

ARTICULO ORIGINAL

ANALISIS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA TRANS-SIALIDASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*. IDENTIFICACION DEL SITIO DE RECONOCIMIENTO DE LOS RESIDUOS DE ACIDO SIALICO Y DEL SITIO CATALITICO DE LA ENZIMA

John Santiago Mejía Tobón*

RESUMEN

Mejía J.S. Análisis de la estructura primaria de la trans-sialidasa de *trypanosoma cruzi*. Identificación del sitio de reconocimiento de los residuos de ácido siálico y del sitio catalítico de la enzima. CES, Med 1995; 9:176-182

La trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* es una de las enzimas más versátiles descritas y uno de los principales determinantes de patogenicidad del parásito. Cataliza una reacción que es crucial en el ciclo de vida del parásito: la transferencia de residuos de ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos del huésped hacia sacáridos aceptores sobre la superficie de los tripomastigotos. El entendimiento de la estructura de esta enzima es fundamental ya que, por ser específica de parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, es un blanco potencial para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos o vacunas. Con base en estudios comparativos de la secuencia de aminoácidos de la trans-sialidasa y la secuencia de la hemaglutinina del virus de la influenza, se postula la localización del sitio de reconocimiento de los residuos de ácido siálico en la trans-sialidasa. Además, la comparación de la secuencia de aminoácidos de la trans-sialidasa con otra proteína muy similar (SAPA) que carece de actividad catalítica permite identificar la localización del sitio catalítico de la enzima. Estos hallazgos permiten postular que la vacuna del virus de la influenza está en condiciones de inducir una respuesta inmune protectora en contra del *T. cruzi*.

SUMMARY

Mejía J.S. Analysis of the primary structure of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. Identification of the catalytic site of the enzyme and the binding site of sialic acid. CES Med 1995;9:176-182

The trans-sialidase is one of the most versatile enzymes described and one of the main pathogenicity determinants of *Trypanosoma cruzi*. It catalyzes a crucial reaction in the life cycle of the parasite: the transfer of sialic residues from the glycoproteins and glycolipids of the host to acceptor saccharides on the surface of the trypomastigotes. It is fundamental to understand the structure of this enzyme since, by being found only in parasites of the *Trypanosomatid* family, it is a potential target of chemotherapeutic agents and vaccines. Based on comparative studies of the protein sequence of trans-sialidase and influenza virus hemagglutinin, a proposal is made on the localization of the site for recognition of the sialic acid residues of the trans-sialidase. Comparison of the trans-sialidase protein sequence with that of a very similar protein (SAPA) without catalytic activity, identified an area where the catalytic site may lay. These findings allow to postulate that influenza virus hemagglutinin is able to induce a protective immune response against *T. cruzi*.

INTRODUCCION

En contraste con la característica expresión de una sola glicoproteína sujeta a intensa variabilidad antigénica en la superficie de los tripanosomas africanos,¹ los tripomastigotos de *Trypanosoma cruzi* expresan simultáneamente varias glicoproteínas de superficie²⁻⁷ que no están sujetos a variabilidad antigénica.⁸ Algunas de estas glicoproteínas participan en el proceso de invasión celular y se ha postulado que su alto polimorfismo es una estrategia que le permite al parásito invadir una gran variedad de células.⁸

Los residuos de ácido siálico están dentro de los principales ligandos de estas otras glicoproteínas de superficie de las formas infectantes del parásito. En los tripomastigotos tisulares el reconocimiento de estos residuos es mediado por una lectina (penetrina)^{9,10} y por una enzima (trans-sialidasa).¹¹ Se ha postulado que en este proceso participan también algunos miembros de la familia de la trans-sialidasa carentes de actividad catalítica.⁷

* Master en Ciencias, Instituto Politécnico Nacional, México, Profesor CES.

La trans-sialidasa en la relación huésped-parásito

La trans-sialidasa es uno de los principales determinantes de patogenicidad de *Trypanosoma cruzi* y una de las enzimas más versátiles descritas. Cataliza la remoción de residuos de ácido siálico en glicoproteínas y glicolípidos del huésped vertebrado para transferirlos a sacáridos aceptores presentes sobre la superficie de las formas infectantes del parásito.¹²⁻¹⁵ En ausencia de un sacárido aceptor adecuado, el residuo de ácido siálico puede ser transferido a moléculas de agua, por lo que la trans-sialidasa es también una sialidasa o neuraminidasa.^{11,16}

La actividad catalítica de la trans-sialidasa tiene profundos efectos en la relación huésped-parásito. La sialilación de los tripomastigotos los hace más infectantes y menos activadores del sistema del complemento, permitiéndoles así evadir los sistemas de defensa del huésped.^{15,17,18} Además, la trans-sialidasa modula la infectividad de los tripomastigotos tisulares¹⁹ y participa en un esquema de evasión inmune basado en la expresión de un epítipo inmunodominante que no induce inmunidad protectora.² De otro lado, la desialilación de las moléculas del huésped altera su función, vida media e inmunogenicidad, lo cual contribuye a los procesos patológicos que causan anemia, leucopenia, trombocitopenia, arritmias cardíacas, activación policlonal del sistema inmune e inmunosupresión durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas.²¹⁻²⁴

Regulación en la expresión de la trans-sialidasa

La trans-sialidasa se expresa preferencialmente en las formas infectantes del parásito (tripomastigotos); niveles más bajos se detectan en las formas de multiplicación presentes en el insecto vector (epimastigotos) y no se detecta actividad alguna en las formas de replicación intracelular (amastigotos).²⁵ El inicio de la expresión de la trans-sialidasa ocurre durante la transformación de amastigotos en tripomastigotos intracelulares, detectándose primero en el aparato de Golgi y después en la superficie de los parásitos.^{26,27} Dentro de la célula infectada todos los tripomastigotos expresan la trans-sialidasa, pero al entrar en contacto con el medio extracelular, se inicia un proceso de liberación de la enzima. Este nivel de regulación de la expresión de la trans-sialidasa está a cargo de una enzima del parásito (fosfolipasa C) que rompe específicamente los puentes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que anclan la trans-sialidasa a la superficie del parásito.²⁸

Experimentos *in vitro* revelan que la liberación

de la trans-sialidasa es rápida y selectiva; la mayoría de los tripomastigotos (70-80%) dejan de expresarla, mientras que el resto continúa haciéndolo de manera estable.²⁸ Estudios con marcaje metabólico de la trans-sialidasa sugieren que el mecanismo de resistencia a la fosfolipasa C de las moléculas de trans-sialidasa que permanece asociada al parásito, no es debido a la presencia de un dominio transmembrana. Una explicación alternativa es que estas moléculas tengan en el sistema de anclajes GPI una modificación que lo haga resistente a la fosfolipasa C, lo cual ocurre si se establece la esterificación de un ácido graso al inositol del oligosacárido conector.²⁹

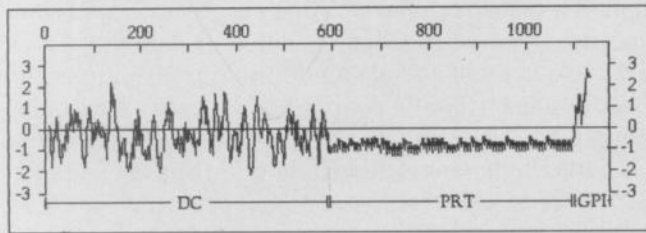
Es posible que la regulación de la expresión de la trans-sialidasa represente un mecanismo de evasión inmune ya que la enzima expresa un epítipo inmunodominante hacia el cual se generan altos títulos de anticuerpos durante la fase aguda de la enfermedad.²⁰ Además, es posible que represente un sistema para generar subpoblaciones de parásitos con diferentes grados de infectividad, una estrategia que garantiza la diseminación de la infección a los diferentes tejidos del huésped y la permanencia en sangre periférica de una subpoblación de baja infectividad que es clave en la transmisión de la infección al insecto vector.

Estructura de la trans-sialidasa

Anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para la trans-sialidasa permitieron la caracterización de la enzima^{26,30} y la clonación del gene.⁶ La trans-sialidasa es un sistema enzimático polimórfico, con característicos patrones electroforéticos en las diferentes cepas de *T. cruzi*.³ En la cepa Silvio X10/4, la enzima está conformada por oligómeros constituidos por subunidades de 200,150 y 120 kDa.³⁰ Una de estas subunidades fue clonada a partir de una librería genómica con el anticuerpo monoclonal TCN-1.⁶ El gene secuenciado contiene un marco de la lectura abierto que codifica para una proteína de 1162 aminoácidos. Tres dominios se reconocen en la secuencia: un dominio amino-terminal (aminoácidos 1-588), un dominio formado por 44 péptidos repetidos en tandem (aminoácidos 589-1127) (dominio PRT) y un segmento carboxilo-terminal hidrofóbico cuya secuencia es compatible como parte de un sistema de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (puentes GPI) (aa1128-1162). Estos tres dominios se pueden identificar claramente en una representación del grado de hidrofobicidad (>0)/hidrofilicidad (<0) de la secuencia peptídica. (Figura 1).

Figura 1.

Representación del índice de hidrofobicidad (Kyte Doolittle) de la secuencia del gene de la trans-sialidasa de *T. cruzi*



DC = Dominio catalítico
 PRT = Péptidos repetidos en tandem.
 GPI = Puentes de glicosilfosfatidilinositol.

Dominio de anclaje

La presencia del dominio GPI confirma estudios preliminares que indican que la trans-sialidasa usa este tipo de anclaje.^{5,28}

Dominio de péptidos repetidos en tandem (PRT)

Este dominio está conformado por un dodecapéptido hidrofílico que se repite en tandem un número variable de veces (44 en la clona 7F). Al comparar la secuencia del dominio PRT de la trans-sialidasa⁶ con la de otro miembro no catalíticamente activo de la familia de la trans-sialidasa, SAPA,⁵ se observó que la variabilidad en la secuencia está prácticamente confinada a las posiciones 6 y 12 del péptido, en donde se observan cambios conservativos (glicina por serina en posición 6 y valina por alanina en posición 12) (Figura 2). Con muy poca frecuencia se observan cambios en las posiciones 3 y 7.

Dentro de las funciones definidas del dominio PRT se encuentra la oligomerización de la enzima³¹ y la expresión de un epítipo inmunodominante que hace parte de un esquema de evasión inmune previamente descrito para otros parásitos y conocido como la cortina de humo.^{20,32} La presencia de un péptido inmunodominante repetido en tandem en una proteína bloquea la maduración de la respuesta inmune humoral impidiendo el desarrollo de reactividades capaces de neutralizar funciones de otras partes de la molécula.³ Estos dominios de PRT pueden, además, inducir la activación de los linfocitos B en ausencia de ayuda de linfocitos T.³³

Estudios enzimáticos, inmunológicos y genéticos indican que la expresión del dominio PTR es universal en toda las cepas de *T. cruzi*, lo cual indica que debe realizar una función vital para el parásito. Es posible que cambios sustanciales en la secuencia de este dominio permitan a los huéspedes infectados desarrollar una inmunidad protectora antes de que el

Figura 2.

Variabilidad en la secuencia del péptido repetido en tandem (PRT) en la secuencia de la trans-sialidasa de *T. cruzi*

Secuencia del dodecapéptido												TCNA	SAPA
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
D	S	S	A	H	S	T	P	S	T	P	A	(18)*	(6)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	(9)	(4)
-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	V	(9)	(2)
-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	(7)	(0)
-	-	-	-	-	G	A	-	-	-	-	-	(1)	(0)
-	-	T	-	-	G	-	-	-	-	-	V	(0)	(2)

* Número de péptidos que aparecen en la secuencia del dominio PRT.

TCNA. Secuencia del gene de la trans-sialidasa obtenida de la cepa Silvio X-10/4.

SAPA. Secuencia del gene de la trans-sialidasa obtenida de la cepa Ra.

parásito alcance la circulación periférica, lo cual bloquearía la transmisión de la infección al insecto vector. Sin embargo, la preservación de la secuencia de PRT de la trans-sialidasa puede tener otra razón biológica más interesante. El dominio PRT de la trans-sialidasa tiene una significativa homología con la cola de la RNA polimerasa II,³⁴ una estructura que es fosforilada y/o glicosilada en los múltiples residuos de serina o treonina de su secuencia.³⁵ En el dominio PRT de la trans-sialidasa se encontraron 180 sitios que podrían ser fosforilados y/o glicosilados por las mismas enzimas que actúan sobre la RNA polimerasa II;⁶ de ocurrir estas modificaciones en la trans-sialidasa, se depletarían rápidamente los niveles de ATP de la célula infectada, un evento que podría señalar la destrucción celular y liberación de los tripomastigotos tisulares. En este contexto sería muy importante la preservación de la secuencia peptídica del dominio PRT.

Dominio catalítico

Estudios con fragmentos proteolíticos y con proteínas recombinantes han establecido que el sitio catalítico de la trans-sialidasa se encuentra en el dominio aminoterminal.^{16,31} En este dominio se encontraron secuencias características de las sialidasas bacterianas^{6,36-38} (Figura 3). Estas secuencias S-x-S-x-D-x-T-W (en donde x puede ser cualquier residuo) se encuentran espaciados en la secuencia de las sialidasas bacterianas y en varias glicoproteínas de membrana de los tripomastigotos

Figura 3.

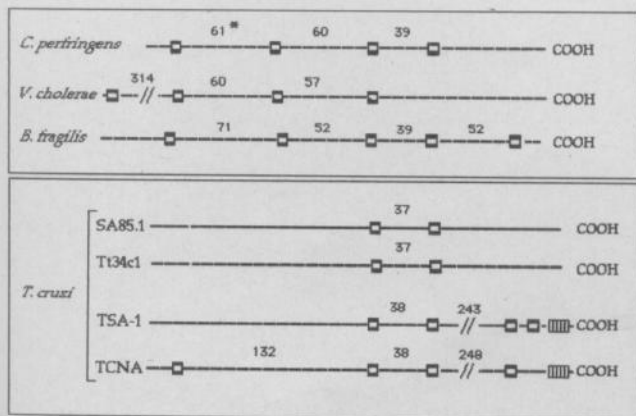
Secuencias conservadas en neuraminidasas bacterianas (SNB) y presencia de estas secuencias en el gene de la trans-sialidasa de *T. cruzi*

71-- A R S T D F G K T W E T	<i>C. perfringens</i>
140-- I Y S D D N G L T W S N	
208-- I Y S K D N G E T W T N	
255-- Y I S H D L G T T W E I	
263-- R T S R D G G I T W D T	<i>V. cholerae</i>
585-- I Y S D D G G S N W Q T	
653-- F L S K D G G I T W S L	
718-- W F S F D E G V T W K G	
X X S X D X G X T W X X	CONSENSO
23-- K Y S V D D G E T W E T	<i>T. cruzi</i>
163-- F Y S E D D G K T W K F	
209-- Y E S S D M E K P W V E	
469-- G L S Y D E K H Q W Q P	

tisulares de *T. cruzi* (Figura 4).⁷ Es poco probable que las SNBs representen el sitio activo de la trans-sialidasa puesto que muchas de las proteínas de superficie de los tripomastigotos tisulares que las expresan no tienen actividad de trans-sialidasa. Sin embargo, se ha postulado que su función está relacionada con el plegamiento adecuado de las glicoproteínas para el reconocimiento de los residuos de ácido siálico u otros sacáridos.^{3,4,39}

Figura 4.

Localización de las secuencias conservadas en neuraminidasas bacterianas (SNB) en los genes de 3 neuraminidasas bacterianas y en 4 genes de superficie de tripomastigotos tisulares de *T. cruzi*

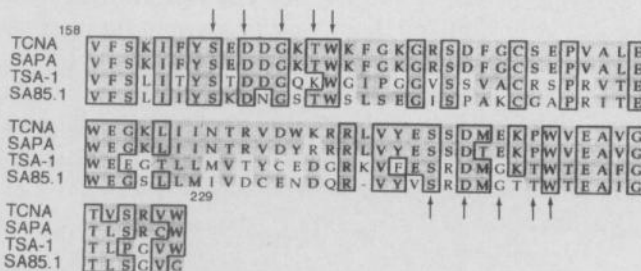


□ SNB
 * Número de aminoácidos que separa las SNB
 ▨ Dominio PRT

Una comparación en la secuencia de cuatro de las principales moléculas de superficie de los tripomastigotos (TS, SAPA, TSA-1 y SA85.1) revela la significativa homología en el área donde están las SNBs (Figura 5). Las SNBs son sólo una de varias secuencias preservadas en esta familia de glicoproteínas. Otras secuencias altamente conservadas son: ²⁴⁵ T-x-T-I-E-G-x-x-V-M-L-x-T ^{258, 324} R-L-x-x-E-L-x-x-I-x-S-V-L-x-x-W ³³⁹ y ⁵⁵³ T-x-x-x-V-x-L-Y-N-R-x-L ⁵⁶⁶.

Figura 5.

Homología en la secuencia de 4 glicoproteínas de superficie de tripomastigotos tisulares de *T. cruzi*

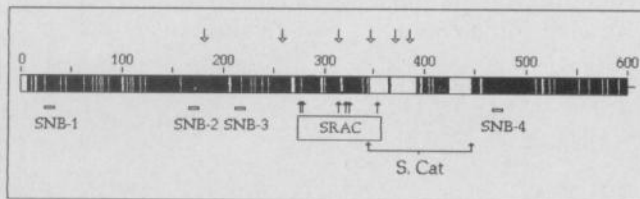


Las flechas indican los residuos preservados en neuraminidasas bacterianas.

El análisis comparativo de las secuencias de la trans-sialidasa y SAPA es importante en la definición del sitio catalítico de la trans-sialidasa puesto que, a pesar de su alta homología (>85%), SAPA no tiene actividad enzimática. Las mayores diferencias en la secuencia se observan entre los residuos 344 y 441 de la trans-sialidasa en donde postulamos debe estar el sitio catalítico de la enzima (Figura 6).

Figura 6.

Estructura del dominio catalítico de la trans-sialidasa de *T. cruzi*



La secuencia peptídica de la trans-sialidasa (gene TCNA) está representada en la barra numerada. Las líneas verticales dentro de la barra representan residuos no conservados en la secuencia de SAPA. SNB = Secuencia de neuraminidasas bacterianas. SRAC = Secuencia de reconocimiento de ácido siálico S. Cat = Sitio catalítico. Flechas blancas indican la posición de los residuos de cisteína en la secuencia.

Es posible que el sitio de reconocimiento de los residuos de ácido siálico (SRAC) de la transaminasa se encuentre entre los residuos 271 y 352, con base en la significativa homología con el sitio de reconocimiento de ácido siálico de la hemaglutinina del virus de la influenza (Figura 7).^{40,41} La SRAC de la trans-sialidasa se encuentra contenida en un segmento rico en cisteínas y anexo al área que hipotéticamente representa el sitio catalítico (S.Cat) de la trans-sialidasa (Figura 6). El plegamiento proteico mediado por puentes disulfuro permitiría la formación de un bolsillo con afinidad por los residuos de ácido siálico (Figura 8).

Esta homología estructural entre la trans-sialidasa de *T. cruzi* y la hemaglutinina del virus de la influenza plantea la posibilidad de inducir una respuesta inmune neutralizante de la actividad catalítica de la trans-sialidasa inmunizando con la hemaglutinina del virus de la influenza. Dada la importancia de la trans-sialidasa en la relación huésped-parásito, sería posible prevenir la enfermedad de Chagas con la vacuna del virus de la influenza.

Figura 8.
Posible estructura terciaria de la trans-sialidasa de *T. cruzi*

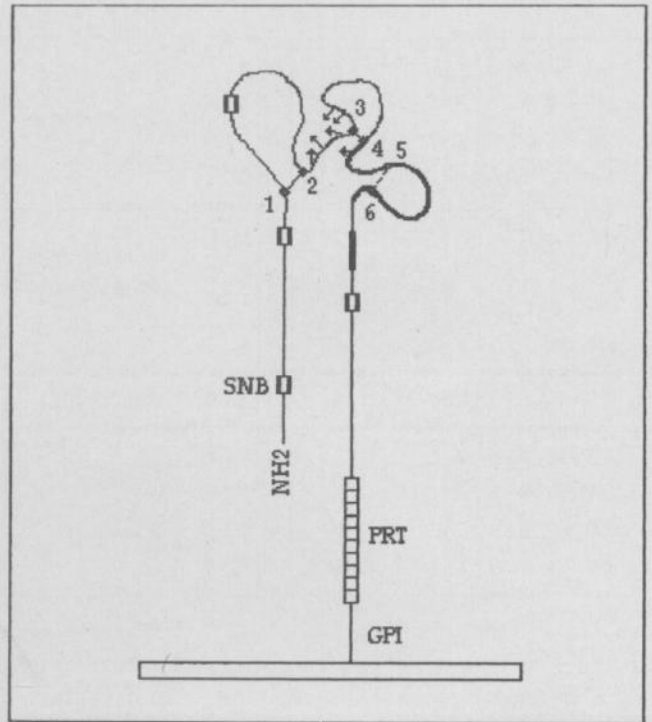
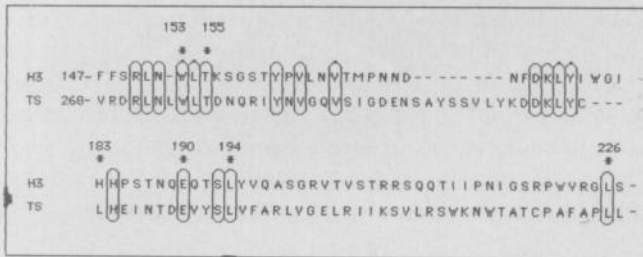


Figura 7.
Homología de la secuencia de amino ácidos de la hemaglutinina (H3) del virus de la influenza y la trans-sialidasa (TS) de *Trypanosoma cruzi*



SNB = Secuencias de neuraminidasas bacterianas
 PRT = Péptidos repetidos en tandem
 GPI = Puentes de glicosilfosfatidilinositol
 Los números indican los residuos de cisteína.
 Las flechas representan los posibles sitios de fijación al ácido siálico.

* Los residuos señalados sobre la secuencia de la hemaglutinina del virus de la influenza (H3) conforman el sitio de fijación al ácido siálico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barry JD. African trypanosomiasis. Vaccination strategies of tropical diseases. FY Liew editor. Boca Raton: CRC Press, 1989: 197-217.
2. Kahn S, Colbert TG, Wallace JC, Hoagland NA, Eisen H. The major 85Kd surface antigen of the mammalian-stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. Proc Nat Acad Sci 1991; 88:4481.
3. Fouts DL, Ruff J, Ridley PT, Wrightsman RA, Peterson DS, Manning JE. Nucleotide sequence and transcription of a trypomastigote surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi*. Mol & Biochem Parasit 1991; 46:189-200.
4. Tacke GB, Cross GAM. An 85Kd surface antigen gene family of *Trypanosoma cruzi* encodes polypeptides homologous to bacterial neuraminidase. Mol & Biochem Parasit 1991; in press.
5. Pollevick GD, Affranchino JL, Frash ACC, Sánchez DO. The complete sequence of shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. Mol & Biochem Parasit 1991; 47: 247.
6. Pereira MEA, Mejía JS, Ortega-Barría E, Matzilevitch D, Prioli RP. The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. J Exp Med; 1991; 174:179-191.
7. Colli W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. FASEB J 1993; 7:1257-1264.
8. Kahn S, Van Voorhis WC, Eisen U. The major 85Kd surface antigen of the mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. J Exp Med 1990; 172:589.
9. Ortega-Barría E, Pereira MEA. Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. Infec Ag and Dis 1992; 1:136-145.
10. Ortega-Barría E, Pereira MEA. A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. Cell 1991; 67:411.
11. Ming M, Chuenkova M, Ortega-Barría E, Pereira MEA. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. Mol & Biochem Parasit 1993; 59: 243-252.
12. Previato JO, Andrade AF, Pesolani MC, Mendoca Previato L. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. Mol & Biochem Parasit 1985;16:85-96.
13. Zingales B, Carniol C., De Lederkremer RM, Colli W. Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol & Biochem Parasit 1987; 26:135.
14. Scudder P, Doom JP, Chuenkova M, Manger I D, Pereira MEA. Enzymatic characterization of B-D-galactoside a-2,3-trans-sialidase. J Biol Chem 1993; 268:9886-9891.
15. Schenkman S, Ferguson MAJ, Heise N, Cardoso de Almeida ML, Mortara RA, Yoshida N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. MBP 1993; 59:293-304.
16. Uemura H, Schenkman S, Nussenzweig V, Eichinger D. Only some members of a gene family in *Trypanosoma cruzi* encode proteins that express both trans-sialidase and neuraminidase activities. EMBO J 1992; 11:3837-3844.
17. Kipnis TL, David JR, Alper CA, Sher A, Da Silva WD. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiate their uptake by macrophages. Proc Nat Acad Sci USA 1981; 78:602.
18. Schenkman S, Kurosaki T, Ravetch JV, Nussenzweig V. Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of non-phagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. J Exper Med 1992; 175:1635-1641.
19. Pereira MEA. (1988) Does *Trypanosoma cruzi* modulate infection by inherent positive and negative control mechanisms?. En: The biology of parasitism. PT Englund and A Sher (ed). New York: Alan R Liss, Inc, 1988:105-109.
20. Prioli RP, Ortega-Barría E, Mejía JS, Pereira MEA. Mapping of a B-cell epitope in the neuraminidase of *Trypanosoma cruzi*. Mol & Biochem Parasit 1992; 52:85-96.
21. Libby P, Alroy J, Pereira MEA. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. J Clin Invest 1986;77: 127.
22. Simchon S, Jan K-M, Chien S. Studies on sequestration of neuraminidase-treated red blood cells. Am J Physiol 1988; 254:H1167.
23. Titto EH, Araujo FG. Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. Clin Immunol & immunopath 1988; 46: 157.
24. Yee Jr HF, Weis JN, Langer GA. Neuraminidase selectively enhances transient Ca⁺ current in cardiac myocytes. Am J Physiol 1989; 256:C126.
25. Pereira MEA. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. Science 1983; 219:1444.
26. Prioli RP, Mejía JS, Aji T, Aikawa M, Pereira MEA. *Trypanosoma cruzi*: Localization neuraminidase on the surface of trypomastigotes. Trop Med & Parasit 1991; 42:146-150.
27. Rosenberg I, Prioli RP, Mejía JS, Pereira MEA. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase in intra- and extracellular trypomastigotes. Infection & Immunity 1991a; 59:464-466.
28. Rosenberg I, Prioli RP, Ortega-Barría E, Pereira MEA. Stage-specific phospholipase C mediated release of *T. cruzi* neuraminidase. Mol & Biochem Parasit 1991b; 46:303-306.
29. Englund PT. The structure and biosynthesis of glycosylphosphatidyl inositol protein anchors. Ann Rev Biochem 1993; 62:121-138.
30. Prioli RP, Mejía JS, Pereira MEA. Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhance infection in vitro. J Immunol 1990; 144:4384.
31. Schenkman S, Chaves LB, Pontes de Carvalho LC, Eichinger D. A proteolytic fragment of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the carboxy-terminal domain is active, monomeric and

- generate antibodies that inhibit enzymatic activity. *J Biol Chem* 1994; 269:7970-7975.
32. Anders RF, Coppel RL, Brown GV, Kemp DJ. Antigen with repeated amino acid sequences from the asexual blood stage of *Plasmodium falciparum*. *Prog in Allergy* 1988; 4:148.
 33. Cazzulo JJ, Frasch ACC. SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *T. cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB J* 1992; 6:3259-64.
 34. Matusushima N, Creutz CE, Kretsinger RH. Polyproline, B-turn helices. Novel secondary structures proposed for the tandem repeats within rhodopsin, synaptophysin, synexin, gliadin, RNA polimerase II, hordein and gluten. *Proteins: Structure, function, and genetics* 1990; 7:125.
 35. Hart GW, Kelly WG, Blomberg MA et al. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic protein is as abundant as dynamic as phosphorylation. In: *DNA replication and the cell cycle*. 44. Colloquium Mosbach. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1993:91-103.
 36. Roggentin P, Rothe B, Lottspeich F, Schauer R. Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene. *FEBS Letter* 1988; 238:31.
 37. Russo TA, Thompson JS, Godoy VG, Malamy MH. Cloning and expression of the *Bacteroides fragilis* TAL 2480 neuraminidase gene, nanH, *E. coli*. *J Bacteriol* 1990; 172:2594.
 38. Roggentin P, Rothe B, Kaper JB et al. Conserved sequences in bacterial and viral sialidases. *Glycoconjugate J* 1989; 6:349.
 39. Peterson DS, Fouts DL, Manning JE. The 85Kd surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* is telomeric and a member of a multigene family. *EMBO J* 1989; 8:3911.
 40. Donis RO, Bean WJ, Kawaoka Y, Webster RG. Distinct lineages of influenza virus H4 hemagglutinin genes in different regions of the world. *Virology* 1989; 169:408-417.
 41. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 1988; 333:426-431.