *TcGPI8* alleles (Figure 5A–B), several attempts to generate double-resistant, null mutant epimastigotes with both *TcGPI8* alleles deleted were unsuccessful. Also unexpectedly, transfection with plasmid constructs containing *TcGPI3* and *TcGPI10* sequences flanking the neomycin resistance gene did not result in G418 resistant parasites,

indicating that disruption of even one allele of a gene involved in the initial steps of the GPI biosynthesis pathway results in non-viable parasites (not shown). Thus, our results suggest that, in contrast to *T. brucei* and *L. mexicana*, the GPI biosynthesis may be an essential pathway in epimastigotes of *T. cruzi*. In agreement with PCR analyses that showed the disruption of single alleles of *TcGPI8* (Figure 5B), northern blot assays (Figure 5C) showed that both heterozygous *TcGPI8* mutants have the expression of *TcGPI8* mRNA reduced by about 40%. Although a few double-resistant epimastigote clones were generated and PCR analyses indicated that the neomycin and hygromycin resistance genes were inserted into both *TcGPI8* alleles, PCR amplifications also indicated that additional sequences corresponding to the *TcGPI8* gene were present in a different genomic location in the double resistant parasites (Figure 6A–B). It should be noted that it was possible to generate the double resistant parasites only after we prepared different plasmid constructs in which the resistance genes were linked to trans-splicing and polyadenylation signals from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) and the ribosomal protein TcP2β (*HX1*) genes and performing drug selection by gradually increasing drug concentrations. Northern blot analyses (Figure 6C) indicate that the recombination events that resulted in viable, double resistant parasites allowed the expression of an aberrant *TcGPI8* mRNA population. Among this *TcGPI8* mRNA population transcribed in the double resistant mutants, mature, trans-spliced mRNAs were detected by RT-PCR using primers specific for *TcGPI8* sequences and the *T. cruzi* spliced leader (Figure 6D), thus indicating that this gene is still active in these mutants. Although no significant changes in either growing or overall morphology of the *TcGPI8* mutants were observed, transmission electron microscopy showed striking alterations in the dense glycocalyx that covers the parasite surface. As shown in Figure 7, cell membranes of epimastigotes from *TcGPI8* heterozygous mutants (+/–N) present a thinner layer of the surface glycocalyx compared to wild type (WT) epimastigotes. In contrast, cell membranes from both clones of double resistant parasites (N/H), which may have suffered recombination events involving *TcGPI8* sequences, present an increased thickness of their glycocalyx compared to the heterozygous mutants (Figure 7). Although no significant differences in the levels of mucins were detected in the heterozygous mutants, western blot analyses of membrane proteins of WT and double resistant *TcGPI8* mutants using the anti-mucin monoclonal antibody 2B10 [74] showed increased amounts of the 35–50 kDa glycoproteins (also known as Gp35/50 mucins) expressed on the surface of epimastigotes of the double resistant clones (Figure 8). Flow cytometry of epimastigotes stained with 2B10 antibodies also showed increased amounts of surface mucins in the double resistant parasites (Figure S4).

Table 2. Functional complementation of yeast mutants by *T. cruzi* genes.

Yeast mutants	pRS Tc
YPH499 DPM1	+
YPH499 GPI3	–
YPH499 GPI12	+
YPH499 GPI14	–
YPH499 GPI10	+
YPH499 GAA1	–
YPH499 GPI8	–
YPH499 AUR1	–

The (+) signs indicate the ability of transformed mutants to grow in nonpermissive glucose-containing media.

doi:10.1371/journal.pntd.0002369.t002

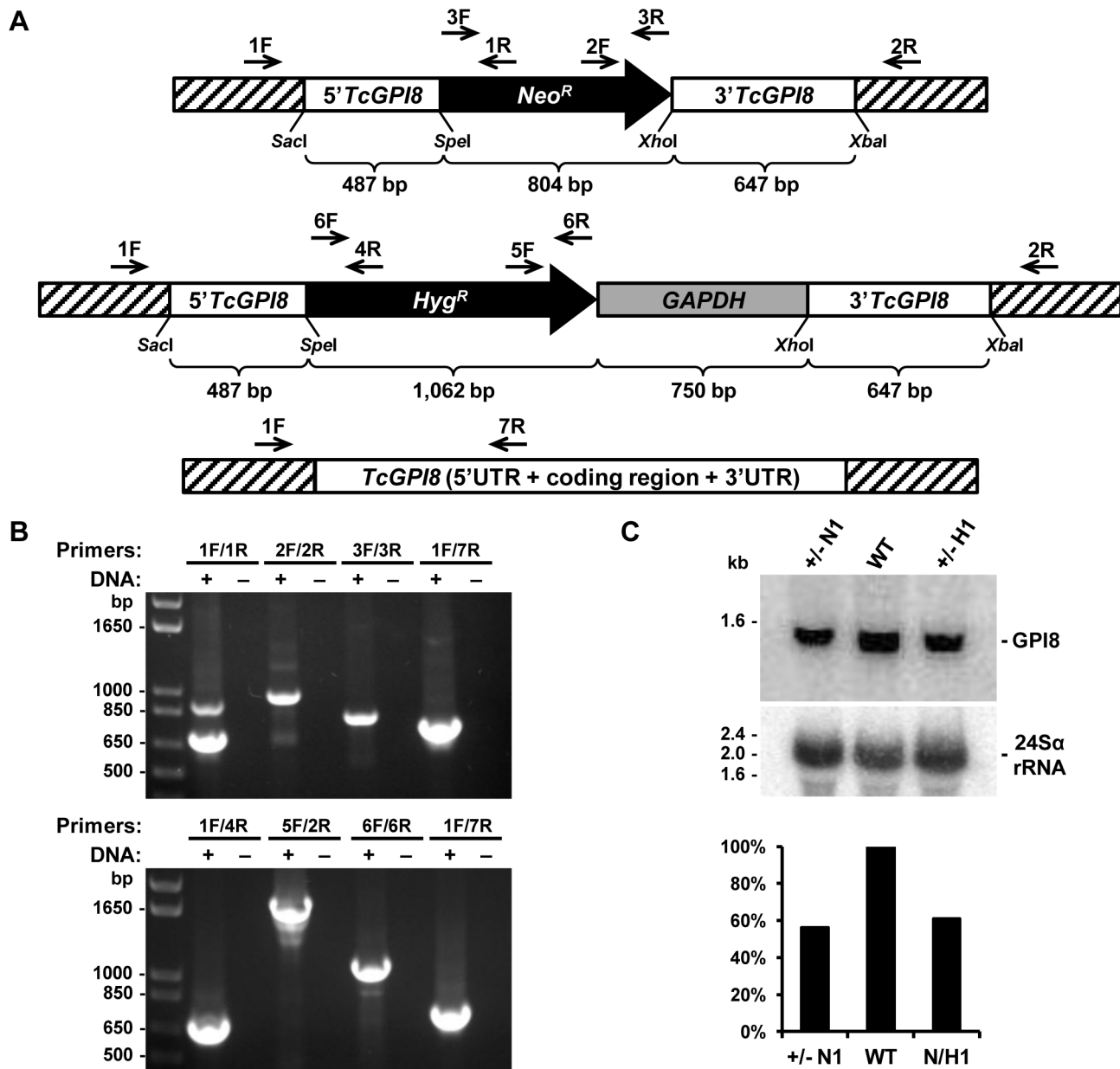


Figure 5. Generation of *TcGPI8* heterozygous mutants. (A) DNA constructs generated to delete both *TcGPI8* alleles by homologous recombination are shown with the *Neo^R* or *Hyg^R* genes flanked by 5' and 3' sequences of the *TcGPI8* gene and the *SacI*/*SpeI* and *XhoI*/*XbaI* cloning sites from the pCR2.1TOPO vector. After transfecting epimastigotes with the purified DNA fragments, parasites were selected in LIT medium containing 200 μ g/ml of G418 or hygromycin. Total DNA, isolated from G418 or hygromycin resistant parasites was analyzed by PCR amplifications, using the primers indicated by arrows. Below the schemes of DNA constructs, the sizes of the *Neo^R* or *Hyg^R* genes and the 5' and 3' sequences of the *TcGPI8* gene are shown. (B) PCR amplification products analyzed on 1% agarose gel electrophoresis were obtained from DNA isolated from epimastigotes transfected with the *GPI8*-Neo (top panel) or *GPI8*-Hyg construct (bottom panel) and using pairs of primers showed in A. Amplicons derived from PCR using the primer pair 1F/7R that amplify a *T. cruzi* *GPI8* allele which was not deleted are shown. On lanes indicated by (-), loaded samples were from PCR in which no template DNA was added. (C) Expression levels of *TcGPI8* mRNA in WT and *TcGPI8* single knockout of each allele interrupted by *Neo^R* or *Hyg^R* genes (+/- N or +/- H, respectively). Total RNAs purified from epimastigotes were hybridized to [α - ^{32} P]-labeled probes specific for the *TcGPI8* gene (top panel) or for the 24S α rRNA (bottom panel) used as loading control. The size of ribosomal RNA bands are indicated on the left and a graph with the quantification of the signals from the *TcGPI8* probe after normalization using the 24S α rRNA probe is shown below. doi:10.1371/journal.pntd.0002369.g005

Discussion

Several *T. cruzi* surface proteins known to be involved in parasite infectivity or escape from the host immune response are anchored to the parasite membrane by covalent linkage to glycosylphosphatidylinositol (GPI). *T. cruzi* GPI anchors are also

strong proinflammatory molecules, being critical in the modulation of the host immune response against this parasite. *T. cruzi* belongs to a group of early branching eukaryotic protists that are responsible for several neglected human tropical diseases, for which there is a strong need for new drug treatments. The elucidation of the structures of molecules that play a direct role in

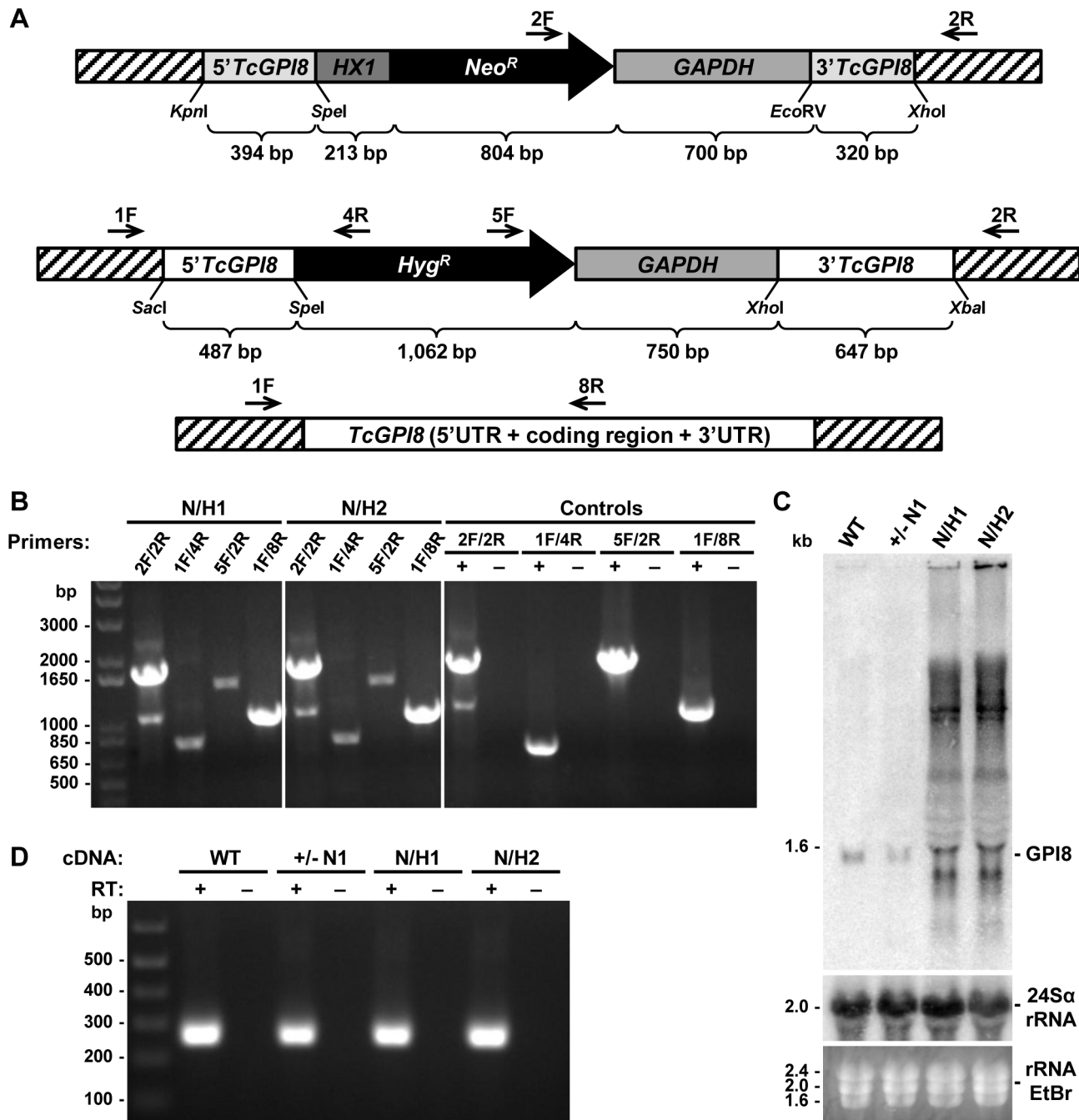


Figure 6. Translocation of the *TcGPI8* gene in *T. cruzi* mutants. (A) DNA constructs generated to delete both *TcGPI8* alleles are shown with the *Neo^R* or *Hyg^R* genes flanked by 5' and 3' sequences of the *TcGPI8* and spliced leader (SL) addition and polyadenylation signals from *TcP2β* (HX1) and *gapdh* genes. (B) DNA isolated from two cloned epimastigote cell lines that have been sequentially transfected with *Neo^R* and *Hyg^R* constructs and selected with G418 and hygromycin (double resistant mutants, N/H) were PCR amplified with primers shown in (A). Amplicons generated using primers 2F/2R indicate the integration of the *Neo^R* in one of the *TcGPI8* alleles whereas amplicons generated with primers 1F/4R and 5F/2R indicate the integration of the *Hyg^R* sequences in the second *TcGPI8* allele. PCR amplification using primers 1F/8R shows that double resistant parasite cell lines still maintained at least one intact copy of the *TcGPI8* gene. As positive controls, DNA from *Neo^R* (for primers 2F/2R), *Hyg^R* (for primers 1F/4R and 5F/2R) single knockout and wild-type parasites (for primers 1F/8R) were used. (C) Expression levels of *TcGPI8* mRNA in WT, *TcGPI8* single knockout *Neo^R* (+/- N1) and two double resistant clones (N/H1 and N/H2). RNA purified from epimastigotes were hybridized to [α - ^{32} P]-labeled *TcGPI8* (top panel) or 24S α rRNA (middle panel) probes. (D) RT-PCR amplification of *TcGPI8* sequences. Reverse transcribed *TcGPI8* mRNA obtained from WT, single knockout *Neo^R* (+/- N1) and two double resistant clones (N/H1 and N/H2) were PCR amplified with primers annealing with *TcGPI8* sequences and the *T. cruzi* SL sequence. First strand cDNA synthesis reactions were done with primers complementary to *TcGPI8* in the presence (+) or absence (-) of reverse transcriptase. PCR products, separated on 1% agarose gels were stained with ethidium bromide. Molecular weight DNA markers are shown on the left.

doi:10.1371/journal.pntd.0002369.g006

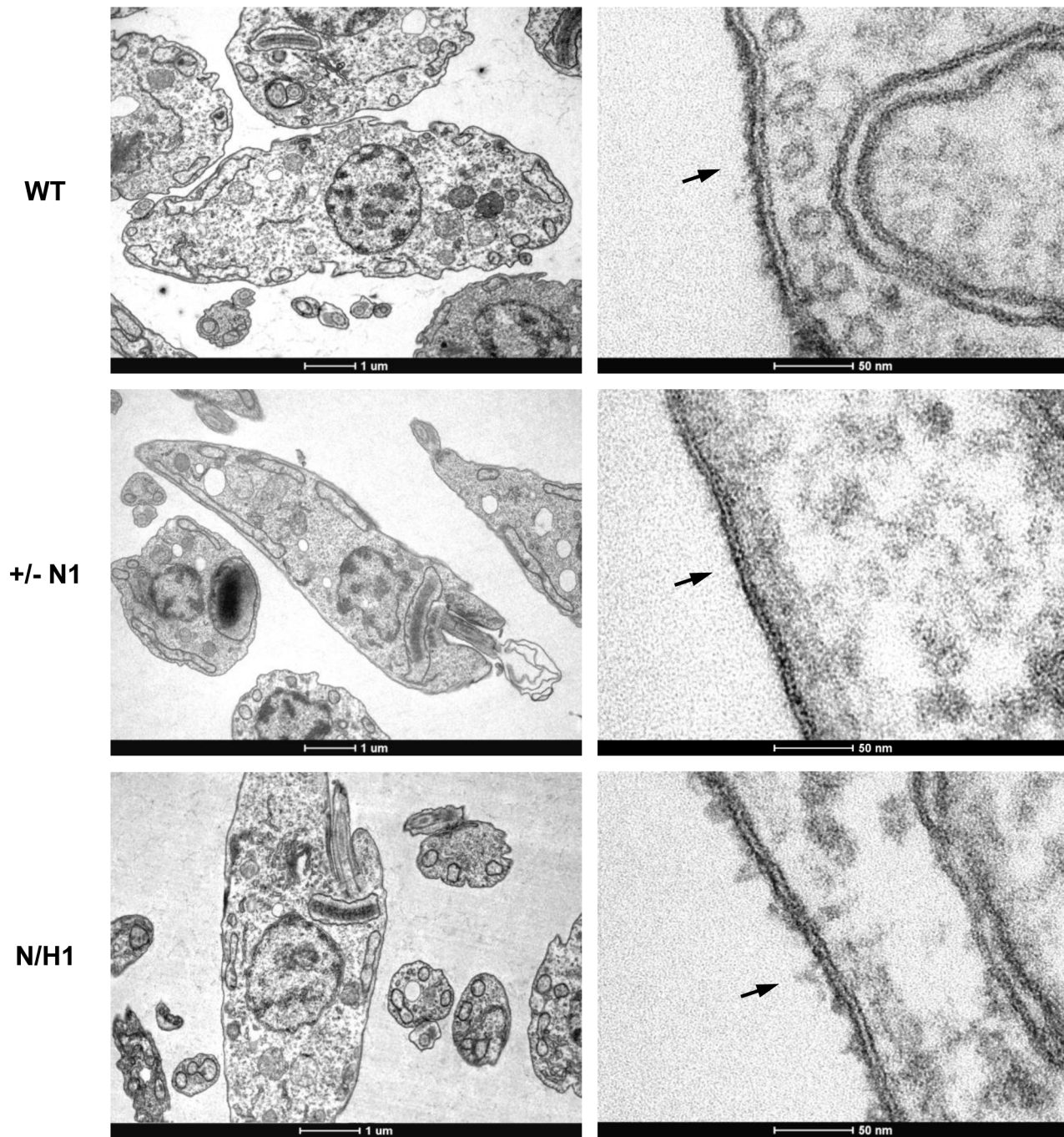


Figure 7. Cell membrane morphology of *T. cruzi* GPI8 mutants. Transmission electron microscopy showing cellular membranes of wild type *T. cruzi* epimastigotes (WT), *TcGPI8* single allele knockout, neomycin resistant (+/- N1) and double resistant *TcGPI8* epimastigote mutants (N/H1). Although displaying similar morphologies, representative images show that single allele *TcGPI8* mutants present a thinner layer of parasite glycocalyx, when compared to wild type cells, whereas cell membranes of double resistant parasites present a glycocalyx layer that is slightly thicker than the glycocalyx of wild type parasite membranes (indicated by the arrows).
doi:10.1371/journal.pntd.0002369.g007

host-parasite interactions and the understanding of the biosynthetic pathways that generate these specific parasite molecules, such as the *T. cruzi* GPI biosynthetic pathway, represent a significant contribution towards this goal. Using a combination of sequence similarity analyses based on yeast, mammal, *T. brucei* and *P. falciparum* previously characterized genes, cellular localization and functional expression in yeast mutants we identified 18 orthologous genes encoding components of the GPI biosynthetic

pathway present in the published *T. cruzi* CL Brener genome database. In addition, the gene encoding the IPC synthase, an enzyme responsible for a key modification that occurs in the lipid anchor during in the infective, trypomastigote stage of the parasite, was also identified. Although most sequences were correctly annotated in the TriTrypDB genome database, *TcGPI15*, *TcGPI19*, *TcDPM2* and *TcGPI16* were not correctly identified. It should be noted however that, because the assembly of the CL

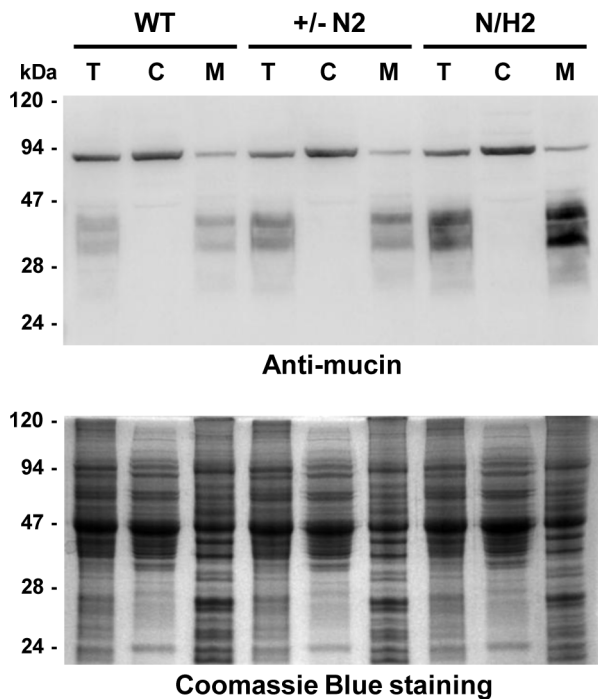


Figure 8. Cell membrane mucins in *T. cruzi* GPI8 mutants. Immunoblot of total (T), cytoplasmic (C) and membrane (M) fractions of WT epimastigotes, *TcGPI8* single allele knockout, neomycin resistant (+/-N2) and double resistant *TcGPI8* (N/H2) mutant cell lines. Equivalent amounts of protein from each fraction, as showed by the Coomassie blue stained bands (bottom panel), were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with anti-mucin antibodies and revealed with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies.
doi:10.1371/journal.pntd.0002369.g008

Brener genome is not complete, our *in silico* analyses might still contain a few missing genes whose presence or absence can only be unambiguously determined by a total sequencing read based analysis or through degenerate PCR experiments. Efforts towards identifying additional genes, such as the ones encoding a component of the mannosyltransferase I complex, α -1,2-mannosyltransferase IV or the acyltransferase, responsible for acylation of the inositol ring, are underway.

By expressing these genes in yeast mutants, we generated yeast cell lines that can now be used in high throughput screening assays for drugs that are specifically targeted to *T. cruzi* enzymes. Using yeast as a tool for drug screening against parasites is a strategy that has been successfully employed [5], [21], [75]. This system allows the identification of drugs acting specifically on the parasite enzyme since their effect on transfected yeast mutants growing in permissive and nonpermissive media can be compared (for a recent review, see [76]). Alternatively, specific inhibitors can be discovered using cell-free system assays, as it was shown for *T. brucei* and *L. major* enzymes involved with GlcNAc-PI de-N-acetylation, mannosylation and inositol acylation [23], [24], [25]. It is noteworthy that, among all tested genes, we observed functional complementation in yeast only for those whose products are not part of a protein complex. Among the *T. cruzi* genes that we were able to show complementation is the *DPM1* gene. Since all four mannose residues are likely to be transferred from dolichol-P-mannose, *DPM1*, a gene encoding the dolichol-P-mannose synthase is considered an excellent candidate gene to be targeted for drug test studies. In contrast to *DPM1*, for which the *T. cruzi* homologous protein has high levels of amino acid identity

with the yeast enzyme, *TcGPI10* was also able to complement the yeast mutation even though it has only 21% identity with the yeast enzyme. On the other hand, the *T. cruzi* IPC synthase, which presents 10% identity with the yeast enzyme and is also a promising target for chemotherapy against trypanosomiasis, is not functional in yeast. This is an unexpected result, since it has been shown that the *Leishmania major* IPC synthase gene (also known as *AUR1* gene) restored the growth of yeast *AUR1* mutants in nonpermissive, glucose-containing media [70].

We further confirmed the role of these genes by analyzing the cellular localization and mRNA expression of their gene products. Sequences corresponding to *TcDPM1*, *TcGPI3* and *TcGPI12* genes, expressed as GFP-fusion proteins in epimastigotes, showed a cellular localization compatible with ER. Interestingly, the *T. cruzi* sequences containing ER localization signals can be recognized by the mammalian protein trafficking machinery, since we were also able to show similar localization of GFP fusions of *TcDPM1*, *TcGPI3*, *TcGPI8* and *TcGPI12* in the ER of transfected HT1080 human fibrosarcoma cells. As expected, analyses of mRNA levels of *TcGPI8* and *TcGPI10* indicated that the components of the GPI biosynthetic pathway are more actively produced in the two proliferative stages of the parasite life cycle, epimastigotes and amastigotes.

To gain further insights into the role of GPI molecules as well as GPI-anchored proteins, we tried to generate *T. cruzi* null mutants for some of these genes. Because a large number of *T. cruzi* proteins involved in host-parasite interactions such as members of the large *trans*-sialidase, mucin and MASP families are GPI anchored, the availability of *T. cruzi* cell lines with disrupted genes of the GPI biosynthetic pathway would allow us to perform a number of studies regarding the effect of the absence of these proteins on the parasite surface during infection. Given that it encodes the catalytic subunit of the GPI:protein transamidase complex, responsible for transferring GPI anchor to the proteins, we sought to disrupt the *TcGPI8* gene, which would have resulted in parasites containing only surface GPIs, but no GPI-anchored proteins. Not surprisingly, the deletion of a single *TcGPI8* allele could be easily achieved by homologous recombination between sequences from each allele flanking the neomycin or hygromycin resistance genes. Accordingly, mRNA expression analyses showed that both *TcGPI8* heterozygous mutants have decreased mRNA levels. On the other hand, several attempts to delete the second *TcGPI8* allele did not result in viable parasites. When the plasmid constructs were modified and drug selection protocol was conducted in such a way that drug concentrations were increased gradually, rare double resistant cell lines were obtained. However, these parasites seem to have undergone large gene rearrangement involving *GPI8* sequences. Although frequently described in *Leishmania* spp, where gene amplification and overexpression of sequences have been observed after disruption of essential genes [45], [77], this phenomenon has been rarely reported for *T. cruzi* [78]. Together with the results of northern blot and RT-PCR analyses, preliminary data on pulse field gel electrophoresis and southern blot hybridizations (not shown) suggested that the amplification of *TcGPI8* sequences involved the production of episomal DNA molecules. Thus, the anomalous expression of *TcGPI8* mRNA sequences from distinct genomic locations, indicated by a large smear of high molecular weight RNA bands in northern blots and the amplification of spliced leader containing *TcGPI8* mRNA allowed the growth of mutants in which both *TcGPI8* alleles were disrupted by drug resistance markers. Surprisingly, although no major morphological alterations were evident, electron microscopy analyses of cell membrane structures of epimastigotes showed that *TcGPI8* mutants have changes in

their glycocalyx layer. Even though the small reduction in the glycocalyx layer observed in the heterozygous mutants could not be correlated with changes in the levels of mucins, western blot with membrane fractions, confirmed by flow cytometry using anti-mucin antibodies indicated that double-resistant parasites present a small increase in the amount of surface glycoproteins, most likely due to an increased expression of the translocated copies of *TcGPI8* gene. Mucins play a critical role during infection, since they are the acceptors of sialic acid that allows trypomastigotes to build a negatively charged coat that protects them from killing by host anti- α -galactopyranosyl antibodies [79]. Whether the genomic rearrangements that resulted in the expression of *TcGPI8* from different genomic locations have affected the expression of other *T. cruzi* genes, it remains to be determined. It will be also important to determine which are the mechanisms employed by the parasite that resulted in the genomic rearrangement observed with the double resistant clones.

Interestingly, despite being viable in culture, *T. brucei* mutants lacking *TbGPI8* resulted in the absence of GPI-anchored surface proteins, accumulation of non-protein-linked GPI and incapacity of procyclic forms to establish infections in the tsetse midgut [80]. In contrast, *GPI8* RNAi knock-down in bloodstream forms resulted in accumulation of unanchored variant surface glycoprotein (VSG) and cell death with a phenotype indicative of blocking cytokinesis [72]. On the other hand, *L. mexicana GPI8* knockouts, although deficient of GPI-anchored proteins, display normal growth in culture, are capable of differentiating into amastigotes, and are able to infect mice [19]. In addition to *GPI8*, procyclic *T. brucei* lacking the *TbGPI12* and *TbGPI10* were also obtained. Although unable to synthesize GPI structures beyond GlcNAc-PI, *TbGPI12*^{-/-} parasites are viable in culture, but are not able to colonize the tsetse midgut [51]. Deletion of *TbGPI10* also interferes with the ability of procyclic mutants to infect tsetse flies [18]. These reports are in contrast with our results indicating that disruption of only one allele of a gene involved in the initial steps of the GPI pathway such as *TcGPI3* or *TcGPI10* resulted in non-viable *T. cruzi* epimastigotes. On the other hand, similarly to the genomic alterations we observed in the *T. cruzi* double resistant *TcGPI8* mutants, an attempt to create a *L. mexicana* knockout by targeted deletion of the gene encoding the dolichol-phosphate-mannose synthase resulted in amplification of this chromosomal locus [45]. Thus, our contrasting results attempting to generate *T. cruzi* null mutants of genes involved with GPI biosynthesis, compared to similar studies described in *T. brucei* and *L. mexicana*, suggest that, although considered closely related organisms, the different members of the trypanosomatid family have significant peculiarities that deserve detailed analyses of major biochemical pathways in each parasite species.

Supporting Information

Figure S1 Cellular localization of *T. cruzi* proteins expressed in mammalian cells. The *T. cruzi* genes *TcDPM1*, *TcGPI3*, *TcGPI12*, and *TcGPI8* were cloned in fusion with GFP in the vector pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO and transfected into HT1080 human fibrosarcoma cells. Forty eight hours after transfections with pcDNA-GFP-*TcDPM1* (A), pcDNA-GFP-*TcGPI3* (B), pcDNA-GFP-*TcGPI12* (C), pcDNA-GFP-*TcGPI8* (D) or after mock transfections (E), cells were stained with DAPI and visualized under fluorescence microscopy. All plasmids were cotransfected with the pGAG-DsRed-ER plasmid to visualize cellular ER compartments. Scale bars: 20 μ m. (TIF)

Figure S2 RT-PCR mRNA analysis of yeast mutants transformed with *T. cruzi* genes. Reverse-transcription and PCR amplifications (RT-PCR) of total RNA isolated from non-transformed yeast mutants or mutants transformed with *T. cruzi* genes were analyzed by agarose gel electrophoresis. Total RNA was isolated from *GPI8* yeast mutants (top panel) or *AUR1* mutants (bottom panel). mRNA expression was analyzed in non-transformed mutants (*GPI8* mutants or *AUR1* mutants) or mutants transformed with pRS426Met plasmids carrying either the *T. cruzi* (*TcGPI8* or *TcIPCS*) that were grown in galactose-containing media. For each RNA sample, pair of primers used for cDNA amplifications, which are specific for the *TcGPI8*, *TcIPCS*, the endogenous *ScGPI8* or *ScAUR1*, as well as for the yeast *26S rRNA* genes, are indicated above each lane of the gel and are listed in Table S1. It is also indicated above each lane, whether the amplicons were generated in presence (+) or in the absence (−) of reverse transcriptase (RT). Molecular weight DNA markers are shown on the left. (TIF)

Figure S3 Synthesis of dolichol-P-mannose in yeast mutants expressing the *TcDPM1* gene. Thin Layer Chromatography (TLC) of dolichol-phosphate-mannose *in vitro* labeled with GDP-[2-³H]mannose was performed using membrane fractions from: wild type yeast expressing the *DPM1* endogenous gene (A), grown in the complete medium and preincubated with dolichol-phosphate; (B) *DPM1* mutant grown in SD medium supplemented with uracil (nonpermissive conditions); (C) wild type yeast, expressing the *DPM1* endogenous gene, grown in the YPGR medium and preincubated with amphomycin and dolichol-phosphate; (D) *DPM1* mutant transformed with the recombinant plasmid pRS426Met containing the *ScDPM1* grown in nonpermissive medium; (E) WT yeast, containing the *DPM1* endogenous gene, grown in complete but not preincubated with amphomycin and dolichol-phosphate; (F) *DPM1* mutant transformed with the recombinant plasmid pRS426Met containing the *TcDPM1* grown in nonpermissive medium. The position of the dolichol-P-mannose (Dol-P-Man) in the TLC is indicated by an arrow. (TIF)

Figure S4 Flow cytometry analyses of *T. cruzi* mutants. Wild type epimastigotes (WT), two *TcGPI8* single knockouts *Neo*^R (+/− N1 and +/− N2) and double resistant clones (N/H1 and N/H2) were stained with the anti-mucin monoclonal antibody 2B10 (dilution 1:450) and analyzed by flow cytometry. The values of mean fluorescence intensity (MFI) for each parasite cell line are shown below. (TIF)

Table S1 Sequences of oligonucleotides used for PCR amplifications and to generate plasmid constructs. (PDF)

Acknowledgments

We are indebted to Marco Antonio S. Campos for helpful discussions. R.T. Schwartz is a visiting Professor at University of Lille.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HS RTS RTG SMRT. Performed the experiments: MSC CJ RCT HS CSM PRA DAG PMM JK PS SN JOP LM. Analyzed the data: MSC CJ RCT HS RTS JOP LM RTG SMRT. Contributed reagents/materials/analysis tools: HS PMM RTS JOP LM RTG SMRT. Wrote the paper: MSC SMRT.

References

- McConville MJ, Ferguson MA (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J* 294: 305–324.
- Fujita M, Kinoshita T (2010) Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. *FEBS Lett* 584: 1670–1677.
- Prevato JO, Wait R, Jones C, DosReis GA, Todeschini AR, et al. (2004) Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. *Adv Parasitol* 56: 1–41.
- De Lederkremer RM, Agusti R, Docampo R (2011) Inositolphosphoceramide metabolism in *Trypanosoma cruzi* as compared with other trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol* 58: 79–87.
- Ferguson MA (2000) Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10673–10675.
- Prevato JO, Jones C, Xavier MT, Wait R, Travassos LR, et al. (1995) Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. *J Biol Chem* 270: 7241–7250.
- Giorgi ME, de Lederkremer RM (2011) Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. *Carbohydr Res* 346: 1389–1393.
- Nakayasu ES, Yashunsky DV, Nohara LL, Torrecilhas AC, Nikolaev AV, et al. (2009) GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Syst Biol* 5: 261.
- Yoshida N (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78: 87–111.
- Alves MJ, Colli W (2008) Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcell Biochem* 47: 58–69.
- Frasch AC (2000) Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 16: 282–286.
- Almeida IC, Gazzinelli RT (2001) Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol* 70: 467–477.
- Junqueira C, Guerrero AT, Galvão-Filho B, Andrade WA, Salgado AP, et al. (2012) *Trypanosoma cruzi* adjuvants potentiate T cell-mediated immunity induced by a NY-ESO-1 based antitumor vaccine. *PLoS One* 7: e36245.
- Eisenhaber B, Maurer-Stroh S, Novatchkova M, Schneider G, Eisenhaber F (2003) Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins. *Bioessays* 25: 367–385.
- Pittet M, Conzelmann A (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1771: 405–420.
- Kinoshita T, Inoue N (2000) Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 4: 632–638.
- Ferguson MA (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 112 (Pt 17): 2799–2809.
- Nagamune K, Nozaki T, Maeda Y, Ohishi K, Fukuma T, et al. (2000) Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10336–10341.
- Hilley JD, Zawadzki JL, McConville MJ, Coombs GH, Mottram JC (2000) *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI):protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol Biol Cell* 11: 1183–1195.
- Delorenzi M, Sexton A, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Speed T, et al. (2002) Genes for glycosylphosphatidylinositol toxin biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 70: 4510–4522.
- de Macedo CS, Shams-Eldin H, Smith TK, Schwarz RT, Azzouz N (2003) Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Biochimie* 85: 465–472.
- Sütterlin C, Horvath A, Gerold P, Schwarz RT, Wang Y, et al. (1997) Identification of a species-specific inhibitor of glycosylphosphatidylinositol synthesis. *EMBO J* 16: 6374–6383.
- Smith TK, Sharma DK, Crossman A, Dix A, Brimacombe JS, et al. (1997) Parasite and mammalian GPI biosynthetic pathways can be distinguished using synthetic substrate analogues. *EMBO J* 16: 6667–6675.
- Smith TK, Sharma DK, Crossman A, Brimacombe JS, Ferguson MA (1999) Selective inhibitors of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 18: 5922–5930.
- Smith TK, Crossman A, Borissow CN, Paterson MJ, Dix A, et al. (2001) Specificity of GlcNAc-PI de-N-acetylase of GPI biosynthesis and synthesis of parasite-specific suicide substrate inhibitors. *EMBO J* 20: 3322–3332.
- Smith TK, Crossman A, Paterson MJ, Borissow CN, Brimacombe JS, et al. (2002) Specificities of enzymes of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Trypanosoma brucei* and HeLa cells. *J Biol Chem* 277: 37147–37153.
- Morita YS, Paul KS, Englund PT (2000) Specialized fatty acid synthesis in African trypanosomes: myristate for GPI anchors. *Science* 288: 140–143.
- Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosome in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 93–100.
- Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE (1995) Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 270: 22586–22594.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Mazhari-Tabrizi R, Blank M, Mumberg D, Funk M, Schwarz RT, et al. (1999) Chromosomal promoter replacement in *Saccharomyces cerevisiae*: construction of conditional lethal strains for the cloning of glycosyltransferases from various organisms. *Glycoconj J* 16: 673–679.
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110: 119–122.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355–360.
- Damaseno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, et al. (2007) Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 381–389.
- Mazhari-Tabrizi R, Eckert V, Blank M, Müller R, Mumberg D, et al. (1996) Cloning and functional expression of glycosyltransferases from parasitic protozoans by heterologous complementation in yeast: the dolichol phosphate mannose synthase from *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 316 (Pt 3): 853–858.
- Sharma CB, Babczinski P, Lehle L, Tanner W (1974) The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 46: 35–41.
- DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, et al. (2004) Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res* 92: 113–120.
- Bangs JD, Uyetake L, Brickman MJ, Balber AE, Boothroyd JC (1993) Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in *Trypanosoma brucei*. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. *J Cell Sci* 105: 1101–1113.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409–415.
- Orlean P (1990) Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10: 5796–5805.
- Maeda Y, Kinoshita T (2008) Dolichol-phosphate mannose synthase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1780: 861–868.
- Tomita S, Inoue N, Maeda Y, Ohishi K, Takeda J, et al. (1998) A homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Dpm1p is not sufficient for synthesis of dolichol-phosphate-mannose in mammalian cells. *J Biol Chem* 273: 9249–9254.
- Colussi PA, Taron CH, Mack JC, Orlean P (1997) Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7873–7878.
- Shams-Eldin H, de Macedo CS, Niehus S, Dorn C, Kimmel J, et al. (2008) *Plasmodium falciparum* dolichol phosphate mannose synthase represents a novel clade. *Biochem Biophys Res Commun* 370: 388–393.
- Ilgoutz SC, Zawadzki JL, Ralton JE, McConville MJ (1999) Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*. *EMBO J* 18: 2746–2755.
- Watanabe R, Murakami Y, Marmor MD, Inoue N, Maeda Y, et al. (2000) Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2. *EMBO J* 19: 4402–4411.
- Sobering AK, Watanabe R, Romeo MJ, Yan BC, Specht CA, et al. (2004) Yeast Ras regulates the complex that catalyzes the first step in GPI-anchor biosynthesis at the ER. *Cell* 117: 637–648.
- Murakami Y, Siripanyaphinyo U, Hong Y, Tashima Y, Maeda Y, et al. (2005) The initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-Y, a seventh component. *Mol Biol Cell* 16: 5236–5246.
- Watanabe R, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Kinoshita T (1999) Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem J* 339 (Pt 1): 185–192.
- Chang T, Milne KG, Güther ML, Smith TK, Ferguson MA (2002) Cloning of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* major genes encoding the GlcNAc-phosphatidylinositol de-N-acetylase of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis that is essential to the African sleeping sickness parasite. *J Biol Chem* 277: 50176–50182.
- Güther ML, Lee S, Tetley L, Acosta-Serrano A, Ferguson MA (2006) GPI-anchored proteins and free GPI glycolipids of procyclic form *Trypanosoma brucei* are nonessential for growth, are required for colonization of the tsetse fly, and are not the only components of the surface coat. *Mol Biol Cell* 17: 5265–5274.
- Sharma DK, Smith TK, Weller CT, Crossman A, Brimacombe JS, et al. (1999) Differences between the trypanosomal and human GlcNAc-PI de-N-acetylases of glycosylphosphatidylinositol membrane anchor biosynthesis. *Glycobiology* 9: 415–422.

53. Sanyal S, Frank CG, Menon AK (2008) Distinct flippases translocate glycerophospholipids and oligosaccharide diphosphate dolichols across the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 47: 7937–7946.
54. Murakami Y, Siripanyapinyo U, Hong Y, Kang JY, Ishihara S, et al. (2003) PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor. *Mol Biol Cell* 14: 4285–4295.
55. Güther ML, Ferguson MA (1995) The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 14: 3080–3093.
56. Hong Y, Nagamune K, Morita YS, Nakatani F, Ashida H, et al. (2006) Removal or maintenance of inositol-linked acyl chain in glycosylphosphatidylinositol is critical in trypanosome life cycle. *J Biol Chem* 281: 11595–11602.
57. Heise N, Raper J, Buxbaum LU, Peranovich TM, de Almeida ML (1996) Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 271: 16877–16887.
58. Umemura M, Okamoto M, Nakayama K, Sagane K, Tsukahara K, et al. (2003) GWT1 gene is required for inositol acylation of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *J Biol Chem* 278: 23639–23647.
59. Güther ML, de Almeida ML, Yoshida N, Ferguson MA (1992) Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. The structure of the glycan core. *J Biol Chem* 267: 6820–6828.
60. Ashida H, Hong Y, Murakami Y, Shishioh N, Sugimoto N, et al. (2005) Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I. *Mol Biol Cell* 16: 1439–1448.
61. Kim YU, Ashida H, Mori K, Maeda Y, Hong Y, et al. (2007) Both mammalian PIG-M and PIG-X are required for growth of GPI14-disrupted yeast. *J Biochem* 142: 123–129.
62. Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas AC, De Marchi CR, et al. (2004) The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem* 279: 15860–15869.
63. de Lederkremer RM, Agusti R (2009) Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 62: 311–366.
64. Orlean P, Menon AK (2007) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J Lipid Res* 48: 993–1011.
65. Benghezal M, Benachour A, Rusconi S, Aebi M, Conzelmann A (1996) Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J* 15: 6575–6583.
66. Nagamune K, Ohishi K, Ashida H, Hong Y, Hino J, et al. (2003) GPI transamidase of *Trypanosoma brucei* has two previously uncharacterized (trypanosomatid transamidase 1 and 2) and three common subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10682–10687.
67. Serrano AA, Schenkman S, Yoshida N, Mehler A, Richardson JM, et al. (1995) The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J Biol Chem* 270: 27244–27253.
68. Agusti R, Couto AS, Campetella OE, Frasch AC, de Lederkremer RM (1997) The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two different lipids. *Glycobiology* 7: 731–735.
69. Figueiredo JM, Dias WB, Mendonça-Prevato L, Prevato JO, Heise N (2005) Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 387: 519–529.
70. Denny PW, Shams-Eldin H, Price HP, Smith DF, Schwarz RT (2006) The protozoan inositol phosphorylceramide synthase: a novel drug target that defines a new class of sphingolipid synthase. *J Biol Chem* 281: 28200–28209.
71. Heidler SA, Radding JA (1995) The AUR1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes dominant resistance to the antifungal agent aureobasidin A (LY295337). *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2765–2769.
72. Lillico S, Field MC, Blundell P, Coombs GH, Mottram JC (2003) Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8. *Mol Biol Cell* 14: 1182–1194.
73. Hong Y, Nagamune K, Ohishi K, Morita YS, Ashida H, et al. (2006) TbGPI16 is an essential component of GPI transamidase in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* 580: 603–606.
74. Mortara RA, da Silva S, Araguth MF, Blanco SA, Yoshida N (1992) Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun* 60: 4673–4678.
75. Bilsland E, Pir P, Gutteridge A, Johns A, King RD, et al. (2011) Functional expression of parasite drug targets and their human orthologs in yeast. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1320.
76. Nordliffe JL, Alvarez-Ruiz E, Martin-Plaza JJ, Steel PG, Denny PW (2013) The utility of yeast as a tool for cell-based, target-directed high-throughput screening. *Parasitology*: 1–9.
77. Boitz JM, Ullman B (2010) Amplification of adenine phosphoribosyltransferase suppresses the conditionally lethal growth and virulence phenotype of *Leishmania donovani* mutants lacking both hypoxanthine-guanine and xanthine phosphoribosyltransferases. *J Biol Chem* 285: 18555–18564.
78. Li ZH, Alvarez VE, De Gaudenzi JG, Sant'Anna C, Frasch AC, et al. (2011) Hyperosmotic stress induces aquaporin-dependent cell shrinkage, polyphosphate synthesis, amino acid accumulation, and global gene expression changes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 286: 43959–43971.
79. Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, et al. (2000) Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl antibodies. *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1299–1307.
80. Nagamune K, Acosta-Serrano A, Uemura H, Brun R, Kunz-Renggli C, et al. (2004) Surface sialic acids taken from the host allow trypanosome survival in tsetse fly vectors. *J Exp Med* 199: 1445–1450.