



## QUITINASE DE *PARACOCIDIODES BRASILIENSIS*: CLONAGEM MOLECULAR E ANÁLISE ESTRUTURAL, FILOGENÉTICA, EXPRESSÃO E ATIVIDADE

### CHITINASE FROM *PARACOCIDIODES BRASILIENSIS*: MOLECULAR CLONING, STRUCTURAL, PHYLOGENETIC, EXPRESSION AND ACTIVITY ANALYSIS

**SHEYLA MARIA RONDON CAIXETA BONFIM**

**Endereço atual/Current address:** Rua 1, nº. 352, CEP: 74115-040, Goiânia, Goiás, Brasil; e-mail: sheylabonfim@ig.com.br

**Dissertação de Mestrado/Master Dissertation:** Programa de Pós-Graduação de Biologia, Área de Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/ Postgraduate Program in Biology, Area of Molecular Biology, Federal University of Goiás, CEP: 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.

**Defendida/Defended:** 12.VIII.2005.

**Orientadora/Supervisor:** Maristela Pereira, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Área de Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, CEP: 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil/ Area of Molecular Biology, Federal University of Goiás, CEP: 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.

**RESUMO:** Um cDNA codificante de uma quitinase (Pbcts1) foi clonado por rastreamento de uma biblioteca de células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis*. O cDNA consiste de 1.888 pares de bases e codifica uma ORF de 1.218 pares de bases correspondentes à uma proteína de 45 kDa com 406 resíduos de aminoácidos. Pbcts1 é composta de duas assinaturas no domínio catalítico da família 18 e parece pertencer à classe fungo/bactéria. A análise de Southern Blot indicou que Pbcts1 está em cópia única. As análises filogenéticas de Pbcts1 e outras quitinases apontam a possibilidade de que parálogos de várias quitinases estejam agrupados, com base em funções especializadas, as quais refletem diversos e múltiplos papéis desempenhados por quitinases de fungos. As análises computacionais revelaram que Pbcts1 apresenta uma estrutura complexa de domínios, o que pode implicar multifuncionalidade. Embora Pbcts1 não apresente domínio de ligação à quitina (CBD) nem regiões ricas em serina/ treonina/prolina, o domínio imunoglobulina tipo C (Igc1) propicia a interação com a cadeia de quitina durante a catálise. A atividade glicosil hidrolase foi avaliada e os resultados demonstraram que *P. brasiliensis* é capaz de produzir e secretar estas enzimas, principalmente durante a transição de levedura para micélio. Dessa maneira, *P. brasiliensis* deve ser capaz de usar quitina como fonte de carbono. Em adição, Pbcts1 apresenta um domínio Amy, indicando a possibilidade de atividade alfa amilase. A presença de um sinal endocítico na proteína deduzida sugere que ela pode ser secretada por um mecanismo de exportação vesicular não-clássico. A expressão de Pbcts1 em micélio, em levedura, durante a diferenciação de micélio para levedura e em células leveduriformes obtidas de ratos infectados, sugere a relevância dessa molécula em *P. brasiliensis*, o que torna PbCTS1 um atrativo alvo de drogas.

**PALAVRAS-CHAVE:** atividade enzimática, diferenciação celular, *Paracoccidioides brasiliensis*, quitinase.

**ABSTRACT:** A full-length cDNA encoding a chitinase (Pbcts1) was cloned by screening a cDNA library of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. The cDNA consists of 1,888 bp and encodes an ORF of 1,218 bp, corresponding to a protein of 45 kDa with 406 amino acid residues. The deduced PbCTS1 is composed of two signatures in family 18 catalytic domains and seems to belong to the fungal/bacterial class. Southern blot analysis indicated that Pbcts1 is present as a single copy. Phylogenetic analyses of PbCTS1 and other chitinases point to the possibility that paralogous of several chitinases are grouped, based on specialized functions, which may reflect the multiple and diverse roles played by fungal chitinases. Computer-based sequence analyses revealed that PbCTS1 presents a complex structure of domains, which

can imply multifunctionality. Although PbCTS1 presents neither chitin-binding domains (CBD) nor serine/threonine/proline-rich regions (STP), the immunoglobulin C-Type domain allows the interaction with the chitin chain during catalysis. Glycosyl hydrolase activity was evaluated and the results demonstrated that *P. brasiliensis* is able to produce and secrete these enzymes, mainly during the yeast to mycelium transition. Thus *P. brasiliensis* may be able to use chitin as a carbon source. Furthermore, PbCTS1 presents an Amy domain, indicating the possibility of alpha amylase activity. The presence of an endocytic signal in the deduced protein suggests that it may be secreted by a nonclassical vesicular export pathway. The Pbcts1 expression in mycelium, in yeast, during differentiation from mycelium to yeast, and in yeast cells obtained from infected mice suggests the relevance of this molecule in *P. brasiliensis*, which makes PbCTS1 an attractive drug target.

**KEY WORDS:** enzymatic activity, cellular differentiation, *Paracoccidioides brasiliensis*, chitinase.