



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia

**Purificação parcial das quitinases, *Pbcts1* e *Pbcts2*, do fungo
*Paracoccidiodes brasiliensis***

Candidata: Lidiane Aparecida da Penha Santana

Orientadora: Profa. Dra. Maristela Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia.

Goiânia – Goiás
Abril - 2008

DISSERTAÇÃO DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA.

Apoio financeiro: Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Maristela Pereira, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SUPLENTE

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Não deixe que a saudade sufoque,
que a rotina acomode, que o medo
 impeça de tentar. Desconfie do
destino e acredite em você. Gaste
 mais horas realizando que
sonhando, fazendo que planejando,
 vivendo que esperando, porque,
embora quem quase morre esteja
vivo, quem quase vive já morreu.
 (Luiz Fernando Veríssimo)

Dedico esta dissertação aos meus
pais Vivaldo Santana da Silva e
Marleny da Penha Oliveira Santana
pelo grande amor, apoio e total
confiança depositada em mim.

Dedico ainda à minha orientadora,
Maristela, que acreditou em mim,
esteve SEMPRE presente na
produção desse trabalho e é um
exemplo de chefe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos e detalhes de nossas vida.

À Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, pelo apoio, pelas sugestões e por todo auxílio prestado durante a realização desta dissertação.

À Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein e ao Prof. Augusto Shrank por me receber muitíssimo bem em seus laboratórios na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Agradeço também a confiança dos senhores no meu potencial como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, pelo seu apoio, sugestões e atenção mesmo em seu pouco tempo disponível.

Aos professores do Curso e Mestrado do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, que muito contribuíram em meu aprendizado.

À minha querida amiga Débora, por ser a pesquisadora mais nata que já conheci e tentar me fazer sentir assim também. E ainda aos meus amigos, Bruno e Guilherme pelo auxílio estatístico!

À Patrícia Lima, pela amizade, carinho e confiança.

À Patrícia Kott pelos ensinamentos iniciais na pesquisa científica e pela sua amizade.

Ao Rogério, Neto, Patrícia Zambuzzi, Sabrina, Sarah, Kelly Pacheco, Amanda, Raquel, Regilda, Tereza Cristina, Mariana, Nathalie, Rodrigo e Murilo pela amizade e por tornar o ambiente de trabalho um local agradável de estar.

Aos alunos da professora Marilene, do professor Augusto e do professor Henrique que me receberam muito bem em seus laboratórios. Agradeço em especial à Irina, Lívia, Juli, Melissa, Bianca, Roberta, Juliano, Charley, Leonardo e Cláudio pelo apoio na minha adaptação e pela amizade.

E a todos os colegas e companheiros que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho: Luiz Augusto, Juliana, Clayton, Alexandre, Roney, Elisa Flávia, Mirelle, Ana Flávia, Ívian, Ademar, Leandro, Daiane, Martha e João Guilherme.

E ainda aos que deixaram muitas saudades: Bruno, Moniquinha, Milce, Aline, Cristhielly e Kesser.

Ao CNPq, CAPES e PROCAD, pelo apoio financeiro.

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
I – INTRODUÇÃO.....	12
I.1 – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	13
I.2 – Quitinases.....	18
II – JUSTIFICATIVAS.....	29
III – OBJETIVOS.....	31
IV – MANUSCRITO.....	33
Title, general information and keywords.....	34
Abstract.....	35
Introduction.....	36
Materials and methods.....	37
Results.....	42
Discussion.....	45
Acknowledgements.....	47
References.....	48
Table.....	52
Figure legends.....	53
Figures.....	56
V – CONCLUSÕES.....	60
VI – PERSPECTIVAS.....	63
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
VII – ANEXOS.....	81

Instruções aos autores – FEMS Microbiology Letters

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico patogênico humano. A quitinase recombinante de *P. brasiliensis*, *Pbcts1r*, foi superexpressa em *Escherichia coli* utilizando pET-32(a)+ como vetor. A enzima foi produzida em corpos de inclusão e se tornou solúvel pela adição de sarkosyl, sendo purificada em um único passo com a utilização da resina Ni-NTA. *Pbcts1r* mostrou atividade diante de 4-MU-(GlcNAc)₃ e 4-MU-(GlcNAc)₂, apresentando atividade de endoquitinase. A reação de *imunoblot* com anti-*Pbcts1r* identificou duas proteínas no extrato bruto de levedura. A purificação parcial do extrato bruto de *P. brasiliensis* por cromatografia de troca-catiônica em HPLC revelou duas quitinases diferentes, *Pbcts1* e *Pbcts2*, com massas moleculares de 45 e 34 kDa, respectivamente. *Pbcts2* tem atividade de exoquitinase e *Pbcts1* de endoquitinase. Reações com anti-*Pbcts1r* mostraram a presença de *Pbcts1* e *Pbcts2* no extrato bruto de levedura e transição de micélio para levedura. No extrato bruto de micélio foi encontrado somente *Pbcts1* e no extrato de parede celular de levedura somente *Pbcts2*. Ambas as proteínas foram encontradas secretadas pela fase parasitária (levedura), mostrando a provável importância dessas proteínas na permanência do fungo no hospedeiro. Relações filogenéticas entre os ortólogos *Pbcts1* e a provável *Pbcts2* indicam a presença de um ancestral comum. Durante a evolução, *P. brasiliensis* poderia ter adquirido *Pbcts2* e *Pbcts1* desempenhando diferentes papéis para o crescimento e sobrevivência do fungo na fase saprofítica e parasitária.

ABSTRACT

Paracoccidoides brasiliensis is a human pathogenic dimorphic fungus. The recombinant chitinase from *P. brasiliensis*, *Pbcts1r*, was overexpressed in *Escherichia coli* using pET-32a (+) as vector. The enzyme was produced as inclusion bodies and became soluble by Sarkosyl being purified by a single step using a Ni-NTA resin. *Pbcts1r* showed activity against 4-MU-(GlcNAc)₃ and 4-MU-(GlcNAc)₂, presenting an endochitinase activity. Immunoblot reaction with anti-*Pbcts1r* identified two proteins in yeast crude extract. A partial purification of *P. brasiliensis* yeast crude extract by cationic-exchange chromatography on HPLC revealed two different chitinases, *Pbcts1* and *Pbcts2*, with molecular mass of 45 kDa and 34 kDa, respectively. *Pbcts2* has exochitinase activity and *Pbcts1* has endochitinase activities. Reactions with anti-*Pbcts1r* showed the presence of *Pbcts1* and *Pbcts2* in crude extracts of yeast and transition from mycelium to yeast. On mycelium crude extracts was found only *Pbcts1* and on yeast cell wall extract only *Pbcts2*. Both proteins were found to be secreted by yeast parasitic phase showing their probable importance in the permanence of the fungus in the human host. Phylogenetic relationships between the orthologs *Pbcts1* and the putative *Pbcts2* indicated the presence of a common ancestor. During evolution, *P. brasiliensis* could have acquired *Pbcts2* and *Pbcts1* playing distinct roles in order to grow and survive in diverse environments on saprophytic and parasitic phases.