

**Rafael Miyazawa Martins**

Lise Celular e Ativação da Triolisina,  
Proteína Citolítica da Saliva de *Triatoma infestans*

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo - Escola Paulista  
de Medicina, para a obtenção do Título  
de Doutor em Ciências

São Paulo  
2007

**Rafael Miyazawa Martins**

Lise Celular e Ativação da Trialisina,  
Proteína Citolítica da Saliva de *Triatoma infestans*

**Orientador: Prof. Dr. Sergio Schenkman**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Amino**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo - Escola Paulista  
de Medicina, para a obtenção do Título  
de Doutor em Ciências

São Paulo  
2007

Martins, Rafael Miyazawa

**Lise Celular e Ativação da Trialisina, Proteína Citolítica da Saliva de *Triatoma infestans*** / Rafael Miyazawa Martins - São Paulo, 2007

viii, 115 fl.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês: Cell Lysis and Activation of Trialysin, Cytolytic Protein from *Triatoma infestans* saliva.

1. *Triatoma infestans*; 2. trialisina; 3. saliva; 4. lise celular; 5. peptídeos antimicrobianos; 6. ativação proteolítica

Trabalho realizado na Disciplina de Biologia Celular do  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da  
Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina,  
com auxílio financeiro concedido pela  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**"A LUZ NO FIM DO TÚNEL É SÓ A LUZ  
DE UM TREM QUE VEM VINDO"**

**ROBERT LOWELL**

# AGRADECIMENTOS

À minha família, que me suporta e ampara em todos os momentos da minha vida: Mãe, Sazinha, Soni, Tiaha, Tiaki, Tiami, Tio Rômulo, Tio Issao e Tia Cecília; Alva, Edu, Rominho, Rê e especialmente aos meus lindos irmãos Rita e Frederico, pelos anos de convívio e aprendizado nem sempre fácil; por encararem bravamente meu Mr. Hyde que às vezes (!?) aflora e por darem o máximo para satisfazer o reizinho mandão!

À minha namorada Taís pelo amor, companheirismo, paciência, alegria e dedicação; obrigado por cuidar de mim nos momentos mais críticos e também por me introduzir na sua família maravilhosa que me acolheu tão bem.

Aos Fabulosos  :

Ao Sergio, por me aceitar no laboratório, me orientar, me dar toda a liberdade de trabalhar e exemplificar ética e dedicação à ciência. Obrigado pelo entusiasmo contagiante, disponibilidade e por me permitir trabalhar dentre pessoas especialíssimas.

Ao Roti, que me guiou nos mistérios do laboratório desde 1998... Obrigado pela amizade, paciência, conselhos, bom-humor, disponibilidade e principalmente pelo exemplo espiritual e científico. Sinto muitíssimo não ter aproveitado seu ensinamento futebolístico mas quem sabe ainda haja tempo...

Donizete Babinska, Júlio Monte, Lúcio Freitas-Júnior, Lys Guilbride, Marcel Ramirez, Marcella Faria, Marília Malta, Patrícia Godoy, Rafael Marques Porto, Tatiana Ejchel, Thais Falcão e Vera Chioccola – obrigado pelo apoio nos momentos de desespero, quando o FPLC apita, as bolhas materializam no leitor de UV, o gel de prata cai na pia suja, os barbeiros tentam voar... Foi ótimo ter convivido com vocês, aprendi muito nesse período (mas sem socar centrífugas nem geladeiras)!

- Carol Elias, adorável presença do lab, companheira de Coca-light, pão de queijo e capuccino no Fala! Valeu pelo auxílio freqüente e pelas conversas sobre futuro, Harry Potter, pós-docs, Jack Bouer, vida...

- Evânia, a super! Valeu por toda a ajuda no dia-a-dia e nos momentos divertidíssimos de praia, forró e churras!!!

- Carlos Massayuki, grande descascador de milho – lembro as aulas de cinética enzimática do 2º ano... Valeu pelas conversas, almoços às 11h, baladas, cervejas, clube da fumaça, pela família demais!

- Fernando Dossin, (*é, mister M...*), caríssimo parceiro de corridas ocasionais, cervejinhas, bandejão, Sabedoria Chapa Quente, (algumas) baladas, papos cabeçudos e lições de vida (A gente faz o que a gente pode....heheheh)!

- Júlia Cunha, querida companheira de Unifesp/Bio32, uma pseudo-golfinho ímpar! Muito obrigado pela amizade, conselhos, espectrometria de massas, exemplo de arrumação de bancada (hehehe) e profissionalismo.
- Teresa Jesus, exemplo de força e determinação, uma potência na bancada! Valeu pelas conversas, aulas de spinning, compras e passeios calóricos na Paulista!
- Claudeci, sempre fazendo e falando 3000 coisas ao mesmo tempo, obrigado por nos dar mais do que a mão e me aturar. Lembre-se: queremos mais churrascos!
- Ludmila, valeu pela amizade, pelo carinho e alegria no lab, conversas ótimas, momentos bidimensionais e espectroscópicos de massas...
- Cláudio, valeu pela tremenda ajuda na cultura, na caça às presas dos barbeiros, por estar sempre disposto a auxiliar e aprender, tô esperando o preço justo...
- Sheila Cristina, ponta firme de boteco. Valeu pela aromatização artificial de baunilha no laboratório e principalmente pela ampliação de meu vocabulário, guria.
- Thiago, caçara sofredor, solícito e dedicado, cuidado com a sua faca de diamante!
- Alberto, chileno sensível, nervoso e divertido... Valeu pela companhia de corridas e bancada!
- Tarsis Ferreira, agregado divertidíssimo, valeu pelas conversas de altíssimo teor, pelas análises açucaradas e discussões científicas.
- Vivi Ha, coreana que parece quietinha mas quando desanda a falar... diversão garantida e presença constante nos encontros!
- Rebecca Midory, cuja sensibilidade e inteligência me guiam nas escolhas quadrinhísticas!!
- Carla, Erik, Ivan, Juca, Luana, Luciana e Rafão, alunos de iniciação que agitam o lab e dão sopro de vida e excitação ao laboratório! Obrigado por agitarem um pouco os velhíssimos pós-graduandos deste lab!
- Finalmente, obrigado Bruno Mococa e Rogério Sacramento (o colaborador), que me testam todos os dias, sofrem comigo e de vez em quando geram resultados!!! Obrigado pela disposição, força de vontade e insistência! Espero que ambos continuem e cresçam na pesquisa; foi ótimo aprender com vocês!

À Bio 32 e agregados, especialmente Aninha, Alisson, Bia, Cassiano, Cláudio, Dagot, Fabrício, Guto, Leila, Mari-bel, Ota, Paulinha, Renata-torredebabel, Rodrigo, Tati, Truz e Van. Vocês foram extremamente especiais e importantes desde minha chegada em São Paulo. Obrigado pelas conversas, mega-baladas, gorós homéricos, alegrias, tristezas e crises partilhadas!!! Obrigado, Juli-bel (Med 66) por também fazer parte dessa fase! Família Bel, obrigado por tudo o que vocês representam, adoro vocês!

Aos habitantes do 8º andar, Disciplina de Biologia Celular; secretários: Márcia, Marcelo, Joseli e Antônia, por toda a ajuda na burocracia; Má, sem você cuidando das reservas técnicas, não sei o que seria de nós... Técnicos: Américo, Dona Sebá, Maria, Luizão, Seu Tônico, Zé Carlos, pela sabedoria (grande Dona Sebá!!) e apoio em todas as necessidades urgentíssimas nossas! Nossos vizinhos: Rosana Puccia, Zoilo Camargo, Olga Gompertz, Maria Lúcia Cardoso de Almeida, Luiz Travassos, Elaine Rodrigues e equipes por reagentes, discussões, desabafos, aparelhos... Especialmente Tânia Barros, Flávia Moraes, Kátia Cardoso, Antônio Augusto, Wagner Batista, Luciane Ganiko, Milene; Cris, Bel, Geisa, Rodrigo, Júnior, Sílvia; Fabiane, Clédja, Pato Godoy, Xandão; Rose, Carol Borsói, Mourisa, Maria Amélia, Ricardo e

Camila; Thaysa, Andrey, Rose, Sabrina, Carla (Querida Cuuuuunnnn!), Flávia Hebler, Fabi, Bianca, Luis Marchi, Fizão, Cambinão e Cintião (Arre égua!)! Obrigado pelos ótimos momentos juntos!

À Bio 38 e agregados: Bárbara, Felipe, João, Joes, Karen, Leo, Marialice, Mineiro, Paula, Renata, Sílvia, Tato, Tim, Toddy, Clarissa, Chinezinho Cabeção, Débora, Mari Carioca, valeu pelas caminhadas nas nuvens juntos! Às meninas da Enf 64: Camila, Ju Fono, Lívia, Luana, Maris Morena e Loira, Pri, Uçu, Vivi; Bio 37: Artur, Bruno, Emília, Fefa, Gabi, Julien, Leo, Lipe, Mac, Marco. Valeu pela diversão!!!!

Aos membros do Departamento: Parasitologia: secretárias Mércia e Regiane pela resolução dos problemas mais críticos em menor tempo possível, professores Nobuko Yoshida, Maurício Rodrigues, Clara Mestriner, José Franco da Silveira, Michel Rabinovitch, Renato Mortara; Microbiologia: Marcelo Briones (Bia Schnabel), Bia Castilho (Vivi-Xuxa, Carolzinha, Larissa, Nilce, as Spice Girls).

Aos ressonantes do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron: Thelma Pertinhez, Alberto Spisni, Maurício Sforça, Leonardo Trabuco, Aline Oliveira, Rita Figueiredo, Sérgio Oyama; obrigado pela introdução ao mundo dos spins nucleares, seqüências de pulso e DYANAs!!

À querida Prof<sup>a</sup>. Cida Tanaka e equipe: Ricardo, Ivan, Serginho, Diogo, Cássia, Carla, Renato. Obrigado pela excelentíssima companhia, além disso pelos reagentes, equipamentos, discussões, conversas, festinhas, botecos, cafés.

À Prof<sup>a</sup> Iolanda Cuccovia e sua fantástica pós-doc Katia Daghanli pela ajuda nos ensaios com lipossomos.

Aos professores Maria Juliano e Luiz Juliano pelos peptídeos que me salvaram a tese. Izaura Hirata pelos seqüenciamentos e análises de aminoácidos e Iuri Gouvêa pelo uso do fluorímetro.

Ao Prof. Magnus da Silva, pelas excelentes conversas, dicas e apoio nessa fase difícil de doutorado/pós-doutorado...

To the special BoP 2006 attendants: Bruna, Lari, Angie, Nick, Mai, Najju, Katy, Markus, Tiff, Arnaud, Isabel, Jo, Beth, Paul, Kathryn, Megan, Dr. Patricia Johnson and Dr. Chris Hunter: because you know that *Hips don't lie*... and all the terrific faculty and lecturers I met during this magical summer experience!!

Ao Dr. Eduardo Aoki, Serviço de Saúde do Corpo Discente (Dra. Nair), Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (Drs. Roberto Takimoto, Marcelo Rosado, Macoto Kosugi, Murilo, Marcel) da Unifesp; às atenciosas enfermeiras da Ala de Internação de docentes, alunos e funcionários do Hospital São Paulo: obrigado por cuidarem da minha saúde na detecção, extirpação e eliminação do meu carcinominha...

À Unifesp e Fapesp pela acolhida e suporte financeiro.



# ÍNDICE

Lista de abreviaturas	1
Resumo	3
Summary	5
Introdução	7
1. Doença de Chagas	7
2. Os triatomíneos	8
3. A saliva dos triatomíneos	10
3.1. A saliva de <i>Rhodnius prolixus</i>	11
3.2. Glândulas salivares e saliva de <i>Triatoma infestans</i>	13
4. Polipeptídeos líticos de membranas	16
4.1. Citolisinas formadoras de poros	16
4.2. Peptídeos antimicrobianos e citolíticos	19
Objetivos	24
Capítulo 1: Purificação, clonagem e caracterização da trialisina	25
Resumo	26
Artigo	28
Capítulo 2: Estrutura de peptídeos sintéticos baseados no N-terminal da trialisina	35
Resumo	36
Artigo	40
Capítulo 3: Expressão em sistema heterólogo da trialisina e pró-trialisina recombinantes	50
Resumo	51
Introdução	51
Materiais e métodos	54
Resultados	62
Capítulo 4: Inibição da lise da trialisina pela pró-região	70
Resumo	71
Artigo	74
Discussão Geral e Conclusões	97
Referências Bibliográficas	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

2X YT: meio de cultivo de bactérias com extrato de levedura e bacto-triptona (*Yeast extract, Tryptone*).

ADP: 5'-difosfato de adenosina, *adenosine 5'- diphosphate*

AMPc: 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico, *cyclic adenosine 3',5'-monophosphate*

APMSF: fluoreto de (4-amidino-fenil)-metano-sulfonil, *(4-amidino-phenyl)-methane-sulfonyl fluoride*

ATP: 5'-trifosfato de adenosina, *adenosine 5'-triphosphate*

CAP: proteína ativadora por AMPc, *cAMP activator protein*

CD59: antígeno de diferenciação de grupo 59, *Cluster of Differentiation 59*

CDCs: citolisinas dependentes de colesterol

cdNA: ácido desoxirribonucléico complementar, *complementary DNA*

C-terminal: terminal carboxila

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético, *ethylenediaminetetraacetic acid*

GPI: glicosil-fosfatidilinositol

GST: glutationa S-transferase

HPLC: cromatografia líquida de alta performance, *high performance liquid chromatography*

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

L30: trialisina, clone 30 (Genbank AF427486)

LB: meio de cultivo de bactérias Luria-Bertani

Ni-NTA: ácido nitrilotriacético-níquel, *nickel-nitrilotriacetic acid*

NL2: fragmento não-lítico, clone 2

NO: óxido nítrico

NP1-4, NP-7: nitroforina 1-4, nitroforina-7

N-terminal: terminal amino

ORF: fase de leitura aberta, *open reading frame*

PCR: reação em cadeia da polimerase, *polymerase chain reaction*

PFO: perfringolisina O

pl5: pró-trialisina, clone 5 (Genbank AF427487)

RMN: ressonância magnética nuclear

RNA: ácido ribonucléico, *ribonucleic acid*

RPAI: inibidor de agregação plaquetária de *Rhodnius*, *Rhodnius platelet aggregation inhibitor*

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio, *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TAE: solução contendo Tris-Acetato e EDTA

TFE: trifluoro-etanol

TMH: grampos transmembrânicos, *transmembrane hairpins*

TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>

ufc: unidades formadoras de colônias

WHO: Organização Mundial da Saúde, *World Health Organization*

δ (ppm): deslocamento químico (partes por milhão)

## RESUMO

A saliva de artrópodos hematófagos constitui um coquetel farmacológico que atua nos sistemas hemostático, inflamatório e imunológico de seus hospedeiros para auxiliar a aquisição do sangue. O inseto *T. infestans*, vetor da doença de Chagas, apresenta em sua saliva uma série de moléculas e atividades biológicas já descritas. Dentre elas está a trialisina, uma proteína formadora de poros em bicamadas lipídicas. A trialisina é capaz de lisar/permeabilizar diversos tipos celulares e se propõe que a atividade lítica ocorra pela inserção da porção N-terminal da molécula na membrana das células de tal forma a promover a formação de um poro. A identificação do gene que codifica a trialisina mostrou que além de ter uma seqüência sinal de secreção, a proteína conteria uma região ácida no seu N-terminal. Este domínio está ausente na proteína madura purificada da saliva e poderia inibir a ação da trialisina. O objetivo de nosso trabalho foi estudar o mecanismo de lise da trialisina e como se daria a ativação do precursor da trialisina (pró-trialisina) durante a secreção da glândula salivar até a ejeção da saliva.

Para entender o mecanismo de ação da trialisina, já que a expressão heteróloga tanto da pró-trialisina quanto da trialisina apresentou várias dificuldades, utilizamos peptídeos sintéticos baseados na região N-terminal da trialisina madura. Os peptídeos mostraram diferentes especificidades para tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, hemácias humanas e *Escherichia coli*, mas de modo geral, aqueles que continham a maior parte da primeira hélice anfipática predita na trialisina madura apresentaram maior atividade lítica. Todos os peptídeos adquiriam estrutura secundária ( $\alpha$ -hélices) na presença de agentes miméticos de membranas. Determinamos as estruturas tridimensionais em solução por Ressonância Magnética Nuclear dos três peptídeos mais ativos e de um pouco ativo e pudemos observar a importância de segmentos distintos de alguns peptídeos nas especificidades dos alvos.

Utilizando um anti-soro gerado contra a porção C-terminal da trypsinina recombinante (fragmento não-lítico), identificamos a pró-trypsinina em extratos de glândulas salivares contendo APMSF, inibidor da ativação da trypsinina. O precursor apresentou menor atividade lítica contra tripomastigotas. Embora fosse previsto que o precursor teria uma porção pró de 33 resíduos, a diferença entre as bandas em SDS-PAGE da pró-trypsinina e trypsinina foi de cerca de 10-15 aminoácidos. Um peptídeo de fluorescência apagada contendo 12 resíduos da porção pró e 27 do N-terminal da trypsinina madura foi sintetizado e observamos que sua atividade lítica era aumentada quando a serino-protease salivar tripsina ou endoproteinase Arg-C eram adicionadas, ao mesmo tempo em que o peptídeo alterava sua estrutura, indicando que a porção acídica é responsável pela inibição da lise. Esses resultados permitiram caracterizar o papel do N-terminal da trypsinina no processo de lise, identificar o precursor da trypsinina na glândula salivar, verificar sua ativação durante a salivação e melhor elaborar um mecanismo pelo qual a atividade é controlada durante o armazenamento da proteína nas glândulas salivares.

## SUMMARY

Hematophagous arthropods contain in their saliva a pharmacological cocktail that acts on the hemostatic, inflammatory and immune systems of their hosts facilitating blood acquisition. The saliva of the insect *T. infestans*, vector of Chagas' disease, contains several described molecules and biological activities, among which lies trialysin, a protein that forms pores in lipid bilayers. Trialysin can lyse/permeabilize different cell types and it is proposed that lytic activity is achieved by insertion of the N-terminal portion of the molecule onto a cell membrane forming a pore. The identification of the gene that codes for trialysin has shown that besides a secretion signal sequence, the protein contains an acidic region upstream the mature sequence that is not present in the N-terminus of trialysin purified from saliva and could inhibit the activity of the molecule. Our goal was to study trialysin lytic mechanism and the activation of its precursor (pro-trialysin) from secretion inside the salivary glands to saliva ejection.

To understand trialysin action mechanism, since heterologous expression of either pro-trialysin or trialysin was mostly unsuccessful, we used synthetic peptides based on the N-terminal region of mature trialysin that presented different specificities against *T. cruzi* trypomastigotes, human erythrocytes and *E. coli*, but those that encompassed most of the first predicted amphipathic helix in trialysin were more active. All peptides folded into  $\alpha$ -helices in the presence of membrane mimetic agents. We solved the tridimensional solution structures by Nuclear Magnetic Resonance of the three most active peptides and a less lytic one and observed that distinct regions of some peptides determine target specificity.

Using an anti-serum against the recombinant C-terminal portion of trialysin (non-lytic fragment), we identified pro-trialysin in salivary glands extracts containing APMSF, inhibitor of trialysin activation. The lytic activity of the precursor against trypomastigotes is reduced.

Although it was predicted that the precursor would contain a pro-region 33-amino acids long, the difference between the SDS-PAGE trialysin and pro-trialysin bands was around 10-15 residues. Using a fluorescence resonance emission transfer peptide encompassing 12 pro-region amino acids and 27 mature N-terminal residues, after incubation with triapsin or endoproteinase Arg-C, an increase in lytic activity was observed. At the same time, the peptide changed its structure indicating this region can impair lysis inside salivary glands. These results allowed us to characterize the role of trialysin N-terminus in the lysis process, identify the trialysin precursor in the salivary gland, and determine the mechanism of activation and lysis control during storage and saliva release.

# INTRODUÇÃO

## 1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo sua transmissão ao homem realizada por insetos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae), conhecidos popularmente como barbeiros (Chagas, 1909). As formas tripomastigotas sangüíneas presentes no hospedeiro vertebrado são sugadas durante o repasto sangüíneo do barbeiro. Essas formas, não-replicativas, diferenciam-se nas formas replicativas epimastigotas no trato digestivo do inseto e, ao atingirem a ampola retal, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, não-replicativos e infectivos aos hospedeiros mamíferos. A infecção pode se dar pelo contato das formas metacíclicas com a lesão provocada pela picada ou com mucosas. Dentro do hospedeiro vertebrado, o parasita infecta diferentes tipos celulares e, intracelularmente, diferencia-se em amastigotas, formas replicativas, que por fim diferenciam-se nos tripomastigotas sangüíneos, que continuam o ciclo, infectando outras células ou barbeiros (figura 1).

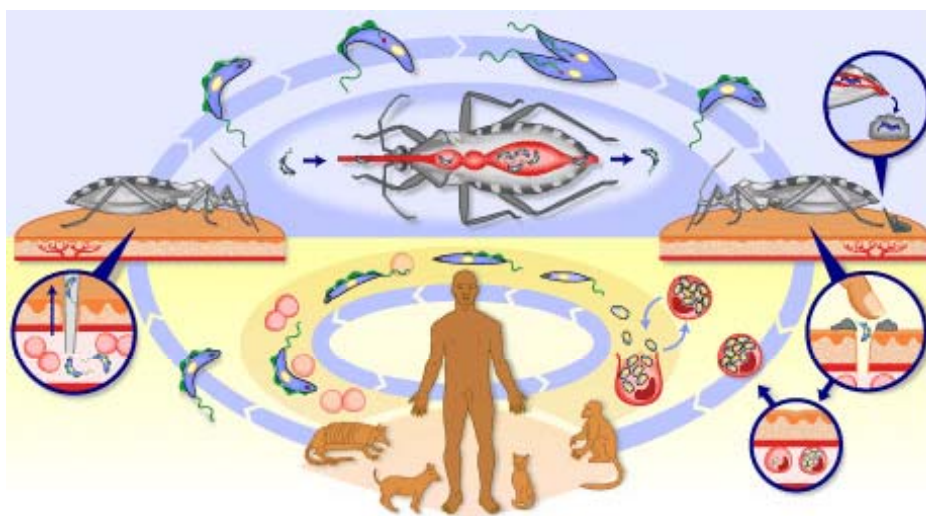


Figura 1 - Ciclo da doença de Chagas. Retirado de WHO 2004 (WHO Expert Committee, 2002).



A doença se manifesta clinicamente em duas fases: aguda, que se inicia com a infecção, apenas reconhecida em 1 a 2 % dos infectados e crônica, que persiste por décadas, com baixa parasitemia e alterações em órgãos como coração, cólon, esôfago e sistema nervoso autônomo. No último relatório da Organização Mundial da Saúde, de 2002, calculou-se que cerca de 17,4 milhões de pessoas encontram-se infectadas e quase 93 milhões sob risco de infecção (WHO Expert Committee, 2002).

## 2. Os triatomíneos

Dentro da ordem Hemiptera, família Reduviidae, a sub-família Triatominae reúne insetos exclusivamente hematófagos dos quais cerca de 50% são capazes de transmitir o *T. cruzi* para vertebrados (Monteiro et al., 2001). As 130 espécies dessa sub-família estão distribuídas em 5 tribos, sendo de duas delas os representantes mais estudados dada sua importância médica como vetores da Doença de Chagas, sua ampla distribuição e capacidade de conviver com humanos, o *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* (tribo Triatomini) e o *Rhodnius prolixus* (tribo Rhodniini) (Schofield, 2000).

A distribuição geográfica de *Rhodnius* é bastante diferente da de *Triatoma*: *R. prolixus* é encontrado na região Amazônica, Venezuela, Colômbia e América Central enquanto *T. infestans*, do nordeste do Brasil até o sul do continente Sul Americano (figura 2). As espécies de *Rhodnius* são consideradas derivadas de populações arborícolas, dadas suas adaptações para escalada e o hábito de colar os ovos a substratos, assim como infestação de ninhos de pássaros e mamíferos em palmeiras e bromeliáceas. Diferentemente, os *Triatoma* infestam ninhos de animais terrestres, covas e sob pedras, pondo ovos espalhados no solo (Schofield, 1988).



Figura 2 – Distribuição de espécies de *Triatoma* na América. Regiões pretas: *R. prolixus*, regiões hachuradas, *T. infestans*. Modificado de (World Health Organization e Center for International Earth Science Information Network, 1989).

O surgimento do hábito hematofágico em Triatominae é tido como recente, derivado de reduvídeos predadores, com a intensificação da sua interação com mamíferos e aves em seus ninhos (Schofield, 2000). Assim, diversas adaptações ocorreram, entre elas a suavização das peças bucais (perfuração da epiderme vertebrada em contraposição ao exoesqueleto das presas invertebradas), alteração da fisiologia digestiva (fatores hemolíticos, detoxificação do heme sangüíneo, secreção de catepsinas, etc.) (Terra, 1988; Oliveira et al., 1999; Azambuja et al., 1983) e da função e constituição salivar (Ribeiro e Garcia, 1981b).

Ao se alimentar, o barbeiro insere sua mandíbula na epiderme do hospedeiro e na derme, sua maxila busca o sangue contido em um vaso, e não em hemorragias provocadas na rede capilar como na alimentação de *Diptera* (Lavoipierre et al., 1959; Ribeiro, 1995) (figura 3A). Na primeira etapa, de sondagem, a maxila se movimenta aleatoriamente na procura de um vaso, concomitantemente liberando saliva; segue-se então a fase de experimentação, em que o inseto prova o líquido circundante e por fim, na sucção, quando um vaso é encontrado,

o sangue é bombeado para o intestino anterior do inseto. Recentemente, viu-se que *R. prolixus* libera saliva em todas essas fases, inclusive na sucção, em que o bombeamento é interrompido pela liberação de pequenos bolos salivares (Soares et al., 2006). Isto é possível graças à separação dos canais salivar e alimentar por toda a maxila desses insetos (figura 3B) (Lavoipierre et al., 1959).

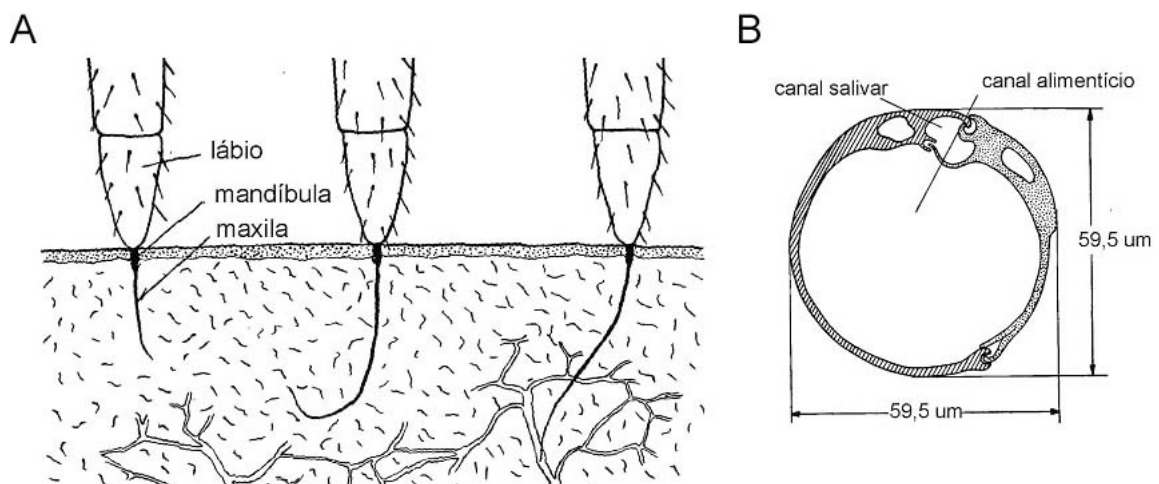


Figura 3 – A picada do triatomíneo. A, o inseto insere na epiderme sua mandíbula e na derme a maxila movimenta-se à procura de um vaso. B, corte transversal da maxila de *T. infestans*. Modificado de (Lavoipierre et al., 1959).

A saliva então se torna uma ferramenta essencial à manutenção do hábito hematofágico. Da constituição tóxica necessária à predação (neurotoxinas, proteases digestivas), a saliva torna-se uma forma de contornar o sistema homeostático do hospedeiro (agregação plaquetária, coagulação sangüínea, resposta do vaso, inflamação), que visa a contenção da perda sangüínea, e a percepção da picada (Ribeiro, 1995).

### 3. A saliva dos triatomíneos

Em 1995, numa estimativa de Ribeiro (Ribeiro, 1995), dentre mais de 14.000 espécies de artrópodos hematófagos, já haviam sido descritos e minimamente caracterizados cinética ou molecularmente, 12 vasodilatadores, 21 anti-agregantes plaquetários e 6 anticoagulantes. Hoje, com o avanço das técnicas de biologia molecular e proteômica, a descoberta de novas moléculas salivares com potencial farmacológico tem aumentado, apresentando-se um painel bastante diversificado das ferramentas empregadas por esses animais (Ribeiro e Francischetti, 2003).

Muitos hematófagos apresentam anticoagulantes, que atuam principalmente sobre a trombina. A etapa final da coagulação é a formação da rede de fibrina, a partir da clivagem proteolítica do fibrinogênio plasmático pela trombina. A ativação da trombina pode ocorrer por duas vias, extrínseca e intrínseca. A primeira é ativada pelo fator tecidual (III), enquanto a intrínseca é desencadeada após exposição de superfícies de contato negativamente carregadas como colágeno e a membrana basal, ambas levando à clivagem do fator X, culminando na ativação da trombina (Mann et al., 1990). Em vênulas e arteríolas, o principal componente da hemostasia é a agregação plaquetária (Ribeiro e Garcia, 1981a). Após rompimento do vaso e exposição de estruturas subendoteliais, as plaquetas aderem-se a elas, ativam-se e geram tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), liberando ADP, ATP e serotonina, entre outros fatores. Serotonina e TXA<sub>2</sub> atuam no músculo liso, causando vasoconstrição. Outro componente da homeostase, a inflamação, é mediado por diversas substâncias, participantes de outros sistemas como o das cininas, complemento, radicais de oxigênio, etc, além de componentes celulares.

### 3.1. A saliva de *Rhodnius prolixus*

*R. prolixus* expressa em suas glândulas salivares uma grande quantidade de proteínas da família das lipocalinas (Ribeiro et al., 2004). Essa família estrutural cujos membros

encontram-se envolvidos nos mais diversos processos biológicos, tem a característica de formar um barril- $\beta$ ; um bolso hidrofóbico no centro da estrutura serve de sítio de ligação a pequenas moléculas, principalmente hidrofóbicas (Flower, 1996). As lipocalinas de *R. prolixus* podem ser agrupadas em dois grupos, dependendo dos ligantes e suas funções desempenhadas: 1) nitroforinas: NP1-4 e NP7, inicialmente purificadas das glândulas salivares de *Rhodnius*, há pouco tempo, com o chamado sialoma, utilizando técnicas de HPLC, degradação de Edman e seqüenciamento de bibliotecas de cDNA, descobriu-se uma grande quantidade de transcritos de nitroforinas. Essas contêm uma molécula de heme cujo íon férrico ( $Fe^{3+}$ ) liga-se ao óxido nítrico (NO) no lúmen das glândulas salivares, de pH  $\sim 5,0$ . No momento da picada, o complexo nitroforina-NO é dissociado pela diferença de pH e o NO atua na musculatura do vaso, relaxando-a. Sem NO, as nitroforinas captam a histamina liberada por mastócitos, inibindo a inflamação (Montfort et al., 2000). A NP2 (também conhecida como prolixina-S) ainda possui atividade anticoagulante, inibindo a ativação do fator Xa, ligando-se ao fator IX e IXa, na via intrínseca (Zhang et al., 1998; Gudderra et al., 2005). Já a recém descrita NP7, também anticoagulante, liga-se com alta afinidade a membranas contendo fosfatidilserina, possivelmente impedindo a ligação do complexo pró-trombinase a superfícies lipídicas (Andersen et al., 2004). Além disso, uma outra lipocalina, ligadora de aminas biogênicas (norepinefrina, epinefrina e serotonina), 23% similar à NP2, porém incapaz de ligar heme, foi descrita como anti-agregante plaquetária e vasodilatadora e possivelmente anti-inflamatória (Andersen et al., 2003). 2) RPAIs: acrônimo de *Rhodnius Platelet Aggregation Inhibitors*, as RPAIs são lipocalinas semelhantes à triabina, pallidipina e procalina dos barbeiros *Triatoma pallidipennis* e *Triatoma protracta* (inibidores de trombina, agregação plaquetária mediada por colágeno e ADP e alérgeno, respectivamente). As RPAIs já caracterizadas, RPAI 1-3, ligam-se fortemente a nucleotídeos de adenosina (ADP), impedindo a agregação plaquetária mediada por colágeno (Montfort et al., 2000; Francischetti

et al., 2002). Uma apirase, 5'-nucleotidase capaz de hidrolisar ADP em AMP, impedindo agregação plaquetária (Sarkis et al., 1986) completa a lista de fatores descritos na saliva de *R. prolixus*. Outras possíveis proteínas encontradas como transcritos no sialoma podem completar o quadro, por exemplo, proteínas ligadoras de derivados do ácido aracdônico, uma possível lectina e mucina (Ribeiro et al., 2004). Além de proteínas, há lipídeos na saliva, inclusive lisofosfatidilcolina, em concentrações capazes de inibir agregação plaquetária e aumentar a produção de óxido nítrico em células endoteliais (Golodne et al., 2003).

### 3.2. Glândulas salivares e saliva de *Triatoma infestans*

Em 1954, foi detalhadamente descrita a anatomia do complexo de glândulas salivares de *T. infestans* acrescida de uma breve avaliação das atividades biológicas de seus conteúdos luminares (Barth, 1954). Três pares de glândulas são responsáveis pela síntese da saliva (figura 4). Todas elas são formadas por uma monocamada de células secretoras, envoltas por uma lâmina basal, músculos e traquéolas. Na glândula D1, a secreção foi nomeada do tipo merócrina (secreção de vesículas citoplasmáticas), na D2, apomerócrina (variando entre merócrina e apócrina) e na D3, apócrina (secreção passiva do conteúdo citoplasmático) (figura 5). No conteúdo da D1, descreveu-se uma atividade anticoagulante e proteolítica (originalmente "destrói a hemoglobina"), na D2, uma hemolítica e a D3, considerada como fonte do veículo para os conteúdos de D1 e D2. Em recente trabalho, as glândulas salivares de *T. infestans* foram analisadas morfológicamente e citoquimicamente por microscopias eletrônicas de transmissão e varredura (Reis et al., 2003). Viu-se uma grande quantidade de microvilos em todas as três glândulas. Secreções ricas em lipídeos são encontradas em D1 e aparentemente em maior quantidade na D2, onde a coloração intensa é observada em vesículas claramente liberadas do citoplasma. As vilosidades são sugestivas da secreção

classicamente conhecida como merócrina (diferentemente da designação de Barth, acima), na qual o conteúdo citoplasmático é exocitado passivamente, sem liberação de vesículas. A secreção de grandes corpúsculos encontrados no lúmen contendo vesículas citoplasmáticas, classicamente designada de apócrina, é observada em D1 e em maior escala em D2.

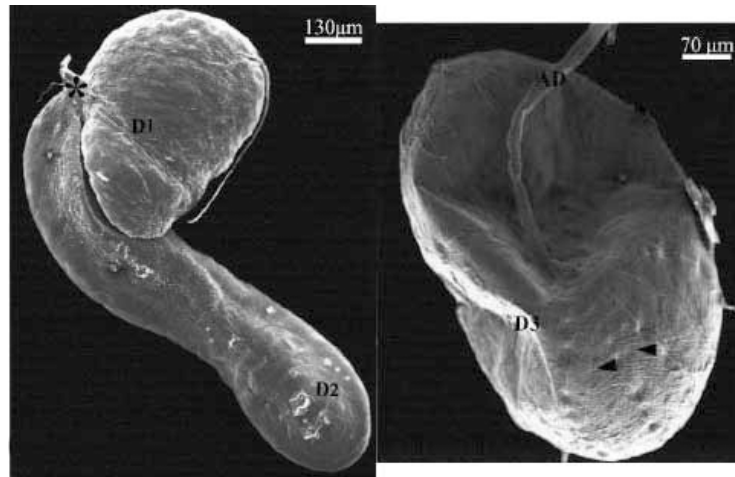


Figura 4 – Glândulas salivares de *T. infestans*. Micrografia eletrônica de varredura das glândulas D1 e D2 (painel esquerdo, indicadas) e D3 (painel direito). O hilo está indicado por \*, ducto acessório por AD e fibras musculares, cabeças de seta. Retirado de (Reis et al., 2003).

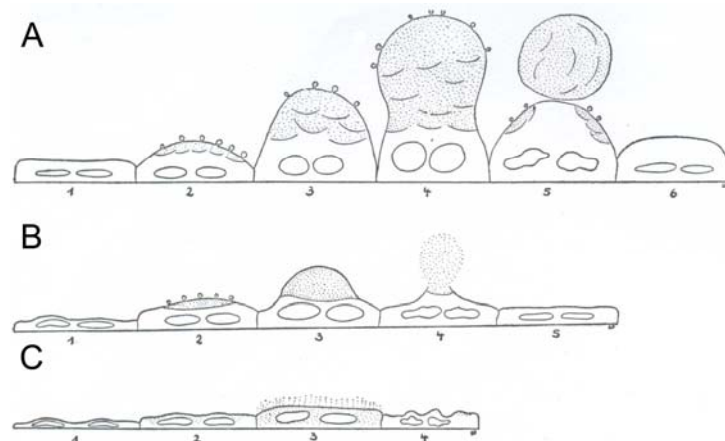


Figura 5 – Esquema da secreção do epitélio glandular de *T. infestans*. A numeração crescente indica as células nos diferentes estágios encontrados a partir do dito repouso (1), até a secreção final do maior volume de saliva (5 em A, 4 em B e 3 em C). A, D1; B, D2; C, D3. Retirado de (Barth, 1954).

Décadas depois de Barth, com maior detalhamento bioquímico, a atividade anticoagulante foi atribuída a dois componentes: um inibidor da via intrínseca e outro da via comum da coagulação (Pereira et al., 1996). A atividade proteolítica é devida à presença de diferentes enzimas, aparentemente representando uma cascata de ativação nas glândulas salivares de *T. infestans*, sendo a protease majoritária purificada e denominada de triapsina (Amino et al., 2001). A triapsina é semelhante à tripsina, com especificidade para clivagem em resíduos de arginina e sua forma precursora parece ser clivada por uma aspartil-protease, visto que pepstatina A, inibidor dessa classe de proteases, impede a ativação da triapsina. A atividade hemolítica, sobre a qual esta tese versa, será abordada adiante. Além disso, na glândula D2, foi caracterizada uma sialidase com especificidade para ácidos siálicos  $\alpha(2-3)$  ligados, possivelmente originária de um vírus por transferência horizontal. A sialidase, como as proteases, é liberada na saliva no momento da picada. Essa sialidase poderia atuar impedindo a inflamação no sítio da picada, inibindo a degranulação de mastócitos e/ou impedindo a ancoragem (*homing*) de leucócitos pela dessialilação do antígeno de Lewis, que medeia a ancoragem às selectinas do endotélio ativado (Amino et al., 1998).

Uma atividade anestésica, inibidora de canal de  $\text{Na}^+$ , também foi encontrada na saliva desses insetos, impedindo a propagação do sinal doloroso na picada. Com essa atividade, o *T. infestans* diminui a percepção da dor do hospedeiro, podendo representar um dos fatores contribuintes para o sucesso do inseto na aquisição de sangue, visto que o volume de sangue ingerido é inversamente proporcional à irritação causada no momento da picada (Dan et al., 1999).

O *T. infestans* também conta com atividade anti-agregante plaquetária devido à ação de apirases secretadas na saliva (Faudry et al., 2004). Porém, este conta com cinco moléculas distintas, pertencentes à família das 5'-nucleotidases. Recentemente, duas proteínas inibidoras da agregação plaquetária induzida por colágeno, semelhantes à pallidipina foram



caracterizadas e denominadas triplatina-1 e -2. Diferentemente das RPAIs de *R. prolixus*, elas não inibem a agregação plaquetária induzida por ADP (Morita et al., 2006).

Quanto à atividade hemolítica descrita por Barth em 1954 (Barth, 1954), essa foi comprovada por Gregório e Ratcliffe em 1999 que também observaram uma atividade lítica contra *Trypanosoma rangeli*, protozoário não patogênico ao homem (Gregorio e Ratcliffe, 1991). *R. prolixus* não apresenta atividade semelhante em suas glândulas salivares, mas sim em seu intestino anterior (Azambuja et al., 1983). A molécula lítica foi identificada e caracterizada em nosso laboratório, sendo batizada de trialisina. Toda esta tese trata da caracterização dessa proteína formadora de poros em bicamadas lipídicas.

#### 4. Polipeptídeos líticos de membranas

Como dito acima, a trialisina de *T. infestans* possui semelhanças com proteínas formadoras de poros e peptídeos antimicrobianos. Na natureza, essas moléculas apresentam papéis predominantemente defensivos ou ofensivos. Por exemplo, na imunidade inata de diferentes organismos pluricelulares, após um desafio à homeostasia, diversos peptídeos antimicrobianos são sintetizados e secretados a fim de impedir uma infecção massiva (Boman et al., 1991; Hoffmann et al., 1993; Hancock e Lehrer, 1998; Lehrer e Ganz, 1999). Esses peptídeos constituem o coquetel venenoso de diferentes animais e são expressos em bactérias como uma forma de manutenção/conquista do nicho ecológico ou fatores de patogenicidade (Bernheimer e Rudy, 1986; Kuhn-Nentwig, 2003; Cheigh e Pyun, 2005).

##### 4.1. Citolisinas formadoras de poros

O modo de ação das proteínas bacterianas é bastante estudado na literatura, havendo muitas com estrutura cristalográfica determinada. Há duas classes dessas proteínas, de acordo com as estruturas constituindo seus poros:  $\alpha$ -toxinas e  $\beta$ -toxinas formadas predominantemente por  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  transmembrânicas, respectivamente (Gilbert, 2002). A família das citolisinas ativadas por tiol, ou citolisinas dependentes de colesterol, (CDCs) compreende diversas exotoxinas bacterianas como a pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, a estreptolisina O de *Streptococcus* spp. e a perfringolisina O de *Clostridium perfringens*, entre diversas outras. Essas moléculas inserem-se em membranas contendo colesterol e oligomerizam, formando poros de até 30 nm, contendo de 30 a 80 monômeros (Palmer, 2001; Billington et al., 2000; Tweten, 2005; Gilbert, 2005). No caso da intermedilisina, o receptor é a proteína ancorada por glicosil-fosfatidilinositol (GPI), CD59, um inibidor da formação do complexo de ataque à membrana do sistema do complemento (Giddings et al., 2003). Após contato de uma região de 11 resíduos de aminoácidos das CDCs com colesterol, as proteínas difundem lateralmente na membrana iniciando a oligomerização em um pré-poro (Hotze et al., 2001; Shepard et al., 2000). O pré-poro então sofre uma alteração conformacional em que duas  $\alpha$ -hélices tornam-se dois grampos- $\beta$  anfipáticos, que formam a parede do poro transmembrânico, um barril- $\beta$  (Shatursky et al., 1999) (figura 6).

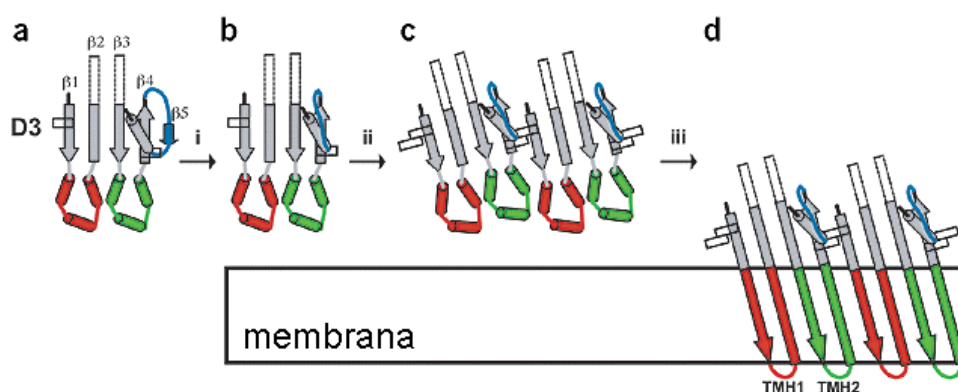


Figura 6 – Esquema da formação de poros de citolisinas dependentes de colesterol. Exemplo da perfringolisina O (PFO). Em i, PFO se liga à membrana através do domínio D4 (não mostrado), oligomeriza (ii)

e se insere na membrana (iii) alterando a conformação das hélices em grampos transmembrânicos (TMH). Retirado de (Ramachandran et al., 2004).

A  $\alpha$ -hemolisina de *Staphylococcus aureus* é o protótipo de uma subclasse de  $\beta$ -citolisinas da qual também fazem parte o antígeno protetor de *Bacillus anthracis*, a  $\beta$ -toxina de *Clostridium perfringens*, leucocidinas e  $\gamma$ -hemolisinas. Elas são secretadas como monômeros ou dois componentes monoméricos distintos que oligomerizam na membrana, sem nenhum receptor específico identificado até o momento. Elas formam um barril- $\beta$  hexa, hepta (a forma do poro cristalizada e de estrutura resolvida) ou octamérico (Gouaux et al., 1994; Song et al., 1996; Steinthorsdottir et al., 2000; Menestrina et al., 2001; Menestrina et al., 2003).

Aerolisina, de *Aeromonas* spp. é secretada em sua forma precursora inativa, pró-aerolisina, que necessita ser processada por proteases da célula-alvo como por exemplo a furina (Abrami et al., 1998b; Abrami et al., 1998a). A ligação à membrana é via âncoras de GPI na membrana e, após processamento, moléculas de aerolisina heptamerizam e então inserem-se na membrana formando um barril- $\beta$  semelhante à  $\alpha$ -hemolisina de *S. aureus* (Abrami et al., 1998b; Wilmsen et al., 1992). Entretanto, ainda não se sabe como a proteína ganha acesso ao *core* sacarídico da âncora, havendo sugestões de que a interação seja inicialmente dependente de oligossacarídeos N-ligados no glicocálice das células, além do fato de que, em eritrócitos, a ligação é através da glicoforina (Rossjohn et al., 1998; Abrami et al., 2000; Abrami et al., 2003). Embora experimentos *in vitro* mostrem que o poro permite o vazamento de moléculas grandes como glucagon (Howard e Buckley, 1982), *in vivo*, o poro apenas permite o fluxo de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  (Abrami et al., 1998b). Intracelularmente, há liberação de  $Ca^{2+}$  e vacuolização não-apoptótica do retículo endoplasmático, ativação de proteína G e produção de inositol (1, 4, 5)-trifosfato (Krause et al., 1998; Abrami et al., 1998b).

As  $\alpha$ -toxinas são bem menos caracterizadas estruturalmente do que as  $\beta$ -toxinas (Gilbert, 2002). A hemolisina E de *E. coli* forma oligômeros de 8 unidades, com 4  $\alpha$ -hélices constituindo o poro (Tzokov et al., 2006; Wallace et al., 2000; Atkins et al., 2000) (figura 7). A família das toxinas bacterianas AB<sub>5</sub> é formada por várias proteínas de alta homologia estrutural, envolvidas na patogênese de doenças: toxina colérica, shiga-toxina, enterotoxinas de *E. coli* termolábeis e do tipo shiga e toxina pertussis. Essas são constituídas por cinco monômeros que se ligam às membranas por oligossacarídeos e uma última subunidade diferente, catalítica, com a atividade tóxica (por exemplo, ativação de proteína G<sub>s $\alpha$</sub>  ativando uma adenilato-ciclase, seguida de abertura de canais de cloreto e inibição da tradução), que não apresenta atividade lítica (Lencer e Saslowsky, 2005). As colicinas são proteínas formadoras de canais dependentes de voltagem na membrana plasmática de *E. coli*. Elas têm três domínios: de ligação ao receptor, de translocação e de formação do canal. Ao se ligar a porinas da membrana externa, segue-se sua translocação através das mesmas para o espaço periplasmático e formação do canal na membrana interna, citoplasmática (Stroud et al., 1998; Zakharov e Cramer, 2002).

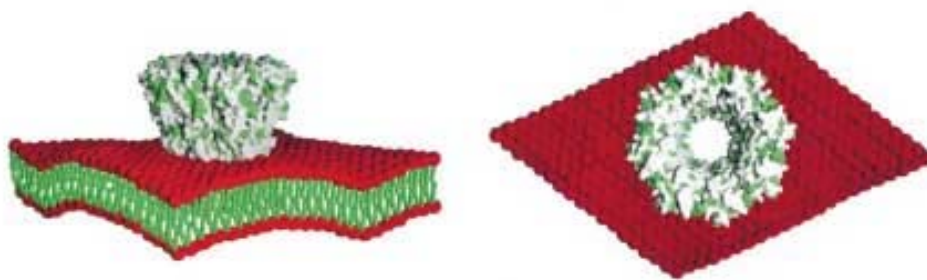


Figura 7 – Modelo da hemolisina E de *E. coli*. Duas visões do modelo cristalográfico do octâmero de hemolisinas E foi inserido num esquema de uma bicamada lipídica: em vermelho, cabeças polares e verde, cadeias apolares lipídicas. Retirado de (Wallace et al., 2000).

#### 4.2. Peptídeos antimicrobianos e citolíticos

Já os peptídeos líticos que participam da imunidade inata geralmente são expressos após um trauma ou infecção (Boman et al., 1991; Lehrer e Ganz, 1999; Hancock e Lehrer, 1998). Hoje, uma variedade imensa de peptídeos antimicrobianos é descrita, nos mais distintos organismos (Boman, 2003). Para fins didáticos, serão descritos e discutidos aqui apenas os peptídeos clássicos, de estrutura de  $\alpha$ -hélice e folhas- $\beta$ , tidos como modelos de antimicrobianos.

Muito se tem discutido sobre os mecanismos de ação tóxica dessas moléculas; sabe-se que anfipaticidade é a característica fundamental que os permite interagir com membranas. A grande maioria dos peptídeos é catiônica, havendo alguns poucos membros ácidos, algumas vezes resultantes da clivagem de algumas proteínas, como o caso das pró-regiões de zimogênios que após processamento apresentam atividade antimicrobiana (Brogden et al., 1997).

O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos e citolíticos envolve inicialmente a ligação à superfície celular, seja à parede celular ou ao glicocálice, antes de efetivamente encontrar a membrana plasmática. Alguns estudos mostram que as moléculas se dispõem paralelamente ao plano da membrana (efeito tapete), ligando-se aos lipídeos negativamente carregados e permeabilizando a membrana (Steiner et al., 1988; Gazit et al., 1995), enquanto outros mostram uma inserção transmembrânica das moléculas (Mchaourab et al., 1993). Acredita-se que a interação da molécula paralelamente ao plano da membrana seja uma primeira etapa na permeabilização, seguida por um aprofundamento dela na bicamada e finalmente uma inserção acompanhada de oligomerização (Silvestro e Axelsen, 2000). Assim, hoje, são postulados dois mecanismos distintos de inserção à membrana, de acordo com as interações do peptídeo com ela e sua orientação: o mecanismo do tipo tapete e o do barril (Shai, 1999; Brogden, 2005). No primeiro, os peptídeos atacam na membrana, interagindo

com as cabeças polares de fosfolípidos. Então podem ou exercer uma permeabilização geral da membrana, micelizando-a e destruindo-a como um detergente ou, ainda interagindo com as cabeças polares lipídicas, formar poros chamados toroidais, em que a membrana é curvada na periferia do poro. No tipo barril, os resíduos hidrofóbicos do peptídeo entram em contato com a fase hidrofóbica da membrana, particularmente com as cadeias acila dos lípidos, formando poros (figura 8).

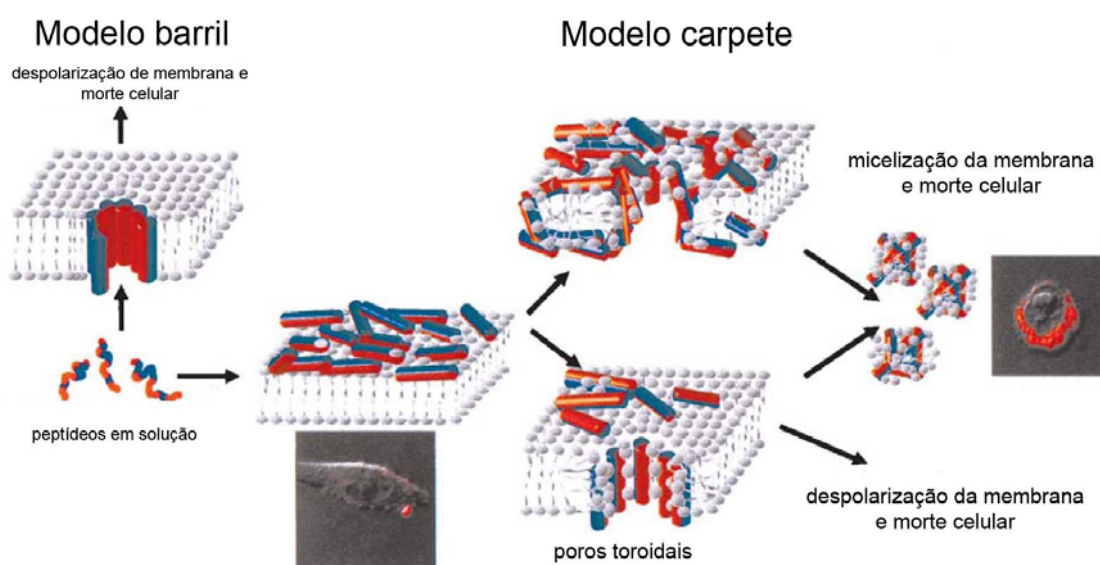


Figura 8 – Esquema representando os modelos de ação de peptídeos antimicrobianos. Retirado de (Papo e Shai, 2005).

As cecropinas foram os primeiros antimicrobianos isolados da hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia* após infecção bacteriana (Steiner et al., 1981). Seu espectro de ação cobre bactérias Gram positivas e negativas e a lise ocorre por formação de poros na membrana (Christensen et al., 1988; Boman e Steiner, 1981). As cecropinas têm sido encontradas constituindo a imunidade de outros insetos como *Drosophila* e *Aedes* (Imler e Bulet, 2005; Lowenberger et al., 1999). Outras moléculas do tipo-cecropina têm sido descobertas, como as sarcotoxinas (Okada e Natori, 1985), moricinas (Hara e Yamakawa, 1995) e também foi descrita uma molécula tipo-cecropina produzida pela bactéria

*Helicobacter pylori* com ação pró-inflamatória contribuindo para disfunção linfocitária e desenvolvimento de gastrite crônica (Betten et al., 2001). Em solução aquosa, as cecropinas assumem uma conformação não estruturada, porém, em soluções mistas (orgânicas/parcialmente orgânicas) há a formação de  $\alpha$ -hélices: no caso da cecropina A, duas porções helicoidais (Holak et al., 1988).

Magaininas são peptídeos líticos de  $\alpha$ -hélice isolados da secreção epitelial do sapo *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987) que possuem atividade antimicrobiana e anti-tumoral (Cruciani et al., 1991; Baker et al., 1993). A magainina se liga preferencialmente a membranas contendo lipídeos acídicos como fosfatidilglicerol (abundantes em membranas bacterianas) (Op den Kamp, 1979; Cronan, 2003). Inicialmente (ou em baixa razão peptídeo/lipídeo) o eixo longitudinal da magainina posiciona-se paralelamente ao plano de membrana, pouco se aprofundando na monocamada externa. Essa situação, quando acompanhada de um aumento na razão peptídeo/lipídeo, força uma reorganização da membrana, levando os peptídeos a se situar perpendicularmente a essa, porém mantendo contato com as cabeças polares dos lipídios, formando o poro, multimérico, do tipo toroidal (Zhao et al., 2001). O mesmo mecanismo parece se aplicar para a melittina, presente no veneno da abelha *Apis mellifera*, porém, sua ação em lipídeos zwitteriônicos como fosfatidilcolina (presentes em membranas de células de mamíferos) (Matsuzaki, 2001) é semelhante ao das magaininas, enquanto em lipídeos acídicos ela é tipo-detergente (Ladokhin e White, 2001; Yang et al., 2001).

Os maiores exemplos da classe de peptídeos antimicrobianos do tipo  $\beta$  são as defensinas, que são peptídeos líticos encontrados em vertebrados, invertebrados e plantas cuja formação de poro baseia-se em estruturas de folhas- $\beta$  estabilizadas por 3 pontes dissulfeto intramoleculares (Clarke e Campopiano, 2006). Elas são encontradas em grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e macrófagos, células epiteliais de mamíferos e hemolinfa de

artrópodos após infecção bacteriana, além de sementes de mono e dicotiledôneas (Kagan et al., 1990; Hancock e Lehrer, 1998; Lehrer e Ganz, 1999; Bulet et al., 1999).

A idéia de se utilizar esses peptídeos na prática clínica é crescente, visto que gerar resistência contra moléculas que atuam sobre a membrana plasmática é bastante difícil para qualquer organismo. Além disso, tem-se cogitado seu uso quimioterápico em câncer (Papo e Shai, 2005). Embora exista resistência à ação de peptídeos antimicrobianos (Peschel, 2002), a diversidade e facilidade de se modular a atividade dessas moléculas tornam seu uso bastante promissor, com alguns peptídeos já em ensaios clínicos de fase III (Zasloff, 2002).

Tem ganhado espaço na literatura a idéia de que a toxicidade de peptídeos ativos em membranas deve-se não apenas à lise celular e sim por distúrbios intracelulares como, por exemplo, inibição de síntese da parede celular, metabolismo de DNA, RNA e tradução (Brogden, 2005). Sendo em sua maior parte peptídeos catiônicos, não é surpreendente a capacidade desses em se ligar a moléculas poli-aniônicas como proteoglicanos, DNA e RNA, por vezes encontrados no citoplasma ao invés de associados à membrana plasmática (Sandgren et al., 2004; Park et al., 1998; Haukland et al., 2001).



## OBJETIVOS

A trialisina mostra-se como um modelo bastante interessante, tanto do ponto de vista estrutural, pelo fato da molécula ser única, quanto do aspecto de mecanismo de ação, reunindo características de peptídeos antimicrobianos e proteínas formadoras de poros e também quanto à sua função nas glândulas salivares de *T. infestans* e no momento da picada, no hospedeiro vertebrado.

Dessa forma, nesta tese nos propusemos a:

- compreender o mecanismo da lise provocada pela trialisina em detalhes estruturais usando como modelos peptídeos sintéticos baseados no N-terminal da molécula madura.
- analisar o controle da atividade lítica pela pró-região e ativação da pró-trialisina.

## **Capítulo 1: Purificação, clonagem e caracterização da trialisina.**

Artigo: Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects  
activated by limited proteolysis

Rogério Amino, Rafael M. Martins, Joaquim Procopio, Izaura Yoshico Hirata, Maria  
Aparecida Juliano e Sergio Schenkman

The Journal of Biological Chemistry 2002, Vol. 277 (8) 6207-6213

Desde 1954 é conhecida a existência da atividade citolítica da saliva de *T. infestans* porém nenhuma análise bioquímica havia sido realizada. Neste artigo, realizado durante minha iniciação científica e adicionado à tese por fundamentar todo o trabalho posterior, purificamos e caracterizamos a molécula responsável pela lise celular da saliva, batizada de trialisina.

A trialisina foi purificada da saliva de *T. infestans* e além de lisar tripomastigotas de *T. cruzi*, permeabilizava células eucarióticas. Em ensaios de formação de condutância em bicamada lipídica plana, a molécula purificada apresentou atividade formadora de poros dependentes de voltagem. O N-terminal da proteína foi obtido por degradação de Edman e baseados nessa seqüência, desenhamos um oligonucleotídeo degenerado para clonarmos o cDNA correspondente utilizando uma biblioteca de glândulas salivares do barbeiro. Amplificamos o cDNA da trialisina por PCR e a seqüência obtida mostrou uma proteína predizendo ~22 kDa cujo N-terminal formaria duas  $\alpha$ -hélices anfipáticas catiônicas, características de peptídeos antimicrobianos. Um peptídeo sintético abrangendo a primeira das hélices preditas apresentou atividade lítica e permeabilizante porém menor que a da trialisina.

Utilizando um oligonucleotídeo baseado no C-terminal da trialisina, amplificamos o cDNA inteiro da molécula por PCR. A seqüência da pró-trialisina apresentava uma região ausente na molécula madura apresentando um peptídeo sinal seguido por 33 resíduos de aminoácidos contendo 45,5% de aminoácidos acídicos. Além disso, o processamento ocorre em um resíduo de arginina, sugerindo que a protease salivar triapsina seria a responsável pela ativação da trialisina. Realizando homogenatos de glândulas salivares na presença de APMSF, inibidor da triapsina, observamos redução da atividade lítica contra tripomastigotas, o que nos levou a propor o modelo mostrado na figura 8 do artigo. A trialisina é sintetizada na forma precursora, na qual a pró-região acídica impede a atividade lítica interagindo com o N-

terminal básico. No momento da picada, há o processamento pela triapsina, permitindo que o N-terminal lítico interaja com bicamadas lipídicas formando poros dependentes de voltagem.

Devido a sua atividade, a trialisina pode ter papel na manutenção da higiene das glândulas salivares, uma vez que as glândulas salivares de insetos hematófagos infectadas por vírus (Grimstad et al., 1980), *Plasmodium* (Wekesa et al., 1992; Rossignol et al., 1984) ou *Trypanosoma rangeli* (Garcia et al., 1994) têm redução dos fatores anti-hemostáticos na saliva, tornando maior a frequência de picadas, aumentando a quantidade de saliva injetada e aumentando a probabilidade de transmissão desses patógenos. O papel nutricional da trialisina pode ser descartado uma vez que hemácias são mantidas intactas no estômago de *T. infestans* por um longo período de tempo, sendo rompidas apenas no intestino posterior. Além disso, sua capacidade de permeabilizar hemácias é menor do que outras células.

# Trialysin, a Novel Pore-forming Protein from Saliva of Hematophagous Insects Activated by Limited Proteolysis\*

Received for publication, October 12, 2001, and in revised form, December 2, 2001  
Published, JBC Papers in Press, December 19, 2001, DOI 10.1074/jbc.M109874200

Rogério Amino‡, Rafael Miyazawa Martins‡, Joaquim Procópio§, Izaura Yoshico Hirata¶, Maria Aparecida Juliano¶, and Sergio Schenkman‡||

From the ‡Departamento de Microbiologia, Imunologia, e Parasitologia and the ¶Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, S.P. 04023-062 and §Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, S.P. 05508-900, Brazil

We have characterized a pore-forming lytic protein from the saliva of the hematophagous insect *Triatoma infestans*, a vector of Chagas disease. This protein, named trialysin, has 22 kDa and is present in the saliva at about 200 µg/ml. Purified trialysin forms voltage-dependent channels in planar lipid bilayers with conductance of  $880 \pm 40$  pS. It lyses protozoan parasites and bacteria indicating that it has a role in the control of microorganism growth in the salivary glands. At higher concentrations, but below those found in saliva, trialysin can also permeabilize and lyse mammalian cells, suggesting that it might also facilitate insect blood feeding by interfering with the cell response of the host. The translated cDNA sequence of trialysin shows a basic, lysine-rich protein in which the N-terminal region is predicted to form an amphipathic  $\alpha$ -helical structure with positive charges on one side and hydrophobic amino acids on the opposite side. A synthetic peptide corresponding to this cationic amphipathic  $\alpha$ -helix induces protozoan lysis and mammalian cell permeabilization, showing that this region is involved in lytic activity. However, the lytic peptide G6V32 is 10-fold less efficient than trialysin in lysing parasites and 100-fold less efficient in permeabilizing mammalian cells. Trialysin activity is about 10-fold reduced in salivary gland homogenates prepared in the presence of an irreversible serine-protease inhibitor. Since trialysin precursor contains an anionic pro-sequence of 33 amino acids contiguous to the cationic amphipathic putative  $\alpha$ -helix, we propose that removal of the acidic pro-sequence by limited proteolysis activates trialysin by exposing this lytic basic amphipathic motif.

Molecules able to form pores in biological membranes have been evolutionarily selected in prokaryotic and eukaryotic organisms where the balance between permeabilization and lytic effect dictates their functions. Over the last decade, several pore-forming peptides, ranging from 12 to 45 amino acid residues, have been identified in animals and plants (1, 2). Most of

them are part of an innate defense mechanism against microorganisms. Despite differences in the primary and secondary structure ( $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets), they share a highly basic and amphipathic feature with a higher selectivity to lyse bacteria than host cells (3).

Another well studied class of pore-forming molecules includes proteins like bacterial toxins (4, 5), which require oligomerization for pore formation and specific membrane targets such as cholesterol (6), glycosylphosphatidylinositol (7), and integrins (8). Crystallographic data showed that  $\alpha$ -hemolysin from *Staphylococcus aureus* is formed by the oligomerization of 33-kDa monomers in a heptameric  $\beta$ -barrel pore (9). Octameric and pentameric pores were found in HlyE hemolysin of Gram-negative bacteria (10) and in *Vibrio cholerae* cytolysin (11), respectively. In cholesterol-dependent cytolysins produced by more than 20 species of Gram-positive bacteria, the pores can be larger and formed by monomer assembling into rings of 30–50 subunits (12, 13). These cytolysins are bacterial virulence factors, affecting host immune cell function and cytokine induction (14).

Here we describe a new type of pore-forming molecule in the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae), an obligate hematophagous insect that transmits the human pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, through its feces. It is a 22-kDa protein that shares the properties of the two classes of lytic molecules. It possesses a basic amphipathic lytic motif in the N-terminal region containing 27 amino acid residues, similar to antimicrobial lytic peptides, and a protein portion that increases the lytic specificity toward eukaryotic cells such as bacterial toxins. This protein, named trialysin, was purified from the salivary glands of *T. infestans*. It forms negative voltage-dependent pores in planar lipid bilayers and induces lysis of bacteria, *Trypanosoma*, and mammalian cells. In addition, we provide evidence that trialysin is synthesized as a precursor and is processed by limited proteolysis.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

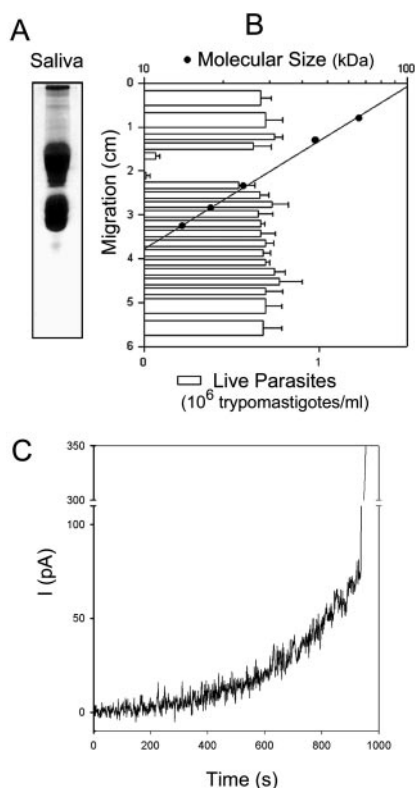
**Insects and Saliva**—*T. infestans* were reared at the Laboratório de Xenodiagnóstico, Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, Brazil, in glass cylinders at 28 °C. The insects fed on ducks between each molt. Male adults were used in this study. One week after feeding, the collector held the insects ventrally and gently blew air at their rostrum to liberate the maxilla with a drop of saliva. This small drop was collected immediately using a glass capillary and stored at –20 °C.

**Lytic and Permeabilization Assays**—The assays were performed with trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain) obtained from an infected tissue culture of LLC-MK<sub>2</sub> cells maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The parasites were collected by centrifugation and resuspended to the indicated concentrations with Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum. After incubation with lytic material, the

\* This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AF427486 and AF427487.

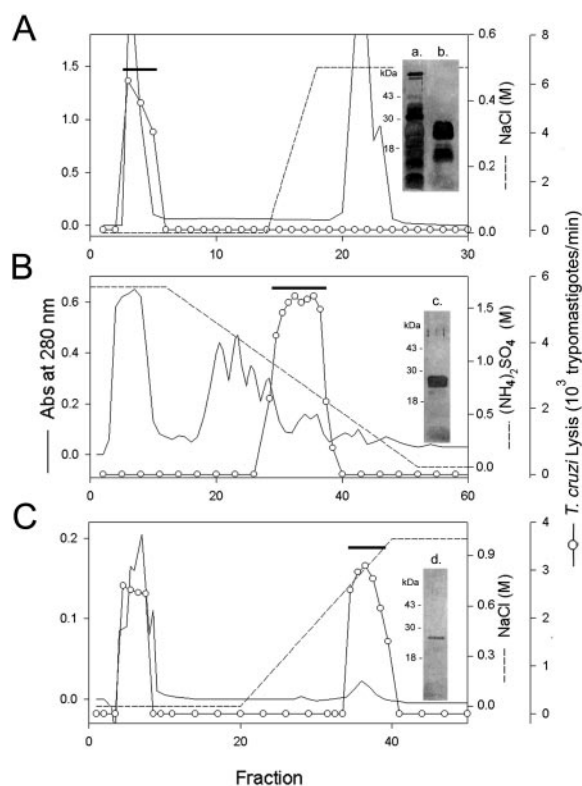
|| To whom correspondence should be addressed: R. Botucatu 862-8ª, EPM-UNIFESP, 04023-062 São Paulo, S.P. Brazil. Tel.: 55-11-55751996; Fax: 55-11-55715877; E-mail: sergio@ecb.epm.br.



**FIG. 1. Detection of a lytic and pore forming activity in insect saliva.** Two aliquots of *T. infestans* saliva were mixed with sample buffer and fractionated by non-reducing 12.5% SDS-PAGE. **A**, the gel containing one sample (1  $\mu$ l of saliva) was stained with Coomassie R-250. **B**, the other piece of gel, containing 2.5  $\mu$ l of saliva, was treated with 15% methanol for 1 h and with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, for another 1 h. The gel was cut into slices that were incubated with  $1 \times 10^6$  *T. cruzi* trypomastigotes/ml in 50  $\mu$ l of Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal bovine serum. The remaining parasites after 105 min at 37 °C were counted in a Neubauer chamber. Means of triplicate measurements  $\pm$  S.D. are shown in the figure. This experiment was repeated twice with similar results. The molecular size standards are as follows: bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa;  $\beta$ -lactoglobulin, 18 kDa; and lysozyme, 14 kDa. **C**, a black planar lipid bilayer (2.5% azolecithin in *n*-decane) was formed in an orifice 1.0 mm in diameter in 5 mM Tris-HCl and 5 mM KCl, pH 7.4, with a  $V_{\text{clamp}} = V_{\text{trans}} = -20$  mV. After base-line stabilization, saliva was diluted about 25,000-fold in the *cis* compartment, and data were recorded.

parasites were placed on ice, and the number of live parasites was counted in a Neubauer chamber using a phase microscope. Hemolysis was determined by hemoglobin release from human erythrocytes by measuring the absorbance at 405 nm after centrifugation. A 100% rate of hemolysis was achieved by treatment with 2% Triton X-100. Bacteriolytic activity was quantified after plating bacteria incubated with the lytic fractions onto LB agar. Permeabilization was detected by incubating bacteria in suspension or mammalian cells attached to glass coverslips with the lytic molecules in the presence of 10  $\mu$ g/ml ethidium bromide. Fluorescence and phase contrast images were acquired with a digital camera (MX12P, Adimec) connected to a fluorescence microscope and processed with Leica Qwin version 2.3 software.

**Purification of Trialysin**—Trialysin was purified by diluting 1 volume of saliva with 2 volumes of MilliQ/H<sub>2</sub>O. A precipitate was formed and removed by centrifugation at  $14,000 \times g$  for 10 min. The supernatant was chromatographed on a 1.0-ml Hitrap Q column (Amersham Biosciences) equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. The unbound material was collected and mixed with 1 volume of 3.4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The sample was further purified through a 1.0-ml phenyl-Superose column equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 1.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The column was eluted with a linear gradient of 20 ml of the above buffer to 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, at 0.5 ml/min. The fractions containing the lytic activity were pooled and applied to a 1.0-ml Mono S



**FIG. 2. Purification of trialysin.** **A–C** respectively show the elution profile of the Hitrap Q, phenyl-Superose, and Mono S columns of a typical purification from 1.2 ml of water-diluted saliva. The trypanolytic activity is represented as *open circles*, the protein as *solid lines*, and the salt gradients as *dashed lines*. To detect the lytic activity the fractions were dialyzed against phosphate-buffered saline and incubated at 37 °C with  $1 \times 10^6$  trypomastigotes/ml. The number of parasites lysed per min is shown in each *graph*. *Insets* show silver-stained SDS-PAGE of total saliva (*lane a*, 0.1% of the total sample) and of each pool, as indicated by the *upper trace*. The amount of material loaded onto the gel was 0.08% of Hitrap flow through *lane b*, 0.3% of the phenyl-Superose pool (*lane c*), and 0.5% of the Mono S pool (*lane d*). The standards were as in Fig. 1.

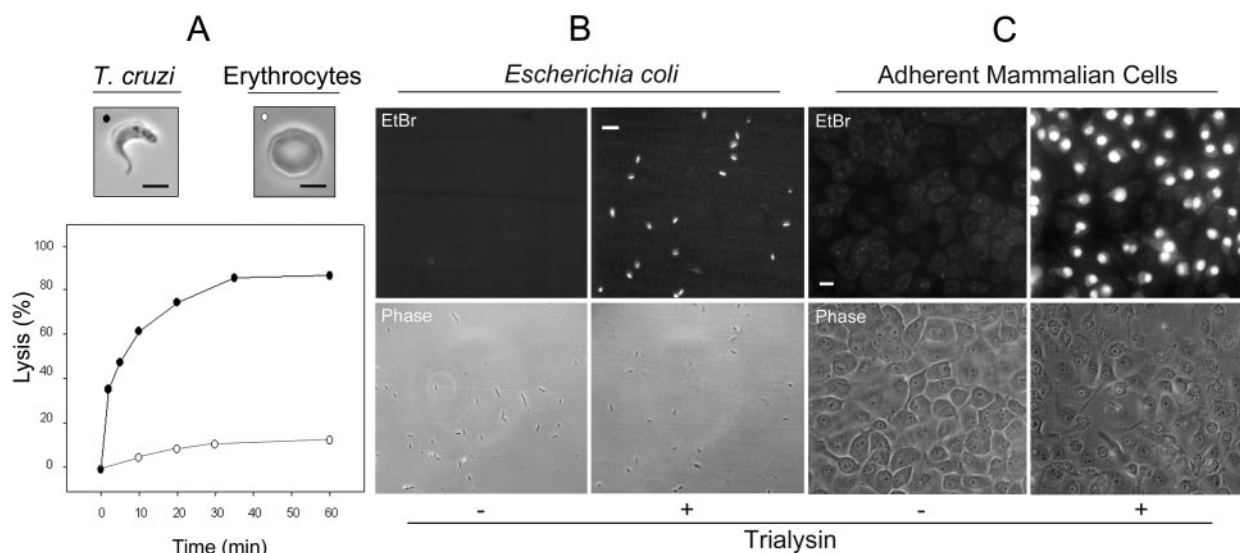
column equilibrated with 20 mM MES,<sup>1</sup> pH 6.0. Bound proteins were eluted with a linear gradient to 1 M NaCl in the same buffer at 0.5 ml/min. All purification steps were performed using a fast protein liquid chromatography system (Amersham Biosciences) at room temperature. The samples were analyzed by 15% SDS-PAGE after Coomassie Blue or silver nitrate staining.

**cDNA Library and Cloning Procedures**—A cDNA library from *T. infestans* salivary glands was constructed with poly(A)<sup>+</sup> mRNA extracted from D1/D2 salivary glands using the QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Amersham Biosciences). The cDNA was prepared from 3  $\mu$ g of mRNA using the SuperScript™ Lambda System for cDNA Synthesis and inserted into the Lambda ZipLox vector (Lambda Cloning System, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The library was packed with the Ready to Go Lambda Packing System (Amersham Biosciences) and amplified in *Escherichia coli* Y1090 (ZL).

The library was used as a template for PCR containing a primer based on the N terminus of trialysin, the degenerated oligonucleotide-NT (5'-TTYAARATHAARCCNGGNAARG) and the SP6 promoter primer located downstream of the  $\lambda$  vector cloning site. The oligonucleotides-CT (5'-CGGGATCCTTAATCAATTTCAACTTCATC) and the T7 promoter primer were used to amplify the full-length cDNA. Amplified products were purified from agarose gels and cloned into pGEM T-easy (Promega). Plasmids were inserted into *E. coli* DH5 $\alpha$ , and clones were sequenced using the Applied Biosystems Inc. 377 Sequencing Apparatus.

**Lipid Bilayer Measurements**—Planar lipid bilayers were formed using a solution of 2.5% azolecithin (Sigma) in *n*-decane according to the

<sup>1</sup> The abbreviations used are: MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; APMSE, aminophenylmethylsulfonyl fluoride; G6V32, the peptide corresponding to the segment from glycine 6 to valine 32 of trialysin.



**FIG. 3. Effect of trialysin on bacteria, protozoa, and mammalian cells.** A, trypomastigotes and human erythrocytes ( $5.0 \times 10^6$  cells/ml) were washed in Hanks' glucose containing 0.2% bovine serum albumin and incubated with purified trialysin (8  $\mu\text{g/ml}$ ) at 37 °C with shaking. The panels show *T. cruzi* trypomastigote and human erythrocyte. Bars, 5  $\mu\text{m}$ . This experiment was repeated independently three times with similar results. B, *E. coli* K12 ( $5.0 \times 10^6$  bacteria/ml) was incubated with ethidium bromide for 40 min at 37 °C in the presence (+) or absence (-) of trialysin (8  $\mu\text{g/ml}$ ). Viability of bacteria was assessed by solid medium growth. Bar, 10  $\mu\text{m}$ . C, confluent LLC-MK<sub>2</sub> cells were incubated with ethidium bromide for 50 min at 37 °C in the presence (+), or absence (-) of trialysin (34  $\mu\text{g/ml}$ ). After washing the cells, the images were acquired under phase contrast (Phase), and by fluorescence using a Nikon UV2A filter (EtBr). Bars, 20  $\mu\text{m}$ .

technique of Mueller *et al.* (15). The membranes for macroscopic conductance measurements were 0.8–1.0 mm in diameter, and those for single-channel recordings were 300–500  $\mu\text{m}$  wide. Conductance was measured using a patch clamp amplifier (Dagan Instruments, model 8900) configured in a voltage clamp mode. The data were acquired using the Axotape 2.0.2 software (Axon Instruments) and analyzed with an AxoScope 8.0 (Axon Instruments). The voltage was simultaneously monitored in a digital oscilloscope (Tektronix TDS 340A).

**Peptide Synthesis, Purification, and Quantitation**—Peptides were synthesized by the Fmoc (*N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) methodology as described by Hirata *et al.* (16) using an automated bench top simultaneous multiple solid-phase peptide synthesizer (PSSM 8 system from Shimadzu, Tokyo). Peptides were purified to homogeneity by high pressure liquid chromatography on a Vydac C<sub>18</sub> analytical column, and the sequence was confirmed by Edman degradation (PPSQ 23 system from Shimadzu, Tokyo). Peptide concentration was determined from stock solutions by amino acid analysis.

## RESULTS

We found that saliva of *T. infestans* killed the infective (trypomastigotes) and replicative (epimastigotes) insect stages of the protozoan *T. cruzi*. Lysis was abolished at 0 °C or when the saliva was heated to 85 °C, suggesting that a protein was involved in parasite lysis (not shown). When the saliva was separated by non-reducing SDS-PAGE, the parasite lytic activity was detected in a gel position corresponding to proteins of 30 kDa (Fig. 1, A and B). Likewise, diluted saliva induced an exponential increase in the conductance of the planar lipid bilayer until disruption of the membrane after 10–20 min (Fig. 1C), suggesting that a pore-forming activity was responsible for the lytic activity.

To purify the lytic molecule, ejected saliva from 800 insects (400  $\mu\text{l}$ ) was diluted in water, and the soluble fraction was applied to an anion exchange column (Hitrap Q). Unbound fractions containing the lytic activity (Fig. 2A) were pooled and adjusted to 1.7 M ammonium sulfate, and the pool was chromatographed through a phenyl-Superose column. The lytic activity eluted with  $\sim 750$  mM ammonium sulfate (Fig. 2B). Fractions with lytic activity were pooled and applied to a cation exchange column (Mono S). The lytic material was eluted with 800 mM NaCl and was separated from most contaminants that did not bind to the column (Fig. 2C). The bound-active fractions

contained a protein that migrated as a single band of 22 kDa in reducing SDS-PAGE stained with silver nitrate (Fig. 2C, inset).

Part of the lytic activity did not bind to the Mono S column when the sample was loaded in the presence of 750 mM ammonium sulfate (Fig. 2C). This lytic activity may be trialysin-bound to other proteins because when we dialyzed the phenyl-Superose pool, all the lytic activity bound to Mono S and eluted with 800 mM NaCl, exactly as trialysin. In this case, however, several other proteins bound to the column, contaminating the trialysin fraction. The final fraction yielded a single silver-stained band by SDS-PAGE of a similar size to the original lytic activity found in saliva. From 400  $\mu\text{l}$  of saliva, about 80  $\mu\text{g}$  of trialysin were obtained in a typical purification procedure, indicating that the concentration of this protein in saliva is at least 200  $\mu\text{g/ml}$  or 9  $\mu\text{M}$ . This purification protocol was repeated several times with similar results.

Purified trialysin induced lysis of *T. cruzi* trypomastigotes and human red blood cells at 8  $\mu\text{g/ml}$  (0.4  $\mu\text{M}$ ). However, parasite lysis occurred much more rapidly than hemolysis (Fig. 3A). This kinetic difference is probably due to the different membrane composition because both types of cells have similar surface sizes. Trialysin was able to permeabilize (Fig. 3B) and kill *E. coli* K12 at 8  $\mu\text{g/ml}$  (not shown). Adherent LLC-MK<sub>2</sub> epithelial cells were also permeabilized but required high concentrations of trialysin (1.5  $\mu\text{M}$ ), as shown in Fig. 3C.

In an initial attempt to elucidate the mechanism of lysis, we found that saliva generates macroscopic currents in large bilayers. The pore-forming activity of trialysin was then tested in small bilayers where evidence of pore-forming events was obtained, as shown in Fig. 4A. Trialysin added to the *cis* aqueous solution at a concentration of 0.2  $\mu\text{g/ml}$  generated a predominant mean current state of  $43.77 \pm 2.33$  pA ( $n = 100$ ;  $V_{\text{clamp}} = V_{\text{trans}} = -50$  mV) with a  $P_o$  of  $\sim 0.5$  and a second current level of  $84.82 \pm 2.85$  pA, indicative of the insertion of two pore-forming complexes in the lipid membrane (Fig. 4, A and B). At positive *trans* voltages (+30 to +100 mV), previous unitary currents were switched off, with reversal to unitary currents upon re-clamping to negative *trans* voltages (Fig. 4C).

Purified trialysin was submitted to N-terminal sequencing,

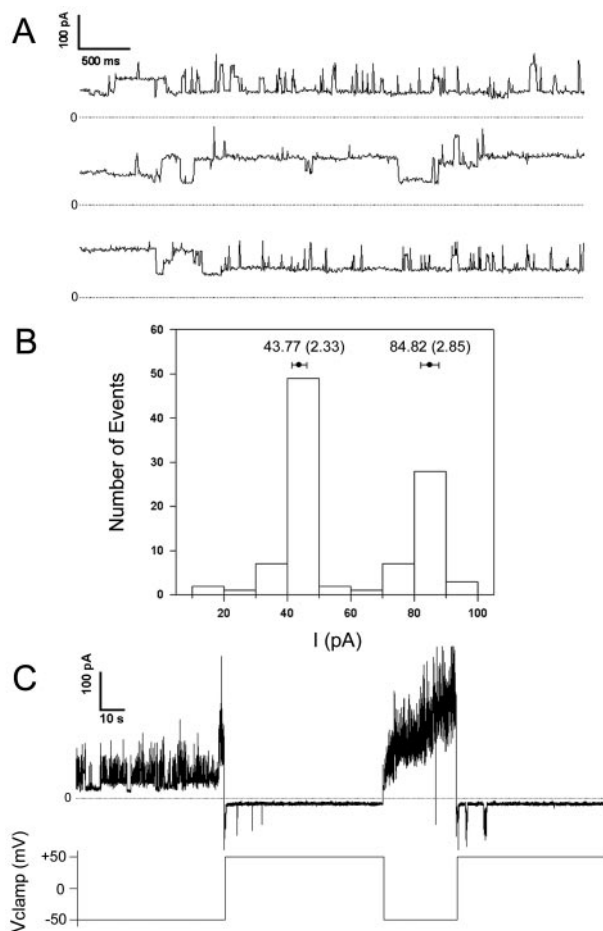


FIG. 4. **Trialysin generates single channels in bilayers.** Black planar lipid bilayers (2.5% azolecithin in *n*-decane) were formed in an orifice 0.5 mm in diameter in phosphate-buffered saline. **A**, trialysin was added to the *cis* compartment (0.2  $\mu$ g/ml), and data were recorded with a  $V_{\text{clamp}} = V_{\text{trans}} = -50$  mV. **B**, distribution of current events ( $>30$  ms,  $n = 100$ ) of data recorded in an experiment similar to that shown in **A**. The numbers above the bars represent the mean  $\pm$  S.D. current during the respective intervals. **C**, trialysin was added to the *cis* compartment (0.2  $\mu$ g/ml), and data were recorded with a  $V_{\text{clamp}} = V_{\text{trans}} = \pm 50$  mV. Similar results were obtained with  $V_{\text{clamp}} = \pm 30, \pm 75, \pm 90$ , and  $\pm 100$  mV.

and the first 20 amino acids were determined. A single sequence was generated (Fig. 5A, **bold letters**), indicating that the protein was highly purified. From the first eight N-terminal amino acids (**underlined** in Fig. 5A), a degenerated oligonucleotide primer was designed. This primer and the SP6 promoter primer, located downstream of genes cloned in a directional  $\lambda$  ZipLox library of *T. infestans* salivary glands, were used to amplify the trialysin cDNA by PCR. Several clones were obtained and sequenced. Seven clones showed the translated sequence of the first 20 amino acids found by protein sequencing. These clones were fully sequenced, presenting similar DNA sequences and almost the same amino acid sequence of 205 amino acids, as shown for clone 30 in Fig. 3A. Some clones had conserved amino acid changes (A28L, clone 31; G45S, M123T, and D183E, clones 17 and 22; F12L and I169V, clone 1), which might be attributed to the fact that we used a population of insects to prepare the cDNA library. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that more than one gene encodes trialysin.

The amino acid sequence predicts a protein with a pI of 9.46, compatible with the high retention in Mono S, and a molecular mass of 22.2 kDa, similar to those obtained by reducing SDS-PAGE. No similarity to other proteins from the data bases was

found. One striking feature of this molecule was the high percent of lysine residues (16%), even in comparison to the other positively charged amino acids, *i.e.* arginine (2%) and histidine (0.5%) residues. The repetitive distribution of these lysines in the N-terminal portion suggested that these initial amino acids form an amphipathic  $\alpha$ -helical structure. The region between Gly<sup>6</sup> and Val<sup>32</sup> predicts an amphipathic  $\alpha$ -helix region by GOR (17) and Eisenberg methods (18) (see Fig. 5B). By plotting this region as a helical wheel (19), the charged amino acids were found predominantly on one side of the helix, whereas the hydrophobic amino acids lay on the opposite side (Fig. 5C). This configuration is similar to that of several other antimicrobial pore-forming lytic peptides such as magainin from frog skin (20), cecropin (21), and sarcotoxin (22) found in insect hemolymph. The G6V32 sequence of trialysin also has a cluster of glycines between the charged and hydrophobic amino acids, as seen in magainin and sarcotoxin.

To verify whether the region between the Gly<sup>6</sup> and Val<sup>32</sup> amino acids of trialysin was involved in the lytic activity, the G6V32 peptide was synthesized and tested for lytic activity. As shown in Fig. 6, the peptide lysed *T. cruzi* trypomastigotes and permeabilized mammalian cells. The lysis was specific since the peptide was ineffective at 0  $^{\circ}$ C, and the purified peptide with blocked lysine residues was unable to induce lysis (not shown). Comparatively, trialysin was more efficient than G6V32 in both assays. However, trialysin-induced parasite lysis was about 10-fold higher, and trialysin-induced mammalian cell permeabilization was about 100-fold higher. This result shows that the remaining amino acid residues of the protein, excluding the cationic amphipathic lytic region, increased the activity of trialysin mainly toward mammalian cells.

Since trialysin was efficient in permeabilizing mammalian cells, it could also produce damage in the insect salivary gland if synthesized with full lytic activity. Therefore, we searched for a precursor molecule by amplifying the cDNA library with an anchor primer corresponding to a site upstream of the vector cloning site and a primer corresponding to the C terminus of trialysin. We obtained a PCR product with about 1100 bp, 300 bp longer than the product amplified based on purified trialysin. Its DNA sequence predicts an amino acid sequence that contains a typical signal peptide (23) followed by a 33-amino acid sequence rich in negatively charged amino acids (7 Asp and 8 Glu) separated by 1 arginine located upstream of the N-terminal sequence of the purified trialysin (Fig. 7A). This finding suggests that the mature protein is produced by limited proteolysis and that these acidic amino acids might control the lytic activity by neutralizing the basic amino acids in the adjacent region corresponding to the lytic amphipathic  $\alpha$ -helix.

Since we have reported previously (24) the presence of a serine protease in salivary glands of *T. infestans* that is activated at the time of the bite and specifically cleaves arginines, we tested the lytic activity of salivary gland homogenates prepared in the presence or absence of an irreversible serine protease inhibitor. As shown in Fig. 7B, a 10-fold reduction in lytic activity was obtained in the presence of APMSF, showing that a serine protease is involved in the processing and activation of trialysin. APMSF did not affect *T. cruzi* lysis when pre-activated saliva was used, excluding the participation of serine proteases in parasite lysis.

#### DISCUSSION

In the present study we have characterized the cytolytic salivary activity of *T. infestans*. It is a pore-forming protein, activated by limited proteolysis, that permeabilizes and lyses prokaryotic and eukaryotic cells. This protein was purified to homogeneity, cloned, and named trialysin (from *Triatoma infestans* cytolytin). We obtained several trialysin cDNA se-



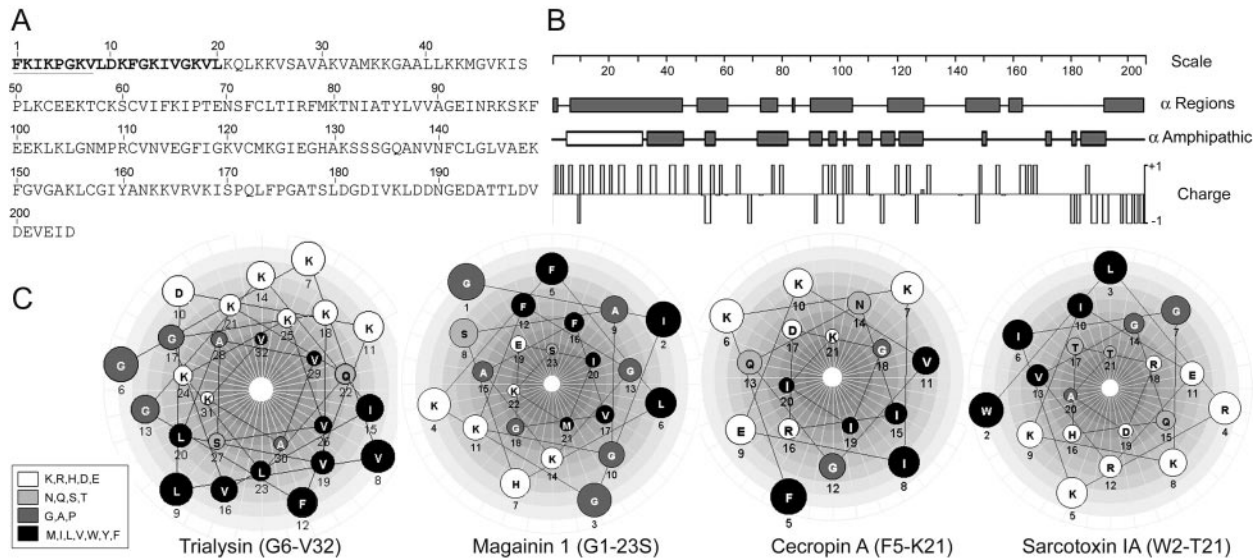


FIG. 5. **Predicted sequence of trialysin.** A, amino acid sequence based on the translated DNA sequence of clone 30 obtained by PCR amplification in a cDNA library of *T. infestans* salivary glands (GenBank<sup>TM</sup> accession number AF427486). The **bold letters** represent the amino acid sequence obtained by Edman degradation of purified trialysin. The underlined sequence corresponds to the primer position used to amplify the cDNA clones. B, the figure shows plot of  $\alpha$ -helical regions using the GOR prediction method with no decision constants ( $\alpha$ -region), plot of  $\alpha$ -helical amphipathic regions using Eisenberg hydrophatic moment ( $\alpha$ -amphipathic), and charge (*Charge*) distribution of the molecule at pH 7.0. C, the figure shows amphipathic helical wheels of trialysin (*open box* in B) and the indicated pore-forming peptides (45) obtained with the software package Protean 4.0 (DNASTAR).

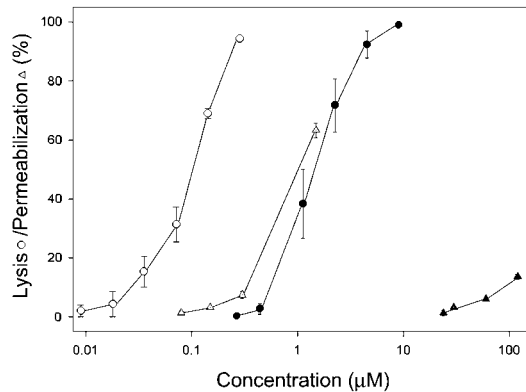


FIG. 6. **Comparison of trialysin and G6V32-induced lysis of *T. cruzi* and mammalian cells.** Trialysin (*open circles*) and G6V32 (*closed circles*) were incubated for 50 min at 37 °C with  $3.0 \times 10^6$  trypomastigotes/ml. Parasite lysis was determined using a Neubauer chamber. Alternatively, trialysin (*open triangles*) and G6V32 (*closed triangles*) were incubated for 50 min at 37 °C with attached and confluent LLC-MK<sub>2</sub> cells in the presence of 10  $\mu$ g/ml ethidium bromide. The percentage of permeabilized cells was determined after digital data analysis. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments.

quences, but all of them predict for proteins with conserved modifications in amino acid sequence.

No significant similarity was found between trialysin and other sequences in data banks. However, the region delimited by Gly<sup>6</sup> and Val<sup>32</sup> (30% lysine) is a suitable cationic amphipathic lytic motif and structurally resembles several antimicrobial lytic peptides. The synthetic peptide G6V32, which corresponds to this domain, lyses trypomastigotes and permeabilizes mammalian cells. However, the entire protein is more efficient than the peptide in inducing parasite lysis and particularly in permeabilizing mammalian cells. Compared with trialysin, larger amounts of G6V32 are required to permeabilize adherent epithelial cells, whereas only a 10-fold molar excess is required to lyse *T. cruzi*. These findings indicate that the remaining 178 residues of the protein have a role in increasing the activity of trialysin-mediated parasite killing and, to a

greater extent, the activity of permeabilizing mammalian cells. This relative mammalian cellular specificity has probably evolved from an early predatory ancestor molecule used to lyse invertebrate cells, once triatomines evolved from predatory family of reduvids insects. Nevertheless, protozoan parasites and bacteria are more susceptible to trialysin and G6V32 compared with mammalian cells, a fact that could be related to differences in their membrane composition and structure. Saliva generates an exponential increase in conductance leading to disruption of artificial lipid membranes. This effect may be due to the trialysin pore forming activity and not to a detergent-like activity. First, trialysin is found at high concentration in saliva, and in its purified state forms single channels. Second, the lipid membrane remained stable in the presence of trialysin and in absence of a negative potential, and no lytic activity could be detected at 0 °C. Finally, trialysin generated conductance only at negative *trans* potentials with the channels reversibly closing at positive *trans* potentials. Events at positive *trans* voltages were rarely detected, probably due to insertion of trialysin in the *trans* side of the membrane.

Cytolytic activities need to be tightly regulated in order to avoid self-damage, mainly in storage compartments such as *T. infestans* salivary glands, where they reach high concentrations (9  $\mu$ M). One way of controlling the lytic activity is to rely on differential specificity of molecules, as seen with bacterial toxins targeted to specific membrane components of host cells. Another way depends on proteolytic processing, as shown for defensins (25), aerolysin (26), and vibriolysin (27). Our data strongly support the notion that trialysin is synthesized as a precursor molecule that is activated by limited proteolysis. The precursor of trialysin contains a signal peptide sequence followed by an acidic 33-amino acid pro-sequence (45% of Glu and Asp), not found in the mature protein. This anionic region is adjacent to the cationic amphipathic lytic motif (30% of Lys), which is located at the N terminus of the mature protein. This suggests that the anionic pro-sequence controls the trialysin activity by neutralizing the adjacent cationic lytic motif. In addition, the hair pin formed by electrostatic interaction of these opposite charged sequences may organize the site of protein processing (Arg<sup>56</sup>) in an exposed loop for a proper

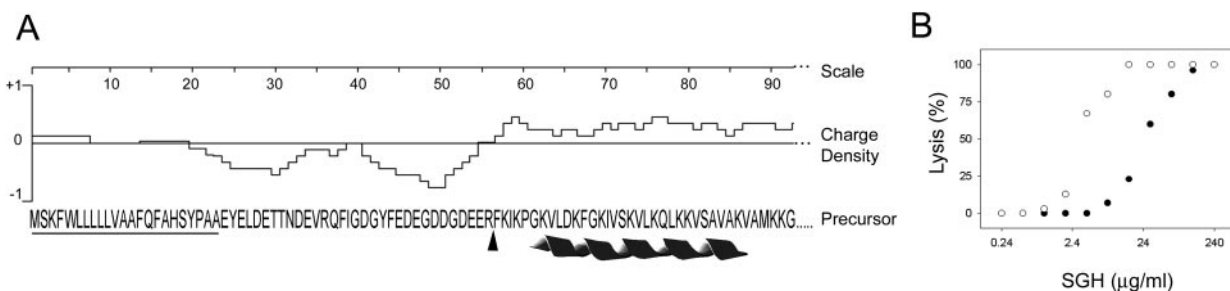


FIG. 7. **Proteolytic activation of the trialysin precursor.** A shows the deduced amino acid sequence of pro-trialysin, the amino acid numbers of the precursor protein, and the charge density at pH 7.0 (Protean 4.0, DNASTAR) (GenBank<sup>TM</sup> accession number AF427487). The *arrowhead* indicates the site of proteolysis, and the *ribbon* indicates the position of the G6V32 peptide. B shows the trypanostigote lysis induced by *T. infestans* salivary gland homogenates (SGH) prepared in the absence (*open circles*) or presence (*closed circles*) of 100  $\mu\text{g/ml}$  APMSF. The extracts contained 133 glands/ml in phosphate-buffered saline. The salivary gland homogenates were incubated for 50 min at 37  $^{\circ}\text{C}$  with  $3.0 \times 10^6$  trypanostigotes/ml. Parasite lysis was determined by counting with a Neubauer chamber. This experiment was repeated independently three times with similar results.

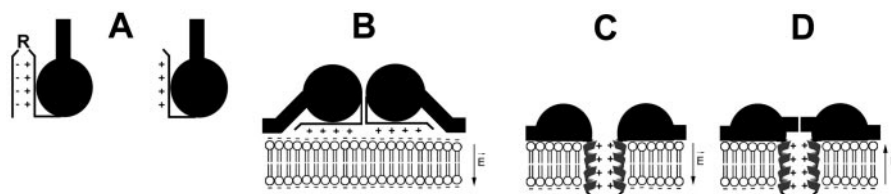


FIG. 8. **Hypothetical model of trialysin activation and pore-forming activity.** A, activation of a molecule by a serine protease occurs by cleavage at Arg<sup>56</sup> of the trialysin precursor. The proteolytic processing releases the anionic pro-sequence exposing the cationic amphipathic lytic motif of trialysin. B, binding of the activated molecule to membrane phospholipids. The negative charge represents the phosphate group of membrane lipids. C, pore formation under a negative membrane potential (*trans* side negative) with the organization of G6V32 in an  $\alpha$ -helical structure. D, reversible closure of the pore under a positive membrane potential (*trans* side positive).

proteolytic attack. A similar anionic pro-sequence of 45 amino acid residues (18% of Glu and Asp) is found in defensin, which is a 30-amino acid peptide that forms cationic amphipathic  $\beta$ -sheets and contains 13% of arginine (28). Interestingly, the ratio of negatively and positively charged amino acids is about 1.5 in both molecules, a finding that suggests a general mechanism of activation control.

We have described previously a serine protease called triapsin, which is present in the salivary glands of *T. infestans* and is released in the ejected saliva (24). Based on the present data, it appears that triapsin is responsible for trialysin activation. First, triapsin is the major proteolytic activity in the salivary glands of *T. infestans*. Second, triapsin is highly specific for cleavage of the arginine bond, and this is the amino acid found before the N terminus of the mature trialysin. Third, APMSF, an irreversible specific inhibitor of triapsin, significantly impairs the activation of trialysin in salivary gland homogenates. Finally, triapsin is activated at the time of saliva ejection, a condition that would prevent self-damage by trialysin.

We propose a simplified model of activation and pore formation, as shown in Fig. 8. The pro-trialysin is stored in the inactive form in salivary glands. At the time of the bite a serine protease is activated (Fig. 8A) and cleaves the exposed Arg<sup>56</sup> of pro-trialysin separating the anionic peptide from the mature pore-forming protein, thus exposing the cationic amphipathic motif of trialysin. This cationic domain of trialysin then binds to the negative head group of membrane phospholipids (Fig. 8B) and inserts the amphipathic  $\alpha$ -helix into the lipid bilayer forming an aqueous pore, which has a *cis-trans* asymmetry (Fig. 8, C and D), being opened by negative *trans* voltages.

In hematophagous insects, lytic activities have been associated with a digestive hemolytic role (29). However, it is unlikely that trialysin has a nutritional role, since blood is stored in the stomach for weeks without hemolysis, which is performed in the posterior midgut of *T. infestans*. A possible role of trialysin may be related to its antimicrobial activity, as shown for cationic amphipathic peptides found in insects (30). Indeed,

we observed that trialysin prevents microbial colonization of salivary glands of *T. infestans* because there is no bacterial growth when saliva from 10 insects is plated onto LB agar (data not shown). Consequently, trialysin could impair the transmission of pathogens through the insect saliva. This is the case of *Trypanosoma rangeli*, a protozoan genetically related to *T. cruzi* (31), which is transmitted by saliva of the triatomine vector *Rhodnius prolixus* but is not transmitted by the bite of *T. infestans* (32–34). Differently from *T. infestans*, *R. prolixus* has no lytic activity in the salivary glands (35) but expresses a lytic peptide in the stomach (36). This basic peptide from the stomach of *R. prolixus* also lyses *T. cruzi* and may provide insect protection against some parasite strains (37). We also found that in some *T. infestans* feeding on mice infected with *T. cruzi*, the recovery of parasites in the gut is low, suggesting that trialysin might also impair the transmission of *T. cruzi* in some cases.<sup>2</sup> No lytic activity is detected in the stomach extracts of starved *T. infestans*.

A role of trialysin in blood feeding on the mammalian host should also be considered. Saliva is the only interface that *T. infestans* possesses to counteract immune, inflammatory, and homeostatic host responses to obtain successfully its blood meal (38). Thus, trialysin may also act during blood feeding since it is able to permeabilize mammalian cells at concentrations lower than those found in saliva. In fact, diluted saliva permeabilizes cells present in rat mesentery and lymphocytes (data not shown). When injected into vertebrate skin, saliva encounters several cell types, such as nerve fibers, mast cells, platelets, smooth muscle cells, and endothelial cells, which depend on controlled ionic flux to exert their physiological roles. It has been demonstrated that pore-forming molecules inhibit platelet function (39, 40), induce apoptosis in leukocytes (41, 42) and in endothelial cells (43), promote shedding of L-selectin in leukocytes, inhibit the lympho-

<sup>2</sup> R. Amino, R. M. Martins, J. Procopio, I. Y. Hirata, M. A. Juliano, and S. Schenkman, manuscript in preparation.

cyte proliferative response, and immunoglobulin production (44) among other cellular activities (14).

In conclusion, our results place trialysin between the lytic pore-forming peptides and the lytic pore-forming bacterial proteins. The cationic amphipathic pore-forming peptides are classically characterized as antibacterial molecules because of the resistance of mammalian cells to peptide lysis and are found in the immune system of several unrelated species. This resistance could be clearly seen when comparing the permeabilizing activity of peptide G6V32 and the entire protein. On the other hand, there are pore-forming proteins from bacteria that possess target specificity for eukaryotic host cells and in many cases interfere with cell function, thus being important determinants of bacterial virulence. Trialysin is able to kill microorganisms like a lytic peptide and permeabilize mammalian cells like a bacterial toxin. This dual role may allow it to act on blood feeding by interacting with host cells and on microbial growth control in salivary glands. In addition, the lytic molecule is activated by proteolytic removal of the anionic pro-sequence contiguous to the cationic lytic motif. Understanding how lytic molecules control their activities and specificities is desirable in order to design cell-specific regulated cytolytic proteins.

*Acknowledgments*—We thank Dr. Abilio Fragata and Dr. Laura Mainfrino (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, SP, Brazil) for providing the insects, Luciana Honda and Evânia Azevedo for technical assistance, Dr. Vitor Marcel Faça for the amino acid analysis, and Dr. Luiz Juliano and Dr. José Marcos Ribeiro for helpful suggestions and for reading the manuscript.

## REFERENCES

- Lehrer, R. I., and Ganz, T. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 23–27
- García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., and Rodríguez-Palenzuela, P. (1998) *Biopolymers* **47**, 479–491
- Matsuzaki, K. (2001) *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 598–601
- Tweten, R. K., Parker, M. W., and Johnson, A. E. (2001) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **257**, 15–33
- Welch, R. A. (2001) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **257**, 85–111
- Watson, K. C., Rose, T. P., and Kerr, E. J. (1972) *J. Clin. Pathol.* **25**, 885–891
- Diep, D. B., Nelson, K. L., Raja, S. M., Pleshak, E. N., and Buckley, J. T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2355–2360
- Lally, E. T., Kieba, I. R., Sato, A., Green, C. L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Wang, J. F., Shenker, B. J., Ortlepp, S., Robinson, M. K., and Billings, P. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30463–30469
- Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J. E. (1996) *Science* **274**, 1859–1866
- Wallace, A. J., Stillman, T. J., Atkins, A., Jamieson, S. J., Bullough, P. A., Green, J., and Artymiuk, P. J. (2000) *Cell* **100**, 265–276
- Zitzer, A., Zitzer, O., Bhakdi, S., and Palmer, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 1375–1380
- Olofsson, A., Hebert, H., and Thelestam, M. (1993) *FEBS Lett.* **319**, 125–127
- Sekiya, K., Satoh, R., Danbara, H., and Futaesaku, Y. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 5953–5961
- Billington, S. J., Jost, B. H., and Songer, J. G. (2000) *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 197–205
- Mueller, P., Rudin, H. T., Tien, T., and Wescott, W. C. (1963) *J. Phys. Chem.* **67**, 534–535
- Hirata, I. Y., Cezari, M. H. S., Nakaie, C. R., Boschov, P., Ito, A. S., Juliano, M. A., and Juliano, L. (1994) *Lett. Pept. Sci.* **1**, 299–308
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978) *J. Mol. Biol.* **120**, 97–120
- Eisenberg, D., Weiss, R. M., and Terwilliger, T. C. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 140–144
- Schiffer, M., and Edmundson, A. B. (1967) *Biophys. J.* **7**, 121–135
- Zaslouff, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5449–5453
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., and Boman, H. G. (1981) *Nature* **292**, 246–248
- Okada, M., and Natori, S. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7174–7177
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) *Protein Eng.* **10**, 1–6
- Amino, R., Tanaka, A. S., and Schenkman, S. (2001) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 465–472
- Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M., and Parks, W. C. (1999) *Science* **286**, 113–117
- Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N. G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S. H., Buckley, J. T., and van der Goot, F. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32656–32661
- Hall, R. H., and Drasar, B. S. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 3375–3379
- Valore, E. V., Martin, E., Harwig, S. S., and Ganz, T. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**, 1624–1629
- Lehane, M. J. (1994) *Int. J. Parasitol.* **24**, 27–32
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., and Hoffmann, D. (1999) *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329–344
- Stevens, J. R., Teixeira, M. M., Bingle, L. E., and Gibson, W. C. (1999) *Int. J. Parasitol.* **29**, 749–757
- D'Alessandro, A. (1972) *J. Med. Entomol.* **9**, 187–195
- D'Alessandro, A., and de Hincapie, O. (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 512–514
- Cuba, C. A. (1998) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **31**, 207–220
- Gregorio, E. A., and Ratcliffe, N. A. (1991) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **86**, 181–186
- Azambuja, P., Guimaraes, J. A., and Garcia, E. S. (1983) *J. Insect Physiol.* **29**, 833–837
- Mello, C. B., Azambuja, P., Garcia, E. S., and Ratcliffe, N. A. (1996) *Exp. Parasitol.* **82**, 112–121
- Ribeiro, J. M. C. (1995) *Infect. Agent Dis.* **4**, 143–152
- Walch, M., Ziegler, U., and Groscurth, P. (2000) *Ultramicroscopy* **82**, 259–267
- Ashmarin, I. P., Tkachenko, S. B., Rud'ko, I. A., Korneva, E. A., Kokriakov, V. N., and Kubatiev, A. A. (1993) *Bull. Exp. Biol. Med.* **115**, 23–25
- Wang, J. F., Kieba, I. R., Korostoff, J., Guo, T. L., Yamaguchi, N., Rozmiarek, H., Billings, P. C., Shenker, B. J., and Lally, E. T. (1998) *Microb. Pathog.* **25**, 317–331
- Korostoff, J., Wang, J. F., Kieba, I., Miller, M., Shenker, B. J., and Lally, E. T. (1998) *Infect. Immun.* **66**, 4474–4483
- Menzies, B. E., and Kourteva, I. (2000) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**, 39–45
- Mitchell, T. J., and Andrew, P. W. (1997) *Microb. Drug Resist.* **3**, 19–26
- Kini, R. M., and Evans, H. J. (1989) *Int. J. Pept. Protein Res.* **34**, 277–286

**Capítulo 2: Estrutura de peptídeos sintéticos baseados no N-terminal  
da trialisina.**

Artigo: Lytic Activity and Structural Differences of Amphipathic Peptides Derived  
from Trialysin

Rafael M. Martins, Maurício L. Sforça, Rogério Amino, Maria Aparecida Juliano, Sérgio  
Oyama, Jr., Luiz Juliano, Thelma A. Pertinhez, Alberto Spisni e Sergio Schenkman

Biochemistry 2006, 45, 1765-1774

Neste artigo, utilizamos peptídeos sintéticos baseados no N-terminal da trypsinina para entendermos o mecanismo de ação da trypsinina.

Testamos 7 peptídeos em ensaios de lise de tripomastigotas de *T. cruzi*, *E. coli* e eritrócitos humanos. Interessantemente, observamos atividades bastante díspares dependendo de pequenas variações (de 5 resíduos de aminoácidos) dentro dos primeiros 52 aminoácidos do N-terminal da trypsinina madura. Decidimos então analisar essas diferenças estruturalmente. O perfil de dicroísmo circular de todos indicava a formação de  $\alpha$ -hélices quando da adição de dodecil-sulfato de sódio (SDS) ou trifluoro-etanol (TFE). Em água, todos apresentavam estrutura randômica. Inicialmente, pretendíamos resolver as estruturas tridimensionais dos peptídeos adotadas num ambiente semelhante ao de uma bicamada lipídica, ou seja, em micelas de SDS, condição em que sabíamos que os peptídeos adquiriam estrutura.

Coletamos dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional do próton  $^1\text{H}$  para avaliarmos preliminarmente as condições experimentais. Utilizando o peptídeo P6, que apresentava maior atividade lítica contra tripomastigotas e melhor representava o N-terminal da trypsinina (cobrindo 32 resíduos de aminoácidos do N-terminal), pudemos observar que os picos correspondentes aos prótons amídicos dispunham-se bastante sobrepostos, o que tornaria a resolução estrutural muito difícil no assinalamento seqüencial dos prótons. Alterando as condições do experimento (figura 9), os picos eram melhor resolvidos porém apenas com o co-solvente orgânico TFE, tido como estabilizador de estrutura (Sonnichsen et al., 1992), foi que obtivemos a melhor dispersão desses prótons, representando a estrutura do peptídeo monomérico. Isso sugeria que em SDS os peptídeos adquiriam estruturas possivelmente agregadas.

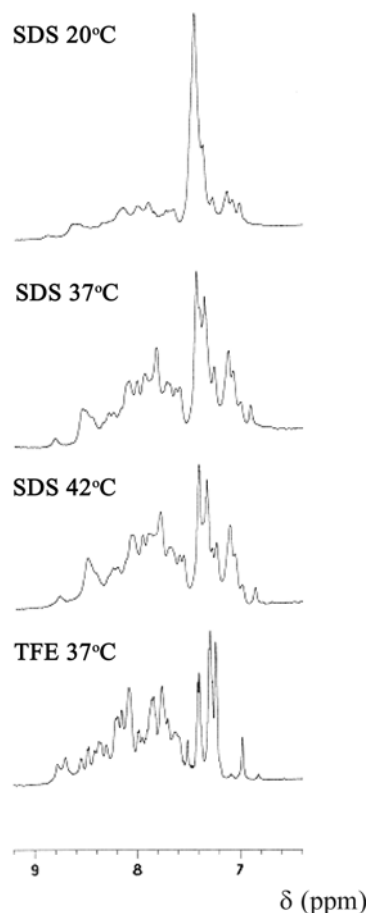


Figura 9 - Espectro unidimensional de RMN do próton  $^1\text{H}$  do peptídeo P6 (1,2 mM) em água contendo 5%  $\text{D}_2\text{O}$ , 100 mM SDS ou 30% TFE. As diferentes condições são indicadas; região dos prótons amídicos (*fingerprinting region*) está mostrada. Eixo das abscissas representando, em partes por milhão (ppm), os deslocamentos químicos ( $\delta$ ).

Desta forma, P5, P6 e P7 tiveram suas estruturas resolvidas em 30% TFE, condição na qual apresentavam máxima estruturação, comparável com SDS. A estrutura de P2 foi resolvida a fim de compararmos os três peptídeos mais líticos com um menos ou não lítico. A análise das estruturas mostrou que P5/6/7 apresentavam uma região helicoidal comum central que se estendia ao C-terminal, compartilhado por P5 e P6 enquanto os N-terminais comuns de P6 e P7 aparentavam desorganização. Quando comparamos separadamente cada região, pudemos observar uma alta similaridade entre essas regiões de P6/P7 e P5/P6 que se estendia

às cadeias laterais dos resíduos envolvidos, sugerindo principalmente no par P6/P7 que uma diferente conformação era mantida no N-terminal.

As superfícies eletrostáticas dos peptídeos mostraram uma clara anfipaticidade gerada pelas cadeias laterais e, no caso de P2, embora contivesse uma região anfipática predita do N-terminal da trialisina, sua superfície não era. Anfipaticidade helicoidal é uma característica muito importante em se tratando da eficácia de peptídeos antimicrobianos. O aumento da helicidade e do momento hidrofóbico tendem a um aumento da atividade hemolítica (Giangaspero et al., 2001; Chen et al., 2005). Para comprovar que a região N-terminal era realmente importante, utilizamos dois peptídeos baseados no P6 com modificações: P6\_1 continha Pro5 e Gly6 trocados por Ala e Ser e P6\_2, cujas Lys 2 e 4 foram trocadas por Ser. Esses peptídeos tiveram praticamente a mesma atividade contra *T. cruzi* (no caso da troca de cargas, em P6\_2, houve uma diminuição), porém em *E. coli* e eritrócitos, a retirada da região envolvida na dobra N-terminal, Pro5-Gly6 aumentou muito a eficiência lítica para essas células.

Os microdomínios identificados nos terminais dos peptídeos puderam então explicar suas diferenças de especificidade. A estrutura formada no N-terminal de P6/P7, que representa o N-terminal da trialisina madura correlaciona com a atividade lítica preferencial contra tripomastigotas de *T. cruzi*. É interessante que uma pequena região pode ter um papel tão diferencial contra um tipo celular específico. Certamente, constituintes específicos da superfície de *T. cruzi* devem aumentar a afinidade dos peptídeos por suas membranas. Embora não tenhamos abordado essas questões, a alta especificidade tanto da trialisina quanto dos peptídeos dela derivados podem dar indícios da função da molécula.

Uma forma excelente encontrada para compararmos as atividades dos peptídeos foi a adoção do chamado "índice de segurança", que leva em consideração a atividade antimicrobiana/anti-parasitária em relação à hemólise: P6 e P7, que contém os cinco primeiros

aminoácidos do N-terminal da trypsinina madura são os mais potentes anti-parasitários. É também interessante observar que em geral todos são melhor anti-parasitários do que anti-microbianos, sugerindo que estudos visando aumentar a estabilidade desses compostos e possíveis utilizações terapêuticas em conjunto com a quimioterapia tradicional podem ser bastante promissores. Dados de nosso laboratório já mostraram que *Trypanosoma brucei brucei* pode ser lisado em sangue de camundongos (não publicado); testes em *Acanthamoeba castellanii*, protozoário causador de ceratite na córnea, podendo infectar inclusive o sistema nervoso central em pacientes imunocomprometidos, mostram um potente efeito quando as proteases secretadas no meio de cultura são inibidas (Sacramento RS, tese em preparação). Visto que a trypsinina evoluiu num ambiente pressionado a não ser reconhecido pelo hospedeiro mamífero, os peptídeos nela baseados podem ser de grande valor no combate a infecções.



## Lytic Activity and Structural Differences of Amphipathic Peptides Derived from Trialysin<sup>†,‡</sup>

Rafael M. Martins,<sup>§</sup> Maurício L. Sforça,<sup>||</sup> Rogério Amino,<sup>⊥</sup> Maria Aparecida Juliano,<sup>+</sup> Sérgio Oyama, Jr.,<sup>||</sup> Luiz Juliano,<sup>+</sup> Thelma A. Pertinhez,<sup>||,®</sup> Alberto Spisni,<sup>\*,||,#</sup> and Sergio Schenkman<sup>\*,§</sup>

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Departamento de Bioquímica, and Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, R. Botucatu 862, São Paulo 04023-062, Brazil, Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo 13083-100, Brazil, and Department of Experimental Medicine, University of Parma, Via Volturno, 39, Parma 43100, Italy

Received July 24, 2005; Revised Manuscript Received November 29, 2005

**ABSTRACT:** Trialysin is a pore-forming protein found in the saliva of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae), the insect vector of Chagas' disease. The protein is active against a broad range of cell types from bacteria to eukaryotic cells. Recognizing that the N-terminus of trialysin harbors the lytic motif [Amino, R., Martins, R. M., Procopio, J., Hirata, I. Y., Juliano, M. A., and Schenkman, S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 6207–6213], we designed a set of peptides scanning this region to investigate the structural basis of its biological function. Peptides encompassing residues 1–32 (P6), 1–27 (P7), and 6–32 (P5) efficiently induced lysis of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and *Escherichia coli* in the 0.4–9.0  $\mu$ M range, while much higher concentrations were required to cause hemolysis. Other more internal peptides, including peptide P2 (residues 21–47) and others up to residue 52, were less effective. P6 turned out to be the most active of all. P7 has a significantly higher activity than P5 against *E. coli*, while P5 has a hemolytic activity comparable to that of P6. CD spectroscopy showed that all tested peptides acquire a comparable helical content in solvent mixtures or in detergent micelles. The solution structure of P2 and P5–P7 was determined in a 30% trifluoroethanol/water mixture by nuclear magnetic resonance. All peptides exhibit a structure characterized by a central helical fold, and except for P2, which does not show a continuous hydrophobic surface, they are amphipathic. The structural models show that P5 and P7 extend their structural similarities with the most active peptide, P6, in either the C-terminus or the N-terminus. Amino acid substitutions in the N-terminus of P6 improved hemolysis but did not change the activity against *T. cruzi*. These results suggest that while amphipathicity is essential for the lytic activity, the selectivity of the active peptides for specific organisms appears to be associated with the structural features of their N- and C-termini.

To obtain its blood meal, *Triatoma infestans*, the insect vector of Chagas' disease, needs to overcome several barriers raised by the host. The first is physical, represented by the skin, and the second biochemical, represented by the hemostatic and inflammatory systems (1). For this reason, the salivary glands of these insects developed an ensemble of compounds aimed at this task, including, besides a

sialidase (2), proteases (3), an anesthetic compound (4), anticoagulant proteins (5), and a pore-forming protein named trialysin (6). Since trialysin exerts its potent cytolytic activity on a large variety of cell types, from bacteria to mammalian cells, it has been hypothesized that it favors the maintenance of the salivary conduct free of microorganisms and parasites, among which is *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease.

The N-terminal region of trialysin has been predicted to form an amphipathic  $\alpha$ -helix, and in a previous work (6), we have found that the peptide encompassing residues Gly6–Val32, P5 (Figure 1), possesses lytic activity, although it is  $\sim 10$  and  $\sim 100$  times less effective than the whole protein against trypanosomes and eukaryotic cells, respectively. The lytic domain of trialysin is reminiscent of the class of cationic lytic peptides found in the immune system and in the venoms of several animal species (7–13). Their mechanism of action is thought to occur either through pore formation, in which the peptides insert perpendicular to the plane of the membrane interacting with the lipid acyl chains, or through a carpet-like mode, in which they lie parallel to the membrane and act as a detergent (14). In either case, the peptides

<sup>†</sup> This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (SMOLBnet) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil.

<sup>‡</sup> The proton chemical shifts of P2 and P5–P7 have been deposited in the BMRB (<http://www.bmrbl.wisc.edu/>) as entries 6859, 6616, 6618, and 6619, respectively.

<sup>\*</sup> To whom correspondence should be addressed. S.S.: phone, (5511) 5575-1996; fax, (5511) 5571-5877; e-mail, sergio@ecb.epm.br. A.S.: phone, (39 0521) 033807; fax, (39 0521) 033802; e-mail, aspin@unipr.it.

<sup>§</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo.

<sup>||</sup> Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

<sup>⊥</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo.

<sup>+</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo.

<sup>®</sup> Present address: Department of Experimental Medicine, Section of Chemistry and Structural Biochemistry, University of Parma, Parma, Italy.

<sup>#</sup> University of Parma.

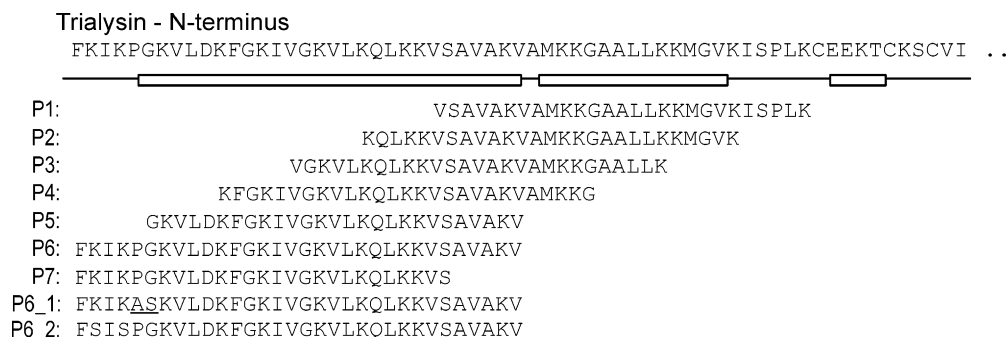


FIGURE 1: Synthetic peptides corresponding to the N-terminus of trialysin. The top sequence shows the N-terminal portion of mature trialysin. The boxes represent predicted amphiphilic  $\alpha$ -helical regions (53). The sequences of peptides synthesized are aligned with respect to the protein sequence. Underlined residues correspond to mutated amino acids.

structural features and charge distribution as well as the composition of the target membrane are key determinants for lysis specificity (15, 16).

Aiming to understand the lytic mechanism of trialysin, we have been prompted to search for its active motif. Here we present a study in which synthetic peptides encompassing portions of the N-terminus of trialysin have been tested for their lytic properties against the infective stage of *T. cruzi*, as well as against *Escherichia coli* and human erythrocytes. We found that the most active ones, independent of the target cell, are those encompassing the first 32 residues of the N-terminus of trialysin, in particular P6 (residues Phe1–Val32). As CD<sup>1</sup> spectroscopy indicated that all peptides acquire an  $\alpha$ -helical fold both in the presence of detergent micelles and in TFE solutions, to highlight the possible existence of structural determinants that could justify their lytic specificity we selected the three most active ones together with one devoid of any activity and determined their structures in a 30/70 (v/v) TFE/water mixture by NMR spectroscopy.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Peptide Synthesis, Purification, and Quantitation.** Peptides were synthesized by the Fmoc [*N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl] methodology as previously described (17) using an automated benchtop simultaneous multiple solid-phase peptide synthesizer (PSSM 8 system from Shimadzu, Tokyo, Japan) and were purified to homogeneity by high-pressure liquid chromatography on a Vydac C18 analytical column. The molecular mass and sequence were checked by amino acid analysis, MALDI-TOF (TOFSpec E instrument from Micromass, Manchester, U.K.), and Edman degradation (PPSQ 23 system from Shimadzu). Peptide concentrations were determined from stock solutions by acid hydrolysis and amino acid analysis.

**Trypanolytic Assay.** Trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain) were obtained from infected tissue cultures of LLC-MK<sub>2</sub> cells maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's

modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Serial dilutions of peptides were incubated with  $3 \times 10^6$  culture trypomastigotes/mL at 37 °C for 1 h. The number of surviving (motile) parasites was determined in a Neubauer hemacytometer using a phase microscope (6).

**Bactericidal Assay.** *E. coli* DH5 $\alpha$  was grown in Luria-Bertani liquid medium to an OD<sub>600</sub> of 0.1 ( $\sim 1.0 \times 10^8$  cells/mL) and incubated in the growth medium with each peptide at various concentrations for 1 h at 37 °C. The samples were then serially diluted in cold medium and plated. After overnight growth at 37 °C, colony-forming units were counted and plotted.

**Hemolytic Assay.** Erythrocytes were obtained from the cellular fraction of human blood collected with citrate and centrifuged at 2000g for 10 min, washed twice, and resuspended in Hanks solution containing 1% BSA. Serial dilutions of peptides were incubated with  $3 \times 10^7$  erythrocytes/mL in U-bottomed 96-well plates at 37 °C for 2.5 h, under agitation. Plates were centrifuged at 2000g for 5 min, and the supernatants were collected. The amount of released hemoglobin was measured by reading the absorbance at 405 nm and compared to the total extent of lysis obtained with 0.2% Triton X-100.

**CD Spectroscopy.** Circular dichroism (CD) experiments were performed using a Jasco J-810 spectropolarimeter (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan), coupled to a Peltier Jasco PFD-425S system for temperature control. Samples were prepared by diluting a stock aliquot of the peptides to different concentrations in deionized water or TFE/H<sub>2</sub>O mixtures or SDS micelles with the pH kept at 4.0. In the experiments carried out in the presence of SDS micelles, the SDS concentration was increased by addition of the required volume of a stock solution (400 mM SDS at pH 4.0). CD measurements were carried out using a 1 mm cell in the spectral range of 190–260 nm, at 37 °C. Each spectrum is the average of four consecutive scans. After baseline correction, concentration adjustment for dilution effects (in the case of SDS addition), and posterior confirmation of peptide concentration by amino acid analysis, the observed ellipticity,  $\theta$  (millidegrees), was converted to the mean residue molar ellipticity,  $[\theta]$  (degrees square centimeter per decimole). The percentage of  $\alpha$ -helix was calculated as described previously (18).

**NMR Spectroscopy.** The samples for NMR measurements were prepared by dissolving P2 and P5–P7 in 600  $\mu$ L of a TFE/H<sub>2</sub>O (30/70, v/v) mixture, containing 5% D<sub>2</sub>O, to yield a peptide concentration of approximately 1.2 mM at pH 4.0.

<sup>1</sup> Abbreviations: BMRB, BioMagResBank; CD, circular dichroism; cmc, critical micelle concentration; DQF-COSY, double-quantum-filtered correlation spectroscopy; LC<sub>50</sub>, peptide concentration producing 50% lysis; LPC, palmitoyllysophosphatidylcholine; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, nuclear Overhauser enhancement spectroscopy; rmsd, root-mean-square deviation; ROESY, rotating frame Overhauser spectroscopy; SDS, sodium dodecyl sulfate; TFE, trifluoroethanol; TOCSY, total correlation spectroscopy.

All two-dimensional  $^1\text{H}$  NMR experiments were carried out in a Varian INOVA AS500 spectrometer operating at 499.730 MHz for the  $^1\text{H}$  frequency at 37 °C. The proton chemical shifts were referenced to 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (0.00 ppm). To assign the peptide resonance peaks, standard methods were used, including double-quantum-filtered correlation spectroscopy (DQF-COSY) (19), total correlation spectroscopy (TOCSY) (20), nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY) (21, 22), and rotating frame Overhauser spectroscopy (ROESY) (23) experiments. The TOCSY spectra were acquired using a DIPSI spin-lock sequence at a field strength of 10 kHz and a spin-lock evolution time of 75 ms. NOESY spectra with mixing times of 150, 200, 300, and 400 ms were recorded to evaluate the spin diffusion. ROESY experiments were recorded with mixing times of 100 and 150 ms.

All two-dimensional experiments were acquired in the phase-sensitive mode using the method of States (24). The spectral width was typically 6000 Hz, and 256  $\tau_1$  increments, with 32 transients of 2048 complex points for each free induction decay, were recorded, except for the DQF-COSY experiment. It was collected with 1024  $\tau_1$  experiments with 32 transients of 8192 complex points. Water suppression was achieved by low-power continuous wave irradiation during the relaxation delay. Solvent suppression in ROESY experiments was achieved using the WATERGATE method (25). Data were processed on a Silicon Graphics Octane 2 workstation using the nmrPIPE/nmrVIEW software (26). Prior to Fourier transformation, the time domain data were zero-filled in both dimensions to yield a 4K  $\times$  2K data matrix. When necessary, a fifth-order polynomial baseline correction was applied after transformation and phasing. To obtain distance constraints, cross-peak volumes were estimated from the 300 ms (P2 and P6) or 400 ms (P5 and P7) NOESY spectra and 100 ms (P6) or 150 ms (P2, P5, and P7) ROESY spectra. To relate them to interproton distances, a calibration was made using the distance of 1.8 Å for the well-defined geminal  $\beta$ -protons, and the NOE volumes were classified as strong, medium, and weak, corresponding to the upper bound constraints of 2.8, 3.5, and 5.0 Å, respectively. Lower bounds were taken to be the sum of the van der Waals radii (1.8 Å) for the interacting protons in all cases.

**Molecular Modeling.** The three-dimensional structures of all peptides were computed using the simulated annealing methods in the DYANA refine module (27). The modeling protocol was based on the method implemented by Pristovšek et al. (28). Each round of refinement started with 20 random conformers, from which the 10 lowest-target function structures were used to analyze constraint violations and assign additional NOE constraints to be included in the subsequent calculation. This process was repeated until all violations were eliminated. In the final round of refinement, a total of 200 structures were calculated and the 40 conformers with the lowest target function were considered for analysis. After simulated annealing, these 40 structures with a target function smaller than  $0.11 \pm 0.010$  (P2),  $0.28 \pm 0.016$  (P5),  $0.20 \pm 0.020$  (P6), and  $0.17 \pm 0.016$  Å<sup>2</sup> (P7), with no distance violation larger than 0.2 Å and no dihedral angle violation greater than 5°, were energy minimized with a full consistent valence force field (29, 30) (Morse and Lennard-Jones potentials, Coulombic term) using, in the early stages of refinement, 1500 steps per structure and steepest

Table 1: Physical Properties of Trialysin-Derived C-Terminally Amidated Peptides

peptide	molecular mass <sup>a</sup> (Da)	charge <sup>a</sup>		mean hydrophobicity <sup>b</sup>		
		pH 7.0	pH 4.0	CSS <sup>c</sup>	Kyte–Doolittle <sup>d</sup>	Eisenberg <sup>e</sup>
P1	2782.5	+5.9	+6.1	-0.95	-0.23	-0.24
P2	2869.6	+7.9	+8.1	-2.07	-0.71	-0.41
P3	2822.6	+6.9	+7.1	-1.35	-0.45	-0.32
P4	2899.6	+7.9	+8.1	-1.76	-0.78	-0.39
P5	2896.6	+5.9	+6.3	-1.31	-0.72	-0.33
P6	3510.4	+7.9	+8.3	-1.15	-0.76	-0.35
P7	3041.8	+6.9	+7.3	-1.22	-0.9	-0.4
P6_1	3517.4	+8.9	+9.5	-1.24	-0.61	-0.35
P6_2	3431.2	+6.9	+7.5	-0.8	-0.53	-0.25

<sup>a</sup> Predictions made by Protean from the DNASTar package. <sup>b</sup> Calculated using the analysis tool of Tossi and Sandri (see <http://www.bbcm.units.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>). <sup>c</sup> As defined in ref 51. <sup>d</sup> As defined in ref 52. <sup>e</sup> As defined in ref 53.

descents until the maximum derivative was less than 1000 kcal/Å. In the final round, 15 000 steps were carried out using conjugated gradients until the maximum derivative was less than 0.001 kcal/Å. All calculations were carried out on a Silicon Graphics Octane 2 workstation using the DISCOVER software package, together with INSIGHT II as the graphic interface (Accelrys Inc., San Diego, CA). The quality of the final structures was analyzed using PROCHECK-NMR (31) and CNS (32).

## RESULTS

**Peptide Design.** Secondary structure prediction indicates that the N-terminal portion of the mature trialysin should form two amphiphilic  $\alpha$ -helices extending from Gly6 to Val32 and from Met34 to Val46 (Figure 1). As peptide P5 was shown to induce lysis of *T. cruzi* and erythrocytes (6), to search for the minimal lytic motif in this region, we selected and synthesized the peptides, in their amidated form, as shown in Figure 1. Table 1 reports the chemical and physical properties of the peptides.

**Biological Activities.** The peptide's lytic activity has been tested after incubation for 1 h at 37 °C against the trypomastigote form of *T. cruzi* (Figure 2A) and *E. coli* (Figure 2B) and after incubation for 2.5 h with human erythrocytes (Figure 2C). Parasite lysis was observed at 0.2  $\mu\text{M}$  P6, with 100% lysis at 2  $\mu\text{M}$ . Bacterial lysis started at 2  $\mu\text{M}$ , reaching total lysis at  $\sim 10$   $\mu\text{M}$ , while higher concentrations of P6 (from 50 to 200  $\mu\text{M}$ ) were required to lyse erythrocytes. Other peptides were less efficient. To compare the lytic activity of the various peptides, we estimated their LC<sub>50</sub> values (Table 2) and considered the value obtained for the most active peptide (P6) to be 100%. As reported in Figure 2D–F, the peptides encompassing the trialysin region, residues Phe1–Val32 (P5–P7; see Figure 1), are the most active ones. Interestingly, however, while P6 is the most effective of all against *T. cruzi*, in the case of *E. coli*, we found that P7 exhibits an activity that is only 50% lower and that P5 is as lytic as P6 against erythrocytes. Peptides P1–P3 encompassing regions of trialysin farther from the N-terminus, between residues Val16 and Lys52 (Figure 1), exhibit much lower activity against *T. cruzi*, and they are practically inactive against bacteria and erythrocytes. P4, residues Lys11–Gly37, has an intermediate activity toward all targets.

To quantify the specificity of an antimicrobial agent, it is common to use the therapeutic index. This parameter is the

Table 2: Lytic Activities of the Synthetic Peptides

peptide	LC <sub>50</sub> [ $\mu$ M ( $\mu$ g/mL)] <sup>a</sup>			safety index <sup>b</sup>	
	<i>T. cruzi</i>	<i>E. coli</i>	erythrocytes	erythrocytes/ <i>T. cruzi</i>	erythrocytes/ <i>E. coli</i>
P1	15 (41.7)	33 (91.8)	>900 (>2500)	—	—
P2	6 (17.2)	>50 (>143)	450 (1290)	75	—
P3	19 (53.6)	>50 (>141)	>900 (>2500)	—	—
P4	6 (17.3)	7.6 (22.0)	274 (794)	46	36
P5	1.6 (4.6)	9 (26.1)	117 (338)	73	13
P6	0.4 (1.4)	2.6 (9.1)	90 (316)	225	35
P7	1.3 (4.0)	5.2 (15.8)	296 (900)	227	57
P6_1	0.4 (1.4)	0.9 (3.2)	12.6 (44.3)	31.5	14.7
P6_2	0.9 (3.1)	1.7 (5.8)	28.1 (96.4)	31.2	16.3

<sup>a</sup> The LC<sub>50</sub> was taken from the curves of Figure 2 as the peptide concentration required to lyse 50% of the target cells. <sup>b</sup> Safety indexes were calculated using the LC<sub>50</sub> (micromolar) reported in this table when precisely determined.

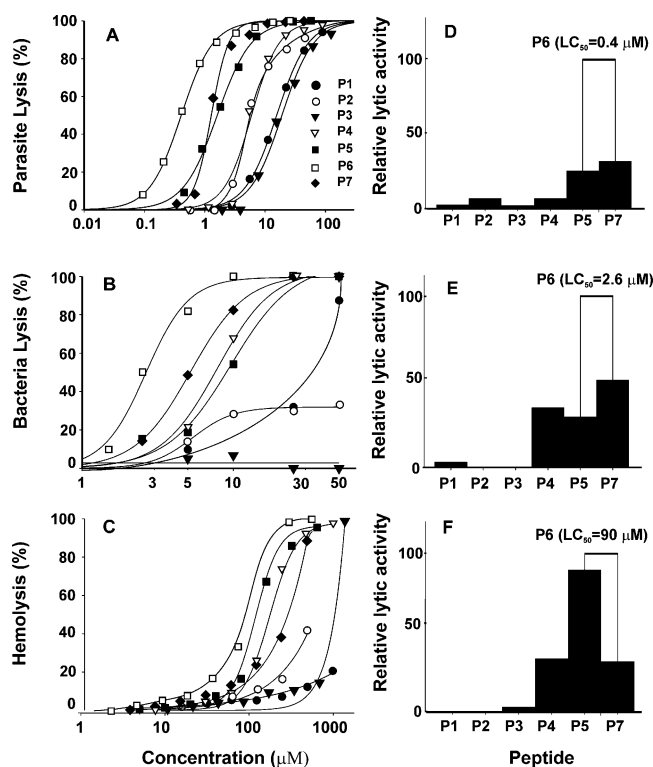


FIGURE 2: Peptide lytic activity. Peptides were incubated at 37 °C with trypomastigote forms of *T. cruzi* (A), *E. coli* (B), and human erythrocytes (C), at the indicated concentrations. Lysis was assessed after 1 h for *T. cruzi* and *E. coli* or 2.5 h for erythrocytes as described in Experimental Procedures. The LC<sub>50</sub> values obtained from the lysis curves were used to compare peptide activities for *T. cruzi* (D), *E. coli* (E), and erythrocytes (F). The LC<sub>50</sub> of the most active peptide (P6) is indicated as a white bar, and it has been taken to be 100%. The LC<sub>50</sub> values of the others peptides (black bars) have been plotted accordingly.

ratio of the minimal hemolytic concentration (MHC) and the minimal inhibitory concentration (MIC), the concentration that totally inhibits bacterial growth (33). Here, the analysis of the concentration dependence of the lytic activity reported in Figure 2 suggests that another possible way to effectively highlight the antimicrobial efficiency and the associated reduced hemolytic damage is the ratio between the LC<sub>50</sub> for erythrocytes and the one for bacteria or parasites, which we call the “safety index”. The larger the value, the better it is from a therapeutical point of view. Table 2 reports these values for the studied peptides. As can be seen, peptides P6 and P7 appear to be the ones with the best features, having a very low LC<sub>50</sub> and a high safety index.

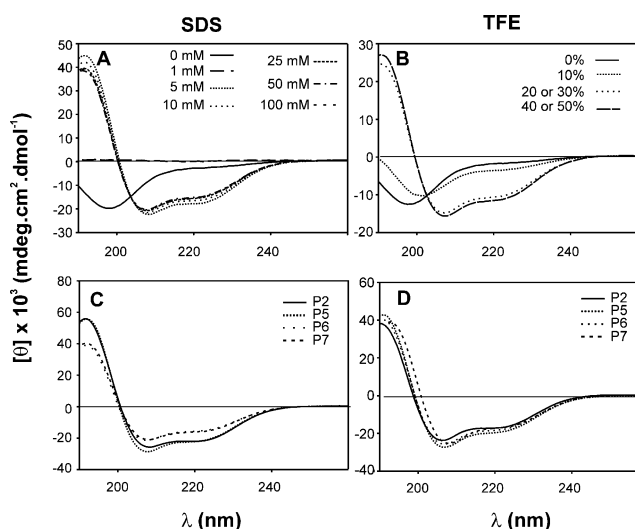


FIGURE 3: Peptide CD spectra. P6 was diluted to 70  $\mu$ M in the indicated concentrations of SDS (A) or TFE (B). Panels C and D show the spectra of 70  $\mu$ M P2 and P5–P7 in 100 mM SDS and 30% TFE. All experiments were carried out at 37 °C and pH 4.0, unless otherwise stated.

**CD Analysis.** All peptides in water exhibit a random coil conformation, and no peptide or salt concentration dependence has been detected (data not shown). However, in the presence of both SDS at concentrations above 5 mM (SDS cmc  $\sim$  3–4 mM) and a TFE/water mixture above 20% TFE (v/v), we found that they all fold into an  $\alpha$ -helical conformation as indicated by the two negative bands at 208 and 222 nm and by the positive one at 194 nm. Panels A and B of Figure 3 report, as an example, the titration of P6 with SDS and TFE, respectively. Panels C and D of Figure 3 report the CD spectra of P2 and P5–P7 in 100 mM SDS and in a 30% (v/v) TFE/water mixture, respectively. A similar CD pattern was observed also for P1, P3, and P4 (data not shown). CD spectra of P2 and P5–P7 indicate that, also in the presence of LPC micelles, the peptides acquire an  $\alpha$ -helical fold (data not shown).

**NMR Spectroscopy.** The initial attempts to determine the solution structure of P6 in SDS or LPC micelles were not successful. In fact, the resonance lines of the amide protons in the monodimensional <sup>1</sup>H NMR experiments turned out to be broad under all the experimental conditions that were tested (data not shown), thus suggesting that the peptide, at the concentration used for the NMR experiments, has a propensity to aggregate. The similarity of the peptides CD

spectra in TFE and in the presence of detergent micelles (Figure 3) suggest they acquire a comparable helical conformation, and because at this stage our goal was to determine the solution structure of the peptides in their monomeric state, the NMR experiments have been carried out in a TFE/H<sub>2</sub>O mixture (30/70, v/v). Peptides P5–P7 were selected as they are the most active and because their lytic activity evidenced a diverse selectivity for each of the chosen targets. We also determined the solution structure of P2 because it is practically devoid of activity against all targets.

The <sup>1</sup>H resonance sequential assignment was achieved on the basis of TOCSY, COSY, NOESY, and ROESY two-dimensional spectra, and the chemical shifts for each peptide have been deposited in the BMRB as accession numbers 6859, 6616, 6618, and 6619 for P2 and P5–P7, respectively.

**Secondary Structure.** The summary of the inter-residue NOEs is reported in Figure 4. Peptides P5–P7 present strong  $d_{NN}(i,i+1)$  NOEs together with a dense pattern of  $d_{\alpha N}(i,i+3)$ ,  $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ , and  $d_{\alpha N}(i,i+4)$  NOEs involving residues Lys11–Leu23, indicating they all possess an  $\alpha$ -helical fold in that region. However, while for P6 the  $\alpha$ -helix extends back to Gly6 and up to Ser27, for P5 the helix extends only from Lys24 to Val29. In the case of P7, in addition to the central  $\alpha$ -helical region common to the other two peptides, there is instead a slight indication of helical secondary structure involving residues Val8–Asp10. For P2, the intense  $d_{NN}(i,i+1)$  and the very dense  $d_{\alpha N}(i,i+3)$ ,  $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ , and  $d_{\alpha N}(i,i+4)$  pattern indicate the presence of an  $\alpha$ -helix encompassing most of the peptide, residues Lys25–Met44. For all peptides, the weaker  $d_{\alpha N}(i,i+1)$ , as compared to  $d_{NN}(i,i+1)$  connectivities, and a well-defined pattern of medium-range NOEs indicate that their central helical fold is quite stable.

**Molecular Modeling.** A total of 321, 384, 305, and 398 distance restraints, including 73, 74, 59, and 126 medium-range, for P5–P7 and P2, respectively, were used for structure calculations using DYANA (27). After energy minimization, 15 models for P5–P7 and 18 models for P2 were chosen on the basis of the lowest rmsd and used to represent the solution three-dimensional structure of each peptide. Table 3 summarizes the structural statistics of these four peptides. The Ramachandran plot analysis shows that all the  $\varphi$  and  $\psi$  angles are in allowed regions. In addition, there are no significant violations of molecular geometry parameters. Figure 5A shows the superimposition of the selected models for the three peptides in the Lys11–Leu23 region where they all exhibit an  $\alpha$ -helical fold as already suggested by the NOE pattern (Figure 4). The rmsd's for the backbone and for the heavy atoms are quite low (Table 3), confirming the good definition of the helix. As indicated by the NOE pattern (Figure 4), the  $\alpha$ -helical region extends differently in P5 with respect to P6 and P7. The rmsd's obtained for the superposition of residues Lys11–Val29 for P5 and Val8–Leu23 for P6 and P7 are still quite satisfactory, indicating that the helical fold is well-defined also in these extended regions (Table 3). A visual inspection of Figure 5A, however, evidences that the three peptides differ in the degree of conformational flexibility of their N- and C-termini, with P5 exhibiting a reduced spread. Figure 5B shows that peptide P2 exhibits a regular and well-defined  $\alpha$ -helical structure involving most of the peptide sequence, Lys25–Gly45, as indicated by the low rmsd (Table 3).

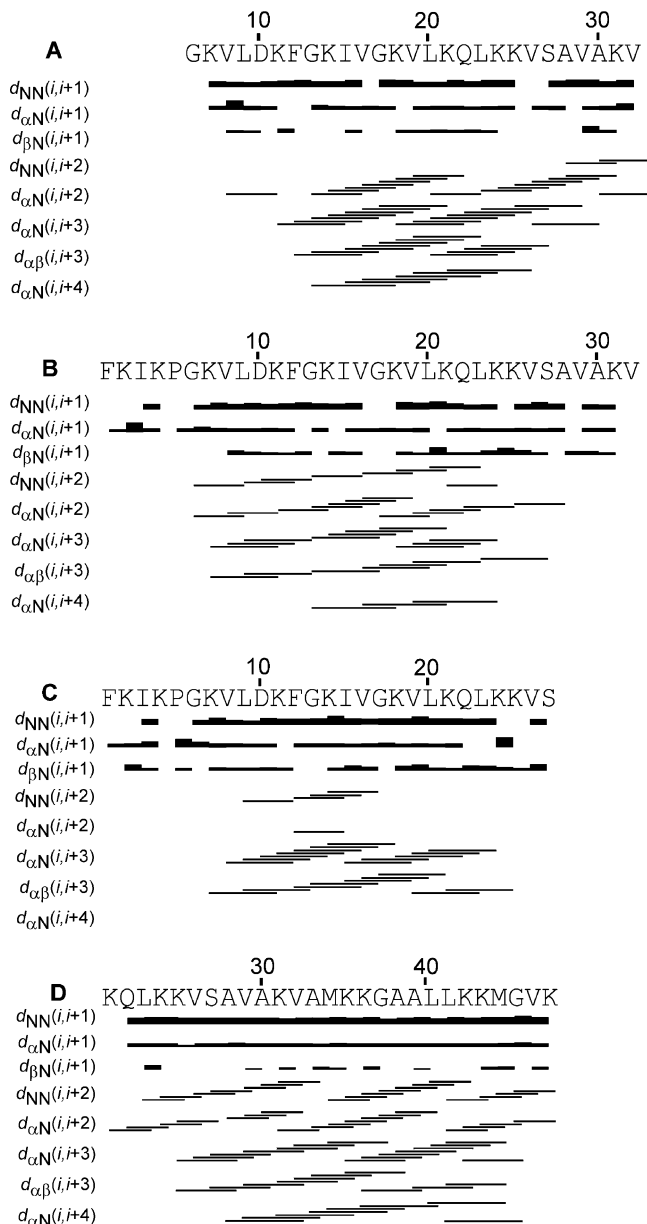


FIGURE 4: Summary of the sequential and medium-range NOE connectivities for P5 (A), P6 (B), P7 (C), and P2 (D) in a TFE/H<sub>2</sub>O (30/70, v/v) mixture at 37 °C and pH 4.0. Only the sequences of peptides P5–P7 are aligned. The intensities of the observed NOEs are represented by the thicknesses of lines and are classified as strong, medium, and weak, corresponding to upper bound constraints of 2.8, 3.5, and 4 Å, respectively.

Recognizing that P5–P7 present a structurally similar central region and that, perhaps, the origin of their differentiated lytic activity is associated with their N- or C-termini, we selected the minimum energy model of each peptide and superimposed their backbones. Figure 6A reports the results of this comparison. As seen here, besides the central region, P6 and P5 show a good superimposition in the Lys24–Ala30 region, with a rmsd for the backbone as low as 0.37 Å (Table 3). On the other hand, P6 and P7 exhibit a quite satisfactory superimposition in the Ile3–Asp10 region, where the rmsd = 1.14 Å (Table 3). Overall, a good superimposition is found in the Lys11–Ala30 and Lys2–Leu23 regions for P6 and P5, and P6 and P7, respectively (Table 3). Interestingly, a good match is found also for the side chains of the N- and C-terminal regions (Figure 6B,C).

Table 3: Structural Statistics of the NMR-Derived Structures of P2 and P5–P7

	P2	P5	P6	P7
no. of structures	18	15	15	15
no. of NOE-based distance constraints				
total distance	398	321	384	305
intraresidue	190	172	235	132
sequential	82	76	75	114
medium-range	126	73	74	59
rmsd from ideal covalent geometry				
bonds (Å)	—	0.0046	0.0036	0.0036
angles (deg)	—	0.5661	0.5123	0.4815
impropers (deg)	—	0.3147	0.1953	0.2411
dihedrals (deg)	—	26.6225	27.7814	27.7273
Ramachandran plot analysis				
most favored region (%)	86.5	87.5	82.7	85.1
additionally allowed region (%)	13.5	12.5	17.3	14.9
generously allowed region (%)	0	0	0	0
disallowed region (%)	0	0	0	0
rmsd (Å)				
backbone (residues) <sup>a</sup>	1.17 ± 0.31 (all)	0.43 ± 0.07 (11–29)	0.44 ± 0.20 (8–23)	0.20 ± 0.07 (8–23)
	0.40 ± 0.11 (25–45)	0.28 ± 0.06 (11–23)	0.28 ± 0.10 (11–23)	0.14 ± 0.04 (11–23)
heavy atoms (residues) <sup>a</sup>	2.16 ± 0.53 (all)	1.17 ± 0.15 (11–29)	1.18 ± 0.38 (8–23)	1.12 ± 0.20 (8–23)
	1.17 ± 0.18 (25–45)	0.96 ± 0.13 (11–23)	1.16 ± 0.37 (11–23)	1.18 ± 0.22 (11–23)
		rmsd (Å) (minimum energy)		
		P5 and P6	P6 and P7	
backbone (residues)		1.00 (11–30)	1.67 (2–23)	
		0.37 (24–30)	1.14 (2–10)	
heavy atoms (residues)		2.47 (11–30)	3.47 (2–23)	
		1.78 (24–30)	2.08 (2–10)	

<sup>a</sup> Values in parentheses correspond to the residues used for superimposition.

## DISCUSSION

In a previous work, we showed that the N-terminus of trialysin contains regions that must be involved with the protein antimicrobial/lytic activity (6). The data presented here evidence that, of the seven peptides that were tested, encompassing selected regions of the first 52 N-terminal residues, three of them, P5–P7, that map the trialysin Phe1–Val32 region exhibit remarkable lytic activity against *T. cruzi* trypanomastigotes, *E. coli*, and, to a lesser extent, erythrocytes. P4, corresponding to residues Lys11–Gly37, turns out to be poorly active against the parasite *T. cruzi*, although its lytic activity is comparable to that of P5 and P7 against bacteria and erythrocytes, respectively. P1–P3, covering the trialysin Val16–Lys52 region, are much less active against all targets.

These peptides have a comparable mass, and their total charges range between 5.9 and 7.9 at physiological pH. Moreover, their mean hydrophobicities, calculated using the various methods available at <http://www.bbcm.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>, do not evidence any significant difference that can be correlated to their diverse biological activity (Tables 1 and 2). Since the CD data indicate that they are all capable of acquiring a comparable helical fold both in TFE and in the presence of detergent micelles (Figure 3), we can infer that the peptide functional differences may be related to other conformational features.

Peptide antimicrobial activity is generally associated with their ability to acquire an amphipathic  $\alpha$ -helical conformation and to possess a positively charged surface. Indeed, as shown in Figure 7A, the hydrophobic/hydrophilic surfaces obtained using Insight II confirm that peptides P5–P7 acquire amphipathic structures. Interestingly, unlike P5, the nonlytic peptide P2 does not present a clear amphipathic nature

(Figure 8), which explains its poor lytic activity. Overall, these results confirm that the presence of an amphipathic helix is a requirement for expressing significant lytic activity (34). Despite its lytic activity against *E. coli* and erythrocytes, peptide P4, which has part of the amphipathic helix of P5, was not investigated because it is practically devoid of any lytic effect against trypanosomes.

By comparing the lytic efficiency of P5–P7, peptide P6 is the most potent of all with an LC<sub>50</sub> ranging from 0.4  $\mu$ M against *T. cruzi* up to 90  $\mu$ M against erythrocytes, a trend common to the three peptides. Interestingly, however, while P5 and P7 are much less effective than P6 against *T. cruzi*, P7 exhibits a significant activity against *E. coli*, being only half that observed for P6, and P5 is as active as P6 against erythrocytes. From a structural point of view, though they all share the same well-defined helical fold in their central part (Figure 5), it is worth noticing that the NMR data reveal that P6 and P5 exhibit the same structure in the C-terminus while P6 and P7 possess the same conformational organization in the N-terminus (Figure 6). In other words, P6 and P5 present a similar conformation in their central and C-terminal regions (rmsd for backbone residues Lys11–Ala30 = 1.00 Å), while P6 and P7 exhibit a superimposable backbone in their N-terminal and central regions (rmsd for backbone residues Lys2–Leu23 = 1.67 Å). These structural similarities at the N- and C-termini also involve the amino acid side chains (Figure 6B,C).

Recently, it has been proposed that the increasing peptide positive charge and amphipathicity are important for bacterial lysis while an increase in hydrophobicity correlates with erythrocyte lysis (33). Indeed, our results corroborate these reports as the analysis of the electrostatic surface of P5–P7 using MOLMOL (35) evidences they have large positively

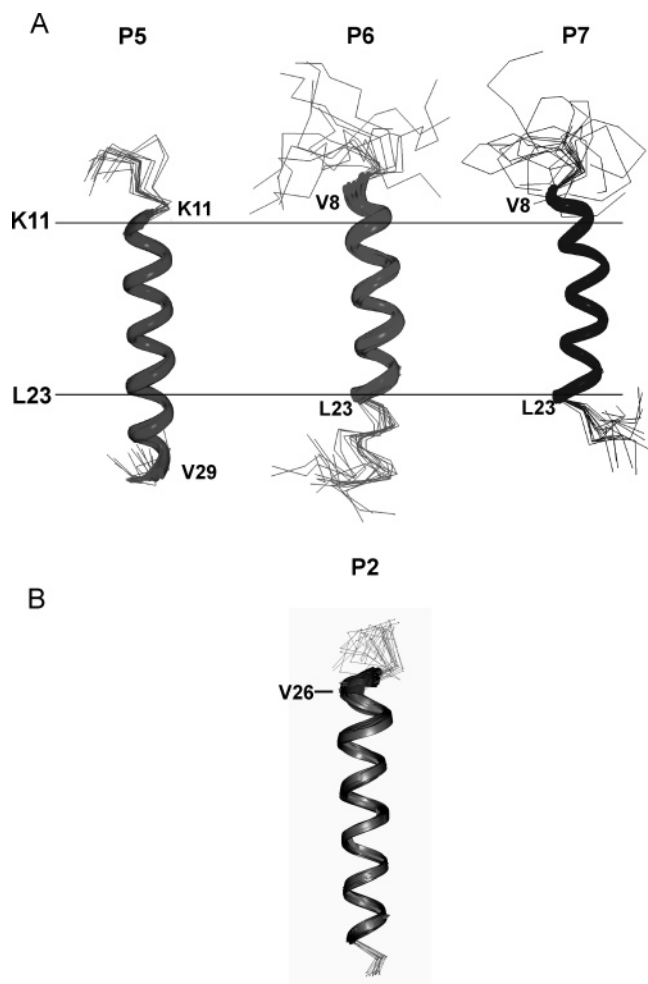


FIGURE 5: Peptide solution structure. (A) Backbone superposition of the final 15 minimum-energy models of P5–P7 in a TFE/H<sub>2</sub>O (30/70, v/v) mixture at 37 °C and pH 4.0. The horizontal lines indicate the position of residues Lys11 and Leu23 of peptides. (B) Backbone superposition of the final 18 minimum-energy models of P2 in a TFE/H<sub>2</sub>O (30/70, v/v) mixture at 37 °C and pH 4.0.

charged patches (Figure 7B), and in fact, they are more active against bacteria and parasites than against erythrocytes. In addition, inconsistent with the hypothesis of the existence of a direct correlation between peptide helicity and hemolytic activity (14), here we find that, despite the comparable helicity (Figure 5) and hydrophobicity (Table 1), P5–P7 exhibit diverse hemolytic activities as well as a diverse selectivity for bacteria and parasites, thus suggesting other factors must be considered. P2, on the other hand, is not amphipathic (Figure 8A). It is mainly neutral (Figure 8B) and, as a result, is devoid of any significant lytic activity against all targets.

Thus, we propose that the diversified lytic activity against the selected targets may be associated with the presence of specific structural details. The relatively higher antimicrobial/antiparasitic effectiveness (as revealed by the combined evaluation of the LC<sub>50</sub> and of the safety index) of P6 and P7, compared to that of P5, might be due to the presence of an N-terminal segment that folds into some nonconventional structural elements (bends or hydrophobic clusters), as it has been found for an antimicrobial peptide derived from bovine hemoglobin (36). In P5, the absence of this type of N-terminus and the concomitant presence of a more extended well-defined  $\alpha$ -helical arrangement in the C-terminus, present

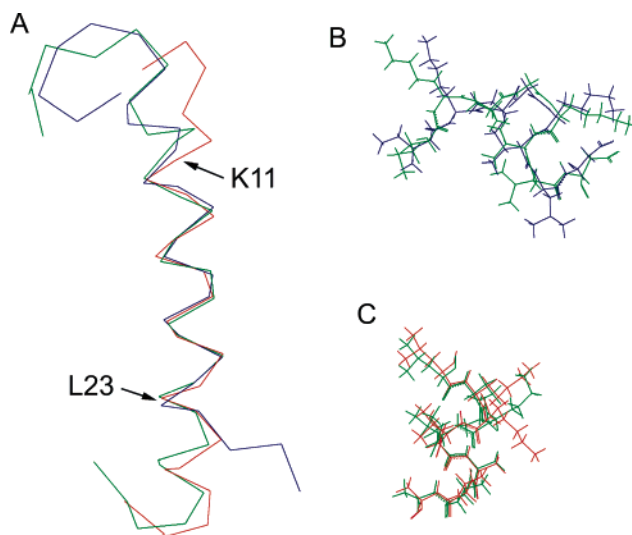


FIGURE 6: (A) Selective backbone superposition of P5–P7. (B) Superposition of the backbone and side chains, residues 3–10, of peptides P6 and P7. (C) Superposition of the backbone and side chains, residues 24–30, of peptides P5 and P6. The color coding is as follows: P6 colored green, P7 blue, and P5 red.

also in P6, could justify their similar high lytic activity against erythrocytes. The fact that P6 contains all these structural features would explain its overall higher lytic efficiency against all targets. Moreover, results showing that modifications introduced into the N-terminus of P6 reduced the safety index further support the notion of the role played by this peptide region. Interestingly, replacement of Pro5 and Gly6 with Ala and Ser, respectively, enhances the peptide's hemolytic activity, without affecting its trypanolysis efficiency (Table 2). Though proline is known to have a role in antimicrobial peptides when located in the middle of the peptide (37, 38), the effect observed in this case cannot be explained simply on the basis of a reduced backbone flexibility. In fact, substitution of Lys2 and Lys4 with Ser produces a comparable effect (Table 2).

Recognizing that the cell membrane is the main target of antimicrobial peptides, we may hypothesize that the diverse lipid composition and distribution or the presence of others components in the cell membrane of the various organisms play an important role in the modulation of peptide–membrane interaction, thus leading to the differentiation of their action. Indeed, while *T. cruzi* membrane composition is characterized mainly by zwitterionic/neutral lipids (39), the erythrocyte cell membrane contains a considerable amount of cholesterol, which confers rigidity to the membrane, and small amounts of negative lipids. In contrast, the *E. coli* plasma membrane contains a significant amount of negatively charged phospholipids, particularly 20% phosphatidylglycerol (40). More than that, while the surface of *T. cruzi* is covered by sialylated mucin-like glycoproteins (41), bacteria present lipopolysaccharides and erythrocytes glycoproteins. Indeed, it is well-known that peptides such as melittin, which has affinity for both anionic and zwitterionic lipids, exhibit a broad range of activity, from bacteria to erythrocytes (11), while magainin, which interacts selectively with the anionic lipids on the outer leaflet of the plasma membrane, is highly effective against microorganisms and a poor hemolytic agent (42). Thus, if we combine these observations with the fact that C-terminally amidated pep-

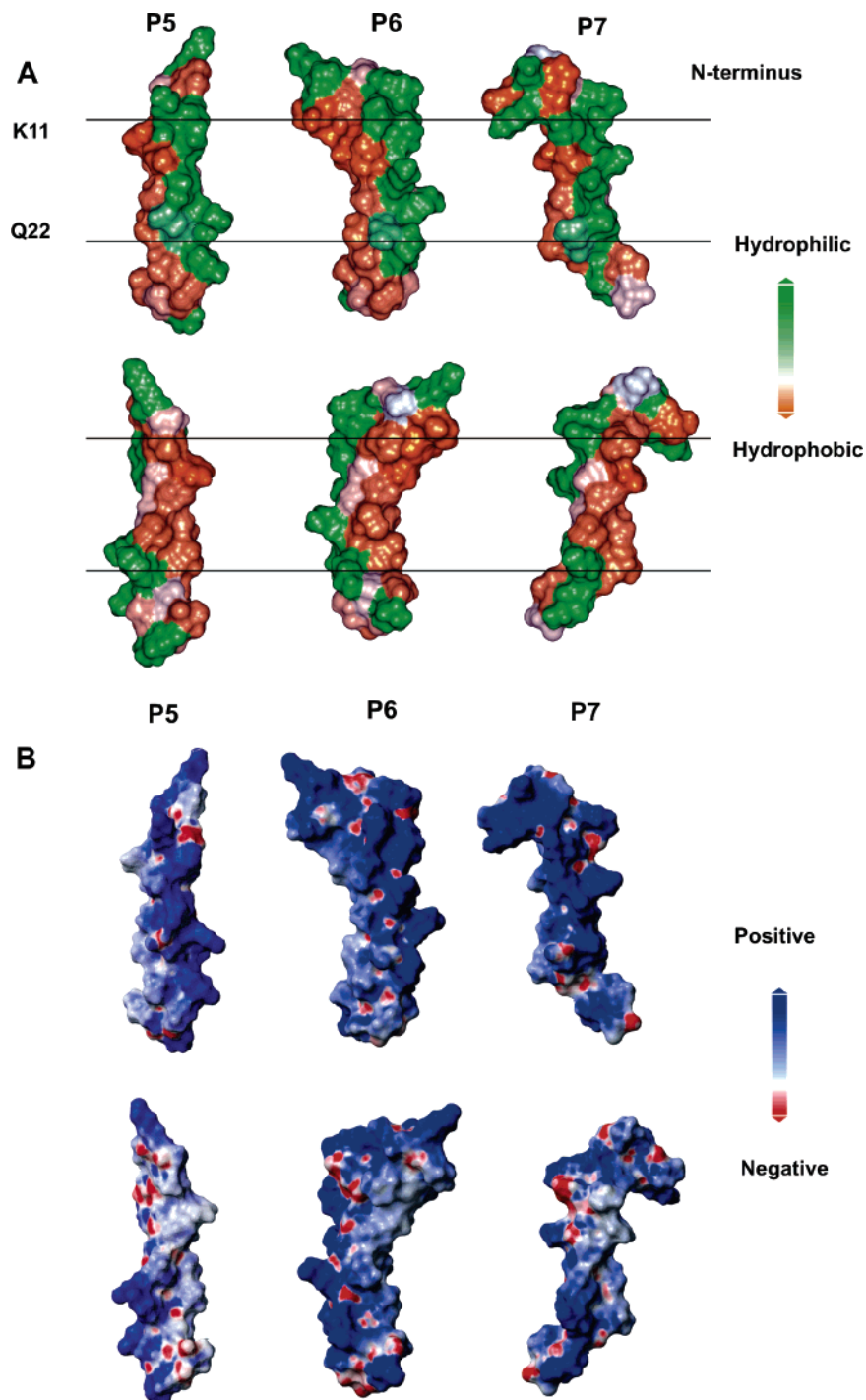


FIGURE 7: (A) Hydrophobic/hydrophilic surface obtained using Insight II (30) for the minimum-energy structure of P5–P7 in a TFE/H<sub>2</sub>O (30/70, v/v) mixture at 37 °C and pH 4.0. (B) The electrostatic surface of the peptides was obtained using MOLMOL (35). The bottom structures represent the peptides rotated 180° around their longitudinal axis.

tides exhibit an enhanced antimicrobial activity due to a reduced structural flexibility of the peptide C-terminal region (ref 12 and a manuscript in preparation), it is conceivable to envisage that the existence of a synergistic effect between the presence of structural details involving the peptide termini and the diverse lipid composition of the membrane that characterize the various antimicrobial peptide target organisms will lead to a differentiation of their selectivity and efficiency.

Overall, in view of the increasing bacterial resistance to conventional antibiotics, antimicrobial peptides have been identified as a promising alternative (43) as they act on a

target against which it is difficult to generate resistance, the plasma membrane. So far, they have been tested against a wide range of microorganisms, even cancer cells, but protozoa have often been overlooked with the exception of some applications in parasitic infections such as *Leishmania* spp. and the malaria-causing parasites, *Plasmodium* spp. (44). Melittin (45), magainins (46), cecropins (47), dermaseptins (48), phylloseptins (49), and even a peptide from NK-lysin, a T lymphocyte protein (50), are active against *T. cruzi* at concentrations ranging from 2.5  $\mu$ M (NK-2 peptide) to 20 mM (magainins). Since the goal is to devise molecules active against parasites and bacteria at very low concentrations that



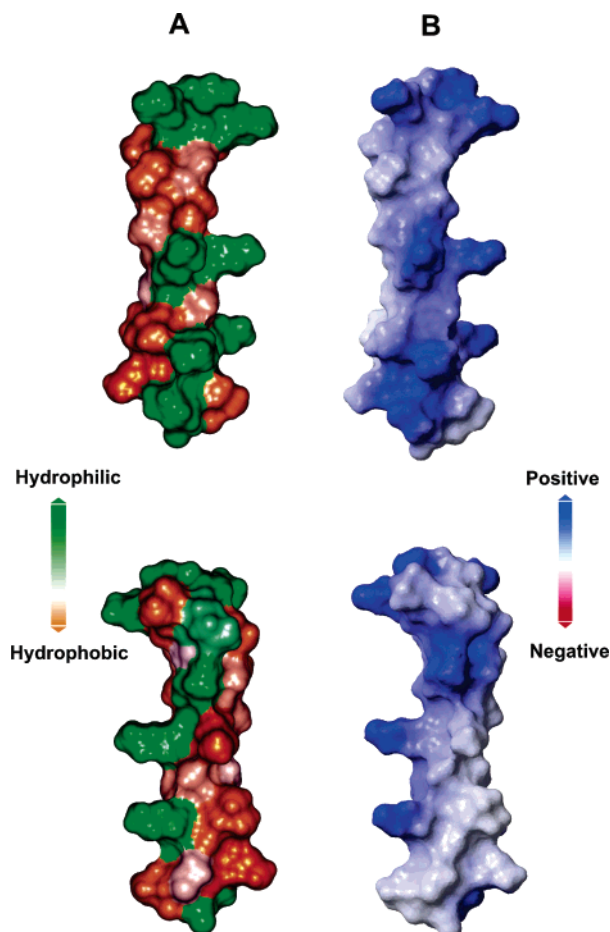


FIGURE 8: Minimum-energy NMR-derived solution structure of peptide P2. (A) The hydrophobic/hydrophilic surface was obtained using Insight II (30). (B) The electrostatic surface was obtained using MOLMOL (35). The bottom structures represent the peptides rotated 180° around their longitudinal axis.

are harmless to mammalian host cells, on the basis of this work, it appears that P7 and P6, due to their very low LC<sub>50</sub> against parasites and bacteria as well as their high safety index (Table 2), are promising peptides for biomedical application.

**ACKNOWLEDGMENT**

We thank Evania Barbosa Azevedo for technical support, Izaura Yoshico Hirata (Departamento de Biofísica, UNIFESP) for the peptide amino acid analysis, and Bruno dos Santos Pascoalino and Gabriel Andrade Alves for help with the bacterial lysis assays.

**REFERENCES**

1. Ribeiro, J. M. (1995) Blood-feeding arthropods: Live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4, 143–152.
2. Amino, R., Porto, R. M., Chammas, R., Egami, M. I., and Schenkman, S. (1998) Identification and characterization of a sialidase released by the salivary gland of the hematophagous insect *Triatoma infestans*. *J. Biol. Chem.* 273, 24575–24582.
3. Amino, R., Tanaka, A. S., and Schenkman, S. (2001) Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 465–472.
4. Dan, A., Pereira, M. H., Pesquero, J. L., Diotaiuti, L., and Beirao, P. S. (1999) Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) on sodium channels. *J. Med. Entomol.* 36, 875–879.

5. Pereira, M. H., Souza, M. E., Vargas, A. P., Martins, M. S., Penido, C. M., and Diotaiuti, L. (1996) Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Trop.* 61, 255–261.
6. Amino, R., Martins, R. M., Procopio, J., Hirata, I. Y., Juliano, M. A., and Schenkman, S. (2002) Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* 277, 6207–6213.
7. Lehrer, R. I., and Ganz, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 23–27.
8. Bulet, P., Töcklin, R., and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169–184.
9. Kuhn-Nentwig, L. (2003) Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2651–2668.
10. Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., and Boman, H. G. (1980) Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106, 7–16.
11. Dempsey, C. E. (1990) The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 143–161.
12. Sforça, M. L., Oyama, S., Jr., Canduri, F., Lorenzi, C. C., Pertinhez, T. A., Konno, K., Souza, B. M., Palma, M. S., Ruggiero, N. J., Azevedo, W. F., Jr., and Spisni, A. (2004) How C-terminal carboxamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. *Biochemistry* 43, 5608–5617.
13. Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5449–5453.
14. Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 55–70.
15. Dathe, M., and Wieprecht, T. (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 71–87.
16. Sitaram, N., and Nagaraj, R. (1999) Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 29–54.
17. Hirata, I. Y., Cezari, M. H. S., Nakaie, C. R., Boschov, P., Ito, A. S., Juliano, M. A., and Juliano, L. (1994) Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing *ortho*-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor–acceptor pairs. *Lett. Pept. Sci.* 1, 299–308.
18. Chen, Y. H., Yang, J. T., and Chau, K. H. (1974) Determination of the helix and  $\beta$  form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* 13, 3350–3359.
19. Piantini, U., Sorensen, O. W., and Ernst, R. R. (1982) Multiple Quantum Filters for Elucidating NMR Coupling Networks. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6800–6801.
20. Braunschweiler, L., and Ernst, R. R. (1983) Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 53, 521–528.
21. Kumar, A., Ernst, R. R., and Wüthrich, K. (1980) A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton–proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1–6.
22. Macura, S., and Ernst, R. R. (1980) Elucidation of Cross Relaxation in Liquids by Two-Dimensional Nmr-Spectroscopy. *Mol. Phys.* 41, 95–117.
23. Bax, A., and Davis, D. G. (1985) Practical Aspects of Two-Dimensional Transverse NOE Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 63, 207–213.
24. States, D. J., Haberkorn, R. A., and Ruben, D. J. (1982) A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in 4 Quadrants. *J. Magn. Reson.* 48, 286–292.
25. Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661–665.

26. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR* 6, 277–293.
27. Güntert, P., Mumenthaler, C., and Wüthrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA, *J. Mol. Biol.* 273, 283–298.
28. Pristovsek, P., Ruterjans, H., and Jerala, R. (2002) Semiautomatic sequence-specific assignment of proteins based on the tertiary structure—the program st2nmr, *J. Comput. Chem.* 23, 335–340.
29. Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V. A., Osguthorpe, D. J., Wolff, J., Genest, M., and Hagler, A. T. (1988) Structure and energetics of ligand binding to proteins: *Escherichia coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system, *Proteins* 4, 31–47.
30. *INSIGHT II User Guide* (1995) Biosym Technologies, San Diego.
31. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, *J. Biomol. NMR* 8, 477–486.
32. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr. D* 54 (Part 5), 905–921.
33. Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E., Vasil, M. L., and Hodges, R. S. (2005) Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index, *J. Biol. Chem.* 280, 12316–12329.
34. van't Hof, W., Veerman, E. C. I., Helmerhorst, E. J., and Amerongen, A. V. N. (2001) Antimicrobial peptides: Properties and applicability, *Biol. Chem.* 382, 597–619.
35. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graphics* 14, 31–32.
36. Sforça, M. L., Machado, A., Figueredo, R. C., Oyama, J. S., Silva, F. D., Miranda, A., Daffre, S., Miranda, M. T., Spisni, A., and Pertinhez, T. A. (2005) The Micelle-Bound Structure of an Antimicrobial Peptide Derived from the  $\alpha$ -Chain of Bovine Hemoglobin Isolated from the Tick *Boophilus microplus*, *Biochemistry* 44, 6440–6451.
37. Pukala, T. L., Brinkworth, C. S., Carver, J. A., and Bowie, J. H. (2004) Investigating the importance of the flexible hinge in caerin 1.1: Solution structures and activity of two synthetically modified caerin peptides, *Biochemistry* 43, 937–944.
38. Kobayashi, S., Chikushi, A., Tougu, S., Imura, Y., Nishida, M., Yano, Y., and Matsuzaki, K. (2004) Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2, *Biochemistry* 43, 15610–15616.
39. Uhrig, M. L., Couto, A. S., Alves, M. J., Colli, W., and de Lederkremer, R. M. (1997) *Trypanosoma cruzi*: Nitrogenous-base-containing phosphatides in trypomastigote forms—isolation and chemical analysis, *Exp. Parasitol.* 87, 8–19.
40. Cronan, J. E. (2003) Bacterial membrane lipids: Where do we stand? *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 203–224.
41. Chioccola, V. L. P., Acosta-Serrano, A., Almeida, I. C., Ferguson, M. A. J., Souto-Pradon, T., Rodrigues, M. M., Travassos, L. R., and 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.
42. Papo, N., and Shai, Y. (2003) Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* 24, 1693–1703.
43. Hancock, R. E. (2001) Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *Lancet Infect. Dis.* 1, 156–164.
44. Vizioli, J., and Salzet, M. (2002) Antimicrobial peptides versus parasitic infections? *Trends Parasitol.* 18, 475–476.
45. Azambuja, P., Mello, C. B., D'Escoffier, L. N., and Garcia, E. S. (1989) In vitro cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin towards different trypanosomatids, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 597–599.
46. Huang, C. M., Chen, H. C., and Zierdt, C. H. (1990) Magainin analogs effective against pathogenic protozoa, *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1824–1826.
47. Barr, S. C., Rose, D., and Jaynes, J. M. (1995) Activity of lytic peptides against intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in vitro and parasitemias in mice, *J. Parasitol.* 81, 974–978.
48. Brand, G. D., Leite, J. R., Silva, L. P., Albuquerque, S., Prates, M. V., Azevedo, R. B., Carregaro, V., Silva, J. S., Sa, V. C., Brandao, R. A., and Bloch, C., Jr. (2002) Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 277, 49332–49340.
49. Leite, J. R., Silva, L. P., Rodrigues, M. I., Prates, M. V., Brand, G. D., Lacava, B. M., Azevedo, R. B., Bocca, A. L., Albuquerque, S., and Bloch, J. (2005) Phylloseptins: A novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus, *Peptides* 26, 565–573.
50. Jacobs, T., Bruhn, H., Gaworski, I., Fleischer, B., and Leippe, M. (2003) NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against *Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 607–613.
51. Fauchere, J. L., Charton, M., Kier, L. B., Verloop, A., and Pliska, V. (1988) Amino acid side chain parameters for correlation studies in biology and pharmacology, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32, 269–278.
52. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
53. Eisenberg, D., Weiss, R. M., and Terwilliger, T. C. (1984) The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 140–144.

BI0514515

**Capítulo 3: Expressão em sistema heterólogo da trypsin e pró-trypsin recombinantes.**

## Resumo

Para entender o mecanismo de ação da trialisina seria imprescindível obtê-la na forma de proteína recombinante. Isto não só permitiria estudar melhor sua função, como obter dados estruturais que permitissem entender em maior detalhe como esta proteína, além de sua porção N-terminal induziria a permeabilização de células. Neste capítulo, descreveremos os resultados de tentativas de expressão, a maioria delas sem sucesso.

## Introdução

A cristalização e resolução estrutural de proteínas de membranas são um dos maiores desafios hoje na Biologia Estrutural. Cerca de 20 a 25% das fases abertas de leitura (*Open Reading Frames*: ORFs) em genomas seqüenciados correspondem a proteínas de membrana (Wallin e von Heijne, 1998) porém, numa estimativa de 2003, apenas 0,3 % das estruturas com resolução atômica depositadas no *Protein Data Bank* representavam proteínas integrais de membrana (Grisshammer e Tate, 2003). A maior parte dessas proteínas teve suas estruturas resolvidas devido às suas ocorrências naturalmente abundantes (Kiefer, 2003). A trialisina não possui nenhuma estrutura similar em banco de dados e possivelmente apresenta um tipo de dobramento inédito.

O sistema bacteriano foi nossa primeira escolha, pois a rapidez e rendimento obtidos eram fundamentais para que pudéssemos realizar os posteriores ensaios de cristalização, difração de raios-X e resolução da estrutura. Utilizamos diversos vetores e cepas de bactérias disponíveis, principalmente aqueles baseados na T7 RNA polimerase. Brevemente descreveremos os sistemas, as construções e os resultados obtidos:

- Sistema pET e T7 RNA Polimerase (Novagen)

Neste sistema, a bactéria hospedeira de um plasmídeo contendo a seqüência exógena a ser expressa possui um lisógeno viral ( $\lambda$ DE3) em seu genoma expressando a T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*. O plasmídeo inserido deverá então conter o gene de escolha sob controle de um promotor dessa enzima. A cepa de *E. coli* utilizada em nossos estudos foi a comercialmente disponível BL21, deficiente na expressão das proteases *lon* e *ompT*, contendo o lisógeno  $\lambda$ DE3. Em níveis basais, a BL21(DE3) conta com inibição da expressão da T7 RNA polimerase pelo repressor lac, produto do gene *lacI*. Para um controle mais rígido, utilizam-se os plasmídeos pLysS e pLysE, que codificam para a T7 lisozima, inibidora natural da T7 RNA polimerase expressa em níveis basais. Adicionando-se isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na cultura bacteriana, o repressor lac é inibido, acarretando expressão da T7 RNA polimerase em níveis tão altos que escapam do controle da T7 lisozima, havendo então a expressão do gene de escolha.

Os vetores pET contêm o promotor da T7 RNA polimerase para transcrição do gene exógeno inserido nas bactérias. Utilizamos o pET-14b e o pET-44a. O primeiro insere no N-terminal da proteína recombinante a ser expressa uma cauda de poli-histidinas (6 resíduos), facilitando posteriormente sua purificação em colunas de afinidade a níquel e um sítio para clivagem pela protease trombina (para efetuar a clivagem da cauda poli-Hys). O segundo insere a chaperonina bacteriana NusA no N-terminal da proteína recombinante, visando solubilizar a proteína a ela fusionada, três caudas de poli-histidinas: no N-terminal e no C-terminal da NusA, outra no C-terminal da proteína de interesse, um sítio de trombina e outro de enteroquinase para clivagem da proteína de fusão.

Outras cepas de *E. coli* utilizadas foram a Rosetta(DE3) e a BL21(DE3). A Rosetta(DE3) possui um plasmídeo contendo sete seqüências de tRNAs contendo códons raros de *E. coli* (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC e CGG), facilitando a expressão de

proteínas que contêm esses códons em suas seqüências. BL21*trxB*(DE3) possui uma mutação na tiorredoxina redutase, facilitando a formação de pontes dissulfeto intracelularmente.

#### -Sistema pBAD/gIII e o operon da arabinose (Invitrogen)

No operon da arabinose, AraC é uma proteína que pode reprimir ou ativar a transcrição do promotor *araBAD*. Na presença de L-arabinose, AraC se liga ao açúcar aumentando sua afinidade aos sítios I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> do promotor, ativando a transcrição dos genes sob seu controle. A ativação é aumentada quando os níveis de 3'-5' monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) são aumentados: essas moléculas se ligam à proteína ativadora por AMPc (CAP, acrônimo de *cAMP activator protein*), que aumenta a afinidade de AraC pelos sítios I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> do promotor. Na ausência do indutor, AraC se liga a dois outros sítios do promotor, O<sub>1</sub> e O<sub>2</sub>, reprimindo a transcrição. Quando glicose é adicionada ao meio de cultura, há redução nos níveis de AMPc, impedindo a ação da CAP, aumentando a repressão transcricional. Utilizamos o vetor pBAD/gIII, que adiciona no N-terminal da proteína recombinante a seqüência de secreção periplasmática pIII, do bacteriófago fd e uma cauda de poli-histidinas no C-terminal.

#### - Sistema pGEX (Amersham)

Nos plasmídeos da série pGEX, a glutathiona S-transferase (GST) é fusionada no N-terminal da proteína de interesse. Assim, a proteína de fusão gerada pode ser purificada em cromatografia de afinidade, utilizando uma resina contendo radicais tióis (-SH), eluindo-se com gradiente de glutathiona reduzida. Testamos dois plasmídeos da série: pGEX-6P3 e pGEX-2T, cujas diferenças estão nos sítios de clivagem de proteases. No primeiro, há um sítio para a protease PreScission (Amersham), enquanto no segundo há um sítio para trombina entre GST e a proteína recombinante. O promotor utilizado é o Ptac, uma modificação do

promotor lac, portanto não há necessidade de se utilizar uma bactéria hospedeira expressando T7 RNA polimerase. O controle da expressão basal não é tão rígido quanto no sistema pET.

- Levedura *Pichia pastoris* (Invitrogen)

O sistema de expressão heteróloga de *P. pastoris* baseia-se na recombinação do gene de interesse no *locus* da enzima álcool oxidase (AOX), que é induzida quando a única fonte nutricional de carbono fornecida é metanol. Para isso, é necessário clonar o gene de interesse em vetores que posteriormente serão digeridos com enzimas de restrição apropriadas, liberando os fragmentos que recombinarão no *locus aox*. Clonamos nossas construções em dois vetores diferentes, que utilizam duas diferentes vias de secreção para o meio de cultura: pPIC9 e pHIL-S1. Assim, as leveduras corretamente recombinadas expressariam a proteína recombinante quando induzidas na presença de metanol. A seleção de recombinantes é realizada pela marca biossintética da *his4*: apenas existente nas leveduras que incorporaram o DNA exógeno.

## **Materiais e métodos**

- Lista de oligonucleotídeos iniciadores (utilizados em clonagens e seqüenciamentos)

Tabela 1 – oligonucleotídeos utilizados nas clonagens e seqüenciamentos das construções realizadas.

Nome	Seqüência	Vetor	Função
<i>NdeLys30</i>	5' GCC ATA TGT TCA AGA TAA AAC CGG GGA AAG 3'	pET-14b	Adicionar sítio para <i>Nde I</i> no terminal 5' da triaisina madura

<i>BamLys30</i>	5' CGG GAT CCT TAA TCA ATT TCA ACT TCA TC 3'	pET-14b	Adicionar sítio para <i>Bam HI</i> no terminal 3' da trisialina madura
<i>Nde-PL5</i> ( <i>AEYELDE</i> )	5' GCC ATA TGG CTG AAT ATG AAC TTG ATG AAA C 3'	pET-14b	Adicionar sítio para <i>Nde I</i> no terminal 5' da pró-trisialina
<i>NDEPL5-99</i>	5' CAT ATG GGT GTG AAG ATC AGC CC 3'	pET-14b	Adicionar sítio <i>Nde I</i> no terminal 5' do fragmento não lítico
<i>NcoPL5-23</i>	5' CCA TGG CTG AAT ATG AAC TTG ATG AAA C 3'	pBAD/gIII C	Adicionar sítio <i>Nco I</i> no terminal 5' da pró-trisialina
<i>Not5PL</i>	5' TGC GGC CGC TTA ATC AAT TTC AAC TTC ATC 3'	pBAD/gIII C pPIC9K/ pPIC9	Adicionar sítio <i>Not I</i> no terminal 3' da pró-trisialina
BAMH15L30	5' CGG ATC CTT TAA GAT TAA ACC TGG 3'	pGEX	inserção de sítio <i>Bam HI</i> no 5' da trisialina madura
BAMH15P15	5' CGG ATC CGC TGA ATA TGA ACT TG 3'	pGEX/ pHIL-S1	inserção de sítio <i>Bam HI</i> no 5' da pró-trisialina
ECOR13LYS	5' CGA ATT CTT AAT CAA TTT CAA CTT C 3'	pGEX	inserção de sítio <i>Eco RI</i> no 3' da trisialina
Eco5PL pPic9k	5' TAG AAT TCG CTG AAT ATG AAC TTG ATG 3'	pPIC9K/ pPIC9/ pHIL-S1	Inserir sítio <i>Eco RI</i> no 5' da pró-trisialina
EcoRIFWDHYS	5' GGA ATT CAT GGG CAG CAG CC 3'	pPIC9/ pHIL-S1	Inserir sítio <i>Bam HI</i> no 5' da cauda de histidinas de pET-14b
NdeP2	5' GCA TAT GAA ACA ATT AAA GAA AGT TAG	pET-14b	Inserir sítio <i>Nde I</i> no 5' da trisialina iniciando no peptídeo



	3'		P2 (resíduo 11)
NdeP3	5' GCA TAT GGT TGG TAA AGT TCT AAA AC 3'	pET-14b	Inserir sítio <i>Nde I</i> no 5' da trialisina iniciando no peptídeo P3 (resíduo 16)
NdeP4	5' GCA TAT GAA ATT TGG G 3'	pET-14b	Inserir sítio <i>Nde I</i> no 5' da trialisina iniciando no peptídeo P4 (resíduo 21)
Nde32	5' GCA TAT GGT GGC TAT GAA GAA AGG 3'	pET-14b	Inserir sítio <i>Nde I</i> no 5' da trialisina iniciando no resíduo 32
T7 promoter	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA 3	pET-14b/ pGEM-T Easy	Seqüenciar a partir do terminal 5'
T7 terminator	5' CTA GTT ATT GCT CAG CGG 3'	pET-14b	Seqüenciar a partir do terminal 3'
SP6 promoter	5' ATT TAG GTGACA CTA TAG 3'	pGEM-T Easy	Seqüenciar a partir do terminal 3'
M13 forward	5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'	pCR 2.1 TOPO	Seqüenciar a partir do terminal 5'
M13 reverse	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'	pCR 2.1 TOPO	Seqüenciar a partir do terminal 3'
PBAD forward	5' ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC 3'	pBAD/ gIII	Seqüenciar a partir do terminal 5'
5'AOX	5' GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC 3'	pPIC9K	Seqüenciar a partir do terminal 5' do gene inserido
3'AOX	5' GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC 3'	pPIC9K	Seqüenciar a partir do terminal 3' do gene inserido

- Clonagens

Todas as clonagens e métodos descritos são bem estabelecidos e se baseiam nos métodos listados em (Sambrook et al., 1989). Utilizamos os clones L30 ou p15 (respectivamente da trypsinase madura e precursora, números de acesso Genbank: AAL82380 e AAL82381) obtidos em nosso laboratório previamente (Amino et al., 2002) nos plasmídeos pGEM-T Easy (Promega) como moldes em reações de cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) e diferentes oligonucleotídeos iniciadores para inserção de diferentes sítios de enzimas de restrição, dependendo dos plasmídeos de expressão a serem utilizados, para amplificar os fragmentos desejados. Esses foram purificados a partir de géis de agarose 1% em solução tampão TAE (40 mM Tris-Acetato 1 mM EDTA) utilizando Sephaglas BandPrep kit (Amersham) ou QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e ligados nos vetores de clonagem pGEM-T Easy ou pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). A ligação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes pelo método do CaCl<sub>2</sub> (Sambrook et al., 1989), plaqueadas nos meios de cultura contendo os antibióticos apropriados. Clones com padrão de restrição esperado foram selecionados, seqüenciados, crescidos para obtermos DNA plasmidial em quantidade, digeridos com as enzimas de restrição necessárias (Fermentas) e os insertos liberados foram purificados para ligação nos plasmídeos desejados previamente digeridos com as enzimas de restrição apropriadas. As ligações foram realizadas com o Rapid DNA Ligation Kit (Promega) e utilizadas para transformar bactérias DH5 $\alpha$ . Clones esperados foram identificados por seqüenciamento e o DNA extraído de um deles, utilizado para transformar bactérias de expressão. No caso da levedura *P. pastoris*, as construções corretas foram digeridas com as enzimas apropriadas e a digestão total monitorada por eletroforese em géis de agarose. A quantidade de DNA necessária para eletroporação das leveduras foi precipitada por isopropanol/NaCl (Sambrook) e o DNA obtido foi ressuspensionado em 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O desionizada e estéril para transfecção (de acordo com o fabricante, Invitrogen).

- Reação de seqüenciamento em ABI-Prism 377

Todas as construções foram checadas para detecção de possíveis erros da DNA polimerase ou mesmo de mutações ocorridas nas transformações. Cerca de 100 ng das construções obtidas por lise alcalina ou fervura (Sambrook et al., 1989) foram submetidas a reações de PCR com apenas um oligonucleotídeo iniciador para cada reação e BigDye Sequencing Reagent (Applied Biosystems). Após as reações, o DNA era precipitado com etanol 80% e submetido à eletroforese em ABI-Prism 377. Os resultados foram analisados com o software DNASTar.

- Expressão de proteínas bacterianas

Alguns clones eram escolhidos para análise de expressão das proteínas recombinantes: as colônias isoladas eram crescidas em 2 ml dos meios apropriados (Luria-Bertani, Terrific Broth, 2X YT, RM [para pBAD- *E. coli* LMG194]) por cerca de 8 h a 37°C sob agitação e alíquotas eram reservadas para congelamento com 20% glicerol. Após crescimento durante a noite, as culturas eram inoculadas em novos meios de cultura (10% volume) e crescidas até atingirem densidade óptica ( $\lambda = 600$  nm) de 0,6. Os indutores eram então adicionados e as condições de cultura alteradas, se necessário (mudança de temperatura: 30°, 25°C, variação de concentração de indutor). IPTG era utilizado até 1 mM e L-arabinose até 0,2%. Após diferentes tempos de incubação, alíquotas eram retiradas para análise de expressão em géis de SDS-PAGE comparando-se com culturas não induzidas.

- Expressão em *P. pastoris*

O protocolo do fabricante (Invitrogen) foi seguido. Resumidamente, após eletroporação das leveduras GS115 e seleção de recombinantes por auxotrofia de histidina

(gene *his4*), diversos clones obtidos foram verificados quanto à presença dos genes desejados por reações de PCR. Aqueles recombinados eram então crescidos em meio sem metanol a 30°C sob agitação e depois induzidos com a adição do álcool 1% e retirada de demais fontes de carbono do meio por até 7 dias com constante adição de metanol. Análise dos sobrenadantes das culturas foi realizada em SDS-PAGE.

#### - SDS-PAGE e imunoblot

A análise de expressão era realizada em géis de SDS-PAGE em concentrações de acrilamida variando de 10% (fusão com NusA) a 15%. A preparação dos géis era feita de acordo com Sambrook e corada com Coomassie Brilliant Blue (0,02% CBB R250 em etanol:ácido acético:água 4:1:4). Para imunoblots realizados com soros anti-trialisina, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra (GE Healthcare) e as reações imunológicas foram realizadas de acordo com Harlow (Harlow e Lane, 1988).

#### - Obtenção da pró-trialisina recombinante em fusão com GST (GST-p15)

Para obter a pró-trialisina em fusão com GST no vetor pGEX-6P3, a bactéria BL21 (DE3) pLysE transformada com o plasmídeo foi crescida a 37°C durante a noite a 200 rpm em 200 ml de meio LB contendo 100 µg/ml ampicilina, 34 µg/ml cloranfenicol e 10 µg/ml kanamicina. No dia seguinte, essa cultura foi utilizada para inocular 2 l do mesmo meio com os mesmos antibióticos e crescida a 37°C por 5 h. A indução era feita com 0,1 mM IPTG por 3 h a 23°C. A cultura era então centrifugada a 3000 g por 10 min, o precipitado de células era ressuspenso em 100 ml de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 5 mM EDTA) e sonificado no gelo utilizando 10 ciclos de 15 s na máxima potência com intervalos de 1 min cada em um sonicador Branson Sonifier 450. A seguir, 0,1 % Triton X-100 (vol/vol) era adicionado e o lisado, submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento (-

80°C/37°C). O sobrenadante obtido por centrifugação a 15000 g por 20 min era aplicado em uma coluna de 1ml de resina de Glutathione-Sepharose 4B (Amersham), pré-equilibrada no tampão de lise contendo 0,1 % Triton X-100. A coluna era lavada com 50 volumes do mesmo tampão e a eluição realizada durante a noite a 4°C com 3 volumes de tampão de lise contendo 20 mM glutathione reduzida.

A GST-p15 produzida por bactérias DH5 $\alpha$  transformadas com a construção em pGEX-2T foi expressa a partir de um pré-inóculo de 2 ml crescidos durante a noite em LB contendo 100  $\mu$ g/ml ampicilina a 37°C a 200 rpm, inoculado em 200 ml do mesmo meio de cultura. A cultura era crescida nas mesmas condições até atingir densidade óptica ( $\lambda = 600$  nm) de 1,5, quando eram adicionados 0,1 mM IPTG. A indução transcorria por uma noite a 30°C sob agitação de 200 rpm. O processamento da cultura e purificação da proteína foram realizados como descrito acima.

- Obtenção da pró-trialisina em fusão com NusA (NusA-p15)

Um clone de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção da pró-trialisina no vetor pET-44a foi crescido em 20 ml de meio LB contendo 100  $\mu$ g/ml ampicilina a 37°C a 200 rpm por uma noite. Essa cultura foi utilizada para inocular 200 ml do mesmo meio até atingir densidade óptica ( $\lambda = 600$  nm) de 1,5. A indução com 0,5 mM IPTG foi realizada por 5 h. A cultura foi então centrifugada por 10 min a 3000 g e o precipitado ressuscitado em 100 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,3 M NaCl e sonicado (idem à GST-p15). O sobrenadante foi obtido após centrifugação a 15000 g por 20 min e aplicado em 1 ml da resina Ni-NTA (Qiagen) pré-equilibrada na mesma solução utilizada para ressuspender as células. O sobrenadante eluído foi reaplicado à coluna por mais duas vezes e então a coluna foi lavada com 200 volumes da mesma solução contendo 5 mM imidazol. A eluição foi realizada com a mesma solução contendo 300 mM imidazol em frações de 1 ml.

- Clivagem das proteínas de fusão

GST-pl5: A protease PreScission (20 unidades/ml) foi adicionada na resina Glutathione-Sepharose contendo a proteína recombinante obtida com o vetor pGEX-6P3. A protease era também retida na coluna que foi lavada com tampão de digestão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,0, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA e 1 mM DTT e incubada a temperatura ambiente por 12 a 15 h, de acordo com o fabricante (Amersham). A proteína recombinante sem a GST era então eluída com o tampão de digestão e detectada por SDS-PAGE. Para verificar a proteína total, 5 µl da resina eram também analisados por SDS-PAGE.

Na construção GST-pl5 em pGEX-2T e NusA-pl5 em pET-44a, a proteína eluída foi incubada com trombina em diferentes proporções de enzima e substrato em tampão de clivagem de trombina que continha 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,15 M NaCl e 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, como sugerido pelo fabricante da protease (Novagen). As clivagens foram feitas entre as temperaturas de 20°C e 37°C por até 20 h. A análise da clivagem foi realizada por SDS-PAGE e imunoblot.

- Ativação das proteínas recombinantes com triapsina

A triapsina da saliva de *T. infestans* foi parcialmente purificada a partir de 100 µl da saliva coletada dos insetos, de acordo com Amino (Amino et al., 2001). Apenas o último pico de atividade, correspondente à triapsina eluído da coluna HiTrap Q contendo atividade amidolítica usando como substrato o cromógeno S-2288 (Cromogenix) foi utilizado para clivar as proteínas recombinantes, com ou sem as proteínas de fusão. A incubação era realizada durante a noite a 37°C e a clivagem, analisada por imunoblot e em ensaios de atividade lítica contra tripomastigotas de *T. cruzi*.

## Resultados

- Sumário das tentativas de expressão

Na tabela II apresentamos um sumário das diferentes tentativas de expressão de trialisina e seu precursor.

Tabela 2 – Vetores, insertos e bactérias hospedeiras utilizados para expressão de diferentes formas da trialisina. Resultados e observações relevantes estão narrados.

Vetor	Características	Inserto	Bactéria	Resultado	Observações
pET-14b	proteína recombinante com cauda de histidinas no N-terminal e sítio de clivagem por trombina	Trialisina madura	BL21 (DE3) pLysS	Não transforma	
			BL21 (DE3) pLysE	Poucos transformantes	Sem expressão
		Pró-trialisina	BL21 (DE3) pLysS	Não transforma	
			BL21 (DE3) pLysE	Alguns transformantes	Produto sem atividade
			BL21 <i>trxB</i> (DE3) pLysE	Quantidade maior de transformantes	Bactérias morrem após indução, recombinante não detectado
		Fragmento não lítico (NL2)	BL21 (DE3) pLysS	Expressão	Não utilizado
			BL21 (DE3) pLysE	Expressão maior que pLysS	Recombinante insolúvel, utilizada para imunização
		Fragmento Tria32 (iniciando no 32º resíduo da trialisina madura)	BL21 (DE3) pLysE	Não transforma	

		Fragmento TriaP4 (iniciando no 21º resíduo da trialisina madura)	BL21 (DE3) pLysE	Não transforma	
		Fragmento TriaP3 (iniciando no 16º resíduo da trialisina madura)	BL21 (DE3) pLysE	Não transforma	
		Fragmento TriaP2 (iniciando no 11º resíduo da trialisina madura)	BL21 (DE3) pLysE	Não transforma	
pET-44a	proteína recombinante fusionada à NusA com caudas de histidinas e sítio de trombina	Trialisina madura	BL21 (DE3)	Expressão	Recombinante solúvel, inativo
		Pró-trialisina	BL21 (DE3)	Expressão	Recombinante solúvel, ativável pela triapsina, inativa
pBAD/gIII C	proteína recombinante periplasmática, cauda de histidinas no C-terminal,	Pró-trialisina	LMG194	Transformantes	Após indução, morte e não detecção de recombinante
pPIC9/ pPIC9K/ pHIL-S1	recombinante secretada	Pró-trialisina	<i>P. pastoris</i> GS115	Transformantes, expressão de proteína	Proteína inativa, instável e recombinação do gene
pGEX-6P3	recombinante fusionada à GST, sítio da protease PreScission	Trialisina madura	BL21 (DE3) pLysS	Transformantes	Não detectada proteína recombinante
		Pró-trialisina	BL21 (DE3) pLysE	Transformantes	Proteína expressa, instável.



pGEX-2T	recombinante fusionada à GST, sítio da protease trombina	Pró-trialisina	DH5 $\alpha$ , Rosetta(DE3)	Expressão	Recombinante solúvel, instável, clivado pela triapsina, inativo
---------	--	----------------	-----------------------------	-----------	---

- Expressão da trialisina e pró-trialisina com cauda de poli-histidinas no N- e C-terminais e formas truncadas

Utilizando os vetores pET-14b e pBAD/gIII C, pretendíamos obter as proteínas recombinantes na forma mais simples possível: apenas com uma cauda de poli-histidinas para facilitar posterior purificação. Entretanto, embora obtivéssemos clones de bactérias de expressão transformados com as construções (com exceção da trialisina madura, em que não se obtiveram transformantes), em diversas condições de cultura não detectamos as proteínas recombinantes. Observamos que as bactérias, ao induzirmos a cultura a expressar ambas as proteínas, sofriam lise, como mostrado nos gráficos 1A e B.

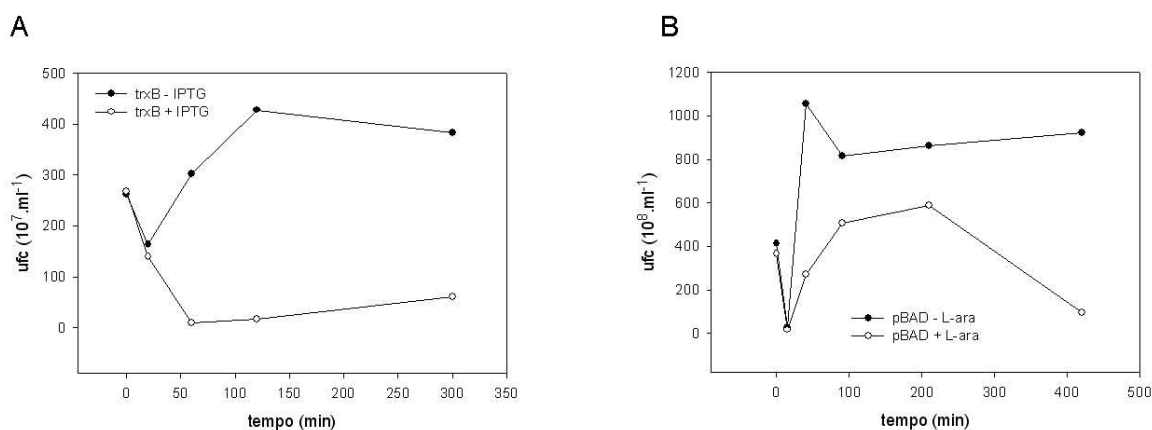


Gráfico 1 – Bactérias morrem ao serem induzidas a expressar a pró-trialisina. Bactérias BL21 (DE3) pLysE contendo a construção pET-14b-pl5 (A) e LMG194 contendo pBAD/gIII C-pl5 (B) foram crescidas e induzidas com IPTG e L-arabinose, respectivamente. A partir da indução, alíquotas das culturas foram retiradas e plaqueadas nos meios apropriados para determinação do número de bactérias vivas (ufc = unidades formadoras de colônias). As placas foram incubadas durante a noite a 37°C e as colônias resultantes foram contadas.

Já que tínhamos evidências do papel do N-terminal da trialisina madura na lise, realizamos uma série de construções no vetor pET-14b suprimindo diferentes regiões do N-terminal da molécula. Foram feitas construções que continham a seqüência a partir dos aminoácidos Lys11, Val16, Lys21, Val32 e Met44 da trialisina madura (triaP2, triaP3, triaP4, tria32 e NL2 respectivamente). Interessantemente, apenas a construção tendo removidas todas as duas regiões previstas de formar  $\alpha$ -hélices anfipáticas é que pode ser expressa, porém totalmente insolúvel (construção NL2, fragmento não-lítico).

- Expressão de fragmento não-lítico e da pró-trialisina em fusão com GST e NusA

A expressão e utilização do fragmento não-lítico da trialisina (NL) são descritos no capítulo seguinte. Utilizamos essa proteína para a obtenção de um soro policlonal de coelhos anti-trialisina e essa ferramenta foi utilizada em muitos experimentos, inclusive na detecção das proteínas de fusão com GST e NusA.

A construção da pró-trialisina em fusão com GST foi obtida no vetor pGEX-6P3, que contém o sítio para clivagem da protease PreScission. Essa protease é a protease do rinovírus 3C fusionada a GST, permitindo que clivemos a proteína de fusão ainda ligada à coluna, liberando em solução apenas a proteína de interesse. Porém, a clivagem da pró-trialisina-GST (GST-pl5) não foi eficiente, levando-nos a utilizar o pGEX-2T, que possui sítio para trombina. Essa construção foi bem sucedida, como mostrado na figura 10A. Inicialmente notamos que a proteína de fusão degradava facilmente, porém, adição de EDTA na purificação impedia esse processo, como mostrado por imunoblot com soro anti-trialisina na figura 10B. O EDTA apenas impediu a degradação, possivelmente proteolítica da proteína recombinante, porém, a molécula continuava instável, agregando e precipitando mesmo na presença de Triton X-100 e outros detergentes, glicerol e uréia (até 2 M).

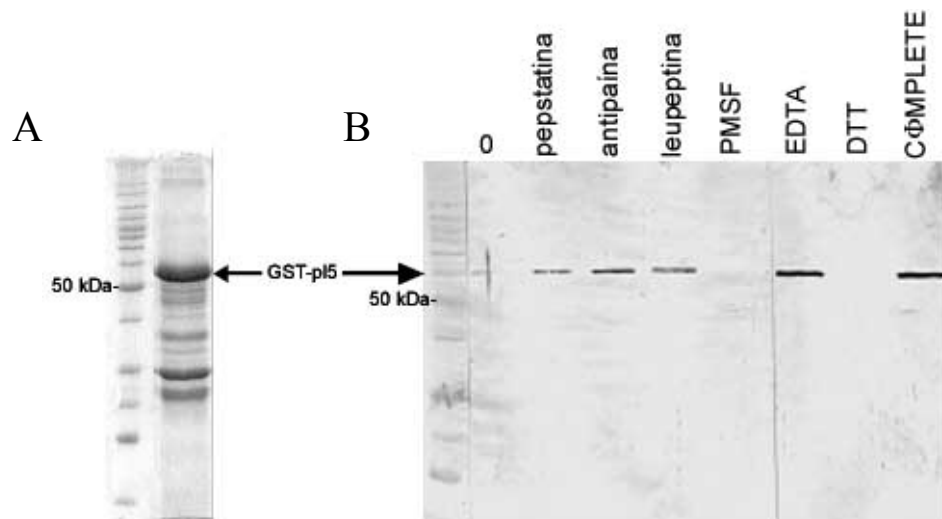


Figura 10 – Expressão da GST-p15 em bactérias e estabilização por EDTA. Em A, a amostra eluída da coluna Glutathione-Sepharose 4B analisada por SDS-PAGE e corada com Coomassie. A mesma amostra foi incubada por 38 h a temperatura ambiente na presença dos inibidores de proteases indicados e após centrifugação, os sobrenadantes foram submetidos a análise por imunoblot com soro anti-trialisina. Padrão de peso molecular Benchmark, (Invitrogen).

Tanto a pró-trialisina quanto a trialisina foram expressas no vetor pET-44a (figura 11A e B). Decidimos utilizar a construção da pró-trialisina (NusA-p15) para posteriores estudos da ativação da molécula. A purificação foi realizada em coluna de níquel e a eluição resultante é mostrada na figura 11C. Após digestão com trombina, a proteína foi liberada da NusA e permaneceu solúvel durante semanas. O problema neste caso é que aparentemente diversos produtos de origem bacteriana, provavelmente contendo NusA, mas sem a trialisina contaminavam a preparação, dificultando a sua purificação para uma análise posterior.

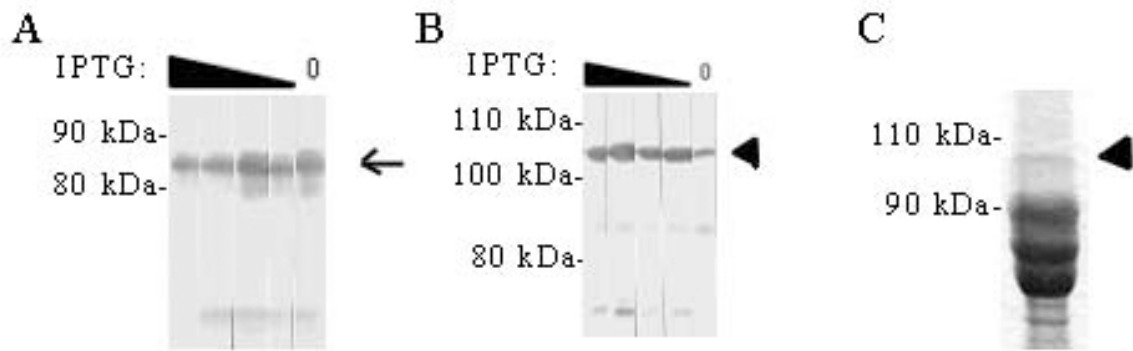


Figura 11 – Expressão e purificação da proteína recombinante em fusão com NusA. A, extratos de bactérias induzidas com diferentes concentrações de IPTG (indicado) submetidas a imunoblot. NusA-L30 (trialisina madura), indicada na seta. B, extratos de bactérias expressando NusA-p15 (ponta de seta). Todas foram induzidas por 5 h a 28°C. Em C, purificação da NusA-p15, fração eluída da coluna Ni-NTA, submetida a SDS-PAGE e corada com Coomassie. NusA-p15 indicada na ponta de seta. Padrão de peso molecular Benchmark, indicados nas figuras, à esquerda.

#### - Clivagem da GST-p15 por proteases salivares

Obtendo a proteína recombinante, o passo seguinte foi ativá-la utilizando proteases salivares. Para que pudéssemos, além de ativar a pró-trialisina, testar sua atividade lítica contra células, necessitávamos utilizar a triapsina purificada pois a saliva total contém muita trialisina, dificultando tanto a detecção da molécula ativada quanto a determinação de atividade. Para isso, preparamos uma fração parcialmente purificada da triapsina cromatografando a saliva total na coluna de troca aniônica HiTrap Q (Amersham). Nessa etapa de purificação da saliva, a atividade de trialisina não é retida enquanto a proteolítica, sim (Amino et al., 2001; Amino et al., 2002). Desta forma as proteínas recombinantes (GST-p15, NusA-p15) foram incubadas com a triapsina e em ambas pudemos notar o aparecimento da trialisina com o tamanho encontrado na saliva (figuras 12A e B). A adição de APMSF impediu a ativação ocasionada pela triapsina. Em um único experimento pudemos detectar atividade da trialisina obtida em fusão em GST, mas não foi possível encontrar condições em

que a proteína ficasse estável. Em diversas outras tentativas, as proteínas geradas em ambas as fusões não apresentavam atividade lítica e em todos os casos elas precipitavam rapidamente.

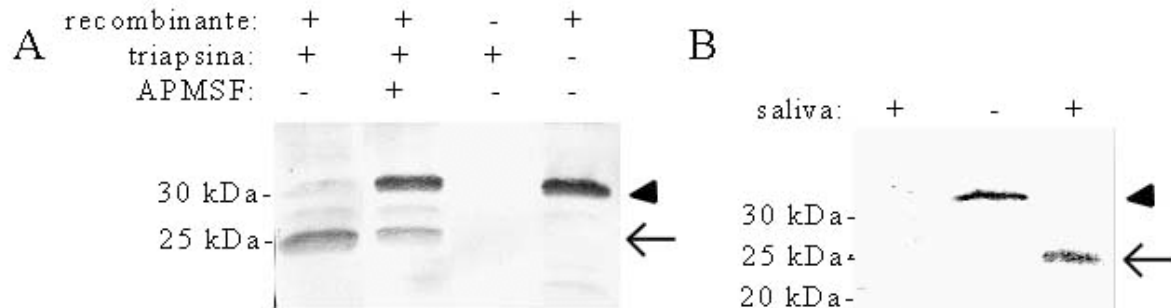


Figura 12 - Ativação da pró-trialisina recombinante por tripsina. A, a proteína GST-pl5 foi digerida com trombina, liberando a pró-trialisina da GST. Essa amostra foi incubada com a fração de tripsina parcialmente purificada e as reações foram analisadas em imunoblot. Na presença do inibidor da tripsina, APMSF, a recombinante não é processada. B, a NusA-pl5 foi clivada com trombina, gerando a pró-trialisina que, quando incubada com saliva numa diluição tal que a trialisina não é detectada no imunoblot, é clivada em trialisina. Ponta de seta, pró-trialisina, seta, trialisina madura. Padrão de peso molecular Benchmark (Invitrogen).

#### - Expressão em *P. pastoris*

Decidimos testar se o sistema da levedura *P. pastoris* permitiria expressar a trialisina recombinante nos sobrenadantes de cultura, uma vez que se tratava de uma célula eucariótica, com mecanismos de síntese protéica e *sorting* intracelular semelhantes aos encontrados nas células do barbeiro. Dois plasmídeos com seqüências sinais para distintas vias de secreção foram utilizados. As leveduras foram transfectadas com construções contendo a trialisina madura e a pró-trialisina com e sem cauda de histidinas. Obtivemos diversos clones que apresentaram a marca de seleção (crescimento em meio sem histidina) porém, ao tentarmos identificar clones recombinados com os genes desejados, encontramos raros positivos em mais de 100 clones de leveduras. Induzimos esses clones positivos a expressar as proteínas recombinantes, porém em diferentes condições, não pudemos detectá-las.

Estes resultados sugerem que a trialisina é bastante tóxica tanto no sistema bacteriano como no sistema de *P. pastoris* e que mesmo a expressão de formas precursoras da trialisina estariam sendo ativados e levando as células à lise. Também mostram que a expressão de fusões de proteínas no N-terminal dos precursores da trialisina permitem a expressão, mas atrapalham de maneira considerável o *folding* da proteína.

## **Capítulo 4: Inibição da lise da trypsin pela pró-região.**

Artigo: Presence of acidic amino acids in the N-terminus of pro-trypsin found in the salivary glands impairs lytic activity of trypsin

Rafael M. Martins, Kátia R. Daghasanli, Maria Aparecida Juliano, Iolanda M. Cuccovia,  
Rogério Amino e Sergio Schenkman

Manuscrito em preparação

Neste artigo em preparação, descrevemos a ativação da trialisina e o mecanismo de controle da atividade lítica.

Utilizamos o fragmento não-lítico da trialisina expresso em sistema bacteriano para obter um soro capaz de reconhecer a trialisina. O fragmento foi expresso na fração de proteínas insolúveis de *E. coli* e purificado na forma desnaturada com 8 M de uréia. O soro obtido reconheceu tanto a proteína recombinante quanto a trialisina da saliva em imunoblots. Dessa forma, pudemos detectar que a trialisina é ejetada na saliva numa forma cerca de 1 a 2 kDa maior do que sua forma madura. Após poucos minutos a pró-trialisina é processada e em até uma hora, degradada, com surgimento de bandas protéicas de tamanho menor. Em glândulas salivares recém dissecadas encontramos a pró-trialisina também com 1 a 2 kDa maior do que sua forma madura.

O cDNA da pré-pró-trialisina prediz um peptídeo sinal de 22 resíduos de aminoácidos seguido por um segmento de 33 resíduos rico em aminoácidos negativamente carregados (45,5% dos resíduos). Baseado nesta previsão, uma forma da trialisina foi expressa em fusão com GST (descrita no capítulo 3). Essa forma migrava em SDS-PAGE com cerca de 30 kDa, portanto maior do que a pró-trialisina estocada nas glândulas salivares de *T. infestans*. Baseados nesses achados, supomos que a pró-região da forma da trialisina acumulada na glândula deveria conter no máximo 15 aminoácidos (figura 13).

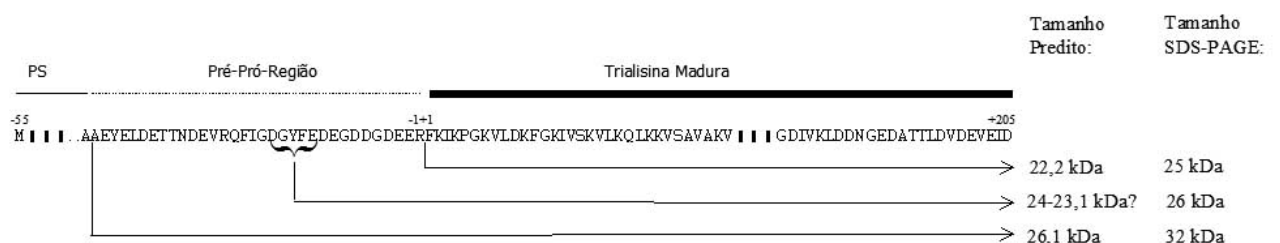


Figura 13 - Esquema do processamento da trialisina. PS, peptídeo sinal. A escala indica as posições dos resíduos de aminoácidos considerando +1 o primeiro aminoácido da trialisina madura; números negativos representam as regiões de seqüência sinal e pré-pró-região. À direita, estão os tamanhos dos polipeptídeos preditos e aqueles observados por migração em SDS-PAGE.



Verificamos que o processamento da pró-trialisina em trialisina madura é realizado pela protease triapsina pois a adição do seu inibidor (APMSF, inibidor de serino-proteases) em extratos de glândulas salivares impede a atividade lítica (em tripomastigotas de *T. cruzi* e eritrócitos) e sua clivagem (a banda de 26 kDa é encontrada). Além disso, uma fração enriquecida para a triapsina é capaz de processar os precursores recombinantes e ativar um peptídeo sintético que mimetizaria o precursor da trialisina (veja abaixo).

Tentamos obter a seqüência do pró-peptídeo através de degradação de Edman e espectrometria de massas porém embora tenhamos obtido outros peptídeos da trialisina, nenhum da pró-região foi encontrado.

Para confirmar que bastaria uma pequena pró-região acídica para impedir a atividade da trialisina, utilizamos um peptídeo sintético denominado proP7 contendo 12 resíduos de aminoácidos da pró-região e o peptídeo P7 (descrito no capítulo 2), que cobre os primeiros 27 aminoácidos do N-terminal da trialisina madura e tem atividade lítica. Além disso, o peptídeo foi sintetizado contendo um fluoróforo no N-terminal (ácido o-aminobenzóico) e um supressor de fluorescência no C-terminal {Gln-[N-(2,4-dinitrofenil)etilenodiamina]}. Tratando o peptídeo com triapsina (ou endoprotease Arg-C, que cliva especificamente no C-terminal de argininas - no caso do proP7, a região de processamento), a pró-região é liberada e o peptídeo P7 resultante foi capaz de lisar células em concentrações mais baixas quando comparado com o peptídeo não processado. Ao mesmo tempo, notamos um aumento de fluorescência após o tratamento com protease. Este aumento de fluorescência sugere que a ativação do peptídeo é acompanhada de alterações conformacionais já que o apagamento da fluorescência é inversamente proporcional à distância entre o fluoróforo e o apagador que ocorre para peptídeos com este tamanho. Além disso, o proP7, diferentemente do peptídeo P7, altera sua estrutura em tampão fosfato contendo NaCl. O espectro de dicroísmo circular é

alterado, havendo uma transição de estrutura randômica para um perfil semelhante ao de  $\alpha$ -hélices.

Em paralelo, pudemos constatar um aumento da lise de lipossomos de fosfatidilcolina contendo 20% cardiolipina quando proP7 é clivado por frações parcialmente purificadas de triapsina ou Arg-C.

Existem duas possibilidades para explicar o controle da lise pela pró-região: na primeira, o pró-peptídeo ácido interage intramolecularmente com as cargas positivas do N-terminal da trialisina madura, bloqueando a atividade lítica da  $\alpha$ -hélice anfipática. A presença do pró-peptídeo deve afetar a estrutura dita não-convencional dos primeiros 11 resíduos da trialisina madura, impedindo a ligação desses com membranas. Uma segunda possibilidade seria que o bloqueio da lise é realizado por interações intermoleculares, do pró-peptídeo de uma molécula com a hélice catiônica de outra molécula. Esse tipo de dimerização bloqueadora de atividade lítica é visto no caso das catelicidinas, em que uma região de um precursor interage com outro precursor, bloqueando a exposição da região contendo o peptídeo antimicrobiano.

Alguns peptídeos antimicrobianos e proteínas formadoras de poros são sintetizados como zimogênios inativos. O caso da pró-trialisina é intrigante pois o bloqueio da lise é parcial e poderia se tornar um problema para sua estocagem nas glândulas salivares. Porém, durante a secreção nas glândulas salivares de *T. infestans*, há a liberação de grandes vesículas muitas vezes contendo gotículas de lipídeos e até pequenas vesículas citoplasmáticas. Nesse ambiente, a pró-trialisina pode interagir com essas estruturas e moléculas, competindo sua ligação às membranas plasmáticas glandulares. Além disso, sua clivagem proteolítica é realizada pela triapsina, secretada em outra glândula, tornando a trialisina bastante letal apenas no momento da picada, em que os conteúdos de todas as glândulas são reunidos.

Presence of acidic amino acids in the N-terminus of pro-trialysin found in the salivary glands impairs lytic activity of trialysin.

## Abstract

*Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) is an hematophagous insect that transmits the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease. Its saliva contains several anti-hemostatic weapons, including the protein named trialysin that forms pores in membranes. Peptides based on the N-terminus of trialysin lyse cells and fold into  $\alpha$ -helical amphipathic segments resembling antimicrobial peptides. Since it is active against a broad range of cell types, its storage/secretion/activation should be strictly controlled. By using a specific antiserum against trialysin we show here that a precursor larger than the mature protein is found in the salivary glands. This precursor form of trialysin is less active than trialysin and is converted into mature trialysin after saliva secretion by limited proteolysis. A synthetic peptide flanked by a fluorophore and a quencher including the acidic portion of the pro-region and the N-terminus of the protein is also less active against cells and artificial membranes. Upon proteolysis by triapsin, the most abundant protease from *T. infestans* saliva, or Arg-C endoproteinase, the peptide unfolds and increases its lytic activity. This mechanism of activation could provide a way to impair the toxic effects of trialysin inside the salivary glands, restricting lytic activity to the bite site.

## Introduction

Hematophagous animals need to counteract physical and molecular barriers such as the epidermis and the inflammatory, hemostatic and immune systems of the hosts to fulfill their

nutritional needs (1). Saliva evolved for the specific task of exploiting these biochemical cascades facilitating blood acquisition. The triatomine insects are exclusive blood-feeders that transmit Chagas' disease. They acquire the parasite when ingesting blood of infected mammalian hosts and transmit the parasites combined with their feces, instead of injecting the protozoan parasites during the bite like anophelines, sand-flies or tsetse flies (2). Several molecules present in the salivary secretion of triatomine bugs that participate in the blood acquisition have been described. For example, *Rhodnius prolixus* saliva contains nitrophorins (NPs), which are heme-binding lipocalin proteins with multiple functions. They can release NO in the bite site, increasing vasodilation, or capture histamine, inhibiting inflammation. Nitrophorins also bind factor IXa and anionic phospholipids inhibiting blood coagulation (in the case of NP2 and NP7) (3;4). An apyrase depletes ADP and ATP in the bite site, acting in concert with lipocalin RPAI1-4, which inhibit platelet aggregation (4). Another lipocalin that does not bind heme but biogenic amines inhibits platelet aggregation and vasoconstriction (5).

*T. infestans* developed a different set of molecules. It expresses three different anticoagulant activities (6), proteases (7), a sialidase (8), apyrases (9), an inhibitor of platelet aggregation (10), a Na<sup>+</sup> channel blocker that acts as a local anaesthetics (11), and a cytolytic protein named trialysin (12). Trialysin is a pore-forming protein that promotes lysis of several cell types, from bacteria to mammalian cells. This protein contains an amphipathic region at the N-terminus. Synthetic peptides based on the mature N-terminus of trialysin displayed lytic activities and their solution structures showed characteristics of cationic amphipathic antimicrobial peptides (13).

The lytic activities presented by trialysin as well as by other pore forming proteins and peptides must be well controlled in order to avoid destroying the membrane compartments

during their synthesis. Precursors are often synthesized as larger sequences containing an N-terminal signal peptide followed by a pro-region and the lytic peptide. The antimicrobial peptides cecropins, melittins, and magainins are synthesized as polypeptides, which are processed by proteolytic cleavage resulting in one antimicrobial molecule (cecropin and melittin) (14;15) or six (one prepromagainin polypeptide generates one magainin I (PGS) and five magainin II (PGS-Gly10-Lys22) molecules (16). The pro-regions of magainin and melittin are composed of negatively charged residues that may inhibit their action. Aureins (17),  $\alpha$ -defensins (cryptdins) (18), dermaseptins (19), laticins are also examples of peptides containing acidic pro-regions (20). In contrast, apolar residues form the pro-region of cecropin. A large pro-region of approximately 100 residues is present in cathelicidins, which are mammal proteins with multiple functions including antimicrobial activity (21). There has been structural evidence that the processing of cathelicidin is performed in dimeric, domain-swapped structures that expose the cleavage site and at the same time control their activities impairing the antimicrobial activity of the C-terminus (22).

Trialysin cDNA predicts a secretion signal followed by an acidic domain composed of 33 negatively charged residues after the predicted signal sequence, not found in the mature protein. The activation of pro-trialysin into mature trialysin was suggested to occur by limited proteolysis as it is prevented by APMSF, which inhibited a major serine protease of *T. infestans* saliva (7). However, the precursor form was not previously identified, and it is unknown when and by which mechanism it occurs. Therefore, here we describe the precursor form of trialysin using an antiserum reactive against salivary trialysin and present evidence that activation occurs after saliva ejection. Using an internally quenched fluorescent peptide based on the predicted pro- and lytic N-terminal regions of pro-trialysin, we provide evidence

that the activation mechanism of the protein involves conformational changes of this segment of the protein.

## Materials and methods

Insects and cells- *T. infestans* (male and females) were maintained at room temperature and fed twice weekly in mice anaesthetized with 0.2% (w/v) ketamine chloridrate, 0.12% (w/v) xylazine chloridrate in PBS. Trypomastigote forms of Y strain of *T. cruzi*, and erythrocytes were obtained as previously described (12).

Saliva extraction and salivary gland extracts - Saliva was collected as described (12) from both male and female insects two days after feeding. Salivary glands were obtained by dissecting the insects by pulling off the rostrum, exposing the thoracic viscera. The glands were separated from the esophagus and ducts and kept in ice-cold phosphate saline buffer (PBS). For SDS-PAGE analysis, glands were readily homogenized in SDS-PAGE loading buffer containing 1% 2-mercaptoethanol, and boiled for 5 min before electrophoresis. Otherwise, glands were mechanically disrupted in ice-cold PBS containing or not 200 µg of the serine-protease inhibitor (4-amidino-phenyl)-methane-sulfonyl fluoride (APMSF) per ml, centrifuged for 5 min at 14000 g. The collected supernatants were used for activity assays and SDS-PAGE analysis. Protein concentration was determined by Bradford technique using bovine serum albumin as standard (23).

Activity assays - Lysis of trypomastigotes and permeabilization assays of erythrocytes were performed as described (12;13) using twofold dilution of salivary glands extracts, or stock solutions of peptide proP7 (see below).

Recombinant protein expression and purification - A Non-Lytic region of pre-pro-trialysin (spanning C-terminal region between amino acid residues Met89 - Asp260, NL2) was amplified by PCR using primers *NDE15P15 89* (5' CCA TAT GAA GAA AGG AGC AGC 3') and *Bam-LYS30 reverse* (5' CGG GAT CCT TAA TCA ATT TCA ACT TCA TC 3'), and the pro-trialysin cDNA as template previously cloned in pGEM-T Easy (Promega) (12) in order to insert *Nde* I and *Bam* HI restriction sites at 5' and 3' termini. The amplified fragment was inserted in the cloning vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) and the reaction was used to transform chemically competent *E. coli* DH5 $\alpha$ . After sequence confirmation the obtained plasmid was digested with restriction enzymes *Nde* I and *Bam* HI (Fermentas), purified from agarose gel and inserted into pET-14b (Novagen) previously digested with the same restriction enzymes using Rapid DNA Ligation Kit (Promega). The ligation reaction was used to transform *E. coli* DH5 $\alpha$ , and the recovered plasmid (pET14b-NL2) was used to transform BL21 (DE3) *pLysE*. The recombinant protein expression was induced in 300 ml LB medium cultures at 37°C at OD<sub>600nm</sub>  $\cong$  0.6 with 0.6 mM isopropyl  $\beta$ -D-thioglucoopyranoside (Sigma) and bacteria was collected after overnight incubation by centrifugation at 3000 x g for 10 min. The bacterial cell pellet was resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, and lysis obtained by three freeze-thawing cycles. The lysate was centrifuged (15000 g, 15 min, at 4°C), and the insoluble pellet was extracted with 100 mM sodium phosphate, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8.0. The insoluble material was removed by centrifugation and soluble NL2 was purified by chromatography in Ni-NTA agarose resin (Qiagen) by elution at pH 4.3. NL2-containing fractions were pooled and the recombinant protein was further purified by gel-filtration in a Superdex HR200 column (Amersham) equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 8 M urea, and 1 mM DTT by using an Äkta Purifier system. The purified protein was visualized by SDS-PAGE and selected

samples were dialyzed twice against 1 L of PBS at 4°C to remove urea. The recombinant protein was recovered in the insoluble form.

Pro-trialysin fused with glutathione S-transferase (GST) was obtained in DH5 $\alpha$  cells transformed with the vector pGEX-2T containing pro-trialysin cDNA. This construction was obtained after inserting by PCR the restriction sites at the flanking regions of trialysin. The template was the same as above and the reaction included oligonucleotides BAMH15P15 (5' CGG ATC CGC TGA ATA TGA ACT TG 3') and ECOR13LYS (5' CGA ATT CTT AAT CAA TTT CAA CTT C 3'). Cells were grown at 37°C in LB medium and at OD<sub>600nm</sub> = 1.5 induced with 0.1 mM IPTG with subsequent growth overnight at 30°C at 200 rpm. Afterwards, the culture was centrifuged at 3000 g for 10 min and the cell pellet was lysed by sonication in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA containing 0.1% Triton X-100 (vol/vol). Soluble proteins were obtained after centrifugation at 15000 g for 20 min and the resulting supernatant incubated with Glutathione-Sepharose 4B (Amersham) previously equilibrated in the buffer used for cell lysis. The column was washed with 50 ml lysis buffer and bound proteins were eluted with the same buffer containing 20 mM reduced glutathione after an overnight incubation at 4°C.

Antiserum production and immunoblotting – A suspension containing 100  $\mu$ g NL2 in 300  $\mu$ l PBS was emulsified with the same volume of complete Freund's adjuvant (Sigma) and subcutaneously injected throughout the dorsum of a female rabbit. Two consecutive boosts in incomplete Freund's adjuvant at 3 weeks intervals were performed and blood was collected from the ear marginal vein. For immunoblots, SDS-PAGEs were wet-transferred to nitrocellulose membranes (Hybond C-extra, Amersham) and total blotted proteins were visualized by Ponceau S staining. The membrane was incubated for 1 h in PBS containing 5% non-fat dry milk and 1 h with the antiserum diluted 1:5000 in the same solution. After three



10 min washes in PBS, bound antibodies were detected after 1 h incubation with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, (Santa Cruz), three 10 min PBS washes and ECL (Pierce) using Hyperfilm-ECL (GE Biosciences).

Peptide synthesis and purification - The fluorescence resonance energy transfer peptide based on the presumptive N-terminus of pro-trialysin found in the salivary glands including the P7 region of mature trialysin (13) was synthesized by solid-phase synthesis (24). An automated benchtop simultaneous multiple solid-phase peptide synthesizer (PSSM 8 system, Shimadzu, Japan) was used to synthesize peptides using the Fmoc-procedure. All peptides obtained were purified by semipreparative HPLC on an ecosil C-18 column. The molecular mass and purity of synthesized peptides were checked by amino acid analysis and MALDI-TOF mass spectrometry using a Tof-Spec-E from Micromass, Manchester, U.K. Further purification in a  $\mu$ RPC C2/C18 reverse phase columns in an Äkta Purifier system (Amersham) was performed. Stock solutions of peptides were prepared in DMSO:water (20:80) and the peptide concentrations were determined spectrophotometrically using the molar extinction coefficient of  $17.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  at 365 nm.

Fluorimetric measurements - The proteolytic cleavage of proP7 peptide was monitored by measuring the fluorescence at  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$  after excitation at  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$  in a plate-reader spectrofluorimeter (Microtek). Stock solutions of the peptide were diluted in the indicated buffer solutions at  $37^\circ\text{C}$  incubated with partially purified triapsin (step 2 of (7)), or with 1 mg/ml trypsin (type VI, bovine, Sigma) or 5  $\mu\text{g/ml}$  Arg-C endoproteinase (Calbiochem).

Liposome preparation and carboxyfluorescein leakage assay - Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared from egg phosphatidylcholine and bovine heart cardiolipin (80:20,

weight) dissolved in ethanol and dried under N<sub>2</sub> flow. The lipid film on the tube was hydrated in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 50 mM carboxyfluorescein. This suspension was extruded through 11 rounds in a LiposoFast (Avestin Inc.) system containing two polycarbonate membranes and submitted to a Sephadex G-25 column equilibrated in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 0.3 M NaCl to remove free carboxyfluorescein from LUVs. Phospholipid content was determined according to Rouser (25). LUVs were diluted in 1 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.3 M NaCl, and fluorescence was measured in a Hitachi F-2000 spectrofluorimeter ( $\lambda_{\text{ex}} = 490$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 512$  nm) after adding peptide solutions. At the end of each experiment, total carboxyfluorescein fluorescence was recorded by addition of 0.1% Triton X-100.

## Results

### Generation of specific anti-trialysin rabbit serum

In order to assess the mechanism of activation of *T. infestans* pro-trialysin, we raised specific antibodies capable of recognizing salivary trialysin. As the N-terminus of trialysin was shown to be the lytic motif, and attempts to obtain the full-length precursor and mature forms of the recombinant protein in heterologous systems were unsuccessful, we subcloned the sequence corresponding to the C-terminal non-lytic (NL) fragment of trialysin into the pET-14b plasmid and expressed it in BL21 (DE3) *pLysE E. coli* cells (Figure 1A). The protein was purified in by Ni-affinity and gel-exclusion chromatography (Figure 1B) and used to immunize rabbits. Immunoblots using *T. infestans* saliva showed that the obtained serum specifically recognized a protein with molecular size similar to that of purified trialysin besides the recombinant protein used to immunize the animals (Figure 1C).

Pro-trialysin is processed after saliva is secreted

As this protein was purified from pooled stocks maintained at -20°C from multiple rounds of saliva acquisition from the insects, we could not be sure when the pro-trialysin was processed. Therefore we first asked if mature trialysin is already processed when saliva is ejected. For this, small amounts of saliva were collected in ice and analyzed by immunoblot. As shown in figure 2, a protein with 26 kDa is detected. After incubation at room temperature for 10 min, the 26 kDa protein is converted to the size of mature trialysin (~24 kDa). At longer incubations it is further processed as judged by the lower molecular weight bands that appear at 45 and 60 min. This result indicates that trialysin is processed after saliva ejection.

The precursor form released in saliva is found in the salivary glands

To detect if the secreted trialysin is already present in the salivary glands, and which of the processed forms would have lytic activity, gland extracts were analyzed by immunoblots. Salivary glands D1 and D2 were homogenized in the presence, or absence, of APMSF, previously shown to inhibit triapsin activity, a protease found in the saliva proposed to be responsible for trialysin activation (12). As shown in figure 3A, the 26 kDa precursor was detected when the glands were prepared in the presence of APMSF, or when the glands were directly boiled in SDS-PAGE loading buffer, while the 24 kDa form was observed in the absence of the inhibitor. In parallel, the lytic activity against trypanosomes was considerably inhibited in the glands pre-treated with APMSF (figure 4A), although the inhibitory effect was less intense for erythrocyte lysis (figure 4B). Activity inhibition did not occur by the APMSF itself, as glands previously prepared in the absence of APMSF had the same lytic activity if the inhibitor was added further on.

To identify which one represents the active form of trialysin a GST-pro-trialysin fusion protein was expressed in *E. coli*. This protein contained GST, a thrombin cleavage site and the pro-trialysin starting from the amino acid –33 to the C-terminus (Figure 1A). It was obtained from soluble *E. coli* extracts and purified by glutathione-Sepharose column. The fusion protein was largely unstable, becoming insoluble as concentration increased. It did not show lytic activity. It could be processed by thrombin generating a 30 kDa protein band in SDS-PAGE. The processed recombinant protein was also lytically inactive. When partially purified triapsin was added to the GST-fusion protein or to the 30 kDa protein they were both processed to a 24 kDa band (figure 3B). All these data indicate that the 24 kD found as the processed form in the saliva is the active form of trialysin and the presence of 10 to 15 amino acids of the pro-region of pro-trialysin stocked in the glands is sufficient to inhibit lytic activity.

A synthetic peptide containing the pro-region and the N-terminus of trialysin is activated by proteolysis

We attempted at identifying the true sequence of pro-trialysin using Edman degradation, bidimensional SDS-PAGE and mass spectroscopy but we did not obtain any possible sequence from the pro-region. So, we decided to check if a segment as small as the difference observed between mature and precursor forms could decrease lytic activity. For this, a synthetic peptide encompassing 12 residues upstream the N-terminus of mature trialysin and 27 residues downstream was synthesized. The 27 mer segment was previously characterized as peptide P7 and shown to retain lytic activity. The new peptide (proP7) is represented in figure 5A and was prepared containing at the N-terminus the fluorescent probe o-aminobenzoic acid (Abz), and at the C-terminus a quencher group Gln-N-(2,4-

dinitrophenyl)ethylenediamine (Q-EDDnp). The quenching depends on the distance between the donor and the acceptor (26). When proP7 was treated with endoproteinase Arg-C, which cleaves the unique arginine of proP7, and releases the precursor from the P7 portion, the fluorescence increases with time (figure 5B). Similar increase in fluorescence was observed by adding trypsin or saliva (not shown). As quenching of fluorogenic peptides longer than 40 amino acids is minimal, unless they are folded, this increase in fluorescence suggests that proP7 is at certain extent structured. Moreover, this peptide acquires structure in buffered solution as seen by circular dichroism analysis (Figure 5C), differently from the mature trialysin N-terminal peptides (13).

Lysis increases after cleavage of proP7

Next, we compared the lytic activity of proP7 and Arg-C processed peptide. For this, artificial liposome membranes (20:80 cardiolipin:phosphatidylcholine) containing 6-carboxyfluorescein, which is a fluorophore that auto-suppresses its fluorescence was used. Upon permeabilization these liposomes release the 6-carboxyfluorescein and the fluorescence increases. As expected, the processed peptide is more effective in promoting liposome permeabilization than proP7 (figure 6A and B). Similar results were obtained comparing the lysis of trypanosomes, although the non-processed forms presented lytic activity against this parasite (figure 6C). These results indicate that a small acidic portion of the pro-region decreases lysis efficiency of trialysin in a peptide model.

Discussion

Here we describe trialysin processing from its accumulation in the salivary glands of *T. infestans* until its release during saliva ejection, when the full lytic capacity of the protein is achieved. As predicted by its cDNA sequence, trialysin must be synthesized containing a 22 amino acids signal sequence that should be post-translationally removed. The resulting polypeptide would have 30 kDa. However, it is not detected in the salivary glands. Instead, a shorter protein, with no more than 2 kDa of the mature trialysin (24 kDa) accumulates in the gland and is released during salivation. This 26 kDa precursor is much less active and part of this decrease in activity can be attributed to the presence of no more than 15 amino acid residues in the pro-region. By introducing 12 amino acids from this short sequence upstream of a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of trialysin, we observed a significant decrease in the lytic activity. This region promotes folding of the peptide in buffered solution, which does not happen with P7 alone, as seen by circular dichroism. We propose that this sequence can promote folding of trialysin N-terminus hiding the positive charges that may interact with the membrane to cause lysis. Proteolytic processing releases the precursor and activates lysis.

It is interesting that such a small region can modulate lytic activity of a powerful cytolysin. Larger forms of trialysin were not detected raising the question whether another protease acting after the signal peptide release would be involved. This process could happen very quickly, after synthesis and only the 26 kDa molecule would be stocked in the gland. Unfortunately, the exact cleavage point was not detected as the N-terminus, or a corresponding peptide was not found. Nevertheless, our data using the peptide indicate that an acidic peptide as short as 12 amino acids already inhibited lysis. It is possible that this acidic region can interact with the basic residues in the amphipathic N-terminus. The observed residual lytic activity for proP7, and to a less extent to pro-trialysin might occur because the acidic segment does not block all the cationic surface available. Alternatively, lysis would be

inhibited by formation of a dimer in which the pro-region of one molecule would interact with the cationic surface of another molecule. It has been shown in the case of cathelicidins (stored in neutrophil granules) that impairment of activity can be accomplished by domain-swapping, in which two molecules fold themselves together as dimers (22). In the case of trialysin, we have no evidence for occurrence of either this mechanism or any other oligomerization control of lytic activity. Against that, the precursor molecule isolated from the gland in the presence of APMSF behaves as a monomer in gel exclusion chromatography (not shown). We cannot exclude, however, this possibility in the case of proP7.

Structural data on the N-terminus of trialysin shows that the very first amino acids are folded in a nonrigid structure that could be part of the bending region of the hairpin in the proposed model (13). This flexibility could allow the acidic domain to interact with positive charges in the context of the protein, but not in the case of a short synthetic peptide. This also suggests that the protein structure might have additional roles in the inactivation of pro-trialysin.

We have previously observed that small variations in the sequence of the N-terminus of trialysin can modify its specificity to target cells. The mobility of the N-terminus seems to prevent lysis of erythrocytes as substitution of Gly and Pro residues increases activity of these cells, but not of trypanosomes (13). This could explain why the acidic portion of trialysin is less effective in the case of erythrocytes as compared to trypanosomes. Perhaps the presence of negative charges in the membrane would compete for the basic domain and the protein would end inserting in the target.

Expression of either the full length predicted pro-trialysin or trialysin itself in bacteria, or in the yeast *P. pastoris* have come unsuccessful up to this moment. Results so far indicate that both the predicted pro-region and the whole N-terminus (the first two predicted amphipathic  $\alpha$ -helices) need to be ablated or fused to a bigger protein (NusA protein or GST; Hys-tags are

insufficient) in order to be translated (data not shown). On the other hand, every recombinant protein expressed (GST-pro-trialysin or NL fragment) was unstable or quickly precipitated during purification. These findings suggest that pro-trialysin might require a proper environment to fold into a lytically inactive protein. The protective action of the molecule could be based on the existence of distinct components in higher-eukaryotes membranes, or a different inhibitor that is degraded, or lost after dilution of the salivary glands homogenate *in vitro*.

*R. prolixus* contains a molecule (nitrophorin-7) that binds to phospholipids in the bite site, decreasing prothrombin complex formation (27). Besides, it has been shown that *R. prolixus* saliva contains lysophosphatidylcholine in enough concentration to affect platelet function in the host (28). Trialysin activity could also be controlled by interacting with lipids present in *T. infestans* salivary glands. Since 1954, it is known that the lytic activity of *T. infestans* saliva resides in the D2 gland and the proteolytic activity, in the D1 (29). Cytochemical analysis (30) have also shown that the lipid content in the D2 secretion is higher and that great amounts of cytoplasmic contents (including vesicles) are expelled in this gland. When the insect bites, proteolytic D1 content mixes with D2 secretion forming the saliva and trialysin is activated by removal of the acidic propiece.

The presence of an acidic portion is also found in other cytolytic protein toxins. For example, some pore-forming bacterial toxins are synthesized as precursors with acidic propieces: proaerolysin is synthesized and secreted by *Aeromonas hydrophilla* as a dimer that binds the glycan core of GPI-anchored proteins on the cell surface and it is processed by host proteases, releasing a small C-terminal peptide, thus enabling the toxin to oligomerize into the heptameric channel (31). The El Tor hemolysin from *Vibrio cholerae* is also processed by many proteases in different sites in the acidic/apolar propiece (32). The fact that a synthetic peptide reproduces, though partially, lysis inhibition and is suitable for proteolytic activation



should be useful to understand how these processes occur at structural levels. In addition, it can help to design regulated antimicrobial compounds.

## References

1. Ribeiro, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? (1995) *Infect. Agents Dis.* 4, 143-152.
2. Chagas, C. Nova tripanozomiase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. (1909) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159-218.
3. Montfort, W. R., Weichsel, A., and Andersen, J. F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 110-118.
4. Ribeiro, J. M., Andersen, J., Silva-Neto, M. A., Pham, V. M., Garfield, M. K., and Valenzuela, J. G. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (2004) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 61-79.
5. Andersen, J. F., Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Schuck, P., and Ribeiro, J. M. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 4611-4617.
6. Pereira, M. H., Souza, M. E., Vargas, A. P., Martins, M. S., Penido, C. M., and Diotaiuti, L. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae) (1996) *Acta Trop.* 61, 255-261.
7. Amino, R., Tanaka, A. S., and Schenkman, S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) (2001) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 465-472.
8. Amino, R., Porto, R. M., Chammas, R., Egami, M. I., and Schenkman, S. Identification and characterization of a sialidase released by the salivary gland of the hematophagous insect *Triatoma infestans* (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 24575-24582.
9. Faudry, E., Lozzi, S. P., Santana, J. M., D'Souza-Ault, M., Kieffer, S., Felix, C. R., Ricart, C. A., Sousa, M. V., Vernet, T., and Teixeira, A. R. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 19607-19613.
10. Morita, A., Isawa, H., Orito, Y., Iwanaga, S., Chinzei, Y., and Yuda, M. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans* (2006) *FEBS J.* 273, 2955-2962.
11. Dan, A., Pereira, M. H., Pesquero, J. L., Diotaiuti, L., and Beirao, P. S. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels (1999) *J. Med. Entomol.* 36, 875-879.

12. Amino, R., Martins, R. M., Procopio, J., Hirata, I. Y., Juliano, M. A., and Schenkman, S. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 6207-6213.
13. Martins, R. M., Sforca, M. L., Amino, R., Juliano, M. A., Oyama S Jr, Juliano, L., Pertinhez, T. A., Spisni, A., and Schenkman, S. Lytic activity and structural differences of amphipathic peptides derived from trialysin (2006) *Biochemistry* 45, 1765-1774.
14. van Hofsten, P., Faye, I., Kockum, K., Lee, J. Y., Xanthopoulos, K. G., Boman, I. A., Boman, H. G., Engstrom, A., Andreu, D., and Merrifield, R. B. Molecular cloning, cDNA sequencing, and chemical synthesis of cecropin B from *Hyalophora cecropia* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 2240-2243.
15. Kreil, G. Biosynthesis of melittin, a toxic peptide from bee venom. Amino-acid sequence of the precursor (1973) *Eur. J. Biochem.* 33, 558-566.
16. Terry, A. S., Poulter, L., Williams, D. H., Nutkins, J. C., Giovannini, M. G., Moore, C. H., and Gibson, B. W. The cDNA sequence coding for prepro-PGS (prepro-magainins) and aspects of the processing of this prepro-polypeptide (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5745-5751.
17. Chen, T., Scott, C., Tang, L., Zhou, M., and Shaw, C. The structural organization of aurein precursor cDNAs from the skin secretion of the Australian green and golden bell frog, *Litoria aurea* (2005) *Regul. Pept.* 128, 75-83.
18. Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M., and Parks, W. C. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense (1999) *Science* 286, 113-117.
19. Amiche, M., Seon, A. A., Pierre, T. N., and Nicolas, P. The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain (1999) *FEBS Lett.* 456, 352-356.
20. Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., Feofanov, A. V., Surovoy, A. Y., Karpunin, D. V., and Grishin, E. V. Latarecins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaei* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 20983-20992.
21. Boman, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts (2003) *J. Intern. Med.* 254, 197-215.
22. Sanchez, J. F., Hoh, F., Strub, M. P., Aumelas, A., and Dumas, C. Structure of the cathelicidin motif of protegrin-3 precursor: structural insights into the activation mechanism of an antimicrobial protein (2002) *Structure.* 10, 1363-1370.
23. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
24. Hirata, I. Y., Cezari, M. H. S., Nakaie, C. R., Boschov, P., Ito, A. S., Juliano, M. A., and Juliano, L. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid-phase synthesis and

fluorescence spectroscopy of peptides containing *ortho*-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. (1994) *Lett. Peptide Sci.* 1, 299-308.

25. Rouser, G., Fkeischer, S., and Yamamoto, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots (1970) *Lipids* 5, 494-496.

26. Pimenta, D. C., Nantes, I. L., de Souza, E. S., Le Bonniec, B., Ito, A. S., Tersariol, I. L., Oliveira, V., Juliano, M. A., and Juliano, L. Interaction of heparin with internally quenched fluorogenic peptides derived from heparin-binding consensus sequences, kallistatin and anti-thrombin III (2002) *Biochem. J.* 366, 435-446.

27. Andersen, J. F., Gudderra, N. P., Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., and Ribeiro, J. M. Recognition of anionic phospholipid membranes by an antihemostatic protein from a blood-feeding insect (2004) *Biochemistry* 43, 6987-6994.

28. Golodne, D. M., Monteiro, R. Q., Graca-Souza, A. V., Silva-Neto, M. A., and Atella, G. C. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 27766-27771.

29. Barth, R. Estudos Anatômicos e Histológicos sobre a Subfamília *Triatominae* (Heteroptera, Reduviidae) (1954) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 52, 517-590.

30. Reis, M. M., Meirelles, R. M., and Soares, M. J. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) (2003) *Tissue Cell* 35, 393-400.

31. Fivaz, M., Abrami, L., Tsitrin, Y., and van der Goot, F. G. Not as simple as just punching a hole (2001) *Toxicon* 39, 1637-1645.

32. Nagamune, K., Yamamoto, K., and Honda, T. Intramolecular chaperone activity of the pro-region of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 1338-1343.

A

<sup>-55</sup> **MSKFWLLLLLVAAFQFAHSYPA***AEYELDETTNDEV*RQFIGDGYFEDEGDDGDEER <sup>-1</sup>

┆▶

<sup>+1</sup>  
 FKIKPGKVLDKFGKIVSKVLKQLKKVSAVAKVAMKKGAALLKKMGVKISPLKCEENT

CKSCVIFKIPTENSFCLTIRFMKTNIATYLVVAGEINRKSKEEKLKLGNMPCRVNVE

GFIGKVCMKGIEGHAKSSSGQANVNFCLGLVAEKFGVGAKLCGIYANKKVRVKISP

QLFPGATSLDGDIVKLDNNGEDATTLDVDEVEID

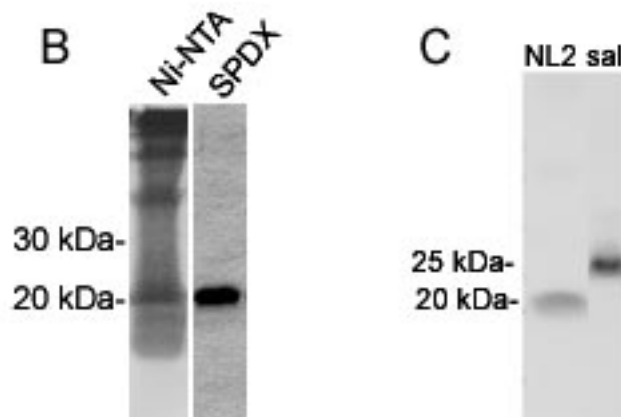


Figure 1 – Sequence, expression and purification of the non-lytic fragment of trialysin. A) The translated cDNA coding for pre-pro-trialysin. The leader peptide sequence is shown in bold letters, the pro-region, in italics and the non-lytic fragment, underlined. Arrow indicates the N-terminus of the proP7 peptide. Numbers show the positions of amino acids according to the N-terminus of mature trialysin (+1), the predicted signal sequence (-55), the acidic pro-region (-33) and the cleavage site (-1). B) The non-lytic sequence (NL2) was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) *pLysE*; the insoluble protein fraction was solubilized in 8 M urea and purified using Ni-affinity chromatography. SDS-PAGE profile of eluate fractions from Ni-NTA and Superdex 200 HR columns (Ni-NTA and SPDX, respectively). C) Immunoblot with anti-NL2 serum; eluate fraction from Ni-NTA column (NL2) and *T. infestans* saliva (sal). Protein molecular weight markers in kDa (Benchmark, Invitrogen).

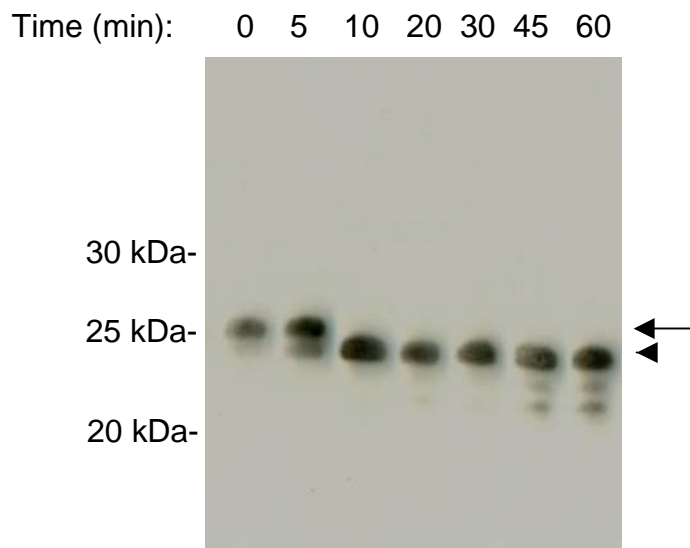


Figure 2 – Pro-trialysin ejected in saliva is smaller than predicted and is quickly processed. Saliva was collected and kept in ice. Aliquots were taken at different time points (0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 min) at room temperature incubation, submitted to SDS-PAGE and immunoblotted using anti-trialysin serum. Molecular weights are indicated on the left. Arrow indicates pro-trialysin and the arrowhead, mature trialysin.

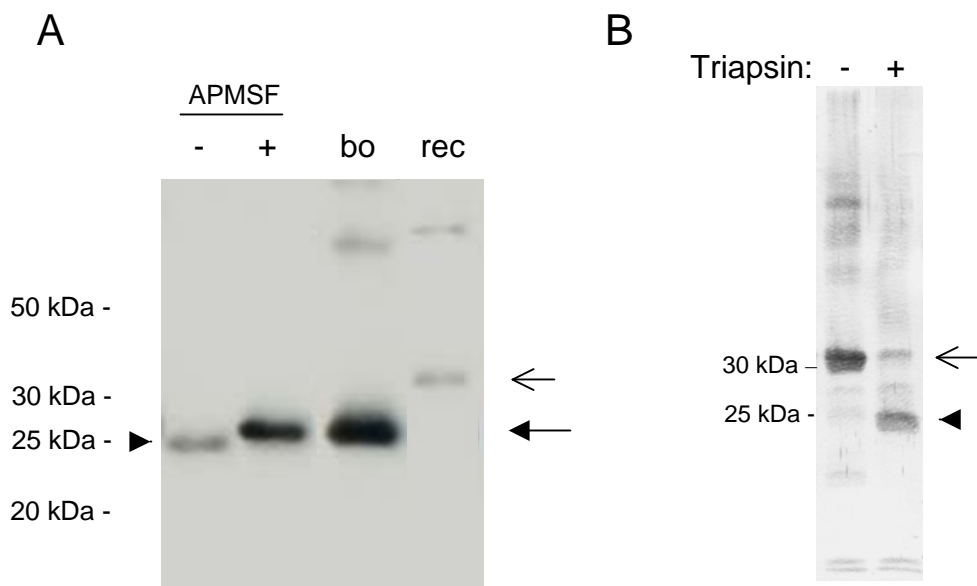


Figure 3 – Trialysin precursor found in the *T. infestans* salivary gland. Panel A shows an immunoblot using anti-trialysin of samples containing salivary glands of *T. infestans* dissected and solubilized in the absence (-), or presence of APMSF (+), and directly boiled in SDS-PAGE sample buffer (bo). The lane (rec) contained a GST-pro-trialysin recombinant pre-treated with thrombin. Panel B shows a immunoblot of recombinant pro-trialysin (from GST-pro-trialysin) untreated (-) and treated (+) with purified triapsin. Molecular weights are indicated on the left. Open arrow indicates the predicted recombinant pro-trialysin size, thicker arrow indicates the protrialysin found in the salivary gland and the arrowhead the size of mature trialysin.

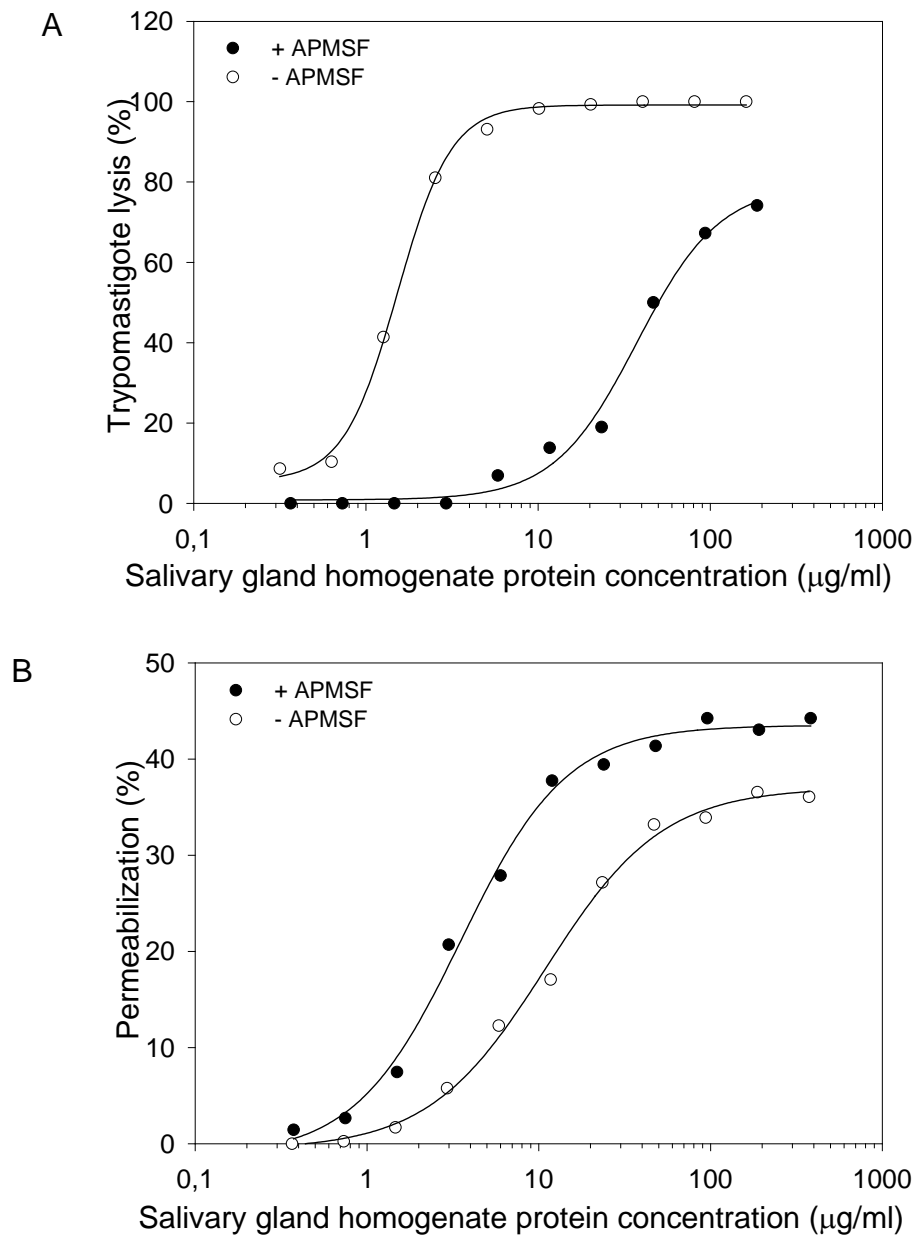


Figure 4 – Lytic activities of *T. infestans* salivary gland homogenates depends on proteolytic activation. Salivary gland homogenates prepared in the presence (●) or absence (○) of APMSF were incubated at 37°C with  $3 \times 10^6$  /ml trypomastigote forms of *T. cruzi* (A), or  $3 \times 10^7$  /ml human erythrocytes (B) for 1 h, and 2.5 h respectively. In A, the number of surviving cells was determined in a hemacytometer and the percentage of lysis was calculated relative to the control. In B, permeabilization percentage was obtained relative to hemoglobin release of control by treating the cells with 0.2% Triton X-100.

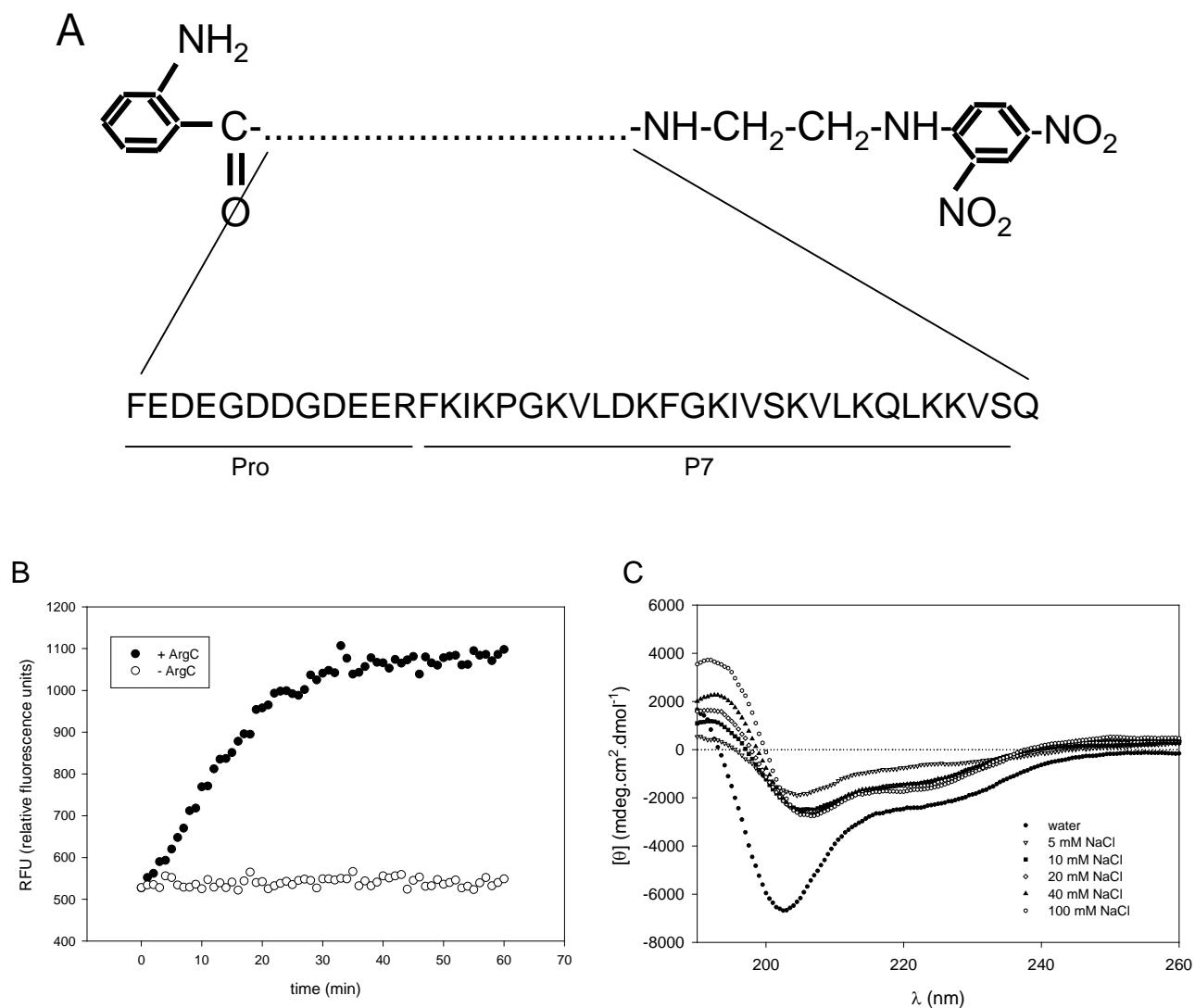


Figure 5 – ProP7 design and activation. Panel A schematically shows proP7 peptide. It was synthesized as a fluorescence resonance emission transfer peptide containing at the N-terminal fluorescence donor *o*-aminobenzoic acid and at the C-terminus the quencher Gln-[N-(2,4-dinitrophenyl)ethylenediamine]. It contained 12 amino acid residues from the pro-region and the 27 residues corresponding to the N-terminal peptide from mature trypsin (P7). Panel B shows the time course of fluorescence increase of proP7 (3.6  $\mu$ M) after incubation with 5 mg/ml endoproteinase Arg-C at 37°C. Panel C shows circular dichroism profile of 51  $\mu$ M proP7 in water and after addition of 10 mM sodium phosphate pH 7.0 containing indicated concentrations of NaCl.



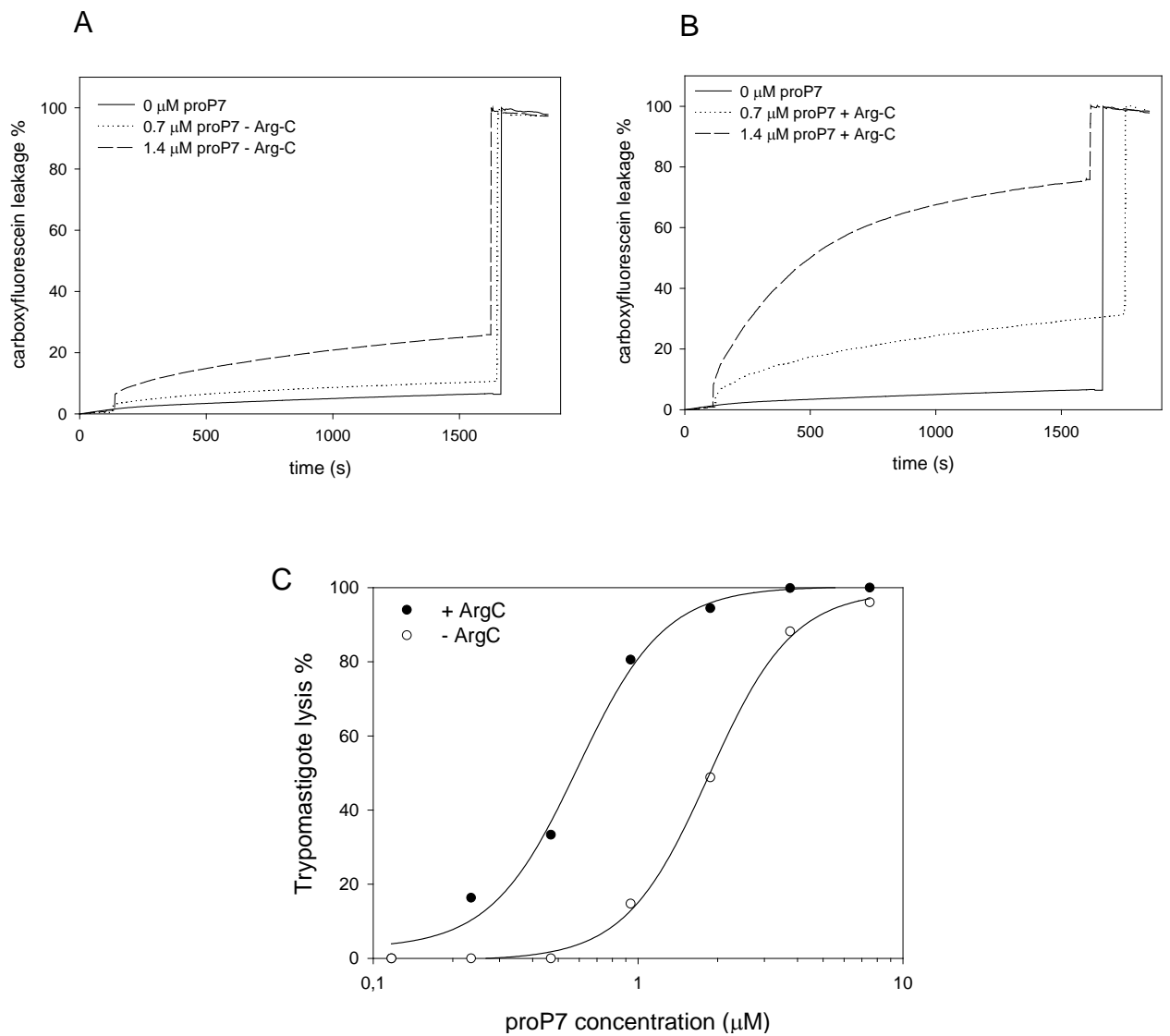


Figure 6 – Endoproteinase Arg-C treatment increases proP7 lytic activity. Leakage of carboxyfluorescein from liposomes prepared using phosphatidylcholine:cardiolipin (80:20 w:w) incubated with proP7 (A) or Arg-C-treated proP7 (B). (C) *T. cruzi* trypomastigotes were incubated with the indicated concentrations of proP7 pretreated (●) or not (○) with Arg-C.

## DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Nesta tese analisamos a estrutura do N-terminal da trialisina, região da molécula responsável pela lise de células e a ativação de sua forma precursora. Utilizando peptídeos sintéticos baseados no N-terminal da trialisina madura, observamos diferentes atividades líticas contra tripanossomas, hemácias e bactérias. Apenas os peptídeos que continham a região da primeira  $\alpha$ -hélice anfipática apresentaram proeminente atividade lítica. Através da resolução das estruturas dos três peptídeos mais ativos por RMN, descobrimos que o N-terminal da trialisina se organiza como uma  $\alpha$ -hélice cuja superfície eletrostática se mostra perfeitamente anfipática a partir do aminoácido 11 até o 30. Os 10 aminoácidos no N-terminal formam uma estrutura não convencional que modifica a especificidade de lise de peptídeos sintéticos frente às diferentes membranas biológicas. A partir do resíduo 30, a estrutura continua a poder formar  $\alpha$ -hélice mas esta passa a ser menos anfipática e tem menor atividade lítica. É possível no entanto que no contexto da proteína essas porções se organizem de maneira diferente. Isto porque, quando tentamos expressar proteínas recombinantes sem as porções do N-terminal cujos peptídeos apresentavam atividade lítica, ou seja, contendo como N-terminais apenas as regiões sabidamente helicoidais porém inativas, as bactérias hospedeiras dos plasmídeos contendo essas construções não puderam ser transformadas. Apenas retirando-se totalmente a região das duas hélices anfipáticas (cerca de 50 resíduos de aminoácidos) é que conseguimos obter a tradução de um polipeptídeo contendo parte da seqüência da trialisina (fragmento não-lítico).

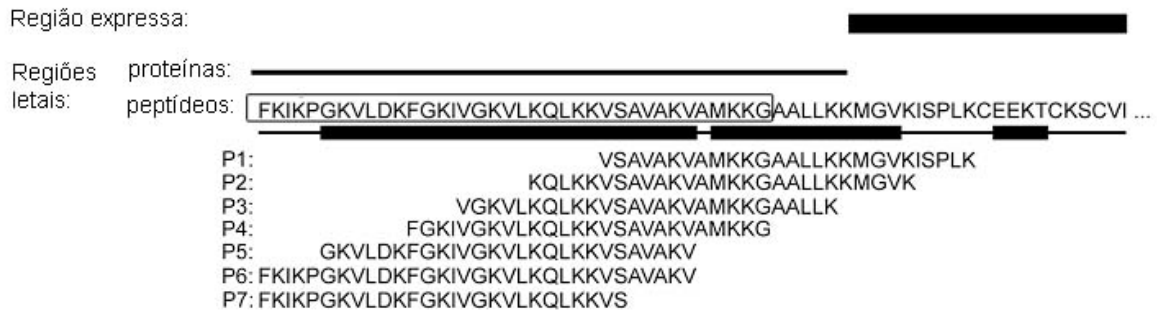


Figura 14 – Esquema dos resultados obtidos sobre a região lítica da trialisina.

Na figura 14, essas diferentes regiões estão esquematizadas ficando evidente que toda esta porção da trialisina deve ter um papel na lise celular desempenhada pela trialisina. É possível que a porção restante da proteína seja responsável pela sua oligomerização na membrana, visto seu caráter insolúvel quando produzido em bactéria. Além disso, todos os resultados em que foi possível obter recombinantes, e mesmo após purificação da trialisina, ela se mostra altamente instável, agregando e precipitando em solução. Também verificamos que após a incubação da saliva com células, a trialisina forma agregados de alta massa molecular.

Para estudar o processamento da trialisina, soros foram obtidos de coelho imunizado contra a parte não lítica e insolúvel da trialisina. Utilizando esse soro, descobrimos que a forma precursora da trialisina que é acumulada na glândula salivar e é depois liberada na salivagem é menor do que o previsto baseado na sequência de seu cDNA. Enquanto a sequência teórica predizia 55 resíduos de aminoácidos a mais do que o primeiro aminoácido da forma purificada da saliva, a forma encontrada na glândula tinha um tamanho que não deve corresponder a mais de 15 aminoácidos na pró-região. É interessante notar (figura 13, capítulo 4) que o precursor teórico tem também uma extensa região acídica, mas ele não está presente na proteína estocada. Talvez ele seja rapidamente processado, uma vez que dentro desta região se encontra uma lisina.

Sabíamos que quando a serino-protease triapsina, a mais abundante da saliva, era inibida por APMSF, a atividade lítica também era. De fato, os homogenatos das glândulas preparados na presença de APMSF, ou fervidos em SDS, contêm a forma da trisialina estocada nas glândulas. Porém, verificamos que a atividade lítica desta forma não é bloqueada totalmente, fato este confirmado quando usamos um peptídeo sintético contendo uma pequena região acídica de 12 aminoácidos (proP7). Estes resultados são interessantes pois em geral proteínas líticas produzidas como zimogênios não têm atividade se não forem processadas. Exemplos são a proteína C9 do sistema do complemento e a aerolisina, que devem ser processadas, para apresentar alguma atividade (Wang et al., 2000; Abrami et al., 1998a).

Além disso, os nossos estudos mostraram pela primeira vez o papel de uma porção encontrada na forma precursora de uma proteína lítica. Aparentemente, a região acídica interage com a parte básica. Os nossos dados de supressão de fluorescência indicam que o peptídeo proP7 está estruturado, evitando assim, que a parte do peptídeo P7 possa interagir com a superfície de membranas. Esta interação é necessária para promover penetração dos peptídeos nas membranas e promover sua ação lítica. Esta estruturação pode ocorrer pela formação de uma espécie de grampo, mas não podemos descartar que no caso do peptídeo estejam ocorrendo dimerização ou outro tipo de agregação dos peptídeos. A figura 15 mostra uma representação deste mecanismo de controle da lise pela pró-região. No caso da trisialina, não encontramos evidências de que ela dimerize no estado ativo, indicando que talvez na proteína intacta um grampo se forme realmente.

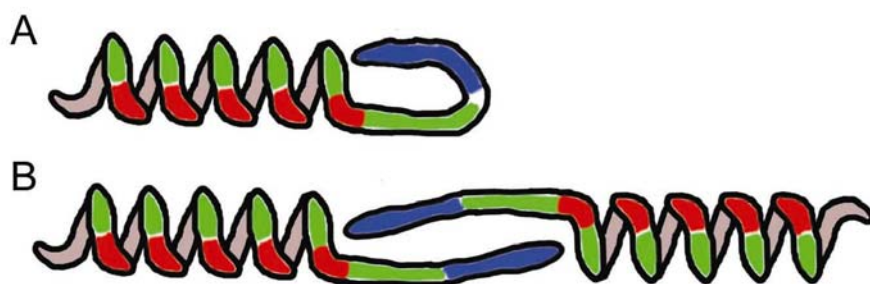


Figura 15 - Hipóteses de controle da lise da trialisina. A, pró-região impede intramolecularmente a lise interagindo com superfície catiônica do N-terminal. B, impedimento da lise ocorre por interações intermoleculares, formando dímeros. Azul, região negativamente carregada; região verde, positiva e vermelha, hidrofóbica.

Baseado nos nossos resultados a trialisina seria secretada pelas glândulas D2 na forma precursora e ao se encontrar com o conteúdo proteolítico presente na secreção da D1, ela é rapidamente ativada no sítio da picada. Nas secreções das duas glândulas, encontram-se muitas vesículas encapsulando a saliva (Reis et al., 2003). Desta forma seria possível que a baixa atividade da pró-trialisina nesse ambiente poderia auxiliar no rompimento dessas cápsulas de forma pouco drástica, solubilizando e homogeneizando o conteúdo salivar. Lipídeos presentes na saliva de *T. infestans* poderiam interagir com a pró-trialisina, impedindo o encontro dela com as membranas plasmáticas das células no órgão, evitando dano irreparável às funções da glândula (figura 16).

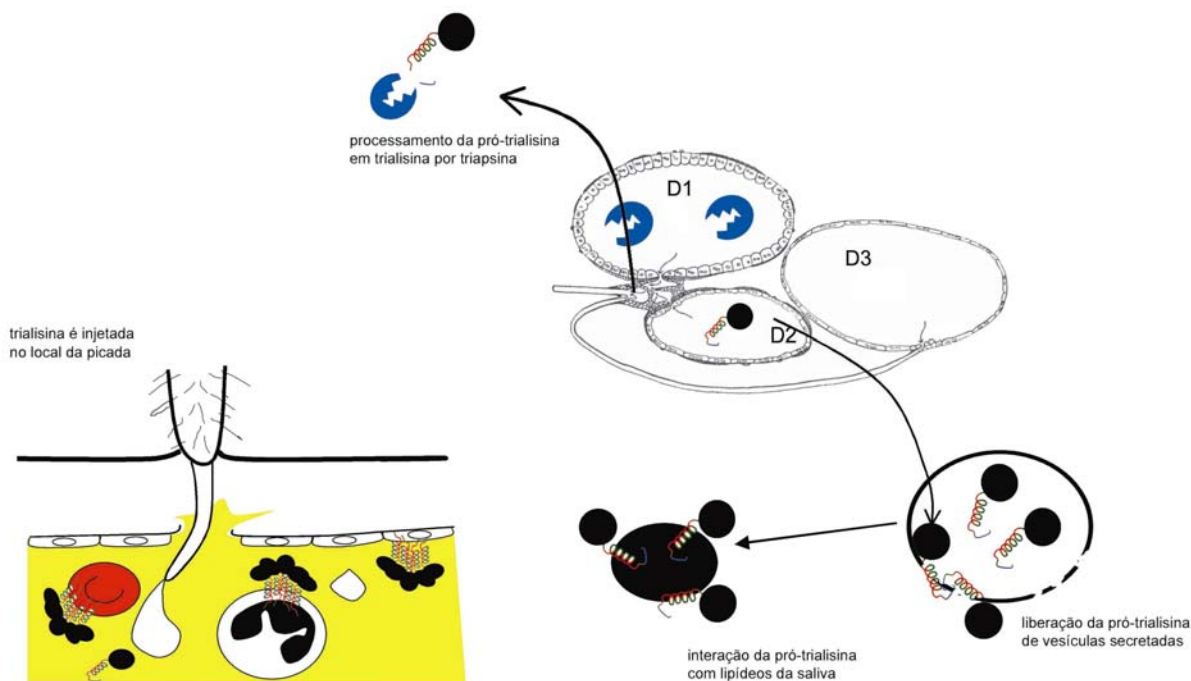


Figura 16 - Esquema da síntese e secreção da trialisina. Modificação de Barth.

No local da picada, com os conteúdos das glândulas reunidos e depois diluídos, a pró-trialisina é processada na forma madura, mais ativa. Nesse ambiente, a trialisina pode interagir com membranas diversas, rompendo plaquetas e permeabilizando endotélio e mastócitos. O efeito de permeabilização nestas células precisa ser demonstrado, além do que seria importante saber o que isto poderia acarretar como vantagem ao inseto durante a sua alimentação. Um papel nutricional pode ser descartado uma vez que os principais constituintes do sangue, as hemácias, permanecem intactas no estômago do inseto por muitas horas antes de serem rompidas. Além disso, muito pouco da saliva deve ser ingerido no repasto e, dadas as características agregantes da trialisina, sua retenção no sítio da picada é bastante provável. O desenvolvimento de insetos deficientes em trialisina, hoje factível com técnicas de interferência de RNA, poderá ajudar nessas questões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrami,L., Fivaz,M., Decroly,E., Seidah,N.G., Jean,F., Thomas,G., Leppla,S.H., Buckley,J.T., e van der Goot,F.G. (1998a). The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J. Biol. Chem.* 273, 32656-32661.

Abrami,L., Fivaz,M., Glauser,P.E., Parton,R.G., e van der Goot,F.G. (1998b). A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 140, 525-540.

Abrami,L., Fivaz,M., Glauser,P.E., Sugimoto,N., Zurzolo,C., e van der Goot,F.G. (2003). Sensitivity of polarized epithelial cells to the pore-forming toxin aerolysin. *Infect. Immun.* 71, 739-746.

Abrami,L., Fivaz,M., e van der Goot,F.G. (2000). Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol.* 8, 168-172.

Amino,R., Martins,R.M., Procopio,J., Hirata,I.Y., Juliano,M.A., e Schenkman,S. (2002). Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* 277, 6207-6213.

Amino,R., Porto,R.M., Chammas,R., Egami,M.I., e Schenkman,S. (1998). Identification and characterization of a sialidase released by the salivary gland of the hematophagous insect *Triatoma infestans*. *J. Biol. Chem.* 273, 24575-24582.

Amino,R., Tanaka,A.S., e Schenkman,S. (2001). Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 465-472.

- Andersen,J.F., Francischetti,I.M., Valenzuela,J.G., Schuck,P., e Ribeiro,J.M. (2003). Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. *J. Biol. Chem.* 278, 4611-4617.
- Andersen,J.F., Gudderra,N.P., Francischetti,I.M., Valenzuela,J.G., e Ribeiro,J.M. (2004). Recognition of anionic phospholipid membranes by an antihemostatic protein from a blood-feeding insect. *Biochemistry* 43, 6987-6994.
- Atkins,A., Wyborn,N.R., Wallace,A.J., Stillman,T.J., Black,L.K., Fielding,A.B., Hisakado,M., Artymiuk,P.J., e Green,J. (2000). Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of alpha G. *J. Biol. Chem.* 275, 41150-41155.
- Azambuja,P., Guimarães,J.A., e Garcia,E.S. (1983). Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: Evidence and partial characterization. *Journal of Insect Physiology* 29, 833-837.
- Baker,M.A., Maloy,W.L., Zasloff,M., e Jacob,L.S. (1993). Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res.* 53, 3052-3057.
- Barth,R. (1954). Estudos Anatômicos e Histológicos sôbre a Subfmaília *Triatominae* (Heteroptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 52, 517-590.
- Bernheimer,A.W. e Rudy,B. (1986). Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 864, 123-141.
- Betten,A., Bylund,J., Christophe,T., Boulay,F., Romero,A., Hellstrand,K., e Dahlgren,C. (2001). A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J. Clin. Invest* 108, 1221-1228.
- Billington,S.J., Jost,B.H., e Songer,J.G. (2000). Thiol-activated cytolytins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 197-205.



Boman,H.G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. J. Intern. Med. 254, 197-215.

Boman,H.G., Faye,I., Gudmundsson,G.H., Lee,J.Y., e Lidholm,D.A. (1991). Cell-free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins. Eur. J. Biochem. 201, 23-31.

Boman,H.G. e Steiner,H. (1981). Humoral Immunity in Cecropia Pupae. Current Topics in Microbiology and Immunology 94-5, 75-91.

Brogden,K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat. Rev. Microbiol. 3, 238-250.

Brogden,K.A., Ackermann,M., e Huttner,K.M. (1997). Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1615-1617.

Bulet,P., Hetru,C., Dimarcq,J.L., e Hoffmann,D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp Immunol. 23, 329-344.

Chagas,C. (1909). Nova tripanozomiase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159-218.

Cheigh,C.I. e Pyun,Y.R. (2005). Nisin biosynthesis and its properties. Biotechnol. Lett. 27, 1641-1648.

Chen,Y., Mant,C.T., Farmer,S.W., Hancock,R.E., Vasil,M.L., e Hodges,R.S. (2005). Rational design of alpha -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. J. Biol. Chem. 280, 12316-12329.

Christensen,B., Fink,J., Merrifield,R.B., e Mauzerall,D. (1988). Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 85, 5072-5076.

Clarke,D.J. e Campopiano,D.J. (2006). Structural and functional studies of defensin-inspired peptides. Biochem. Soc. Trans. 34, 251-256.

Cronan,J.E. (2003). Bacterial membrane lipids: Where do we stand? Annual Review of Microbiology 57, 203-224.

Cruciani,R.A., Barker,J.L., Zasloff,M., Chen,H.C., e Colamonici,O. (1991). Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 88, 3792-3796.

Dan,A., Pereira,M.H., Pesquero,J.L., Diotaiuti,L., e Beirao,P.S. (1999). Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. J. Med. Entomol. 36, 875-879.

Faudry,E., Lozzi,S.P., Santana,J.M., D'Souza-Ault,M., Kieffer,S., Felix,C.R., Ricart,C.A., Sousa,M.V., Vernet,T., e Teixeira,A.R. (2004). *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. J. Biol. Chem. 279, 19607-19613.

Flower,D.R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. Biochem. J. 318 ( Pt 1), 1-14.

Francischetti,I.M., Andersen,J.F., e Ribeiro,J.M. (2002). Biochemical and functional characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet aggregation inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides. Biochemistry 41, 3810-3818.

Garcia,E.S., Mello,C.B., Azambuja,P., e Ribeiro,J.M. (1994). *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp. Parasitol.* 78, 287-293.

Gazit,E., Boman,A., Boman,H.G., e Shai,Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34, 11479-11488.

Giangaspero,A., Sandri,L., e Tossi,A. (2001). Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur. J. Biochem.* 268, 5589-5600.

Giddings,K.S., Johnson,A.E., e Tweten,R.K. (2003). Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 11315-11320.

Gilbert,R.J. (2002). Pore-forming toxins. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 832-844.

Gilbert,R.J. (2005). Inactivation and activity of cholesterol-dependent cytolysins: what structural studies tell us. *Structure.* 13, 1097-1106.

Golodne,D.M., Monteiro,R.Q., Graca-Souza,A.V., Silva-Neto,M.A., e Atella,G.C. (2003). Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 278, 27766-27771.

Gouaux,J.E., Braha,O., Hobaugh,M.R., Song,L., Cheley,S., Shustak,C., e Bayley,H. (1994). Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 12828-12831.

Gregorio,E.A. e Ratcliffe,N.A. (1991). The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 181-186.

Grimstad,P.R., Ross,Q.E., e Craig,G.B., Jr. (1980). *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse virus. II. Modification of mosquito feeding behavior by virus infection. *J. Med. Entomol.* *17*, 1-7.

Grishammer,R. e Tate,C. (2003). Preface: overexpression of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1610*, 1.

Gudderra,N.P., Ribeiro,J.M., e Andersen,J.F. (2005). Structural determinants of factor IX(a) binding in nitrophorin 2, a lipocalin inhibitor of the intrinsic coagulation pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 25022-25028.

Hancock,R.E. e Lehrer,R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* *16*, 82-88.

Hara,S. e Yamakawa,M. (1995). Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* *270*, 29923-29927.

Harlow,E. e Lane,D. (1988). *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory).

Haukland,H.H., Ulvatne,H., Sandvik,K., e Vorland,L.H. (2001). The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Lett.* *508*, 389-393.

Hoffmann,J.A., Hetru,C., e Reichhart,J.M. (1993). The humoral antibacterial response of *Drosophila*. *FEBS Lett.* *325*, 63-66.

Holak,T.A., Engstrom,A., Kraulis,P.J., Lindeberg,G., Bennich,H., Jones,T.A., Gronenborn,A.M., e Clore,G.M. (1988). The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* *27*, 7620-7629.

Hotze,E.M., Wilson-Kubalek,E.M., Rossjohn,J., Parker,M.W., Johnson,A.E., e Tweten,R.K. (2001). Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane beta-sheet from a prepore intermediate. *J. Biol. Chem.* 276, 8261-8268.

Howard,S.P. e Buckley,J.T. (1982). Membrane glycoprotein receptor and hole-forming properties of a cytolytic protein toxin. *Biochemistry* 21, 1662-1667.

Imler,J.L. e Bulet,P. (2005). Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy* 86, 1-21.

Kagan,B.L., Selsted,M.E., Ganz,T., e Lehrer,R.I. (1990). Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 210-214.

Kiefer,H. (2003). In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 57-62.

Krause,K.H., Fivaz,M., Monod,A., e van der Goot,F.G. (1998). Aerolysin induces G-protein activation and Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 18122-18129.

Kuhn-Nentwig,L. (2003). Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 2651-2668.

Ladokhin,A.S. e White,S.H. (2001). 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 253-260.

Lavoipierre,M.M., Dickerson,G., e Gordon,R.M. (1959). Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 53, 235-250.

Lehrer,R.I. e Ganz,T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 23-27.

Lencer,W.I. e Saslowsky,D. (2005). Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins. *Biochim. Biophys. Acta* *1746*, 314-321.

Lowenberger,C., Charlet,M., Vizioli,J., Kamal,S., Richman,A., Christensen,B.M., e Bulet,P. (1999). Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* *274*, 20092-20097.

Mann,K.G., Gaffney,D., Bovill,E.G. (1990). *Williams Hematology*, McGraw-Hill, Inc.

Matsuzaki,K. (2001). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defence? *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 598-601.

Mchaourab,H.S., Hyde,J.S., e Feix,J.B. (1993). Aggregation state of spin-labeled cecropin AD in solution. *Biochemistry* *32*, 11895-11902.

Menestrina,G., Dalla,S.M., Comai,M., Coraiola,M., Viero,G., Werner,S., Colin,D.A., Monteil,H., e Prevost,G. (2003). Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* *552*, 54-60.

Menestrina,G., Serra,M.D., e Prevost,G. (2001). Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon* *39*, 1661-1672.

Monteiro,F.A., Escalante,A.A., e Beard,C.B. (2001). Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends Parasitol.* *17*, 344-347.

Montfort,W.R., Weichsel,A., e Andersen,J.F. (2000). Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta* *1482*, 110-118.

Morita,A., Isawa,H., Orito,Y., Iwanaga,S., Chinzei,Y., e Yuda,M. (2006). Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. FEBS J. 273, 2955-2962.

Okada,M. e Natori,S. (1985). Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. J. Biol. Chem. 260, 7174-7177.

Oliveira,M.F., Silva,J.R., Dansa-Petretski,M., de Souza,W., Lins,U., Braga,C.M., Masuda,H., e Oliveira,P.L. (1999). Haem detoxification by an insect. Nature 400, 517-518.

Op den Kamp,J.A. (1979). Lipid asymmetry in membranes. Annu. Rev. Biochem. 48, 47-71.

Palmer,M. (2001). The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. Toxicon 39, 1681-1689.

Papo,N. e Shai,Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. Cell Mol. Life Sci. 62, 784-790.

Park,C.B., Kim,H.S., e Kim,S.C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244, 253-257.

Pereira,M.H., Souza,M.E., Vargas,A.P., Martins,M.S., Penido,C.M., e Diotaiuti,L. (1996). Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). Acta Trop. 61, 255-261.

Peschel,A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? Trends Microbiol. 10, 179-186.

Ramachandran,R., Tweten,R.K., e Johnson,A.E. (2004). Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit beta-strand alignment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 697-705.

Reis,M.M., Meirelles,R.M., e Soares,M.J. (2003). Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue Cell* *35*, 393-400.

Ribeiro,J.M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* *4*, 143-152.

Ribeiro,J.M., Andersen,J., Silva-Neto,M.A., Pham,V.M., Garfield,M.K., e Valenzuela,J.G. (2004). Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *34*, 61-79.

Ribeiro,J.M. e Francischetti,I.M. (2003). Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* *48*, 73-88.

Ribeiro,J.M. e Garcia,E.S. (1981a). Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia* *37*, 384-386.

Ribeiro,J.M. e Garcia,E.S. (1981b). The role of the salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* *94*, 219-230.

Rossignol,P.A., Ribeiro,J.M., e Spielman,A. (1984). Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *33*, 17-20.

Rossjohn,J., Feil,S.C., McKinstry,W.J., Tsernoglou,D., van der,G.G., Buckley,J.T., e Parker,M.W. (1998). Aerolysin--a paradigm for membrane insertion of beta-sheet protein toxins? *J. Struct. Biol.* *121*, 92-100.

Sambrook,J., Fritsch,E.F., e Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press).



- Sandgren,S., Wittrup,A., Cheng,F., Jonsson,M., Eklund,E., Busch,S., e Belting,M. (2004). The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 17951-17956.
- Sarkis,J.J., Guimaraes,J.A., e Ribeiro,J.M. (1986). Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. *Biochem. J.* 233, 885-891.
- Schofield,C.J. (1988). Biosystematics of the Triatominae. In Biosystematics of Haematophagous Insects, M.W.Service, ed. (Oxford: Claredon Press), pp. 284-312.
- Schofield,C.J. (2000). Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cad. Saude Publica* 16 Suppl 2, 89-92.
- Shai,Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 55-70.
- Shatursky,O., Heuck,A.P., Shepard,L.A., Rossjohn,J., Parker,M.W., Johnson,A.E., e Tweten,R.K. (1999). The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell* 99, 293-299.
- Shepard,L.A., Shatursky,O., Johnson,A.E., e Tweten,R.K. (2000). The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. *Biochemistry* 39, 10284-10293.
- Silvestro,L. e Axelsen,P.H. (2000). Membrane-induced folding of cecropin A. *Biophys. J.* 79, 1465-1477.
- Soares,A.C., Carvalho-Tavares,J., Gontijo,N.F., dos,S., V, Teixeira,M.M., e Pereira,M.H. (2006). Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J. Insect Physiol* 52, 468-472.

Song,L., Hobaugh,M.R., Shustak,C., Cheley,S., Bayley,H., e Gouaux,J.E. (1996). Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274, 1859-1866.

Sonnichsen,F.D., Van Eyk,J.E., Hodges,R.S., e Sykes,B.D. (1992). Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry* 31, 8790-8798.

Steiner,H., Andreu,D., e Merrifield,R.B. (1988). Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. *Biochim. Biophys. Acta* 939, 260-266.

Steiner,H., Hultmark,D., Engstrom,A., Bennich,H., e Boman,H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-248.

Steinthorsdottir,V., Halldorsson,H., e Andresson,O.S. (2000). Clostridium perfringens beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microb. Pathog.* 28, 45-50.

Stroud,R.M., Reiling,K., Wiener,M., e Freymann,D. (1998). Ion-channel-forming colicins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 525-533.

Terra,W.R. (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 675-734.

Tweten,R.K. (2005). Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect. Immun.* 73, 6199-6209.

Tzokov,S.B., Wyborn,N.R., Stillman,T.J., Jamieson,S., Czudnochowski,N., Artymiuk,P.J., Green,J., e Bullough,P.A. (2006). Structure of the hemolysin E (HlyE, ClyA, and SheA) channel in its membrane-bound form. *J. Biol. Chem.* 281, 23042-23049.

- Wallace,A.J., Stillman,T.J., Atkins,A., Jamieson,S.J., Bullough,P.A., Green,J., e Artymiuk,P.J. (2000). E. coli hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* 100, 265-276.
- Wallin,E. e von Heijne,G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7, 1029-1038.
- Wang,Y., Bjes,E.S., e Esser,A.F. (2000). Molecular aspects of complement-mediated bacterial killing. Periplasmic conversion of C9 from a protoxin to a toxin. *J. Biol. Chem.* 275, 4687-4692.
- Wekesa,J.W., Copeland,R.S., e Mwangi,R.W. (1992). Effect of *Plasmodium falciparum* on blood feeding behavior of naturally infected Anopheles mosquitoes in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 484-488.
- WHO Expert Committee. Control of Chagas Disease. 905. 2002. World Health Organization.
- Wilmsen,H.U., Leonard,K.R., Tichelaar,W., Buckley,J.T., e Pattus,F. (1992). The aerolysin membrane channel is formed by heptamerization of the monomer. *EMBO J.* 11, 2457-2463.
- World Health Organization e Center for International Earth Science Information Network. *Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors.* 1989.
- Yang,L., Harroun,T.A., Weiss,T.M., Ding,L., e Huang,H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81, 1475-1485.
- Zakharov,S.D. e Cramer,W.A. (2002). Insertion intermediates of pore-forming colicins in membrane two-dimensional space. *Biochimie* 84, 465-475.
- Zasloff,M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 5449-5453.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Zhang, Y., Ribeiro, J.M., Guimaraes, J.A., e Walsh, P.N. (1998). Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex. *Biochemistry* 37, 10681-10690.

Zhao, H., Mattila, J.P., Holopainen, J.M., e Kinnunen, P.K. (2001). Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophys. J.* 81, 2979-2991.