

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AMINOPEPTIDASE DE *Mesorhizobium* sp. DESCOBERTA
POR MINERAÇÃO DE DADOS GENÔMICOS COM
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E SEU IMPACTO NA
FISIOLOGIA BACTERIANA**

Elwi Guillermo Machado Sierra

Microbiologista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AMINOPEPTIDASE DE *Mesorhizobium sp.* DESCOBERTA
POR MINERAÇÃO DE DADOS GENÔMICOS COM
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E SEU IMPACTO NA
FISIOLOGIA BACTERIANA**

Elwi Guillermo Machado Sierra

Orientadora: Prof^a. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agropecuária.**

2016

M149a Machado, Elwi Guillermo Sierra
Aminopectidase de *Mesorhizobium* sp. descoberta por mineração de dados genômicos com aplicações biotecnológicas e seu impacto na fisiologia bacteriana / Elwi Machado Sierra. -- Jaboticabal, 2016
xii, 100 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Banca examinadora: Maria Celia Bertolini, Eleni Gomes, Mariana Carina Frigieri, Marcos Tulio Oliveira

Bibliografia

1. Expressão genica. 2. Dados genômicos. 3. Prospecção-enzimas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

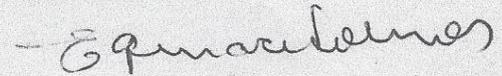
CDU 631.847

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ELWI GUILLERMO MACHADO SIERRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS.

Aos 13 dias do mês de junho do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) IPEBEN (Sala de Reuniões), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS - Orientador(a) do(a) Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal, Profa. Dra. MARIA CELIA BERTOLINI do(a) Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química / UNESP/ Araraquara. sp, Profa. Dra. ELENI GOMES do(a) Departamento de Biologia / UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto, SP, Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI do(a) Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP, Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA do(a) Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de ELWI GUILLERMO MACHADO SIERRA, intitulada **AMINOPEPTIDASE DE *Mesorhizobium* sp. DESCOBERTA POR MINERAÇÃO DE DADOS GENÔMICOS COM APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E SEU IMPACTO NA FISIOLOGIA BACTERIANA.** Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

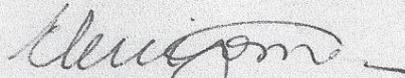
Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS



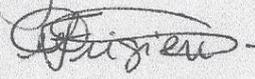
Profa. Dra. MARIA CELIA BERTOLINI



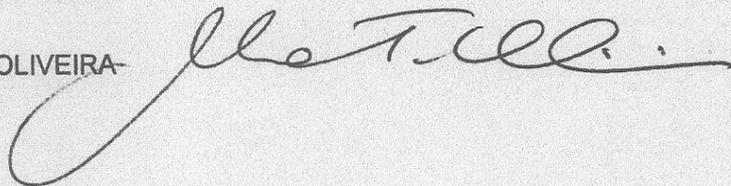
Profa. Dra. ELENI GOMES



Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI



Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA



DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Elwi Guillermo Machado Sierra – Nascido em 12 de Agosto de 1980 em Barquisimeto, Venezuela. Iniciou sua graduação em Microbiologia em Fevereiro de 1999 na Universidade Libre de Barranquilla na cidade de Barranquilla, Colômbia, concluindo seu curso em Junho de 2004. Em Março de 2007 ingressou no curso de Pós-graduação em Biotecnologia de Micro-organismos na Faculdade de Ciências - Universidade dos Andes (ULA), em Mérida, Venezuela, obtendo o título de Mestre em Biotecnologia de Micro-organismos. Em agosto de 2012 ingressou no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, como bolsista Capes.

“O saber não nos torna melhores nem mais felizes.”

Mas a educação pode ajudar a nos tornarmos melhores, se não mais felizes, e nos ensinar a assumir a parte prosaica e viver a parte poética de nossas vidas

Edgar Morin

DEDICATÓRIA

Esta meta lograda con esfuerzo y sacrificio, pero con el objetivo siempre en mente se lo dedico a:

Las hermanitas Sierra – El destino me premio no con una, sino con cinco madres, no le puedo pedir más nada a la vida

Familias Díaz y Aranguren – gracias por tratarme como un hijo más, y sobre todo por hacer de Yani esa increíble mujer

Las familias Orozco Sierra y Sierra Fontalvo

Daniela Rodríguez – Es difícil ver como creces y darme cuenta que no eres una bebe
Fuani, Olaya, Delfina -

Mi ermanita la gran H (Marcela) – Tu valentía siempre me ha motivado e inspirado.

Mi Madre, Elina – Tu apoyo incondicional cada vez me sorprende más.

Mi Padre, Willian – aunque de joven nunca lo entendí, ahora me queda muy claro porqué siempre me presionaste por ir cada vez más lejos.

La persona más importante, Yani – te dedico no solo este logro, sino todos los alcanzados en los últimos 9 años y los próximos 99.

AGRADECIMENTOS

Á **Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**, pela orientação e oportunidade de realizar um sonho que tenho esperando quase 30 anos;

Ao **Programa de Pós – Graduação em Microbiologia Agropecuária** e a **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – FCAV-UNESP**;

A **CAPES** pela bolsa concedida;

Ao **João Carlos Campanharo, Camila Cesario e Luciano Kishi**, pela assistência e ensinamentos transmitidos;

Á minhas companheiras de bancada e amigas para a vida toda, as Doutoradas: **Elisângela Gomes, Thaís Maester, Mariana Pereira, Rosmeriana Garcia e Erica Lopes**, obrigado por compartilhar um pouquinho de suas vidas.

A todos da equipe **LBMP**, que no início deste caminho não foi fácil, mas com o tempo vocês viraram minha família.

A **Fernando e Wilmar**, Colombia (el país), nos espera con los brazos abiertos.

A **Cris, Sonia e Augusto**, minha família em Brasil.

Á **Dra. Yani Cristina Aranguren Díaz**, no tengo las palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí, toda la vida estaré eternamente agradecido...TE AMO.

Esta es una forma sencilla, pero que siempre les recordara lo mucho que estoy agradecido con ustedes.....**Gracias Totales**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	ix
LISTA DE UNIDADES.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Mesorhizobium sp.	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Aplicações biotecnológicas.....	3
2.2 Peptidases	5
2.2.1 Generalidades e classificação	5
2.2.2 Sistema proteolítico nas bactérias	6
2.2.3 Classificação das peptidases.....	7
2.2.4 Aplicação industrial das peptidases	11
2.2.5 Inibidores de proteases	12
2.3 Aminopeptidases.....	13
2.3.1 Generalidades	13
2.3.2 Aplicações industriais	13
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Sequenciamento do genoma do isolado	16
4.1.1 Construção das bibliotecas.....	16
4.1.2 Análise das Sequências e Anotação genômica	16
4.2 Prospecção de genes de interesse biotecnológico no genoma do <i>Mesorhizobium</i> sp J5.	17
4.3 Mineração de dados na literatura científica	17
4.4 Análise das sequências.....	18
4.5 Modelagem molecular	18
4.6 Amplificação dos genes codificadores de enzimas proteolíticas	19
4.6.1 Quantificação e análise do DNA	20

4.6.2	Digestão dos fragmentos amplificados	21
4.6.3	Ligação dos fragmentos ao vetor de expressão.....	21
4.6.4	Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	22
4.6.5	Transformação de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	22
4.6.6	Coleta, estoque dos clones e confirmação da clonagem.	23
4.7	Sequenciamento das ORFs	23
4.8	Expressão e extração das proteínas recombinantes	24
4.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	25
4.10	Purificação de enzimas proteolíticas	26
4.10.1	Purificação por cromatografia de afinidade.....	26
4.10.2	Purificação por exclusão molecular	26
4.11	Zimograma.....	26
4.12	Ensaio espectroscópicos.....	27
4.12.1	Dicroísmo circular.....	27
4.12.2	Termostabilidade da estrutura secundária.....	27
4.13	Determinação da atividade enzimática.....	27
4.14	Efeito do pH sobre a atividade da enzima	29
4.15	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	29
4.16	Influência de íons metálicos, inibidores e detergentes sobre a atividade enzimática	29
4.17	Determinação dos parâmetros cinéticos	30
4.18	Construção do mutante Δ mesoamp	30
4.18.1	Preparação de células competentes de <i>Mesorhizobium sp.</i> J5	30
4.18.2	Construção do vetor suicida pNPTS138 Δ mesoamp	31
4.18.3	Eletroporação de <i>Mesorhizobium sp.</i> J5.....	31
4.18.4	Seleção dos clones positivos.....	32
4.19	Caracterização fenotípica da linhagem Δ mesoamp.....	34
4.19.1	Curva de crescimento <i>in vitro</i> de <i>Mesorhizobium sp.</i> J5 vs linhagem Δ mesoamp	34
4.19.2	Produção de exopolissacarídeos (EPS)	35
4.19.3	Tolerância ao estresse salino	35
4.19.4	Cinética de lise.....	36
4.19.5	Termotolerância	36
4.19.6	Produção de biofilme.....	36

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Predição de peptidase em <i>Mesorhizobium sp. J5</i>	38
5.1.1 Degradação inicial de proteínas extracelulares.....	38
5.1.2 Maquinaria de degradação de proteínas intracelulares.....	39
5.1.3 Manutenção do pool de aminoácidos	39
5.2 Peptidases com potencial biotecnológico no genoma do <i>Mesorhizobium sp. J5</i>	41
5.3 Clonagem das sequências e expressão das enzimas proteolíticas	41
5.3.1 Amplificação e clonagem dos genes no vetor pET28a.....	41
5.3.2 Ensaio de expressão e extração das proteínas recombinantes	45
5.4 Análise da sequência da MesoAmp	47
5.5 A estrutura dimérica da MesoAmp possui elevado grau de conservação....	51
5.6 Expressão e avaliação da estrutura quaternária da MesoAmp.....	54
5.7 MesoAmp apresenta atividade numa extensa faixa de pH e temperatura ...	56
5.8 MesoAmp é uma enzima altamente dependente de íons metálicos	57
5.9 Análise de dicroísmo circular e termoestabilidade.....	60
5.10 Efeito de reagentes desnaturantes e inibidores na atividade da MesoAmp .	61
5.11 MesoAmp mantém sua atividade na presença de altas concentrações de sal, detergentes e solventes orgânicos.....	62
5.12 MesoAmp foi imobilizada e reutilizada com sucesso	68
5.13 Impacto da MesoAmp sobre a fisiologia do <i>Mesorhizobium sp J5</i>	68
5.14 Halo-tolerância de <i>Mesorhizobium sp J5</i> e da linhagem Δ mesoamp.....	75
5.15 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	77
5.16 Produção de biofilme	77
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS	81
8. ANEXOS	91

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. As peptidases e seus mecanismos de ação.....	8
Tabela 2. Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores de síntese utilizados para amplificação dos genes codificadores de peptidases.	20
Tabela 3. Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para gerar a mutação do gene mesoamp.....	31
Tabela 4. Peptidases com potencial biotecnológico no genoma de Mesorhizobium sp. J5.....	43
Tabela 5. Características das proteínas selecionadas obtidas a partir de ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/).....	45
Tabela 6. Efeito dos diferentes cátions bivalentes sobre a atividade da MesoAmp..	59
Tabela 7. Valores de Km e Kcat de amino-peptidases ou leucina-amino-peptidases presentes em outros micro-organismos.	60
Tabela 8. Efeito de inibidores e agentes desnaturantes sobre a atividade da MesoAmp*.....	64
Tabela 9. Efeito dos detergentes na atividade da MesoAmp*.....	66
Tabela 10. Estudos relacionados com a amino-peptidase M29 e seu impacto na fisiologia bacteriana.	70

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo catalítico das peptidases. As enzimas proteolíticas reconhecem as ligações peptídicas (entre o grupo amino de um aminoácidos e o grupo carbóximo do outro aminoácidos) das proteínas, realizando um ataque nucleofílico com ajuda de uma molécula de água.	6
Figura 2. Mecanismo de hidrólise das principais famílias de Peptidases. Nos sítios ativos da Serina (nas Serina-peptidases) e Cistina (nas Cistina-peptidases) interagem com um grupo aceptor de prótons para promover o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica. As Aspartato-peptidases, Metallo-peptidases e Treonina-peptidases precisam de uma molécula de água para realizar o ataque nucleofílico. O processo geral de excisão da ligação peptídica é o mesmo para todas as proteases. a) Serina-peptidases, b) Cisteína-peptidases, c) Aspartato-peptidase, d) Metallo-peptidases e e) Treonina-peptidase.	9
Figura 3. Mapa do vetor pET-28a. A. Vetor usado para a expressão das ORFs codificadoras de enzimas proteolíticas; B. Região de clonagem e expressão do vetor pET28.	22
Figura 4. Esquema da reação de hidrólise da L-Leucina-p-nitroanilida por enzimas proteolíticas.	28
Figura 5. Esquema da PCR overlapping para a construção da versão deletada do gene mesoamp. As letras A, B, C e D indicam a posição dos oligonucleotídeos iniciadores no genoma de Mesorhizobium sp. J5.	32
Figura 6. Mapa do vetor pNPTS138 usado na mutação sítio dirigida.	33
Figura 7. Evento de deleção do gene mesoamp usando o vetor suicida pNPTS138 Δ mesoamp.	34
Figura 8. Modelo do sistema proteolítico de Mesorhizobium sp J5, baseada na mineração dos dados genômicos. As peptidases descritas em vermelho apresentam atividade de amino-peptidase.	40
Figura 9. Eletroforograma dos fragmentos gênicos de interesse, em gel de agarose 1% e corado com brometo de etideo. A. Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas). Canaletas (1,2,3) Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas); Eletroforograma das ORFs 3, 6, 8 e 9 – A seta vermelha sinaliza a temperatura escolhida para as futuras amplificações. Triângulos cinzas na parte superior sinalizam o gradiente de temperatura usada na PCR.	44
Figura 10. Eletroforograma do DNA plasmidial extraído de alguns clones para confirmar a clonagem da construção pET28-mesoamp. A. Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (fermentas). Canaletas: 1-10 Amplificação por PCR dos clones com a construção pET28-mesoamp; canaleta J5: Amplificação por PCR do DNA genômico de Mesorhizobium sp. J5.	45
Figura 11. Eletroforograma em gel de poliacrilamida 12% com SDS (SDS-Page) do extrato celular total da bactérias E. coli BL21 transformada como pET28-mesoamp. Canaletas: (1) Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained	

- BioRad), (2) extrato celular (EC) sem indução, (3) EC após 4 h de indução com 0,1 mM de IPTG, (4) EC após 6 h de indução, (5) EC após 12 h de indução, (6) EC após 24 h de indução. A seta da direita (◄) sinaliza a banda de proteína sobre-expressa (MesoAmp) com um tamanho molecular compatível com MesoAmp. 47
- Figura 12.** Dendrograma das relações filogenéticas entre as peptidases da família M29 e MesoAmp (seta preta). Construído com o algoritmo de máxima verossimilhança, com bootstrap de 1000 e usado a matriz de substituição de aminoácidos LG (LE; GASCUEL, 2008). 48
- Figura 13.** Estrutura cristalográfica resolvidas experimentalmente usadas para a construção do modelo tridimensional de MesoAmp. Os códigos acima de modelo indicam o código PDB. PDB1ZJC: modelo de *Staphylococcus aureus*, PDB4ICQ: *Streptococcus thermophilus* e PDB2AYI: *Thermus thermophilus*. 49
- Figura 14.** Alinhamento multiplex de sequências sinalizando as regiões conservadas de MesoAmp presentes também nos membros mais representativos da família de amino-peptidase M29. O alinhamento de sequências de aminoácidos de MesoAmp e amino-peptidase T de *Thermus thermophilus* (MER001285), amino-peptidase II de *Geobacillus stearothermophilus* (MER001287), amino-peptidase S de *Streptococcus thermophilus* (MER005731), e amino-peptidase S de *Staphylococcus aureus* (MER014416), usando ClustalX e exibidos com Esript 3 (<http://esript.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>). A estrutura secundária prevista de MesoAmp é mostrada na parte superior, com as espirais indicando a hélice α , e as setas indicando folha β . A barra colorida na parte inferior do alinhamento representa a escala de conservação [não-conservados (azul), para estados altamente conservadas (roxo)] para cada um dos aminoácidos de MesoAmp, de acordo com a análise do servidor ConSurf. Os motivos conservados que fornecem uma assinatura para metaloproteases termofílicas se apresentam em caixas cinzas. Os resíduos de ligação a metais estão indicados por um círculo (●), e os resíduos catalíticos são indicados por um triângulo (▲). 50
- Figura 15.** Configuração do sítio ativo de MesoAmp. Resíduos catalíticos (Tyr361), de ligação a metais (Glu259, Glu325, His354, His387), interagindo com o substrato. Os números pequenos indicam a distância em Å das pontes de hidrogênio. 51
- Figura 16.** Análise do gráfico Ramachandran de MesoAmp. Os resíduos de Isoleucina 12 e Asparagina 104 e 127 estão em regiões não permitidas. 52
- Figura 17.** Características estruturais do modelo MesoAmp. **A.** Sobreposição das estruturas tridimensionais de MesoAmp (azul) e AmpS de *Staphylococcus aureus* desvio quadrático médio (RMSD), **B.** Sobreposição do resíduo catalítico (Tyr 361) e os resíduos de ligação a metais Glu259, Glu325, His354, His387 e Asp389, com os resíduos na estrutura de contrapartida AmpS, as esferas pretas representam os íons de cobalto, **C.** Representação do sítio catalítico do MesoAmp (S1) e da cavidade de ligação ao substrato (S2). 52
- Figura 18.** Super expressão e purificação de MesoAmp em sua forma ativa. **A.** Eletroforograma SDS-PAGE para cada etapa de purificação de MesoAmp. Canaletas: (1) Marcador de peso molecular, (2) Fração solúvel antes da indução, (3) Fração solúvel após indução com IPTG, (4) Proteínas não ligadas na resina de Ni-NTA, (5) MesoAmp eluída com 500 mM de imidazol, (6) MesoAmp purificada após

cromatografia de filtração em gel. A seta na direita indicam o peso molecular da MesoAmp. **B.** Perfil de eluição de MesoAmp por filtração em gel utilizando Superdex-200. Linha preta (—) corresponde ao mAu medida a 280 nm; Barra cinza: atividade relativa em porcentagem de MesoAmp. Pico 1 corresponde à agregação de oligômeros de MesoAmp com baixa atividade. Pico 2: frações com alta atividade enzimática. Caixa superior esquerda: análise do peso molecular da MesoAmp nativa com proteínas padrões [Tiroglobulina bovina (670 kDa), γ -globulina (150 kDa), albumina (43 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) e Ácido p -amino benzoico (pABA) (0,13 kDa)] usando a análises de regressão lineal para a determinação do tamanho molecular dos oligômeros (1) e dos homodímeros (2). Caixa superior direita: análise de SDS-PAGE das frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel. Canaletas: (1) Marcador de peso molecular, (2-4) Pico 1, (5-10) Pico 2. 55

Figura 19. Análise físico-químico da MesoAmp. **A.** O efeito do pH sobre a atividade enzimática usando diferentes tampões: Mcllvaine (\blacktriangle); Citrato de sódio (Δ); Fosfato de sódio (\blacklozenge); Tris-HCl (\bullet); Bicarbonato de sódio-hidróxido (\blacktriangledown); Glicina-hidróxido de sódio (\diamond); Fosfato monossódico-hidróxido de sódio (\circ). **B.** Efeito da temperatura sobre a atividade da MesoAmp determinada com 100 mM de tampão Bicarbonato de sódio-hidróxido (pH 8,5). As letras minúsculas na parte superior dos valores (a-k) indicam a diferença significativa entre cada condição testada, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tabela inferior: faixa de pH e os diferentes tampões testados para a determinação do pH ótimo. 58

Figura 20. Análise espectroscópica e de desnaturação térmica de MesoAmp. **A.** O espectro de dicroísmo circular em tampão 100 mM de Bicarbonato de sódio-hidróxido (pH 8,5). **B.** Perfil de desnaturação térmica da estrutura secundária de MesoAmp. As alterações na elipticidade a 222 nm foram representadas graficamente como uma função da temperatura a pH 8,5. A intercepção das linhas pontilhadas indica a temperatura de fusão (T_m) estimada pelo ajuste dos dados utilizando a função sigmoide. 61

Figura 21. Termoestabilidade de MesoAmp usando Leu-p-NA como substrato. A enzima foi incubada a diferentes temperaturas (45 a 80°C) por em intervalos de tempo. 61

Figura 22. Modelo tridimensional de MesoAmp. **A.** MesoAmp, Esferas amarelas indicam a posição das cisteínas no modelo. **B.** Cisteínas (C353, C360, C364) localizadas próximas ao resíduo catalítico de tirosina (Y316). Os números sinalizam a distância (em Å) entre os átomos de enxofre presentes na proteína. **C.** Estrutura tridimensional de PepS (PDB4ICQ). Esferas amarelas indicam a posição das cisteínas na estrutura. 65

Figura 23. Efeito de solventes orgânicos (a diferentes concentrações) na atividade da MesoAmp. 67

Figura 24. Estabilidade operacional de MesoAmp imobilizada. A atividade enzimática em cada ciclo foi realizada com Tris-HCl pH 8,0; 2 mM de Cobalto e 2 mM de Leu-p-NA e 40 °C, durante 15 min ou até atingir o estado estacionário. 68

Figura 25. Diagrama de Venn do sistema proteolítico de *S. aureus* (*Staphylococcus aureus* USAD300); *S. thermophilus* (*Streptococcus thermophilus* CNR21066); *L. monocitogenes* (*Listeria monocytogenes* EGD-e) e *Mesorhizobium* sp J5. Números

embaixo de cada nome indicam a quantidade de peptidases presentes em cada micro-organismo. As peças sobrepostas de diferentes elipses representam o número de peptidases em comum desses grupos em comparação.	71
Figura 26. Eletroforograma para confirmar a mutação no gene mesoamp. 1: Produto de PCR com os oligonucleotídeos A+B; 2: Produto de PCR com os oligonucleotídeos C+D; 3: Produto de PCR de superposição com os oligonucleotídeos A+D; 4: PCR do plasmídeo pNPTS138 Δ mesoamp; 5: PCR do DNA genômico de <i>Mesorhizobium</i> sp. J5, usando os oligonucleotídeos A+D; 6 e 7: PCR do DNA genômico da linhagem Δ mesoamp (dois mutantes), usando os oligonucleotídeos A+D; M: Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas)	72
Figura 27. Atividade de leucina amino-peptidase global do <i>Mesorhizobium</i> sp. J5 e da linhagem Δ mesoamp. A atividade amino-peptidase foi normalizada usando a mesma concentração de proteína total (1 mg/ml).	73
Figura 28. Crescimento do <i>Mesorhizobium</i> sp. J5 e da linhagem Δ mesoamp em meio líquido TY. O ensaio foi realizado em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão.	74
Figura 29. Efeito do estresse salino no desenvolvimento do <i>Mesorhizobium</i> sp J5 e da linhagem Δ mesoamp.	76
Figura 30. Análises dos componentes principais (PCA) dos transportadores ABC de aminoácidos e aminopeptidases M29. Foi possível observar que bactérias que não possuem a enzima aminopeptidase M29 apresentaram uma tendência a possuir uma maior quantidade de transportadores ABC de aminoácidos. Seta vermelha sinaliza a M29.	76
Figura 31. Produção do exopolissacarídeos (EPS) do <i>Mesorhizobium</i> J5 e do linhagem Δ mesoamp. As características reológicas do EPS (viscosidade), foram modificadas pela deleção do gene mesoamp.	77
Figura 32. Produção de biofilme. A. teste in vitro da produção de biofilme por <i>Mesorhizobium</i> sp. J5. (M. sp J5) e o mutante com a deleção no gene mesoamp (Δ mesoamp). B. Porcentagem da produção de biofilme. Os dados de absorbância foram normalizados e tratados usando a equação 3.	78

ABREVIATURAS

Abs- Absorbância

DO_{600nm} – Absorbância medida a 600 nanômetros de comprimento de onda

aa- Aminoácidos

DNA- ácido desoxirribonucleico

dNTP- desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

Xgal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

DMF - N,N'dimethyl-formamida

p/v – peso por volume

TEB- solução tampão Tris-ácido bórico- EDTA

Tris- tris[hidroximetil]aminometano

UV- luz ultravioleta

v/v- volume por volume

BLAST – *Basic Local Aligment Sequence Tool*

E.C. – *Enzyme Comission*

GenBank – banco de sequências de genes e proteínas do *NCBI*

Kb – mil pares de bases

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ORF – *Open Reading Frame* (Fase de leitura aberta codificadora de proteína)

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

MEROPS – Base de dados curadas para peptidases

pH – potencial hidrogeniônico log [H⁺]

pI – ponto isoelétrico

r.p.m. – rotações por minuto

SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase*

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

IUBMB - (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)

LISTA DE UNIDADES

g – aceleração da gravidade

g – grama

L – litro

g^{-L} – gramas por litro

kb – kilobase

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

ng – nanogramas

pb – pares de bases

U – unidades

V- volt

kDa- Quilo Daltons

h – horas

s – segundos

min – minutos

AMINOPEPTIDASE DE *Mesorhizobium sp.* DESCOBERTA POR MINERAÇÃO DE DADOS GENÔMICOS COM APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E SEU IMPACTO NA FISIOLOGIA BACTERIANA

RESUMO - A análise de mineração de dados genômicos de *Mesorhizobium sp.* revelou a presença de uma ORF de 1257pb contendo o gene *mesoamp*, que codifica uma proteína de 418 aminoácidos. A sequência de aminoácidos deduzida apresenta 50% de identidade com uma amino-peptidase termoestável de *Thermus thermophilus*, membro da família de peptidase M29, e oito assinaturas características das metalo-protease termofílicas foram encontrados. O gene *mesoamp* foi clonado e expresso em *Escherichia coli*. A massa molecular da proteína foi avaliada por SDS-PAGE e filtração em gel, o que indicou que a proteína apresenta 45,72kDa e 88,05kDa, respectivamente, sugerindo uma estrutura dimérica da enzima recombinante. A enzima foi nomeada como MesoAmp. Em seguida realizou-se a modelagem 3D estrutural, que mostrou uma região de dimerização e uma região de ligação ao substrato altamente conservada contendo os resíduos de ligação a metais e o resíduo catalítico. A enzima apresentou atividade ótima em pH 8,5 e temperatura de 45°C, foi fortemente ativada por Co^{2+} e Mn^{2+} , nestas mesmas condições de reação, a enzima apresentou K_m e K_{cat} de $0,2364 \pm 0,018 \text{mM}$ e $712,1 \pm 88,12 \text{seg}^{-1}$, respectivamente. Além disso, foi verificado uma notável estabilidade da enzima em solventes orgânicos e elevadas concentrações de NaCl, além de um alto grau de reutilização sem perda apreciável de atividade o que torna MesoAmp única, este trabalho estabelece as bases para potenciais aplicações biotecnológicas e/ou o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, além de descrever uma das primeiras aminopeptidases solvente e halo-tolerantes identificados para o gênero *Mesorhizobium sp.*

Palavras-chave: Expressão genica, Dados genômicos, Prospecção-enzimas

AMINOPEPTIDASE FROM A *Mesorhizobium sp.* DISCOVERED BY GENOMIC DATA MINING WITH POTENTIAL BIOTECHNOLOGY APPLICATION AND ITS IMPACT ON BACTERIAL PHYSIOLOGY

ABSTRACT - The genomic data mining analysis of a *Mesorhizobium sp.* revealed the presence of a 1257-bp open reading frame containing the *Mesoamp* gene, which encodes a protein of 418 amino acids. The deduced amino acid sequence was 50% identical to the thermostable amino-peptidase from *Thermus thermophilus*, a member of peptidase family M29, and eight fingerprints signatures for a thermophilic metalloprotease were found. The *mesoamp* gene was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. The molecular mass of the protein was assessed by SDS-PAGE and gel filtration, which indicated the protein weighs 45.72kDa and 88.05kDa, respectively, suggesting a dimeric structure of the recombinant enzyme. The enzyme was designated as MesoAmp. The 3D structural modeling showed a dimerization region with highly conserved catalytic and binding metal residues. The enzyme exhibited optimum activity at pH 8.5 and 45°C and was strongly activated by Co²⁺ and Mn²⁺. Under these reaction conditions, the enzyme displayed K_m and K_{cat} values of 0.2364±0.018mM and 712.1±88.12seg⁻¹, respectively. Additionally, the remarkable stability of the enzyme in organic solvents, its activity at high concentrations of NaCl and the high degree of reuse without appreciable loss of activity makes MesoAmp unique. In summary, this work lays the foundation for potential biotechnological applications and/or the development of environmentally friendly technologies and describes the first solvent and halo-tolerant amino-peptidases identified for the *Mesorhizobium sp* genus.

Keywords: Gene expression, Mining Data, enzyme prospection

1. INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente complexo e heterogêneo, considerado um extraordinário reservatório da diversidade bioquímica e genética microbiana, tornando-se uma fonte quase inesgotável de biomoléculas, como as enzimas. A busca por enzimas com aplicações industriais tem-se centrado em um número limitado de gêneros microbianos como *Bacillus* (MARUTHIAH et al., 2013), *Pseudomonas* (MEENA et al., 2013) e *Aspergillus* (KANG et al., 2014), deixando outros micro-organismos de interesse biotecnológico, como o *Mesorhizobium*, em um segundo plano.

O gênero *Mesorhizobium* é composto por 24 espécies distribuídas no mundo todo (WANG et al., 2014a) e caracteriza-se por ser geneticamente variável, apresentando características fisiológicas bem distintas entre as espécies. Esta riqueza genética e bioquímica tem sido pobremente estudada, já que 3467 sequências de peptidases conhecidas, putativas ou homólogas de *Mesorhizobium* encontram-se submetidas na base de dados de peptidases (MEROPS) (RAWLINGS et al., 2014), mas nenhuma foi caracterizada ou estudada até o momento. As peptidases são umas das enzimas mais usadas na indústria biotecnológica, atingindo um mercado de quase 8 bilhões de dólares (LI et al., 2012) e projetado para crescer mais nos próximos anos. Todo este crescimento pode ser alcançado por meio de novas abordagens, como a mineração de genes em dados genômicos (GDM) (ADRIO; DEMAIN, 2014; LUO, 2012). O GDM oferece uma oportunidade sem precedentes na área da biotecnologia, devido à abundância de dados pré-existentes e inexplorados, e usando como padrão sequências similares de enzimas conhecidas. Na atualidade esta metodologia está sendo usada na prospecção de enzimas como endoglucanases, lacases, nitrilases, redutases, xilanases e também de policetídeos sintases, as PKS (BACHMANN; VAN LANEN; BALTZ, 2014; GONG et al., 2013; HE et al., 2014), além de outras de grande valor industrial como as peptidases.

As peptidases (E.C. 3.4) são o tipo de enzima mais importante do ponto de vista industrial, capazes de hidrolisar ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos. Podem ser utilizadas em diversas atividades industriais, tais como processamento de bebidas, alimentos, processamento de couro e pele, indústrias têxteis, formulação de

detergentes, no amaciamento de carne e formulação de medicamentos. Os micro-organismos são a fonte mais empregada para a obtenção de proteases de uso industrial, obtidas através de processos fermentativos (RAO et al., 1998). As bactérias, fungos filamentosos e leveduras são pesquisados a fim de alcançar novos genes codificadores de proteases, além de aumentar a produtividade e a estabilidade enzimática daqueles que já são admitidos como micro-organismos proteolíticos.

Observando a versatilidade das proteases na indústria e a demanda pela descoberta de novas enzimas, este trabalho descreve a mineração de dados genômicos de *Mesorhizobium* sp J5, para a prospecção e análises de enzimas proteolíticas, visando sua aplicação em processos biotecnológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Mesorhizobium* sp.

2.1.1 Generalidades

O gênero *Mesorhizobium* sp. foi descrito inicialmente por Jarvis em 1997, a partir de algumas espécies previamente incluídas no gênero *Rhizobium*. As bactérias deste gênero são gram-negativas, não esporuladas e isoladas principalmente do solo, e recentemente tem sido encontradas em diferentes ambientes incluindo solo ártico (GHOBAKHLOU et al., 2015), esponja marinha (KRICK et al., 2007), solos semiáridos e salinos (DIOUF et al., 2015), e solos contaminados com hidrocarbonetos (TENG et al., 2015). A ampla distribuição geográfica deste gênero sugere a presença de um genoma heterogêneo e extremamente adaptável. Pode-se associar endofiticamente ou estabelecer simbiose com algumas espécies de leguminosas (LARANJO; ALEXANDRE; OLIVEIRA, 2014). Esta relação simbiótica é mantida por um complexo de interações bioquímicas que acontecem durante o desenvolvimento e manutenção dos nódulos fixadores de nitrogênio nas raízes das plantas (DAS et al., 2010).

2.1.2 Aplicações biotecnológicas

- Fixador de nitrogênio

A interação *Mesorhizobium* sp.– planta é um excelente exemplo de uma associação simbiótica das bactérias do solo fornecendo nutrientes (hidratos de carbono, vitaminas e purinas) e compostos nitrogenados para a planta (aminoácidos) (DAS et al., 2010). Nos estágios iniciais da simbiose um diálogo molecular extremamente complexo acontece, envolvendo flavonoides liberados pelas raízes das leguminosas e fatores de nodulação (fatores *Nod*) sintetizados pelas bactérias. Os fatores *Nod* são reconhecidos pela planta levando a oscilações do cálcio intracelular, inicialmente em células da epiderme e mais tarde em células corticais permitindo a colonização das bactérias aderidas na superfície da raiz. Nesse momento

as células da planta sofrem modificações no núcleo e citoesqueleto formando um canal anóxico (fio de infecção) que a bactéria usa para introduzir-se e formar o nódulo para a fixação de nitrogênio. Nesta estrutura as bactérias se diferenciam em bacteroide tendo a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico na forma de amônia (NH_4) (OLDROYD, 2013). Além de fixador de nitrogênio, as bactérias de vida livre não-simbióticas podem atuar como bactérias promotoras de crescimento em culturas de importância econômica como o arroz e trigo (LARANJO; ALEXANDRE; OLIVEIRA, 2014).

- Produtor de Exopolissacarídeos (EPS)

O gênero *Mesorhizobium sp.* tem a propriedade de produzir uma ampla variedade de polissacarídeos como: polissacarídeos capsulares (KPSs), lipopolissacarídeos (APLs), β (1,2) glicanos e polissacarídeos segregados no meio externo ou sintetizados por enzimas extracelulares ancoradas na parede celular também conhecidos como exopolissacarídeos (EPS), necessários para o estabelecimento de associações simbióticas com as leguminosas, além de proteção contra estresses ambientais (KELLY, 2012) e para as defesas do hospedeiro.

A síntese de EPS em *Rhizobium* é um processo de múltiplos passos regulado por vários genes (*exo/exs*, *xp*, *orpss*) tanto no nível da transcrição como pós-transcrição. Além disso, fatores ambientais como a concentração e natureza da fonte de carbono, nitrogênio, fosfato, a relação Carbono/Nitrogênio, e uma gama diversa de condições de estresse (desidratação, temperatura e força iônica) afetam a produção do EPS e também suas propriedades reológicas (CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015).

A descoberta de numerosos EPS de importância industrial e médica com valor comercial significativo já foi documentada (NWODO; GREEN; OKOH, 2012). Seu limitado uso como biomaterial ou modificadores da reologia em sistemas aquosos tem sido, em grande parte, devido ao custo de produção em relação ao seu valor comercial. No entanto, diferentes abordagens vem sendo utilizadas para resolver este problema, incluindo: o uso de substratos mais baratos, otimização das condições de fermentação, desenvolvimento de maior rendimento através da manipulação genética e metabólica e otimizando o processamento (REHM, 2010). O uso de EPS

sintetizados por bactérias na medicina incluem: a microencapsulação com alginato, tais como vetores de microesferas para o dosagem de droga, terapias anti-refluxo (NWODO; GREEN; OKOH, 2012), substitutos do plasma (SILVER; AARONSON; VANN, 1988), anticoagulante, antitrombótico, anti-arterosclerótico, anti-angiogese, anti-metastático e anti-inflamatório (DEANGELIS; WHITE, 2002).

- Fábrica de biomoléculas

O conhecimento do potencial biotecnológico do *Mesorhizobium sp.* é ainda limitado, poucas biomoléculas com aplicação industrial têm sido relatadas na atualidade [β - (1,2) glucanos cíclico (VENKATACHALAM et al., 2014), L-ribulose-3-epimerase (UECHI et al., 2013), β -transaminase (KIM et al., 2007), celulase (PRASAD; SETHI, 2013), L-ramnose isomerase (TAKATA et al., 2011), piridoxina 4-oxidase (MUGO et al., 2013) e homoserina lactona (KRICK et al., 2007)]. No entanto, a procura por novas enzimas como lipases e peptidases tem levado a olhar novamente os genomas de micro-organismos cultiváveis com potencial industrial, por exemplo: no banco de dados das peptidases (MEROPs), encontram-se 3179 peptidases identificadas em 29 genomas sequenciados e anotados de *Mesorhizobium sp.*, mas não existe nenhuma informação do sistema proteolítico ou qualquer peptidase com aplicações industriais. Atualmente, chegamos num ponto onde estamos gerando mais informação do que é possível analisar, e é a partir dessa observação surge a pergunta: ***Por que não prospectar genes de interesse industrial (peptidases, lipases e celulases) em genomas de micro-organismos conhecidos, em vez de continuar sequenciando organismos desconhecidos?***

2.2 Peptidases

2.2.1 Generalidades e classificação

As peptidases são denominadas proteases ou enzimas proteolíticas, estão amplamente distribuídas na natureza (plantas, animais e micro-organismos), hidrolisando ligações peptídicas presentes nas proteínas (Figura 1) (RAWLINGS; SALVESEN, 2013).

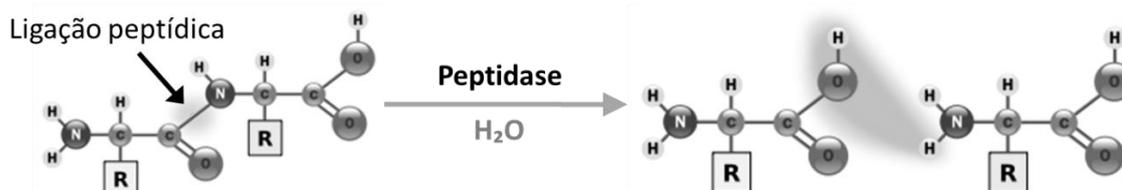


Figura 1. Mecanismo catalítico das peptidases. As enzimas proteolíticas reconhecem as ligações peptídicas (entre o grupo amino de um aminoácidos e o grupo carbóximo do outro aminoácidos) das proteínas, realizando um ataque nucleofílico com ajuda de uma molécula de água.

A atividade proteolítica é uma capacidade própria de todos os micro-organismos, no entanto, as proteases não estão somente associadas ao catabolismo proteico, tem-se admitido que a alta especificidade pelo substrato pode regular processos biológicos bem específicos (FREDERIKS; MOOK, 2004).

2.2.2 Sistema proteolítico nas bactérias

As bactérias usam proteases para controlar temporal e espacialmente três eventos durante os processos de desenvolvimento morfológico. Estes eventos são: ativação e destruição de proteínas reguladoras, e a produção de sinais. Embora alguns destes acontecimentos sejam inteiramente citoplasmáticos, outros envolvem a proteólise intra-membrana de um substrato, a sinalização transmembranar, ou secreção (KONOVALOVA; SØGAARD-ANDERSEN; KROOS, 2014). As bactérias têm desenvolvido diferentes estratégias regulamentares que lhes permitem adaptar-se à mudança de condições, incluindo mudanças na expressão gênica, diferenciação celular e alterações na motilidade. Em várias dessas estratégias, o sistema proteolítico desempenha um papel essencial. A regulação por proteólise é altamente versátil e envolvido em diversos processos, como respostas ao estresse, crescimento, divisão e diferenciação celular, patogênese, formação e desmontagem de biofilme, secreção de proteínas, esporulação, manutenção do *pool* de aminoácidos, adsorção, remodelação da superfície celular e tecidos, doença e apoptoses (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002), digestão de alimentos, transporte, coagulação do sangue, ativação

de zimogênios, ativação de pró enzimas, iniciador de processos de inflamação, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos e ativação do sistema complemento (MAURER, 2004; TYE et al., 2002)

A proteólise em bactérias se apresenta em duas formas: a proteólise geral, importante para a homeostase de proteínas, remoção de proteínas deformadas ou danificadas e é uma parte essencial do sistema de controle de qualidade das proteínas da célula. A proteólise regulada é a remoção ou modificação por clivagem proteolítica das proteínas em resposta a sinais específicos e depende de um alto grau de especificidade para o substrato, a fim de evitar a degradação aleatória das proteínas. Neste caso, um substrato pode conter um ou mais sinais específicos de degradação conhecidos como “*Degrans*”, que tem como alvo uma proteína e uma protease específica (KIRSTEIN et al., 2009), resultando na degradação completa de uma proteína ou um sítio de clivagem específico, dando origem a uma proteína modificada, que é a forma ativa ou tem atividade alterada em comparação com a proteína não clivada (JENAL; HENGGE-ARONIS, 2003).

Entretanto, apenas micro-organismos que produzem quantidades relevantes de enzimas extracelulares são de importância industrial. Na maioria dos organismos, a produção de peptidases é fortemente influenciada pelas condições nutricionais como fonte de carbono, nitrogênio, açúcares; e ambientais: temperatura, pH, densidade de inóculo, tempo de incubação e aeração (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Embora as proteases possam ser extraídas de plantas e animais, estas não atendem à demanda mundial; a introdução das técnicas de DNA recombinante e a diversidade quase inesgotável dos micro-organismos faz com que o interesse pelas enzimas microbianas aumente cada vez mais. Somado a este fato, a fácil manipulação genética e o pouco espaço e tempo necessários para a síntese de enzimas, obtendo assim, uma produção significativa com baixo custo, tem originado uma substituição quase total das proteases de origem animal ou vegetal pelas proteases microbianas (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011; RAO et al., 1998).

2.2.3 Classificação das peptidases

A ampla diversidade das peptidases com características únicas (sequências de aminoácidos, especificidade por substratos, pH ótimo e sítios catalíticos) é o principal problema na classificação, contudo, o *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (CI-IUBM), recomenda uma classificação mais ampla, dependendo do sítio de ação sobre a cadeia peptídica. Esta classificação divide as peptidases em dois grandes grupos: (a) Exopeptidases, que hidrolisam a ligação peptídica mais próxima ao terminal amino ou carboxílico da cadeia; (b) Endopeptidases, que realizam cortes randômicos nas ligações internas da cadeia polipeptídica (RAO et al., 1998). Existe também outra classificação mais complexa, que agrupa as enzimas proteolíticas em 14 grupos dependendo do mecanismo de ação (Tabela 1).

Tabela 1. As peptidases e seus mecanismos de ação. (RAO et al., 1998)

Peptidases	Mecanismo de ação
Exopeptidases <ul style="list-style-type: none"> Carboxi-peptidases <ul style="list-style-type: none"> 3.4.16 Serina peptidase 3.4.17 Metalo-peptidase 3.4.18 Cisteína peptidases Amino-peptidase Dipeptidil peptidases Tripeptidil peptidases 	
Endopeptidases <ul style="list-style-type: none"> 3.4.21 Serina proteases 3.4.22 Cisteína proteases 3.4.23 Aspartato proteases 3.4.23.19 Glutamato protease 3.4.24 Metalo-proteases 3.4.25 Treonina proteases 	
Omega peptidases <ul style="list-style-type: none"> N-terminus bloqueado C-terminus bloqueado 	

De maneira geral as famílias das peptidases são classificadas no grupo das hidrolases (grupo 3, subgrupo 4), com três critérios maiores para defini-las: (1) Tipo de reação catalítica (Figura 2), (2) natureza química do sítio de catálises e (3) relação evolutiva com referência à sua estrutura (BARRETT, 1992). Deste modo, as peptidases foram agrupadas em seis classes (TAVANO, 2013): Serina-peptidases (EC 3.4.21), Cisteína-Peptidase (EC 3.4.22), Aspartato-peptidase (EC 3.4.23), Metalopeptidase (EC 3.4.24), Treonina-Peptidase (EC3.4.25) e Ácido glutâmico-Peptidase (EC 3.4.23.19). Além destas, existem as Peptidases não classificadas (EC 3.4.99), pois não se conhece o mecanismo de ação, sendo que o grupo mais estudado é a Família U40, produzida por bactérias.

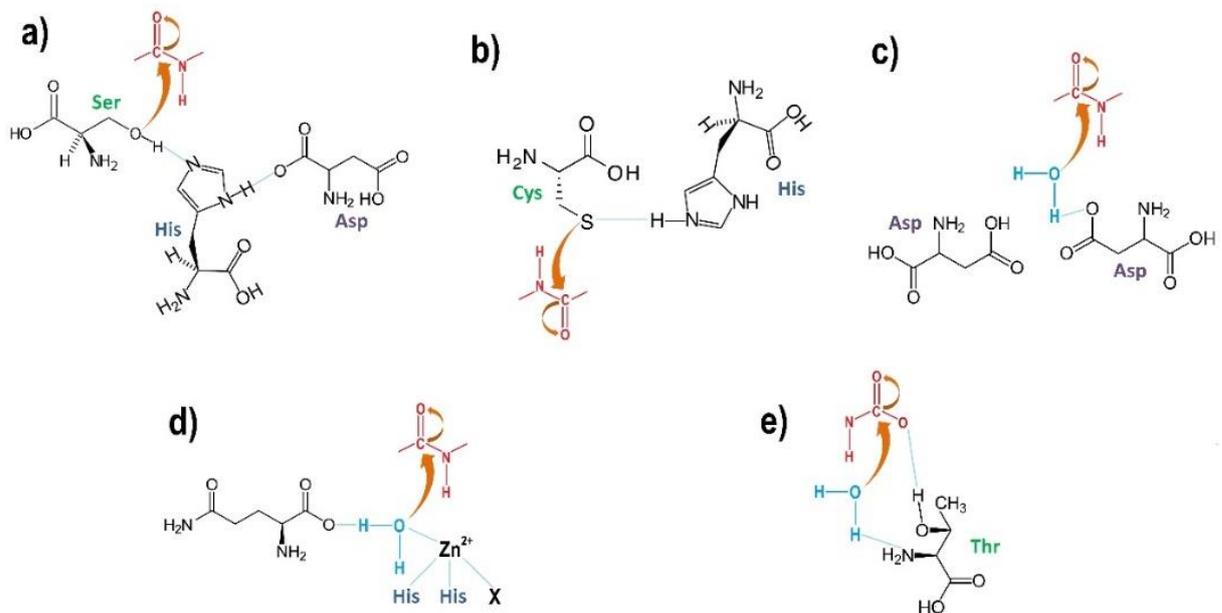


Figura 2. Mecanismo de hidrólise das principais famílias de Peptidases. Nos sítios ativos da Serina (nas Serina-peptidases) e Cistina (nas Cistina-peptidases) interagem com um grupo aceptor de prótons para promover o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica. As Aspartato-peptidases, Metalopeptidases e Treonina-peptidases precisam de uma molécula de água para realizar o ataque nucleofílico. O processo geral de excisão da ligação peptídica é o mesmo para todas as proteases. a) Serina-peptidases, b) Cisteína-peptidases, c) Aspartato-peptidase, d) Metalopeptidases e e) Treonina-peptidase.

Dos pontos de vista fisiológico e biotecnológico são quatro os grupos considerados mais relevantes: serina, cisteína, aspartato e metalo-peptidases (RAJASEKHAR et al., 2011).

- Serina-peptidases (SP): amplamente distribuídas em eucariotos, bactérias e vírus, indicando uma participação vital no metabolismo desses organismos. Os representantes mais conhecidos são a quimiotripsina e a tripsina (MENGES et al., 1997). Ativas em pH alcalino e neutro, com massa molecular de 18 a 35kDa, mas algumas possuem massas moleculares maiores. As SP são distinguidas por serem inibidas irreversivelmente por 3,4-dicloroisocoumarina (3,4 – DCI), L-3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) butano (E-64), diisopropilfluorofosfato (DFP), tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), e tiol *p*-cloromercuribenzoato (PCMB).

- Cisteína peptidases (CP): encontradas em todos os organismos, sendo representadas principalmente pela papaína (nome da família) extraída a partir do látex de *Carica papaya*, constituindo a primeira CP com estrutura tridimensional determinada (RAO et al., 1998). Seu sítio ativo é composto por um resíduo de cisteína, encarregada de coordenar o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica, porém são ativas numa faixa de pH de 6,0 até 7,5. Esta enzima é dividida em grupos que não seguem uma identidade de estrutura tridimensional nem de sequência e provavelmente surgiram de diferentes linhas evolutivas (RAWLINGS; BARRETT, 1994).

- Aspartato-peptidase: Pertence à família pepsina, incluindo enzimas digestivas, catepsinas lisossomais e enzimas de processamento, obtidas principalmente a partir de fungos. São ativas em pH ácido (YIN; CHOU; JIANG, 2013). Seu sítio ativo está localizado entre duas subunidades, onde cada subunidade contribui com um resíduo de aspartato, o qual é necessário para a atividade destas enzimas.

- Metalo-peptidases: Obtidas a partir de bactérias, fungos e organismos superiores, as metalo-peptidases são ativas numa extensa faixa de pH que vai de 6,0 a 9,0, e uma especificidade geralmente baixa (RAO et al., 1998). Apresentam grande diferença em suas sequências e estruturas, porém a maioria destas enzimas precisa

de um íon metálico bivalente o qual é cataliticamente ativo (RAWLINGS; BARRETT, 1995).

2.2.4 Aplicação industrial das peptidases

As peptidases apresentam uma grande variedade de aplicações, principalmente na indústria de alimentos, detergentes e farmacêutica, e mais recentemente (pela pressão relacionada ao meio ambiente) em processos de biorremediação (SCHAECHTER et al., 2009) e sínteses de biocombustíveis (HUO; WERNICK; LIAO, 2012; HUO et al., 2011). Dominando o mercado mundial de enzimas com aproximadamente 40% das vendas em 2012 (RAY, 2012).

Na indústria de alimentos, o uso das proteases, como a quimosina, para a fabricação de queijo é conhecido desde a antiguidade. Com o descobrimento de novas proteases, seu uso tornou-se mais diversificado, como por exemplo: produção de hidrolisados proteicos a partir das proteínas de soja com alto valor nutricional (RAY, 2012); tratamento e conservação de cerveja, melhoramento das propriedades organolépticas da carne (KUDDUS; RAMTEKE, 2012); hidrólise do glúten conferindo melhores propriedades às massas, síntese de Aspartame, usado como edulcorante artificial, na clarificação de sucos e molho de soja (RAO et al., 1998); e na diminuição da resposta alérgica, pela hidrólise de epitomes antigênicos (TAVANO, 2013).

Na indústria de detergentes são utilizadas principalmente as Serino-peptidases produzidas pelas bactérias dos gêneros *Bacillus* (MAURER, 2004) e *Flavobacterium*, e pelo fungo *Conidiobolus coronatus*, micro-organismos GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros) (KUDDUS; RAMTEKE, 2011). Estas enzimas possuem uma ampla especificidade pelo substrato, estabilidade térmica, pH ótimo alcalino e resistentes na presença de compostos quelantes e agentes oxidantes (RAY, 2012).

Na Indústria do couro as proteases substituem produtos químicos altamente contaminantes para o ambiente. O uso das enzimas nessa indústria ainda não é totalmente aceito devido a sua baixa eficiência e custo elevado (ARUNACHALAM; SARITHA, 2009).

As proteases atuam na biorremediação de resíduos industriais e domésticos ao solubilizar os resíduos industriais e domésticos, diminuindo a demanda biológica de

oxigênio dos sistemas aquáticos. O passo seguinte é a pesquisa de novas proteases estáveis em solventes orgânicos para serem usadas na biorremediação de sistemas não aquosos contaminados com hidrocarbonetos (GUPTA; KHARE, 2006).

As aplicações médicas das proteases incluem tratamento de trombooses e diminuição do desenvolvimento de células tumorais (SCHAECHTER et al., 2009); produção de enzimas digestivas para corrigir síndromes de deficiência enzimática (RAO et al., 1998); tratamento de queimaduras, feridas, entre outros (SJÖDAHL et al., 2002).

A pesquisa sobre produção de biocombustíveis pelas proteases tem sido estimulada pelas preocupações ambientais e a crescente demanda de energia no mundo sendo que estes são geralmente produzidos a partir de matéria prima rica em carboidratos e lipídeos (HUO; WERNICK; LIAO, 2012). As proteínas não são utilizadas com esta finalidade principalmente pela dificuldade de retirar o grupo amino dos hidrolisados proteicos. Mais recentemente tem sido dada maior atenção à produção de biocombustíveis por subprodutos de natureza proteica. Porém, com o elevado crescimento industrial, a indústria de ração não é capaz de absorver todo esse material proteico produzido (HUO et al., 2011). Huo e colaboradores (2011), procuraram resolver esse problema mediante engenharia genética, gerando uma *Escherichia coli* YH83 que possui três transaminases exógenas capazes de retirar o grupo amino de hidrolisados proteicos, permitindo à célula gerar álcoois de quatro ou cinco carbonos em condições aeróbias, ou biogás mediante digestão anaeróbica (PERALTA-YAHYA et al., 2012; WERNICK; LIAO, 2013).

2.2.5 Inibidores de proteases

Ao falar de proteases é quase inevitável falar de seus inibidores, moléculas que regulam a atividade das enzimas em condições fisiológicas normais evitando a auto hidrólise por peptidases endógenas ou protegendo os organismos do ataque por proteases exógenas (MEGURO et al., 2011), mas podem também interferir diminuindo a atividade de uma enzima num determinado processo industrial (STONER et al., 2004) e gerar perdas no processo. Recentemente, os inibidores de proteases tem recebido mais atenção por seu potencial de aplicação na indústria farmacêutica,

usados para inativar irreversivelmente proteases microbianas ou proteases alteradas em doenças humanas (JOHNSON; PELLECCIA, 2006).

2.3 Aminopeptidases

2.3.1 Generalidades

Amino-peptidases são enzimas que catalisam a hidrólises de resíduos de aminoácido na posição N-terminal de peptídeos e proteínas. Estas enzimas estão amplamente distribuídas em procariotos e eucariotos desempenhando importantes funções como degradação de proteínas, essencial para a manutenção do *pool* de aminoácidos utilizados para a síntese *in novo* de proteínas, geração de energia metabólica e reciclagem de cofatores. Tem sido demonstrado que as amino-peptidases estão presentes em diferentes compartimentos celulares, principalmente no citoplasma (65%), no periplasma e na parede celular (16%), ou segregadas no ambiente externo (16%) (GONZALES; ROBERT-BAUDOUY, 1996).

2.3.2 Aplicações industriais

Amino-peptidases desempenham papéis importantes em diversos processos celulares. Como consequência, as aplicações farmacêuticas estão sendo direcionadas para controlar sua atividade em processos fisiopatológicos, bem como ferramentas de diagnóstico ou marcadores de vias fisiológicas (POLANIA; MACCABE, 2007).

As aplicações industriais das amino-peptidases microbianas estão associadas principalmente à indústria de alimentos, na produção de hidrolisados proteicos e produtos fermentados ricos em proteínas derivadas de soja, carne, leite e cereais; na elaboração de ingredientes pré-digeridos para nutrição enteral/parenteral; na geração de peptídeos bioativos e produtos de saúde. A utilização de amino-peptidases nestes processos industriais não somente contribui para a melhoria do valor nutricional, mas também para o sabor do produto final, promovendo a degradação dos peptídeos

hidrofóbicos que possuem gostos indesejáveis e a liberação de outros peptídeos com sabor agradável e aminoácidos livres (NANDAN; NAMPOOTHIRI, 2013).

O uso de endopeptidases conjuntamente com amino-peptidases de ampla especificidade tem sido especialmente bem-sucedido na indústria de alimentos pois reduzem os níveis de epítomos tóxicos e alérgicos presentes em proteínas de leite e cereais. Uma abordagem semelhante foi utilizada para a geração de peptídeos bioativos com anti-hipertensivo, imunomoduladores e peptídeos com propriedades antimicrobianas (POLANIA; MACCABE, 2007).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a prospecção e caracterização de enzimas proteolíticas encontradas no genoma do *Mesorhizobium sp.* (denominado J5).

3.1. Objetivos específicos:

- i. Prospectar *in silico* peptidases no genoma do *Mesorhizobium sp.* J5;
- ii. Amplificar e clonar os genes codificadores de enzimas proteolíticas em vetor de expressão;
- iii. Expressar e purificar as proteínas de interesse na fração solúvel;
- iv. Caracterizar bioquimicamente as enzimas expressas com relação a variação de pH, temperatura, influência de íons, solventes orgânicos e detergentes;
- v. Construir os modelos das estruturas tridimensionais das proteínas por meio de análises de bioinformática;
- vi. Verificar a contribuição individual na fisiologia de *Mesorhizobium sp.* da proteína selecionada através de nocaute do gene de interesse;
- vii. Estudar os efeitos ocasionados após o nocaute gênico, dentre eles: produção de EPS, halo-tolerância e produção de biofilme.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sequenciamento do genoma do isolado

4.1.1 Construção das bibliotecas

O sequenciamento do genoma completo do isolado de *Mesorhizobium* sp. J5 foi realizado pela doutora Camila Cesário Fernandes, utilizando a plataforma Illumina, para o qual foram construídas bibliotecas do tipo fragmentos e *mate-pair* de 2-9 Kb, utilizando o TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation e o Nextera Mate-Pair Sample Preparation Kits (Illumina) respectivamente, de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento dessas bibliotecas foi realizado no equipamento HiScanSQ. Para isso foram utilizados os kits Paired-End Cluster Generation Kit v3 (Illumina®) e TruSeq™ SBS Kit v3 - 200 Cycles (Illumina®) e os procedimentos adotados seguiram as recomendações do fabricante.

4.1.2 Análise das Sequências e Anotação genômica

Ao término do sequenciamento os arquivos *fastq* (com os adaptadores trimados) foram analisados pelo doutor Luciano Kishi usando o programa CLC Genomics Workbench 6.0.5, o qual faz uma avaliação de qualidade das sequências geradas com posterior trimagem/corte das regiões onde foram identificadas leituras com baixa qualidade (Phred score < 20). Após esta etapa foi realizado o procedimento de clusterização ou montagem pelo algoritmo (*De Novo Assembly* – com os parâmetros padrão de montagem) com a finalidade de gerar a sequência consenso de cada linhagem (estimadas em 9.000.000 pb), a fim de permitir a anotação genômica. Para a anotação do genoma foi utilizado o programa Prokka 1.5.2 (Prokka: Prokaryotic Genome Annotation System – <http://vicbioinformatics.com/>).

4.2 Prospecção de genes de interesse biotecnológico no genoma do *Mesorhizobium* sp J5.

A anotação das ORFs foi realizada no RAST (Rapid Annotation Using Subsystem Technology) (OVERBEEK et al., 2014). E realizada uma pesquisa para ORFs que codificam genes de enzimas proteolíticas, as ORFs selecionadas foram comparadas individualmente num banco de dados de peptidases, MEROPS, utilizando a ferramenta de alinhamento local, BLASTN, e em um banco de dados de Sequência de proteínas patenteadas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alguns critérios de seleção foram utilizados: E-value $< 1e^{-04}$ (limiar relativamente rigoroso para garantir a alta cobertura e baixos resultados falso-positivos); porcentagem de identidade $\leq 35\%$; a posição dos resíduos do sítio catalítico e/ou de ligação a metais; assim como presença dos motivos proteicos; foram levados em conta para definir as proteases. Além disso, a cobertura $\leq 60\%$; e as sequências redundantes foram excluídas.

Para obter mais conhecimentos sobre a maquinaria proteolítica do gênero *Mesorhizobium* sp, as sequências de proteínas de cada uma das ORFs selecionadas foram submetidas a uma pesquisa exaustiva contra a base de dados MEROPS (RAWLINGS et al., 2014).

4.3 Mineração de dados na literatura científica

Para identificar a informação bioquímica e cinética para cada proteína de interesse biotecnológico encontrada foram usadas as bases de dados BRENDA (CHANG et al., 2015), UniProt (sequência de proteínas e informação funcional) (CONSORTIUM, 2015) e MEROPS (RAWLINGS et al., 2014). As proteínas de interesse foram selecionadas de acordo com a característica físico-química de proteínas homólogas, as quais foram anteriormente caracterizadas e discutidas na literatura. Foram considerados os seguintes parâmetros: pH ótimo $5 \leq$ ou ≥ 8 , temperatura ótima $10^{\circ}\text{C} \leq$ ou $\geq 40^{\circ}\text{C}$, e a estabilidade na presença de agentes desnaturantes e de solventes orgânicos, que são características enzimáticas desejadas na indústria.

4.4 Análise das sequências

As assinaturas de proteínas e motivos conservados foram observados no InterProScan (MITCHELL et al., 2015), e os dados físico-químicos teóricos foram gerados a partir do ProtParam ExPASy (<http://www.expasy.org/>). Para estimar a conservação evolutiva de cada um dos aminoácidos traduzidos a partir dos genes selecionados, suas sequências foram alinhadas com sequências de aminoácidos das famílias das peptidases de interesse, utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). O alinhamento foi analisado com o servidor ConSurf (ASHKENAZY et al., 2010). Além disso, foi realizada uma análise com o servidor SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011), com o intuito de se identificar possíveis peptídeos sinais.

Para as análises das relações filogenéticas, 24 sequências de aminoácidos de peptidases da família M29 (Anexo 1) obtidas da base de dados de peptidases (MEROPs) mais a sequências de aminoácidos de MesoAmp foram alinhadas com o Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) com um alinhamento par a par com abertura do *gap* de 35 e extensão 0,75. O arquivo de alinhamento foi submetido a Mr. Bayes 3.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) para estabelecer a melhor modelo de evolução. Os dendrogramas foram construídos com auxílio do programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) usando máxima verossimilhança, com bootstrap de 1000 e a matriz de substituição de aminoácidos LG (LE; GASCUEL, 2008).

4.5 Modelagem molecular

Foi realizada uma pesquisa de proteínas estruturalmente semelhantes às proteínas de interesse utilizando a ferramenta BLASTp no banco de dados de proteínas PDB (*Protein Data Bank*). Os modelos moleculares foram construídos utilizando o programa Modeller 9.10 (FISER; SALI; ŠALI, 2003) e o servidor I-Tasser (YANG et al., 2014), com os parâmetros fornecidos, com base nas coordenadas estruturais (dados de cristalografia) de proteínas similares depositadas no banco de dados PDB (HOLM et al., 2008). A avaliação da qualidade dos modelos foi realizada

por ModFold (MCGUFFIN; BUENAVISTA; ROCHE, 2013). Os escores da conservação da posição do aminoácido exibida pelo servidor Consurf foram projetadas na estrutura das proteínas de interesse, os volumes das cavidades proteicas foram calculados por KVfinder (OLIVEIRA et al., 2014) e o programa PyMOL (DELANO, 2004) foi utilizado para visualizar os modelos gerados.

4.6 Amplificação dos genes codificadores de enzimas proteolíticas

Uma vez identificadas as ORFs codificadoras de enzimas proteolíticas no genoma de *Mesorhizobium sp* J5, procedeu-se com a clonagem das sequências em vetor de expressão pET28a. Para isso foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (primers) com sítios de restrição adequados nas regiões inicial e final do gene para a clonagem direcional (Tabela 2). O vetor pET28 caracteriza-se por possuir uma sequência codificadora de uma cauda de poli-histidina na região N-terminal da proteína super-expressa que permite a purificação da proteína por cromatografia de afinidade. Para determinar a temperatura de pareamento (T_m) ótima dos primers foram feitas reações de PCR, nas seguintes condições: 2 μ L de Tampão 10X [Tris-HCl 200mM, pH 8,8; 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 100 mM KCl; 1% (v/v) Triton X-100]; 0,5 μ L de dNTP (4mM); 0,5 μ L de MgCl_2 (50mM); 5 pmol de cada primer; 1 U de Taq Polimerase; 200 ng de DNA genômico do *Mesorhizobium sp* J5; e água Milli-Q ultra pura para totalizar o volume final de reação de 20 μ L. As reações foram submetidas ao seguinte programa do termociclador gradiente: passo inicial a 95°C por 1 minuto, 30 ciclos a 95°C por 2 min, e um gradiente de temperatura de 60 °C até 65 °C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e um passo final de 72°C por 5 min e estocadas a 4°C.

Definida a T_m das reações de PCR, novas reações foram feitas utilizando-se uma enzima de alta fidelidade e baixa taxa de erro, a *Pfu* DNA Polimerase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 2 μ L de Tampão 10X [200mM Tris-HCl (pH 8,8), 100mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM KCl, 1 mg/mL BSA, 1% Triton X-100 (v/v), 20 mM de MgSO_4 (Thermo Scientific)]; 0,5 μ L de dNTP (10mM); 200ng de DNA genômico; 10 pmol de cada primer (forward e reverse); 0,5 μ L da *Pfu* DNA Polimerase (2,5 U/mL, Thermo Scientific); e água ultra

pura para totalizar o volume final de reação de 50 µL. As reações foram submetidas ao programa descrito acima, no entanto, com temperatura de pareamento de 61,2°C.

Após o término da reação uma alíquota de 2µL das reações de PCR foi aplicada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (0,5 mg/µL), a fim de se visualizar a amplificação dos produtos de PCR. Os produtos resultantes da PCR foram purificados com o kit PCR clean-Up system (Promega, Madison, Wisconsin, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 2. Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores de síntese utilizados para amplificação dos genes codificadores de peptidases.

ORF	Enzima de restrição	Oligonucleotídeos (5'→ 3')	T _M (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
ORF3	<i>NdeI</i>	GCC <u>C</u> ATATGAAGTCAATTGCAGGTA	58,3	1040
	<i>XhoI</i>	TTCTCGAGCGAATGCTTGCC	57,3	
ORF6	<i>NdeI</i>	CAGGCATATGATCATGACCACACATTCG	66,6,	1256
	<i>XhoI</i>	CGAACTCGAGCCCTCAGGCCCACT	59,5	
ORF8	<i>NdeI</i>	CAGCATATGGACATGATGAACCCGAGA	63,3	1514
	<i>XhoI</i>	TCGCTCGAGTGGTCAGCTCTCGTAG	60,2	
ORF9	<i>BamHI</i>	AGCCGGATCCGCTATGTCCTTTCAGA	57,3	1478
	<i>HindIII</i>	GATCAAGCTTTACGCGGTTCCATA	63,2	

T_m = Temperatura de pareamento
Letras sublinhadas = sítio de restrição das enzimas.

4.6.1 Quantificação e análise do DNA

O DNA fosmidial foi quantificado por espectrofotometria em aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) e a qualidade do DNA e a presença de proteínas contaminantes foi verificada pela relação ²⁶⁰/₂₈₀nm.

O resultado das extrações foi visualizado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (0,05 mg/mL). A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal e conduzida em tampão TBE 1X [Tris 89mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 2,5 mM, pH 8,3] a 80 V por 1 hora e 30 min. As amostras foram preparadas contendo 5 µL de DNA e 3 µL de tampão de corrida [0,025% de azul de bromofenol (p/v) e 50% de glicerol (p/v)]. Foi aplicado o padrão de tamanho

molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Ontário, CA) e a imagem foi visualizada e documentada sob luz UV em aparelho fotodocumentador Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA), através do software Quantity OneR (Bio-Rad).

4.6.2 Digestão dos fragmentos amplificados

Os dois produtos gênicos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI*, *NdeI*, *HindIII* e *BamHI* de acordo com a construção presente em cada gene, conforme apresentado no Anexo 1. Todas as reações de digestão foram realizadas segundo as instruções do fabricante e a quantificação foi feita em aparelho nanodrop™ 1000 spectrophotometer.

4.6.3 Ligação dos fragmentos ao vetor de expressão

O vetor pET28a (Novagen, Gibbstown, New Jersey, USA) foi digerido com as mesmas enzimas de restrição dos produtos gênicos de modo a apresentar extremidades compatíveis, de acordo com o descrito na Figura 3. Assim o vetor e os insertos foram submetidos a uma reação de ligação para a produção de DNA recombinante (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) utilizando T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA).

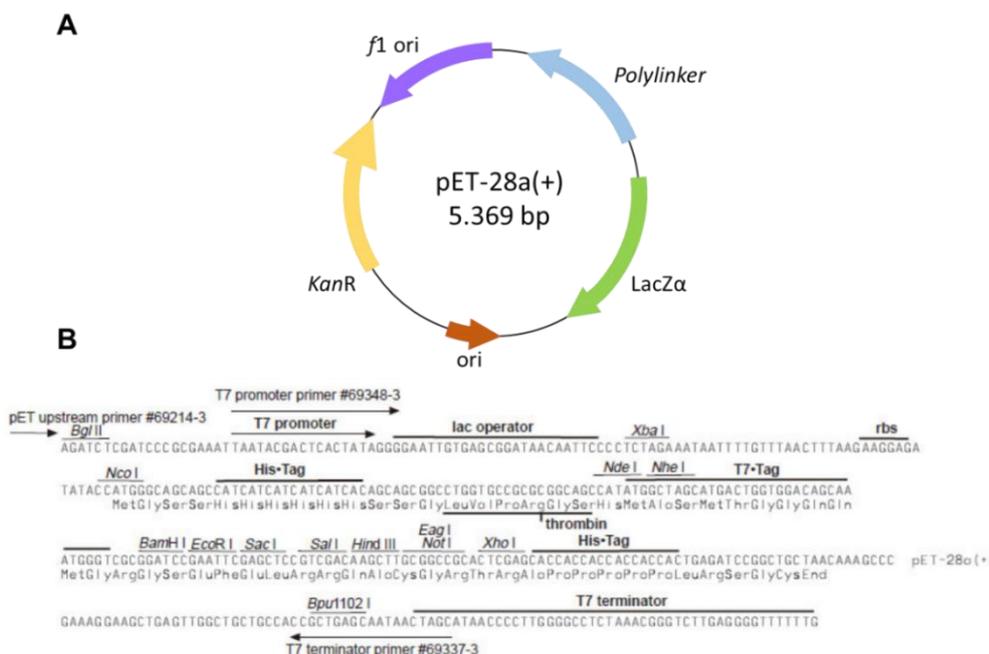


Figura 3. Mapa do vetor pET-28a. **A.** Vetor usado para a expressão das ORFs codificadoras de enzimas proteolíticas; **B.** Região de clonagem e expressão do vetor pET28.

4.6.4 Preparo de células competentes de *Escherichia coli*

Para o preparo de células competentes de *E. coli* seguiu-se protocolo de SAMBROOK e RUSSELL, (2001). Uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 5 mL de meio LB sem antibiótico e incubada a 37°C por 16-18 h, então 3 mL da cultura foram transferidos para 100 mL de LB sem antibiótico e incubado a 30°C, com agitação de 250 r.p.m. até atingir uma DO_{600nm} entre 0.4-0.5. Após, a cultura foi centrifugada a 3000 g por 10 min a 4°C, e o precipitado foi ressuscitado gentilmente em 15 mL de CaCl₂ (50 mM) gelado, incubado no gelo por 15 min e centrifugado novamente, sendo este procedimento com CaCl₂ repetido duas vezes para lavagem das células. Por fim, o precipitado celular foi ressuscitado gentilmente em 500 µL de glicerol a 10% estéril e armazenado em alíquotas de 200 µL a -80°C.

4.6.5 Transformação de células de *E. coli* BL21(DE3)

As transformações foram realizadas com células competentes de *E. coli* BL21(DE3), previamente retiradas do freezer -80°C e descongeladas em banho de

gelo por aproximadamente 5 min. Na reação foram utilizados 10 µL do DNA ligado (construção pET28a+ORF) e 200 µL da célula competente BL21(DE3). A transformação foi feita por choque térmico e, para isso, a reação foi colocada por 20 min em banho de gelo e logo em seguida, submetida a 42°C, por 90 s, sendo recolocada no banho de gelo por mais 2 min.

Após a transformação, foram adicionados 790 µL de meio SOC [2% de triptona (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v), 1 mL de NaCl 1 M, 0,25 mL de KCl 1 M, 1 mL de Mg²⁺ 2 M filtrado a 0,22 µm e 1 mL de glicose 2 M filtrada sob as mesmas condições] para propiciar o desenvolvimento das células transformadas, sendo as mesmas submetidas a agitação orbital de 200 r.p.m., a 37°C por 90 min. Após incubação das células transformadas, alíquotas de 100 µL da cultura foram distribuídas em placas de petri contendo o meio LB sólido com 50 mg/mL de ampicilina, IPTG 0,1 M e 20 µL de X-GAL, 50 mg/mL dissolvidos em DMF. As células transformadas foram incubadas a 37°C por 16-18 h.

4.6.6 Coleta, estoque dos clones e confirmação da clonagem.

A coleta dos clones foi realizada com palitos de madeira estéril, os mesmos foram colocados em 5mL de meio LB com canamicina (50 µg/mL). Os tubos foram incubados sob agitação orbital constante a 250 r.p.m., 37°C, por 20 h. Após este período, uma alíquota de 800 µL da cultura foi transferida para tubo criogênico contendo 200 µL de glicerol 100% esterilizado e estocados a -80°C.

A confirmação da clonagem foi feita através da reação de PCR em colônias. Os clones coletados foram depositados em microtubos de 0,25 mL estéreis e adicionados 20 µL de tampão de lise celular (KCl 50 mM, Tween 20 0,1% e Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), sendo submetidos a 99°C por 30 min para a lises celular. Após, 4 µL do sobrenadante foram utilizados para a reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada ORF, e a visualização do resultado foi feita em eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.7 Sequenciamento das ORFs

Após a PCR das colônias com os clones positivos foi realizada extração de DNA plasmidial utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) para posterior sequenciamento e confirmação da inserção do fragmento no vetor pET28. Para a reação de sequenciamento os DNAs plasmidiais foram amplificados em microplacas nas seguintes condições: 100 ng de DNA plasmidial, 3,0 µL de tampão de sequenciamento 5X v3.1, 1,0 µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems Carlsbad, Califórnia, USA), 10 pmol do oligonucleotídeo, sendo que as reações foram feitas separadamente para Forward e Reverse, e água deionizada estéril para completar o volume de 10 µL. As placas foram levadas ao termociclador, com os seguintes ciclos: desnaturação a 96°C por 1 minuto; 39 ciclos de 96°C por 15 s; 65°C por 15 s, 60°C por 4 min e ciclo final a 4°C até serem retiradas.

Após a reação de sequenciamento procedeu-se com a lavagem da placa, o DNA amplificado foi precipitado com 80 µL de isopropanol 75%, incubando-se em temperatura ambiente por 15 min, sendo posteriormente centrifugadas a 4.000 r.p.m. por 45 min a 15°C, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com 180 µL de etanol 70%, e centrifugadas a 4.000 r.p.m. por 5 min. a 15°C. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi retirado a vácuo por 5 min. As amostras foram ressuspendidas em 10 µL de formamida e incubadas por 5 min a 95°C, a fim de obter o DNA em fita simples e aplicadas no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo recomendações do fabricante.

4.8 Expressão e extração das proteínas recombinantes

Inicialmente foi realizado o teste de expressão das proteínas de interesse. Para isso, uma colônia isolada de *E. coli* BL21(DE3) transformada foi inoculada em 50 mL de meio de cultura LB com canamicina a 50 µg/mL, que permaneceu sob agitação durante 16 h, a 37°C, 200 r.p.m.. Alíquotas de 2 mL foram inoculadas em frascos contendo 200 mL de meio LB com canamicina, que permaneceram sob agitação de 200 r.p.m., 37°C, até atingir a fase logarítmica de crescimento, com D.O_{600nm} entre 0,4 e 0,6. A indução foi feita adicionando 0,1 mM de IPTG à cultura, que permaneceu nas mesmas condições descritas por 2 h.

Foram coletadas alíquotas de 1 mL da cultura no tempo zero (T0 - antes da indução) e no tempo 2 (T2 – 2 h após a indução) e centrifugadas por 10 min a 1700 g, para que fosse possível analisar a expressão da proteína de interesse em comparação às proteínas totais. Após confirmar a expressão, diferentes condições foram testadas, com variações na temperatura, tempo de incubação, aeração (volume de meio de cultura por frasco tipo erlenmeyer) e concentração de IPTG. Uma vez determinada a melhor condição de expressão de cada proteína, ensaios de expressão em volumes maiores foram realizados, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

Para a extração das proteínas, as células foram coletadas por centrifugação a 12000 g por 20 min. A extração iniciou-se pela homogeneização do precipitado celular no tampão de extração (Tris-HCl 100mM, pH 8, com NaCl 200mM; Triton X100 0,2% e Imidazol 10mM), numa relação de 10 mL do tampão por litro de cultura. As células foram rompidas por ultrassom em sonicador Branson Sonifier 250 (Branson, Connecticut, USA), com 30% da razão cíclica por até 30 min com intervalos de 30 s. As amostras foram submetidas à centrifugação por 20 min, a 4°C, 38724 x g, para separação de extratos solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado de restos celulares).

4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise da expressão das proteínas foi realizada através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com o sistema mini-protean (Bio-Rad). A corrida foi realizada a 20 mA, com o tampão de corrida Tris-Glicina [50 mM de Tris-HCl; 150 mM de Glicina e 0,1% de SDS (p/v)]. O preparo das amostras ocorreu com a adição do tampão de amostra 2X e fervura por 10 min a 95°C e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue [40% de metanol (v/v); 10% de ácido acético glacial (v/v) e Coomassie R-250 a 0,1% (p/v)] e descorado em solução contendo 10% de ácido acético (v/v) e 10% de etanol (v/v). Cada etapa da obtenção da proteína foi analisada individualmente por meio de SDS-PAGE.

4.10 Purificação de enzimas proteolíticas

4.10.1 Purificação por cromatografia de afinidade

Os extratos celulares obtidos na fração solúvel foram submetidos à purificação por cromatografia de afinidade a metal usando a resina Ni-NTA Agarose (Qiagen, Venlo, Limburgo, Holanda), carregada com níquel, o que permite a purificação de proteínas com cauda de histidina (6xHis tag). Assim, foram acrescentados ao tampão de extração, descrito no item 4.8, para lavagem da coluna de polipropileno (Bio-Rad) e eluição da proteína, um gradiente de imidazol (de 20 mM a 1 M), que também possui afinidade pelo níquel, compete com os aminoácidos da histidina pela ligação à resina e possibilita a eluição da proteína.

4.10.2 Purificação por exclusão molecular

As frações de interesse coletadas da purificação por afinidade foram concentradas em concentrador para centrifugação Amicon Ultra, MWCO 30 kDa (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). O material concentrado foi submetido à purificação por filtração em gel em aparelho Akta Pure System, filtro de 280 nm e célula de fluxo de 0,5 mm, com a coluna HiLoad Superdex 200 16/60 (GE Healthcare, Little Chalfon, UK) para purificação de proteínas de pesos moleculares de 10 kDa até 600 kDa e um volume de coluna de 120 ml. O equilíbrio da coluna foi feito com dois volumes do tampão (100 mM de Tris-HCl, pH8,0; 200 mM de NaCl e 5% glicerol), com as amostras coletadas em uma fração de 0,5 mL/min. O resultado foi analisado pela formação do pico baseado num padrão de proteínas: Tiroglobulina bovina (670 kDa), γ -globulina (150 kDa), albumina (43 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) e Ácido *p*-amino benzoico (pABA) (0,13 kDa), usando a análises de regressão lineal dos volumes de eluição de cada padrão.

4.11 Zimograma

A detecção da atividade da proteína purificada no gel de PAGE 10% foi realizada por meio de um zimograma, utilizando L-leucina – β – naftilamina como substrato (KUO et al., 2004). As eletroforeses foram feitas a 4°C e voltagem constante de 100 V por 4 h. Ao final, o gel foi submerso em tampão bicarbonato de sódio – NaOH 100 mM, pH 8, 0,4% L-leucina- β -naftilamina, 0,6% de Fast Black K, 4 mM CoCl₂ e incubado a 40°C por 1 hora. Um gel foi utilizado para o zimograma e o outro foi corado com Coomassie Brilliant Blue.

4.12 Ensaios espectroscópicos

4.12.1 Dicroísmo circular

A análise da estrutura secundária foi realizada pela técnica de Dicroísmo Circular (CD) no Espectropolarímetro JASCO-810 (Jasco Corporation, Tóquio, Japão) com o controlador de temperatura Peltier Type Control System PFD425S. O experimento prosseguiu na temperatura constante de 10°C, com 30 *scans* consecutivos, em cubeta de quartzo de 0,1 mm de caminho óptico, no comprimento de onda de 260 a 195 nm, e os espectros da média entre as medidas armazenados. Os dados foram corrigidos, descontando-se a interferência do tampão.

4.12.2 Termostabilidade da estrutura secundária

Para avaliação da termoestabilidade das proteínas foram usados ensaios de desenovelamento térmico, monitorado no comprimento de onda de 222 nm, entre as temperaturas de 20°C a 110°C; com intervalo entre as coletas de 0,5°C. A temperatura de transição do desenovelamento (T_m) foi assumida como a temperatura do ponto de inflexão da curva de desnaturação e, os dados foram plotados e tratados pelo programa Origin 8.0 (Origin Lab Corporation, Copyright 1991-2007) segundo ajuste não linear para T_m .

4.13 Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima foi determinada pela detecção espectrofotométrica a 405 nm da p-nitroanilida liberado a partir do substrato L-leucina-p-nitroanilida (Leu-p-NA) mostrado na Figura 4 (WANG et al., 2014b), usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{\text{pNA}} = 9,620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

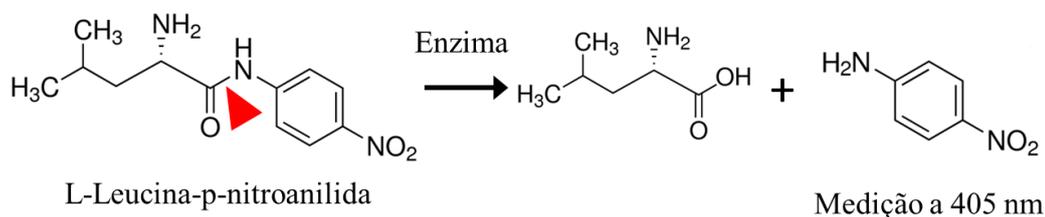


Figura 4. Esquema da reação de hidrólise da L-Leucina-p-nitroanilida por enzimas proteolíticas.

O substrato foi ressuspendido em etanol a 100 mM e estocados a -20°C . O ensaio padrão, a menos que especificado de outra forma, constituiu-se de: 2 mM de L-Leucina-p-nitroanilida, em um tampão de reação a 100 mM de Bicarbonato-NaOH pH 8,0; 2 mM CoCl_2 num volume final da reação de 200 μL com medições da absorbância (405 nm) a cada 30 s por até 20 min, a 40°C , usando um espectrômetro MultiScan Go (Thermo Scientific).

Regressões lineares para determinação das velocidades iniciais (V_0) de reação assim como o cálculo do desvio padrão foi feito no programa SkanIT 3.2 (Thermo Scientific), considerando-se o coeficiente de extinção molar da p-nitroanilida para cada reação (Equação 1/Equação 2). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e como controles foram utilizados sistemas de reação nas mesmas condições sem a presença de enzima. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como 1 μmol de p-nitroanilida liberada por minuto.

Equação 1

$$\text{moles de produto} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon_{\text{pNA}}}$$

Equação 2

$$\varepsilon_{\text{pNA}} = 9.620 \text{ M}^{-1} \times \left(\frac{0,200 \text{ cm}^3}{3,141 \times (0,325 \text{ cm})^2} \right)$$

4.14 Efeito do pH sobre a atividade da enzima

O efeito do pH foi investigado medindo-se a atividade enzimática em tampões a uma concentração de 100 mM com diferentes valores de pH. Foram testados: McIlvaine (pH 3,0 até 4,5); Citrato de sódio (pH 4,0 até 6,5); Fosfato de sódio (6,5 até 8,0); Tris-HCl (pH 7,0 até 8,5); Bicarbonato-NaOH (8,5 até 11); Glicina-NaOH (8,5 até 10,5) e Fosfato monossódio-NaOH (11,0 até 12,0), conforme ensaio padrão descrito anteriormente.

4.15 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A atividade da enzima em diferentes temperaturas foi determinada medindo-se a atividade de 10 a 90°C, no ensaio padrão. Após o término do tempo determinado de incubação a absorbância foi determinada e transformada em Mol de produto.

A termoestabilidade foi determinada pela medição da atividade enzimática residual após incubação da solução da enzima em diferentes temperaturas, na faixa de 45°C a 80°C, por até 1 h, no termociclador em modo gradiente. Após o término do tempo de incubação, os tubos foram resfriados em gelo e a atividade residual foi determinada.

4.16 Influência de íons metálicos, inibidores e detergentes sobre a atividade enzimática

Os efeitos da presença de vários reagentes sobre a atividade enzimática foram investigados através da medição da atividade residual, após 5 min de pré-incubação da enzima com cada reagente. A atividade sem a presença de qualquer aditivo foi definida como 100%. Para analisar o efeito dos sais e íons metálicos, CaCl₂, Li₂SO₄, MnSO₄, NiCl₂, CuSO₄, CoCl₂, MgSO₄, Al₂(SO₄)₃, FeSO₄, NaCl ou KCl foi adicionado à reação enzimática. A ação de detergentes, tais como Tween 20, Tween 80 e Triton

X-100 a 1%, e 5% (v/v) sobre a atividade enzimática, também foi investigada. Dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram testados nas concentrações de 0,5mM e 1mM (p/v). A estabilidade das enzimas na presença de glicerol e solventes orgânicos foi avaliada através da medição da atividade residual após incubação da enzima com o solvente durante 30 min.

4.17 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para obter os parâmetros catalíticos K_m (Constante de Michaelis-Menten), V_{max} (Velocidade máxima da reação), K_{cat} (Constante catalítica) e $K_{cat}.K_m^{-1}$ (Eficiência catalítica), os ensaios foram realizados variando-se as concentrações de Leu-p-NA de 0,05 a 2,5 mM, determinando-se a velocidade inicial (V_0) de cada reação. Os resultados foram obtidos pela regressão não linear dos dados, com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA.).

4.18 Construção do mutante Δ mesoamp

4.18.1 Preparação de células competentes de *Mesorhizobium sp. J5*

As células de *Mesorhizobium sp. J5* foram preparadas segundo o protocolo proposto por Sharma 2010. Uma colônia isolada de *Mesorhizobium sp. J5* foi inoculada em 5 mL de meio líquido TY (BERINGER, 1974) e incubada a 30°C por 150 r.p.m. até alcançar a fase estacionária, um 1 mL de cultura foi usado para inocular 200 mL do mesmo meio mantido sob as mesmas condições e cultivadas até atingirem densidade ótica (DO_{600nm}) de 0,1–0,3. Após o desenvolvimento, as células foram centrifugadas a 6000 g, a 4°C por 30 min e o precipitado celular coletado foi lavado (três vezes) com 200 mL de Glicerol 10% (p/v) gelado; após a última lavagem as células foram ressuspensas em 200 μ L de glicerol 10% e distribuídas em alíquotas de 50 μ L em microtubos, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a –80°C para uso futuro.

4.18.2 Construção do vetor suicida pNPTS138 Δ mesoamp

As regiões que flanqueiam o gene de interesse foram amplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3. Em seguida, os fragmentos de 510 e 543 pb foram usados como molde para uma segunda etapa de PCR (*Overlapping PCR*) usando os oligonucleotídeos A e D. O novo produto de PCR de 1053 pb foi digerido utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e ligado ao vetor pNPTS138 previamente digerido com as mesmas enzimas. O fragmento *mesoamp* de 1284 pb foi removido, mantendo a mesma fase de leitura (ORF) ao longo da deleção para evitar potenciais efeitos polares. O vetor pNPTS138 (Figura 6) é derivado do vetor Litmus 38 que contém o marcador de resistência à canamicina, o gene *levansucrase SacB* e a capacidade de se transferir por conjugação para uma grande diversidade de bactérias (WEST; YANG; STEPHENS, 2002).

Tabela 3. Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para gerar a mutação do gene *mesoamp*.

Nome	Enzima de restrição	Oligonucleotídeos (5'→ 3')	TM (°C)	Produto amplificado
P (A)F	<i>Bam</i> HI	TGCGGATCCTGGCGCAGGAAGTGTT	69,3	510pb
P (B)R	-	CCTCCCTACGTGGGAATCTGACCCATA	65,3	
P (C)F	-	GATCCCACGTAGGGAGGTCGAATGGC	67,4	543pb
P (D)R	<i>Eco</i> RI	CTGGAATTCGTCGGGGACCGGGTTCTG	69,5	
P (A)F	<i>Bam</i> HI	TGCGGATCCTGGCGCAGGAAGTGTT	-	1053pb
P (D)R	<i>Eco</i> RI	CTGGAATTCGTCGGGGACCGGGTTCTG		

TM = Temperatura de pareamento

Letras sublinhadas= sítio de restrição das enzimas

4.18.3 Eletroporação de *Mesorhizobium* sp. J5

Alíquotas de 50 μ L de células de *Mesorhizobium* sp. J5 eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo por aproximadamente 10 min. Em seguida, foi adicionado 1 μ g de DNA do plasmídeo pNPTS138- Δ *mesoamp*, sendo transferidas

para eletrocubetas com espaço de 1 mm (Bio-Rad) previamente geladas (4°C), e colocadas entre os eletrodos do equipamento eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad), onde foi aplicado um pulso elétrico com os seguintes parâmetros: 1800 V de voltagem, 200 V de resistência e 25 FD de capacitância por cerca de 6-10 ms. A corrente gerada altera a estrutura da membrana celular, abrindo poros temporários aquosos na bicamada lipídica que possibilitam a entrada do DNA recombinante na célula-alvo. Após o pulso elétrico as células foram recuperadas em 1,0 mL de meio líquido TY sem antibiótico, incubadas a 30°C por 4 h e 150 r.p.m..

Posteriormente, alíquotas de 100 µL das células transformadas foram inoculadas em meio TY sólido contendo canamicina a 50 µg/mL. As placas foram devidamente identificadas e incubadas a 30°C por 72 h. Após o período de incubação foi possível observar vários clones, posteriormente coletados.

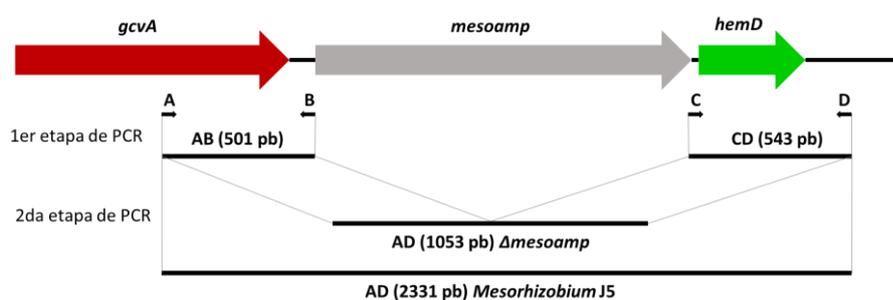


Figura 5. Esquema da PCR *overlapping* para a construção da versão deletada do gene *mesoamp*. As letras A, B, C e D indicam a posição dos oligonucleotídeos iniciadores no genoma de *Mesorhizobium sp. J5*.

4.18.4 Seleção dos clones positivos

O vetor pNPTS138 contendo uma cópia deletada do gene *mesoamp* foi inserido em *Mesorhizobium sp. J5* por eletroporação. O plasmídeo pNPTS138 é capaz de se replicar em *E. coli* DH10β, mas, no entanto, atua como suicida em *Mesorhizobium sp.* devido à incapacidade de se replicar na célula de forma autônoma. Por isso é necessário a integração no genoma de *Mesorhizobium sp.* para permanecer na célula. Uma maneira pela qual o plasmídeo pode se integrar no genoma da bactéria é através da recombinação homóloga no locus do gene alvo. Os transformantes que são

resistentes à canamicina e sensíveis à sacarose são candidatos a esse tipo de recombinação.

Após as transformações em *Mesorhizobium sp.*, as colônias que cresceram em meio TY contendo canamicina (50 µg/mL) foram repicadas nos meios: TY, TY/canamicina e LB/ sacarose 5%. Somente as colônias que cresceram na presença de canamicina e não cresceram em meio LB/ sacarose 5% foram selecionadas. Essas colônias foram inoculadas em 3 mL de meio TY (Tryptona 5 gL⁻¹, extrato de levedura 3 gL⁻¹ e CaCl₂ 0,67 gL⁻¹) e permaneceram a 30°C por 48 h. Para a seleção do segundo evento de recombinação as bactérias foram inoculadas nos meios sólidos TY, TY/canamicina e TY/ sacarose 5%. Assim, as colônias que foram capazes de se desenvolver em presença de sacarose e que apresentaram sensibilidade à canamicina foram selecionadas (Figura 7). Essas colônias foram repicadas novamente nos meios TY/sacarose 5% e TY/canamicina para certificação do fenótipo (Figura 7).

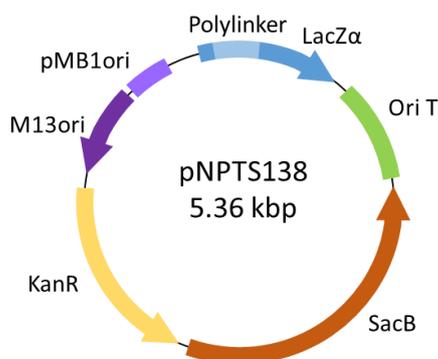


Figura 6. Mapa do vetor pNPTS138 usado na mutação sítio dirigida.

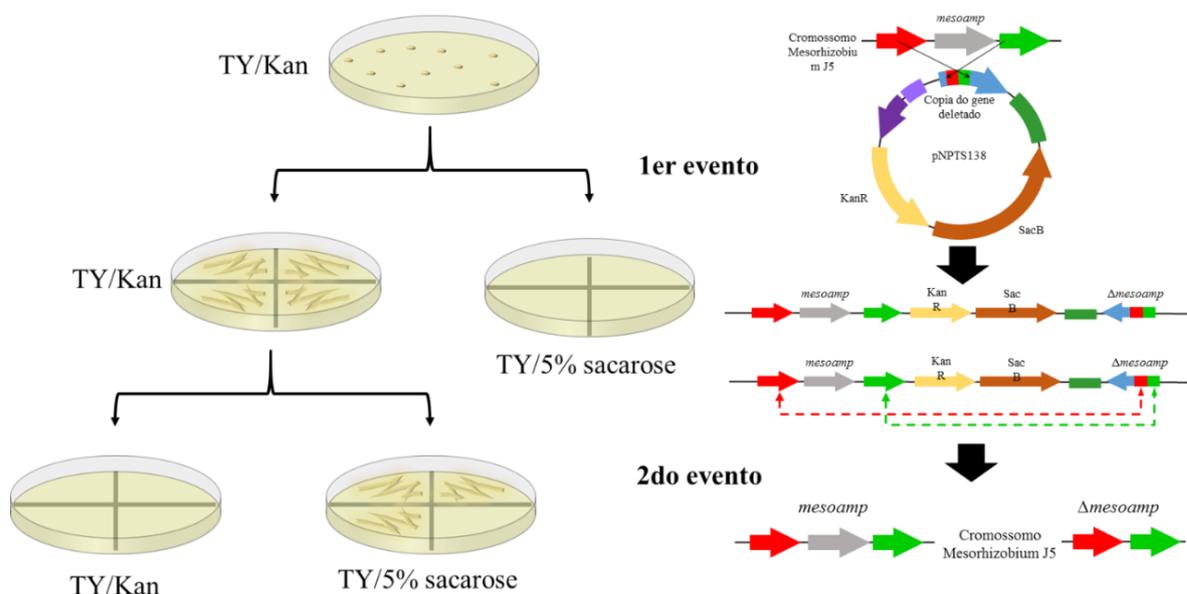


Figura 7. Evento de deleção do gene *mesoamp* usando o vetor suicida *pNPTS138Δmesoamp*.

Para confirmar a deleção foi realizada reação de PCR com os oligonucleotídeos A e D, com o objetivo de comparar o tamanho do fragmento amplificado, estando o gene inteiro presente ou deletado. Colônias de *Mesorhizobium sp. J5* carregando a deleção foram repicadas em 20 μ L de tampão de lises e aquecidas a 96°C por 15 min, a fim de se obter um lisado homogêneo da diluição; 4 μ L desta diluição foram utilizados na reação de PCR em um volume total de 20 μ L. Obtido sucesso no processo de mutação, as colônias selecionadas foram desenvolvidas em 3 mL de meio TY líquido, a 30°C, por 48 h. Do total, 800 μ L foram utilizados para a estocagem do material a -80°C.

4.19 Caracterização fenotípica da linhagem Δ *mesoamp*

4.19.1 Curva de crescimento *in vitro* de *Mesorhizobium sp. J5* vs linhagem Δ *mesoamp*

Para se obter a curva de crescimento, 1% (v/v) das culturas de *Mesorhizobium sp. J5* e da linhagem Δ *mesoamp* (DO_{600nm} 0,5) foram inoculadas em meio TY a 30°C,

200 r.p.m. O crescimento das culturas foi monitorado pela leitura da absorbância a 600 nm durante 96 h.

4.19.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Para a avaliação da produção de EPS pelas culturas de *Mesorhizobium sp.* J5 e da linhagem Δ *mesoamp*, as bactérias foram cultivadas em meio TY a 30°C, 200 r.p.m. Após atingir uma D.O._{600nm} 1, um ml de cultura foram usadas como pré-inóculo para 99 mL de meio PSY (K₂HPO₄ 1,2 gL⁻¹; KH₂PO₄ 0,8 gL⁻¹; MgSO₄ 0,2 gL⁻¹; sacarose 30 gL⁻¹; extrato de levedura 1,0 gL⁻¹) e incubadas a 30°C por 144 h, em agitação orbital a 200 r.p.m. O meio PSY já foi usado em trabalhos anteriores (dados não publicados) no laboratório de bioquímica de micro-organismos e plantas sendo o meio de cultura que apresentou os melhores resultados para produção ótima de EPS.

Após a incubação a cultura foi centrifugada a 12000 g por 20 min, e o sobrenadante separado e tratado com um volume de ácido tricloroacético (10% p/v), sendo homogeneizado com agitação constante (90 r.p.m.) durante 30 min, para então ser centrifugado por 20 min, a 12000 g. O material sedimentado foi descartado, e etanol gelado a 96% foi adicionado ao sobrenadante numa relação 3:1 (v/v). A mistura foi refrigerada a 4°C durante 24 h. Após o período de refrigeração, as amostras foram centrifugadas mais uma vez (10000 g, 4°C, 30 min) para separar o precipitado do solvente. O precipitado foi lavado várias vezes com etanol, e o excesso de foi evaporado. A precipitação com solventes consegue a purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis do meio de cultura (CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015).

4.19.3 Tolerância ao estresse salino

Culturas de *Mesorhizobium sp.* J5 e da linhagem Δ *mesoamp* foram cultivadas em 100 mL de meio TY a 30°C sob agitação de 200 r.p.m., até atingir uma D.O._{600nm} de 0,6; então, 100 μ L de cultura foram adicionados em 650 μ L de meio TY suplementado com 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50 e 2M de NaCl. Após incubação por 72 h a 30°C a D.O._{600nm} foi medida.

4.19.4 Cinética de lise

Culturas de *Mesorhizobium sp.* J5 e da linhagem Δ mesoamp foram incubadas em meio TY até atingir uma D.O._{600nm} de 1; após este período as células foram lavadas e ressuspensas em tampão PBS (contendo 0,05% de triton X-100), numa D.O._{600nm} de 2. As lises celulares foram determinadas por alterações na D.O._{600nm}, medidas a cada 30 min.

4.19.5 Termotolerância

Culturas de *Mesorhizobium sp.* J5 e da linhagem Δ mesoamp foram cultivadas em 100 mL de meio TY a 30°C sob agitação de 200 r.p.m até atingir uma D.O._{600nm} de 0,6; então, 200 μ L de cultura foram incubados a 30, 35, 40, 50, 60 e 70 °C por 30 min. Uma alíquota (0,5 % v/v) da cultura nas diferentes temperaturas foi usada para inocular meio TY, que permaneceram por 72 h a 30°C e, depois deste tempo, a D.O._{600nm} foi medida.

4.19.6 Produção de biofilme

O teste de produção de biofilme foi realizado segundo o protocolo de HASSAN (2011), com algumas modificações. Uma alíquota de 10 μ L de células em suspensão de *Mesorhizobium sp.* e da linhagem Δ mesoamp numa D.O._{600nm} de 1, foi inoculada em 150 μ L de meio TY, PSY, PGY (K₂HPO₄ 1,4 g⁻¹; KH₂PO₄ 1,0 g⁻¹; MgSO₄ 0,2 g⁻¹; glicerol 10 g⁻¹; extrato de levedura 1,0 g⁻¹) e PGE (K₂HPO₄ 0,5 g⁻¹; MgSO₄ 0,2 g⁻¹; NaCl 0,1 g⁻¹; extrato de levedura 3,0 g⁻¹ e glicose 10,0 g⁻¹), em placas de poliestireno de 96 poços, e incubadas durante 144 h, a 30°C. Após a incubação, o meio remanescente na placa foi descartado e as células não aderidas foram removidas com cinco lavagens com água destilada estéril. As placas foram secas ao ar durante 45 min e cada poço foi corado com 200 μ L de solução cristal violeta 1 % (p/v) durante 45 min. Após a coloração, as placas foram lavadas (cinco vezes) com água destilada estéril.

A análise quantitativa e indireta da produção de biofilme foi realizada pela adição de 200 µL de uma solução de etanol-acetona (4:1). Uma solução etanol-acetona-cristal violeta foi medida a D_{O570nm} e usada para calcular a produção de biofilme (SAYEM et al., 2011). A porcentagem de produção de biofilme foi normalizada usando a Equação 3, e este valor foi usado para calcular a “% de formação de biofilme”.

Equação 3

$$\% \text{ biofilme} = \frac{D_{O570nm}(\text{biofilme})}{D_{O600nm}(\text{celulas em suspensão})}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Predição de peptidase em *Mesorhizobium sp. J5*

A ferramenta de anotação automática identificou 101 ORFs candidatas que codificam enzimas proteolíticas, e que tem semelhança com peptidases presentes no genoma do gênero *Mesorhizobium sp.* Nas análises comparativas individuais foi detectado um total de 68 peptidases pertencentes a 26 famílias de enzimas proteolíticas. Estas enzimas foram distribuídas em diferentes grupos, baseando-se no mecanismo catalítico: 6,8% aspartato peptidase, 3% glutâmico peptidase, 2,7% de cisteína-peptidase, 41,1% Metalo-peptidase, 35,6% de serina-peptidase, 4,1% treonina-peptidase, 4,1% mecanismo misto e 5,5% inibidores de peptidase (Anexo 2). Esta descoberta corrobora a hipótese de que um grande número de peptidases com potencial biotecnológico permanecem inexploradas no genoma de *Mesorhizobium sp.*

No sistema proteolítico do *Mesorhizobium sp. J5* foi encontrado três componentes principais: (a) peptidases secretadas e/ou ligadas na parede celular que iniciam a degradação das proteínas extracelulares em polipeptídios, (b) os transportadores de peptídeos, que levam os hidrolisados proteicos para dentro da célula, e (c) várias peptidases intracelulares que degradam as proteínas e peptídeos em peptídeos mais curtos e aminoácidos (Figura 8).

5.1.1 Degradação inicial de proteínas extracelulares

Nesta primeira etapa, três peptidases foram descritas por serem encarregadas pela degradação “indiscriminada” de proteínas extracelulares (TIAN; FINLEY, 2012) e disponibilizar oligopeptídeos no interior da célula, que serão usados para a biossíntese de moléculas (outras proteínas) e energia. A *Oma1* peptidase e a *Leo* peptidases, são proteínas multiméricas de membrana, em forma de barril beta com o domínio catalítico no interior da estrutura. A Glutamato endopeptidase é sintetizada em forma de pro-peptídeo (inativa) e por uma autocatálise muda sua forma ativa (ROUF et al., 2012), hidrolisando preferencialmente resíduos de Glu- e Asp- no substrato.

5.1.2 Maquinaria de degradação de proteínas intracelulares

As principais peptidases responsáveis pela degradação da maior parte das proteínas intracelulares foram encontradas no genoma de *Mesorhizobium sp.*, e são elas: CLp, HtpX, Lon e HslUV. Estas proteínas encontram-se em complexos multiméricos localizados no citoplasma, membrana celular e no periplasma, apresentando três componentes principais: um domínio de reconhecimento, responsável pela ligação da enzima com o substrato; um domínio proteolítico, que realiza a hidrólise da ligação peptídica; e um domínio ATPase, que fornece a energia para a hidrólise do substrato. Por estas características estas enzimas são conhecidas como proteases AAA+ (ATPases associadas com diversas atividades celulares) (RAJU; GOLDBERG; RUBIN, 2012). Estes complexos de ATPase, podem atuar como chaperonas independentes, auxiliando na remodelação de proteínas, podendo estas serem proteínas monoméricas ou diméricas.

5.1.3 Manutenção do pool de aminoácidos

As bactérias mantêm internamente aminoácidos em concentrações elevadas, com a finalidade de manter a taxa de sínteses de proteínas energéticas e compensar parcialmente as alterações na osmolaridade do líquido extracelular (MCNAMARA et al., 2004). No entanto, o estado de organização e o destino final dos compostos químicos exógenos podem ser diferentes daqueles compostos idênticos sintetizados pela célula (BRITTEN; MCCLURE, 1962). Tem-se demonstrado que o fornecimento e a concentração de aminoácidos correlacionam-se positivamente com a eficiência da tradução e a densidade dos ribossomos, beneficiando assim, a manutenção de um ambiente de tradução relativamente estável (HU; YANG; MA, 2015), entre outras funções.

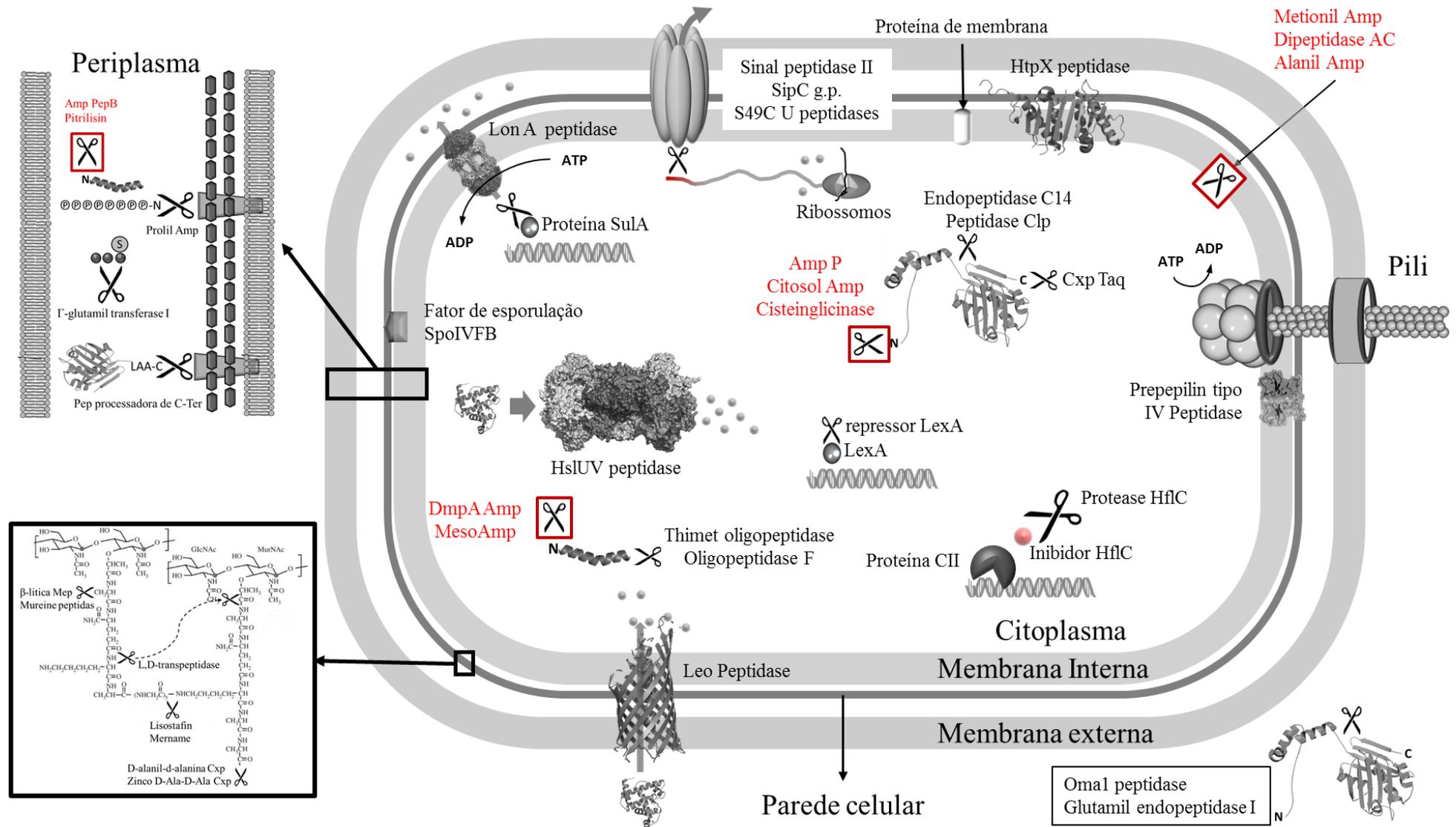


Figura 8. Modelo do sistema proteolítico de *Mesorhizobium* sp J5, baseada na mineração dos dados genômicos. As peptidasas descritas em vermelho apresentam atividade de amino-peptidase.

Para manter o pool de aminoácidos, o *Mesorhizobium sp J5*, precisa de uma maquinaria metabólica redundante, e neste estudo foram encontradas oito amino-peptidases (Amino-peptidase P, Citosol amino-peptidase, Cisteinglicinase, Metionil Amino-peptidase, Dipeptidase AC, Alanil amino-peptidase, DmpA Amino-peptidase e MesoAmp) que possivelmente são as peptidases que fornecem e mantem o pool de aminoácidos intracelular em altas concentrações.

5.2 Peptidases com potencial biotecnológico no genoma do *Mesorhizobium sp. J5*

Após um detalhado estudo das características físico-químicas das peptidases com sequências semelhantes e caracterizadas bioquimicamente através do pH, temperatura e termoestabilidade foram identificadas quatro ORFs codificadoras de enzimas proteolíticas com potenciais aplicações biotecnológicas (Tabela 4).

5.3 Clonagem das sequências e expressão das enzimas proteolíticas

5.3.1 Amplificação e clonagem dos genes no vetor pET28a

As sequências codificadoras de peptidases com potencial biotecnológico identificadas nas etapas anteriores serviram como molde para a construção de oligonucleotídeos visando à amplificação dos genes para clonagem e expressão das proteínas correspondentes. Mesmo após diversos testes de amplificação por PCR, diferentes concentrações magnésio, concentrações de DNA genômico e titulação dos oligonucleotídeos, não foi possível obter o fragmento gênico amplificado da *mesoPP* (ORF3), possivelmente por problemas relacionados ao desenho dos oligonucleotídeos. Já a amplificação dos genes codificados pelas ORFs *mesoleu*, *mesocarx* e *mesoamp* a partir do DNA genômico de *Mesorhizobium sp. J5* resultou em fragmentos do tamanho esperado, conforme evidenciado na Figura 9.

Uma vez obtidos os fragmentos de interesse dos clones de MesoAmp, estes foram submetidos a clivagem com as enzimas de restrição correspondente

para clonagem no vetor de expressão pET28a. Os produtos digeridos foram utilizados nas reações de ligação com o vetor para posterior transformação das células de *E. coli* BL21(DE3). As colônias foram analisadas por meio de PCR com oligonucleotídeos específicos para cada ORF. O perfil eletroforético em gel de agarose possibilitou verificar que os 10 clones coletados da construção pET28-*mesoamp* tiveram amplificação da região de interesse (Figura 10). Um clone foi selecionado para dar continuidade aos ensaios de expressão e a identidade do gene clonado foi confirmada por sequenciamento.

Tabela 4. Peptidases com potencial biotecnológico no genoma de *Mesorhizobium* sp. J5

ORF	Nome	Similaridade (%)	E-value	Família de peptidase	Caraterísticas físico-químicas	Aplicação biotecnológica
3 <i>mesopp</i>	VanY D-Ala-D-Ala carboxipeptidase de <i>Enterococcus faecium</i> (EC:3.4.16.4)	30%	$3,20^{-02}$	M15		Síntese de vancomicina (EVERS; COURVALIN, 1996)
6 <i>mesoleu</i>	Leucina amino-peptidases de <i>Burkholderia pseudomallei</i> (EC3.4.11.1)	41%	3^{-92}	M17	pH 7.0 até 10.5, e temperatura ótima de 70°C (RAWLINGS; SALVESEN, 2013)	Preparação de hidrolisados proteicos sem amargor e conversão de l-homofenilalanil amida em l-homofenilalanina (SHEN et al., 2011)
8 <i>mesocarx</i>	Carboxipeptidase Taq de <i>Thermus aquaticus</i> (EC3.4.17.19)	39%	1^{-104}	M32	pH 6.0 até 7.0 e temperatura ótima de 80 até 100°C (RAWLINGS; SALVESEN, 2013)	Análises de sequência de proteínas a altas temperaturas (ISHIKAWA et al., 2001)
9 <i>mesoamp</i>	Amino-peptidase T (EC3.4.11.10) de <i>Thermus thermophilus</i> .	54%	1^{-107}	M29	pH 7.5 até 8.5 e temperatura ótima 70 até 80°C (RAWLINGS; SALVESEN, 2013)	Análise de sequência de proteínas e hidrólises de peptídeos que conferem amargor nos alimentos (RAWLINGS; SALVESEN, 2013)

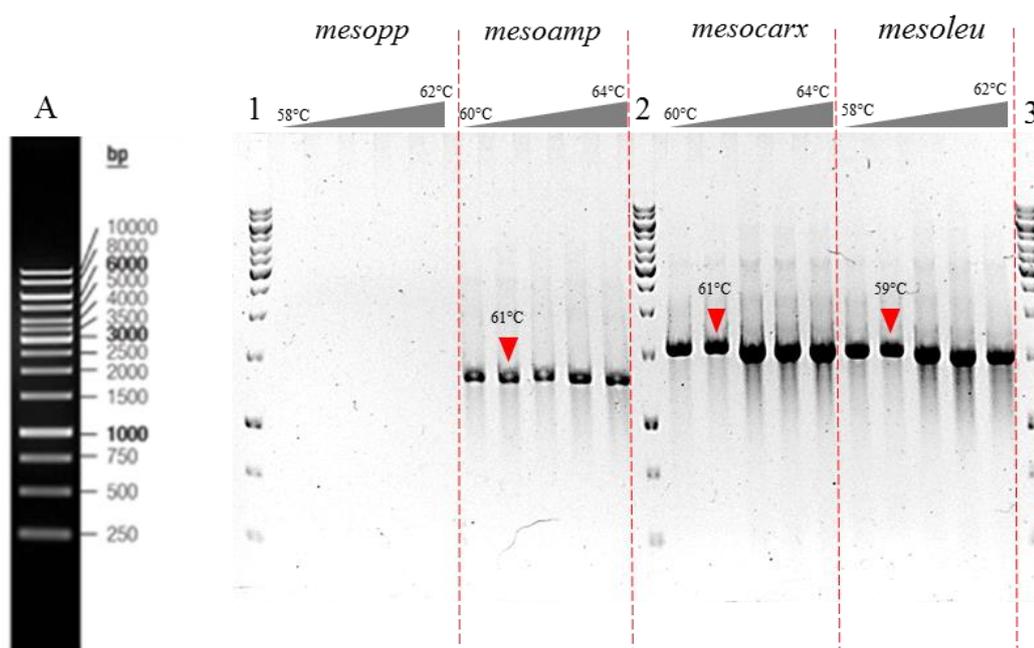


Figura 9. Eletroforograma dos fragmentos gênicos de interesse, em gel de agarose 1% e corado com brometo de etideo. **A.** Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas). Canaletas (1,2,3) Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas); Eletroforograma das ORFs 3, 6, 8 e 9 – A seta vermelha sinaliza a temperatura escolhida para as futuras ampliações. Triângulos cinzas na parte superior sinalizam o gradiente de temperatura usada na PCR.

Para este trabalho escolhemos a ORF *mesoamp* codificadora da proteína Amino-peptidase da família M29 de *Mesorhizobium sp. J5* (MesoAmp), porém, as outras duas ORF (*mesoleu* e *mesocarx*), foram clonadas e expressas em *E. coli* BL21(DE3).

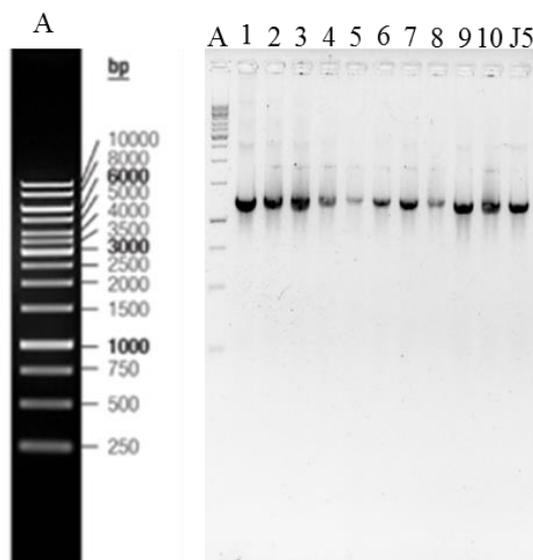


Figura 10. Eletroforograma do DNA plasmidial extraído de alguns clones para confirmar a clonagem da construção pET28-*mesoamp*. **A.** Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (fermentas). Canaletas: 1-10 Amplificação por PCR dos clones com a construção pET28-*mesoamp*; canaleta J5: Amplificação por PCR do DNA genômico de *Mesorhizobium sp. J5*.

5.3.2 Ensaio de expressão e extração das proteínas recombinantes

As análises iniciais das propriedades de cada proteína, tais como massa molecular e ponto isoelétrico (pI) teóricos, foram feitas por meio da ferramenta ProtParam (Tabela 5). Os dados obtidos com estas análises foram utilizados em ensaios futuros, como a identificação das proteínas de interesse no gel de poli-acrilamida.

Tabela 5. Características das proteínas selecionadas obtidas a partir de ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

	<i>MesoPP</i>	<i>MesoLeu</i>	<i>MesoCarx</i>	<i>MesoAmp</i>
Aminoácidos	346	504	495	418
Massa molecular (kDa)	38,44	52,92	55,26	45,05
Ponto Isoelétrico (pI)	9,39	6,64	5,76	5,73
Número de cisteínas	5	1	3	4

Após a identificação dos parâmetros teóricos foram realizados testes de expressão e posterior extração das proteínas. Para os testes, alíquotas de 1 mL de extrato celular sem indução (T0) e induzido (T1) com IPTG foram centrifugados a 15.000g e o precipitado celular foi desnaturado e aplicado no gel de poliacrilamida 12%. Na Figura 11 é possível observar e comparar as proteínas do extrato celular antes da indução e após a indução.

Após definir as condições ideais de expressão (500 ml de meio LB com canamicina 50 mg/ml, 1 mM de IPTG, 30 °C, 200 rpm, e 12 h de incubação após indução) foi possível obter maior quantidade de proteína solúvel, visto que a proteína contida no precipitado (fração insolúvel) foi significativamente baixa. Volumes maiores de cultivo foram utilizados para a indução, visando extrair grandes quantidades de proteína para prosseguir com a purificação.

As informações seguintes tratarão da ORF *mesoamp*, discutindo os resultados obtidos de experimentos realizados desde sua expressão e purificação até a caracterização de suas propriedades bioquímicas e estruturais. A proteína codificada por este gene passou a ser então denominada MesoAmp. Nos selecionamos esta enzima por apresentar além de atividade peptidase envolvida na degradação de peptídeos intracelulares, outras funções indiretas envolvidas na fisiologia do micro-organismo.

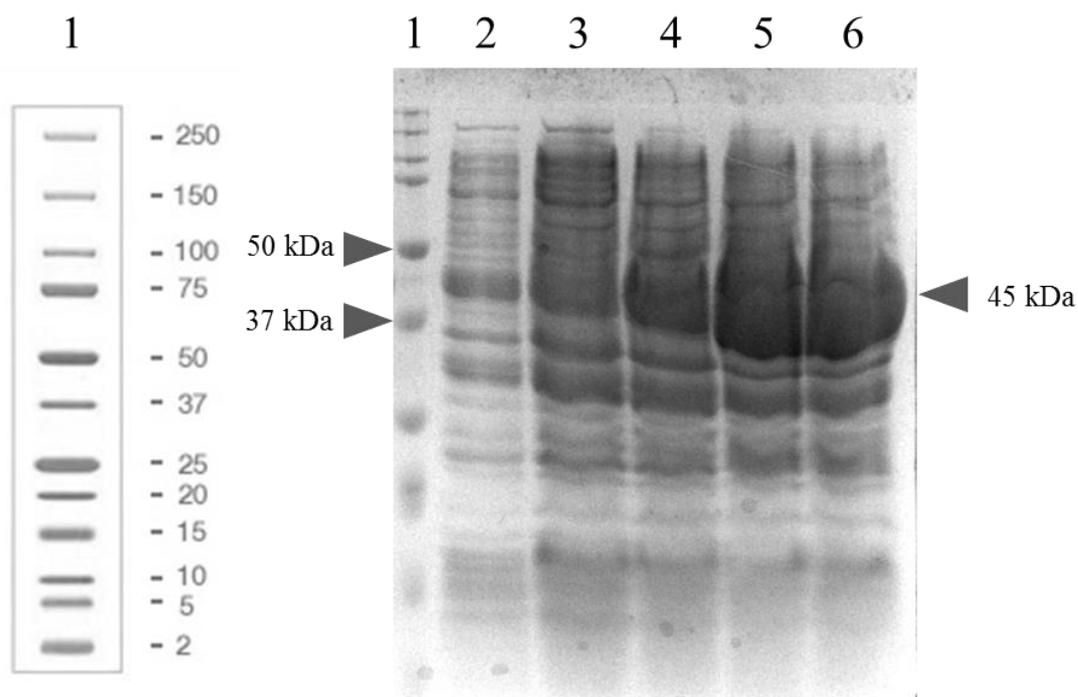


Figura 11. Eletroforograma em gel de poliacrilamida 12% com SDS (SDS-Page) do extrato celular total da bactérias *E. coli* BL21 transformada como pET28-*mesoamp*. Canaletas: (1) Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad), (2) extrato celular (EC) sem indução, (3) EC após 4 h de indução com 0,1 mM de IPTG, (4) EC após 6 h de indução, (5) EC após 12 h de indução, (6) EC após 24 h de indução. A seta da direita (◄) sinaliza a banda de proteína sobre-expressa (MesoAmp) com um tamanho molecular compatível com MesoAmp.

5.4 Análise da sequência da MesoAmp

As relações filogenéticas da MesoAmp foram feitas com o intuito de se identificar as sequências de motivos conservados característicos de cada família e relacioná-los a elementos estruturais envolvidos na catálise e natureza do íon metálico, auxiliando na compreensão da função das enzimas. Sendo assim, foram feitos alinhamentos e inferências filogenéticas. Por meio destas análises foi possível observar que a proteína estudada foi agrupada no grupo da subfamília M29.001, junto com Amino-peptidase T de *Thermus aquaticus* e *Thermus thermophilus*, enzimas que precisam de Zn^{+2} como cofator (Figura 12).

A primeira estrutura tridimensional de uma peptidase da família M29 foi resolvida em 2005, especificamente a Amino-peptidase T de *Thermus Thermophilus*

(ODINTSOV et al., 2005a) e a Amino-peptidase S de *Staphylococcus aureus* (ODINTSOV et al., 2005b), desde então só uma estrutura dessa família foi resolvida (TA et al., 2013) e mostraram uma característica estrutural em particular: um domínio de dimerização relacionado com a formação de estruturas quaternárias dimericas ou em alguns casos a estruturas multiméricas (BERTIN et al., 2005).

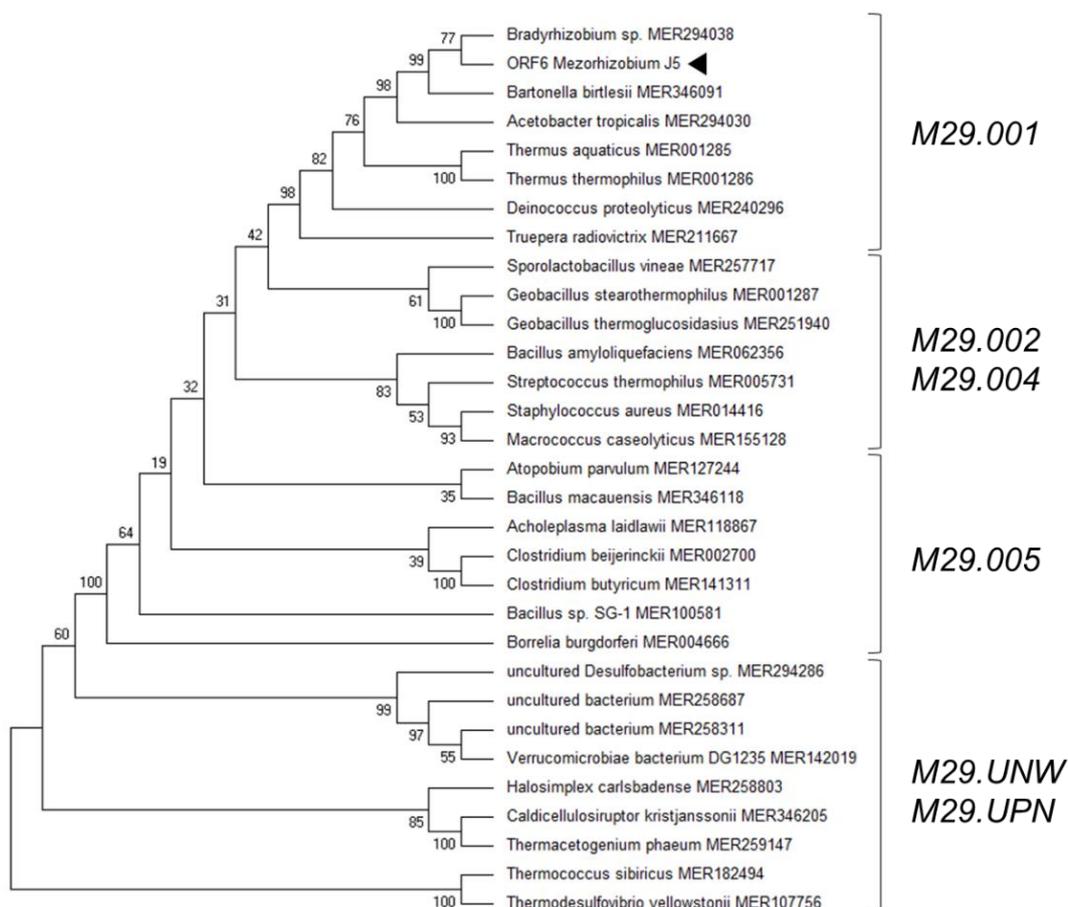


Figura 12. Dendrograma das relações filogenéticas entre as peptidases da família M29 e MesoAmp (seta preta). Construído com o algoritmo de máxima verossimilhança, com bootstrap de 1000 e usado a matriz de substituição de aminoácidos LG (LE; GASCUEL, 2008)

A sequência de *mesoamp* consiste de 1257 pb (conteúdo G+C = 64%) codificando uma proteína com 418 aminoácidos. Nenhuma sequência de peptídeo sinal foi identificada. A sequência de aminoácidos da MesoAmp foi submetida no Blastp no banco de dados do Banco de dados de proteínas (PDB) e exibiu 54% de

identidade com a sequência de aminoácidos da amino-peptidase T (AmpT) de *Thermus thermophilus* (MER001285), 40% de identidade com a amino-peptidases S (PepS) (MER005731) e a amino-peptidase S (AmpS) (MER014416) de *Streptococcus thermophilus* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Figura 13).

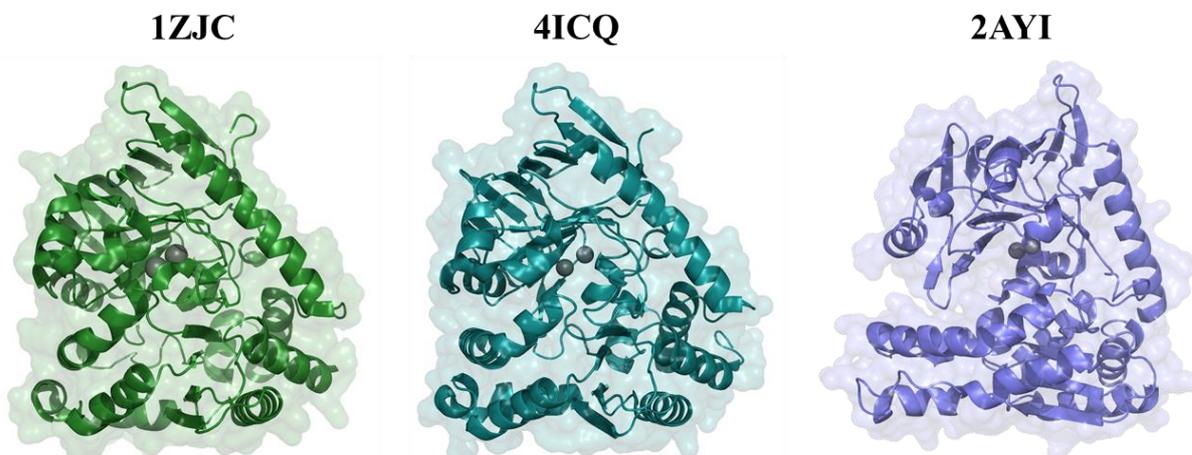


Figura 13. Estrutura cristalográfica resolvidas experimentalmente usadas para a construção do modelo tridimensional de MesoAmp. Os códigos acima de modelo indicam o código PDB. PDB1ZJC: modelo de *Staphylococcus aureus*, PDB4ICQ: *Streptococcus thermophilus* e PDB2AYI: *Thermus thermophilus*.

O alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos de MesoAmp com os membros representativos das peptidases da família M29 mostrou oito motivos conservados (Figura 14), assinatura característica de metalo-proteases termofílicas (*Termofase*) que abrangem praticamente todo o comprimento da proteína (MITCHELL et al., 2015). Foram identificados os aminoácidos de ligação a metal (Glu259, Glu325, His354, His387) responsáveis por estabilizar os íons metálicos, sendo que estes, por sua vez, posicionam a molécula de água (necessária para a ruptura da ligação peptídica), e o resíduo de Trp361, que reconhece, estabiliza e posiciona ao substrato e de Asp348, encarregado da hidrólise da ligação peptídica (Figura 15).

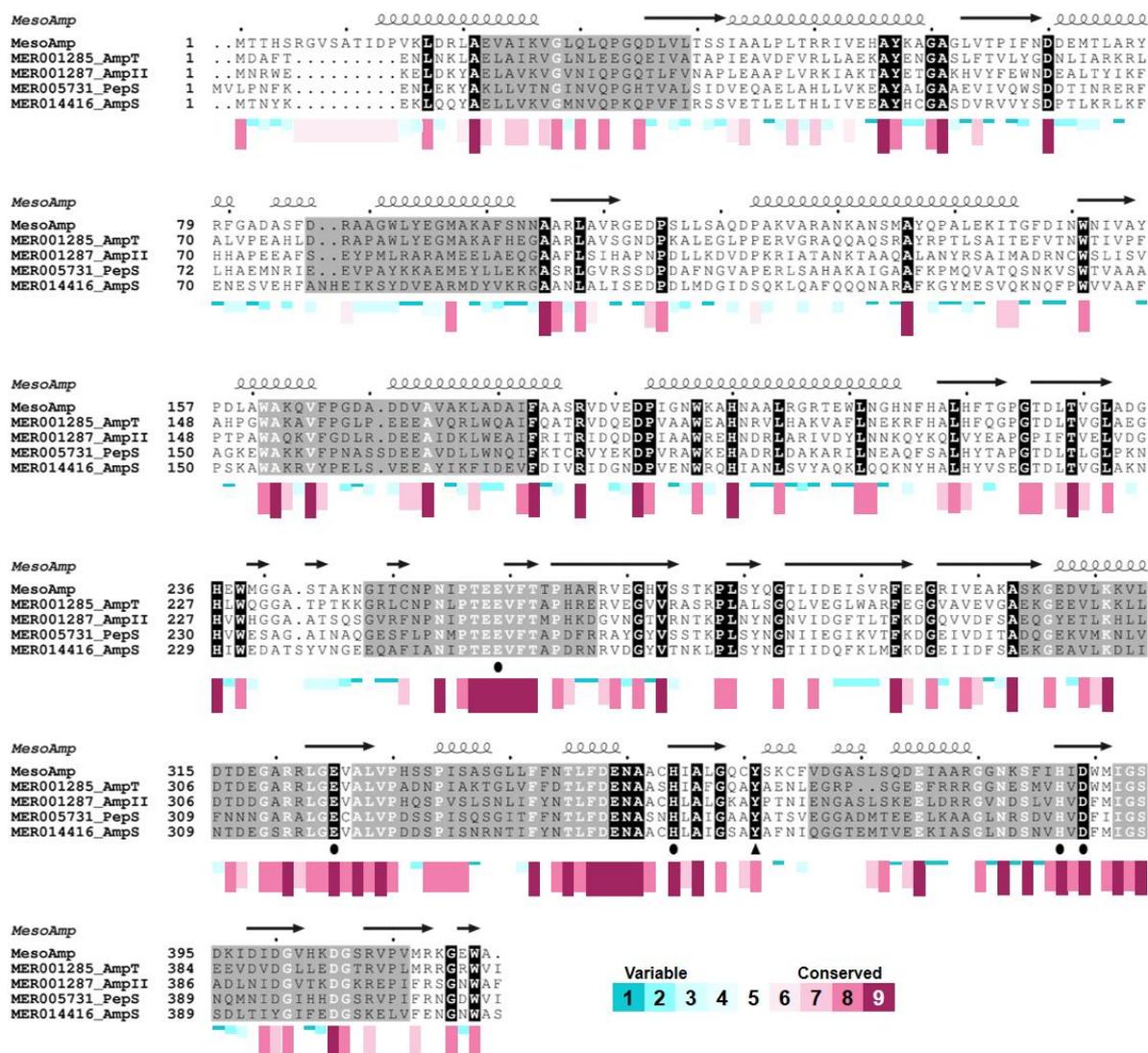


Figura 14. Alinhamento multiplex de sequências sinalizando as regiões conservadas de MesoAmp presentes também nos membros mais representativos da família de amino-peptidase M29. O alinhamento de sequências de aminoácidos de MesoAmp e amino-peptidase T de *Thermus thermophilus* (MER001285), amino-peptidase II de *Geobacillus stearothermophilus* (MER001287), amino-peptidase S de *Streptococcus thermophilus* (MER005731), e amino-peptidase S de *Staphylococcus aureus* (MER014416), usando ClustalX e exibidos com Esript 3 (<http://esript.ibcp.fr/ESPrift/ESPrift/>). A estrutura secundária prevista de MesoAmp é mostrada na parte superior, com as espirais indicando a hélice α , e as setas indicando folha β . A barra colorida na parte inferior do alinhamento representa a escala de conservação [não-conservados (azul), para estados altamente conservados (roxo)] para cada um dos aminoácidos de MesoAmp, de acordo com a análise do servidor ConSurf. Os motivos conservados que fornecem uma assinatura para metaloproteases termofílicas se apresentam em caixas cinzas. Os

resíduos de ligação a metais estão indicados por um círculo (●), e os resíduos catalíticos são indicados por um triângulo (▲).

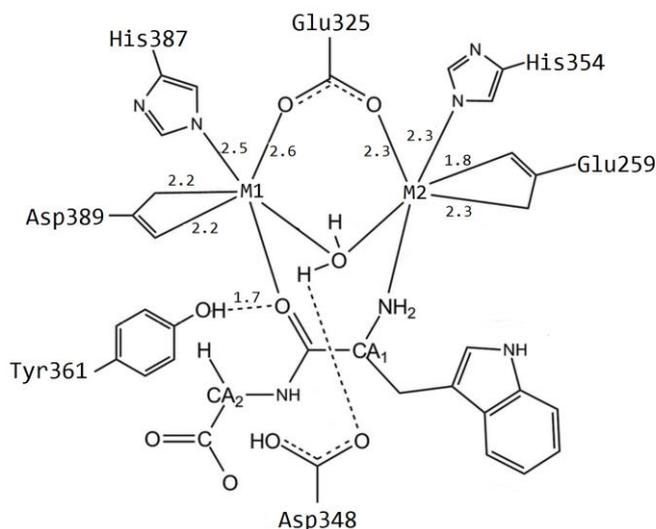


Figura 15. Configuração do sítio ativo de MesoAmp. Resíduos catalíticos (Tyr361), de ligação a metais (Glu259, Glu325, His354, His387), interagindo com o substrato. Os números pequenos indicam a distância em Å das pontes de hidrogênio.

5.5A estrutura dimérica da MesoAmp possui elevado grau de conservação

O modelo estrutural de MesoAmp foi criado usando o programa Modeller e validado com ModFold, e como resultado o software demonstrou que havia menos que 1:1.000 de possibilidade de que os modelos estavam incorretos. As análises utilizando Ramachandran para o modelo selecionado mostrou um número relativamente elevado de aminoácidos em regiões permitidas (99,3%), o que indica que o modelo está otimizado (Figura 16). Como esperado, o modelo estrutural de MesoAmp foi sobreposto satisfatoriamente com as estruturas das outras aminopeptidases cristalizadas exibindo uma r.m.s.d de 0,508 Å para AmpS (Figura 17A) e 0,560 Å para PepS. Os resíduos de MesoAmp que formam o sítio catalítico foram bem sobrepostos com a estrutura de AmpS (Figura 17B).

O modelo tridimensional de MesoAmp apresentou um domínio de dimerização no extremo terminal-N, um *Hinge* (tradução literal “dobradiça”) que é necessária para adotar as conformações aberta ou fechada, e um domínio catalítico no extremo C-

terminal (Figura 17D). Ainda, a análise da conservação de aminoácidos revelou que na superfície da proteína estão presentes alguns resíduos conservados que servem como âncora para as regiões pouco conservadas (Figura 17F) mantendo assim a integridade estrutural da proteína (BAILEY et al., 2006). No interior das proteínas pode ser observada uma cavidade de volume variado, o que conseqüentemente reflete no comprimento do substrato a ser clivado na região C-terminal (Figura 17G).

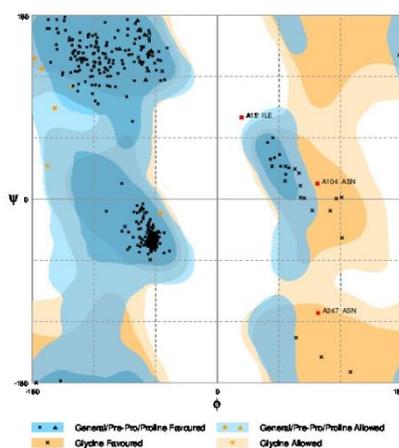


Figura 16. Análise do gráfico Ramachandran de MesoAmp. Os resíduos de Isoleucina 12 e Asparagina 104 e 127 estão em regiões não permitidas.

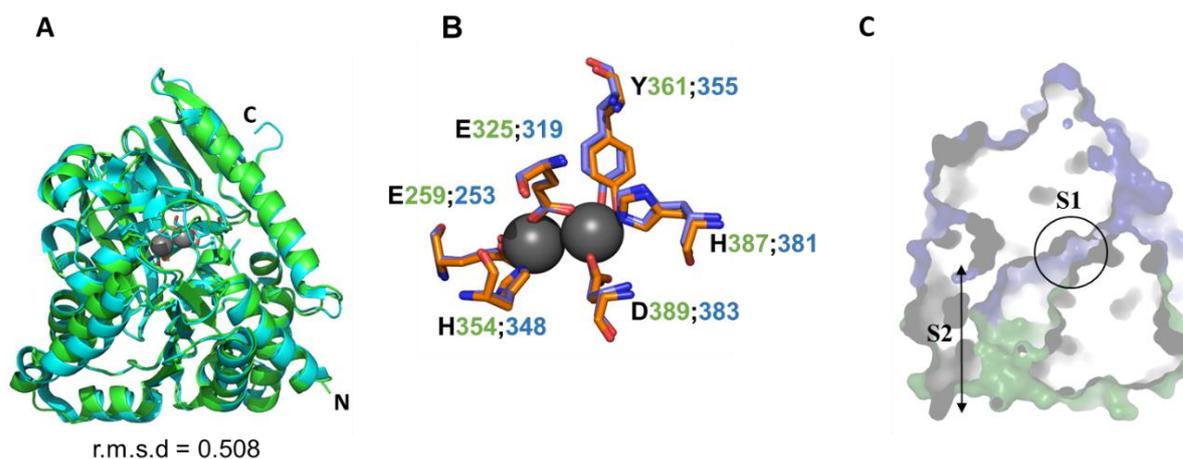


Figura 17. Características estruturais do modelo MesoAmp. **A.** Sobreposição das estruturas tridimensionais de MesoAmp (azul) e AmpS de *Staphylococcus aureus* desvio quadrático médio (RMSD), **B.** Sobreposição do resíduo catalítico (Tyr 361) e os resíduos de ligação a metais Glu259, Glu325, His354, His387 e Asp389, com os resíduos na estrutura de contrapartida AmpS, as esferas pretas representam os íons de cobalto, **C.** Representação do sítio catalítico do MesoAmp (S1) e da cavidade de ligação ao substrato (S2).

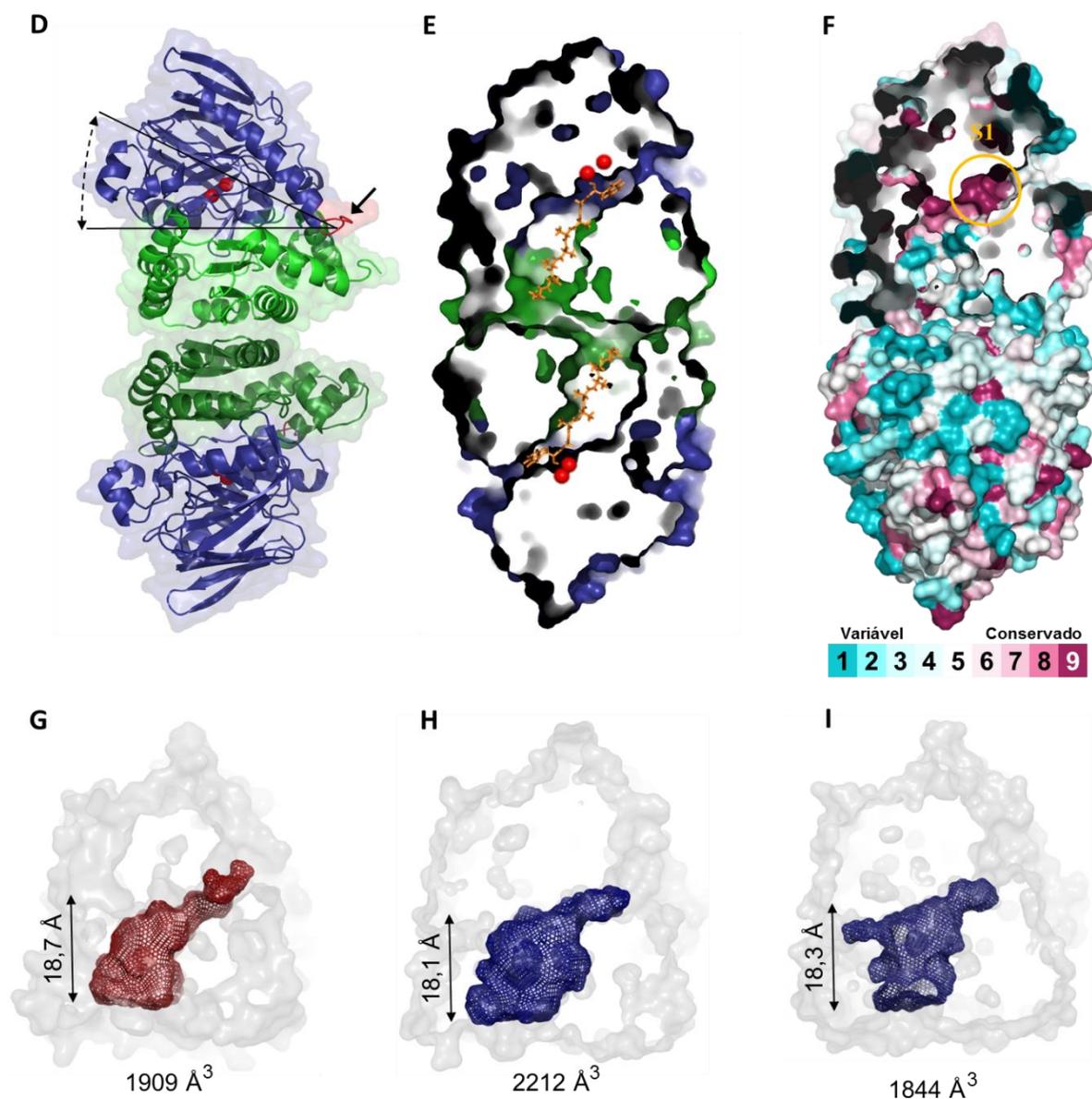


Figura 17 (continuação). **D.** Modelo do arranjo dimérico de MesoAmp com os seu domínio N-terminal (resíduos 1 a 187 envolvidos na dimerização) mostrado em verde e seu domínio do C-terminal (resíduos 188-418 região catalítica) mostrado em azul. Os resíduos do *hinge* (187 a 192) são indicadas seta, **E.** Modelagem de um octapeptídeo na cavidade de ligação ao substrato da MesoAmp em forma dimerica, **F.** Análises de conservação dos aminoácidos internos e externos da estrutura representado com o código de cores do servidor Consurf, sítio catalítico (S1) altamente conservado indicado no círculo laranja, **G.** Cavidade interna da MesoAmp representada em mesh vermelho, **H.** Cavidade interna da PepS representada em mesh azul, **I.** Cavidade interna da AmpS representada em mesh azul número embaixo da figura é o volume (em \AA^3) da cavidade, calculado com o software KVfinder, número ao lado da seta é a longitude (em \AA) da cavidade de ligação ao substrato.

5.6 Expressão e avaliação da estrutura quaternária da MesoAmp

Para seguir com a caracterização bioquímica da MesoAmp, a proteína foi expressa em células de *E. coli* BL21(DE3) na fração solúvel após testes de otimização em diferentes temperaturas (dados não mostrados). A melhor condição para a obtenção da proteína solúvel e ativa se deu ao induzir as células com IPTG a uma concentração final de 0,1 mM, a 30°C, por 12h, a 200 r.p.m. de agitação orbital. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade e eluída num gradiente de imidazol (de 100 até 500 mM). A análise de SDS-Page da proteína purificada revelou que sob condições de desnaturação, sua massa molecular correspondia ao tamanho de 45,5 kDa (Figura 18A) (tamanho previsto com a ferramenta ProtParam). Porém, a proteína purificada foi submetida a um passo de purificação por cromatografia de exclusão molecular, cujo perfil cromatográfico apresentou dois picos estimados como correspondentes em diferentes estados oligoméricos da enzima. O primeiro pico com um tamanho superior a 600 kDa e um segundo pico com um tamanho estimado de 88,05 kDa.

Para se determinar qual estado oligomérico da proteína corresponde a sua forma ativa, padronizou-se a concentração de enzima a 100 µg/ml e determinou-se a atividade enzimática (Figura 18B). Os resultados indicam que a enzima é um homodímero, estrutura quaternária comum para a família M29 de amino-peptidases (WANG et al., 2014b).

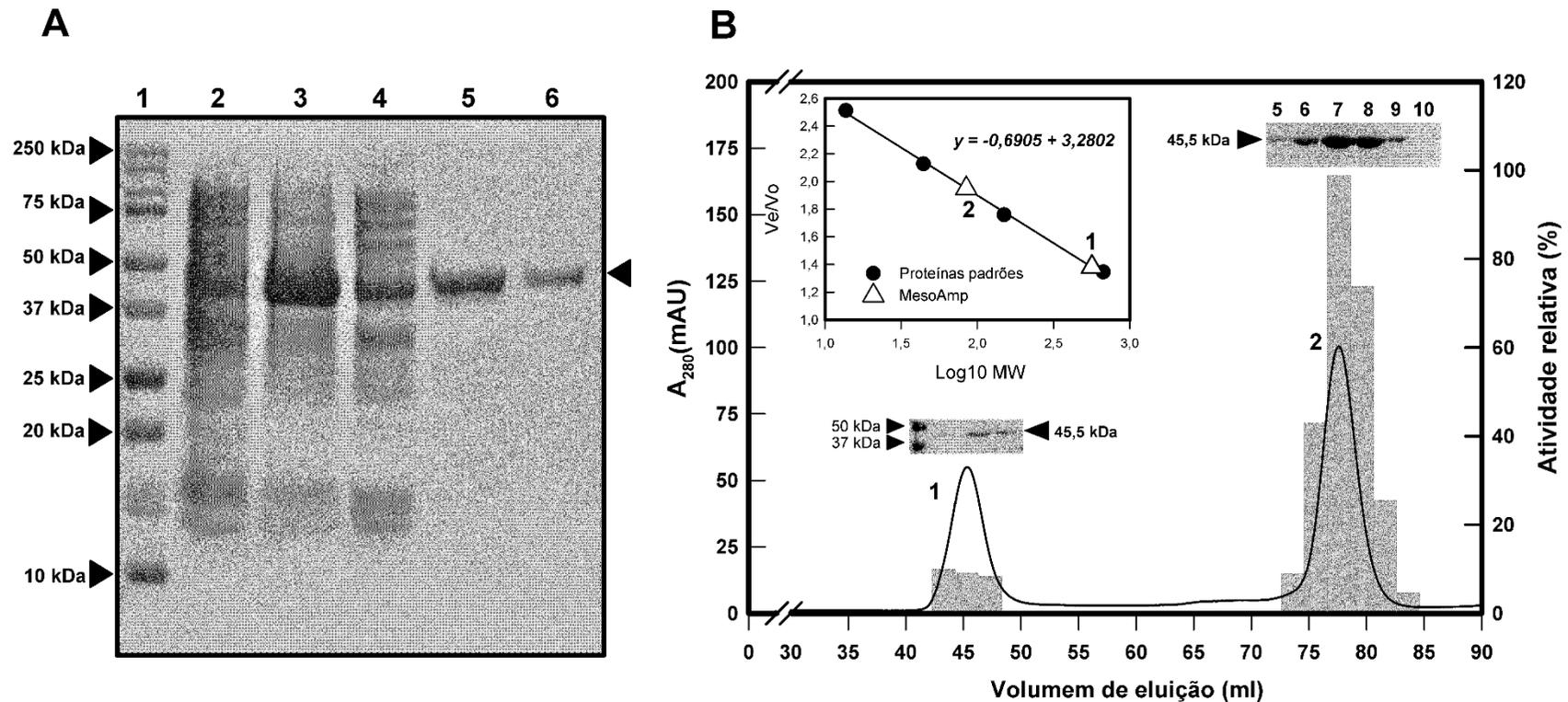


Figura 18. Super expressão e purificação de MesoAmp em sua forma ativa. **A.** Eletroforograma SDS-PAGE para cada etapa de purificação de MesoAmp. Canaletas: (1) Marcador de peso molecular, (2) Fração solúvel antes da indução, (3) Fração solúvel após indução com IPTG, (4) Proteínas não ligadas na resina de Ni-NTA, (5) MesoAmp eluída com 500 mM de imidazol, (6) MesoAmp purificada após cromatografia de filtração em gel. A seta na direita indicam o peso molecular da MesoAmp. **B.** Perfil de eluição de MesoAmp por filtração em gel utilizando Superdex-200. Linha preta (—) corresponde ao mAu medida a 280 nm; Barra cinza: atividade relativa em porcentagem de MesoAmp. Pico 1 corresponde à agregação de oligômeros de MesoAmp com baixa atividade. Pico 2: frações com alta atividade enzimática. Caixa superior esquerda: análise do peso molecular da MesoAmp nativa com proteínas padrões [Tiroglobulina bovina (670 kDa), γ -globulina (150 kDa), albumina (43 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) e Ácido p -amino benzoico (pABA) (0,13 kDa)] usando a análises de regressão lineal para a determinação do tamanho molecular dos oligômeros (1) e dos homodímeros (2). Caixa superior direita: análise de SDS-PAGE das frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel. Canaletas: (1) Marcador de peso molecular, (2-4) Pico 1, (5-10) Pico 2.

5.7 MesoAmp apresenta atividade numa extensa faixa de pH e temperatura

Os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade MesoAmp recombinante foram examinados espectrofotometricamente utilizando Leu-p-NA como substrato. A curva de pH apresentou atividade máxima numa faixa de pH 7,5 até 9,0, sem diferença significativa entre estes valores (Figura 19A). A atividade enzimática caiu consideravelmente quando o pH era inferior a 6,5 ou superior a 10,0, tal fato corrobora com os dados de AmpT (pH ótimo entre 7,0 e 8,0) e PepS amino-peptidase (pH ótimo entre 7,5 e 8,5) (RUL, 2013). De acordo com WANG (2014) a diminuição substancial na atividade fora do intervalo de pH de 7,0 a 9,0 é principalmente devido à alterações irreversíveis na estrutura da proteína pelo pH ou pela desestabilização do tipo de tampão utilizado. Os testes descritos foram realizados em tampão de bicarbonato de sódio-hidróxido 100 mM a pH 8,5.

A família M29 é caracterizada por uma temperatura ótima entre 60 a 70°C (RAWLINGS et al., 2014). Em contraste, MesoAmp teve sua atividade ótima a 40°C (Figura 19B), com uma diminuição de 50% da sua atividade a 60°C, apesar de ter similaridade na sequência, na estrutura tridimensional e no mecanismo catalítico com outras amino-peptidases termofílicas.

A estabilidade térmica desta proteína também se mostrou diferente. A estabilidade térmica parece ser um fenômeno complexo que pode ser afetado por diversos fatores, como exemplo: (1) Os resíduos de prolina apresentam uma menor entropia conformacional num estado desdobrado que conseqüentemente conduz à estabilização de proteínas (PLOTKA et al., 2014). Na estrutura primária de MesoAmp, o resíduo de prolina representa 4,3% da sequência, enquanto estes resíduos representam 5,4% em Amp T (temperatura ótima 70 °C) e 4,1% em PepS (temperatura ótima 55°C); (2) formação de pontes de hidrogênio, o que aumenta a rigidez da enzima, melhorando a estabilidade em altas temperaturas, no entanto, esta rigidez excessiva poderia explicar porque as enzimas termofílicas tornam-se inativas a temperaturas inferiores a 20°C (VIEILLE; ZEIKUS, 2001); (3) Ligação bissulfeto formada por resíduos de cisteína (VIEILLE; ZEIKUS; VIEILLE, 2001) poderia ajudar a estabilizar as enzimas, no entanto, em condições alcalinas acontece a reação de β -eliminação que gera tióis livres que podem desestabilizar a ligação bissulfeto,

decrecendo a estabilidade térmica (VIEILLE; ZEIKUS, 2001). MesoAmp em seu estado monomérico apresenta quatro resíduos de cisteína, no entanto, análises *in silico* não revelaram nenhuma ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína da mesma cadeia ou na estrutura quaternária ; (4) A formação de estados oligoméricos, que pode representar uma vantagem adaptativa em relação aos homólogos monoméricos (BERTIN et al., 2005).

A capacidade de agir a temperaturas acima de 40°C é de grande importância biotecnológica, porque, reduz o risco de contaminação por micro-organismos mesófilos, favorece a difusão dos substratos, a solubilidade do produto, aumentando consequentemente, as taxas de reação (MERHEB-DINI et al., 2009).

5.8 MesoAmp é uma enzima altamente dependente de íons metálicos

Metalo-amino-peptidases exibem uma ampla gama de dependência de íons metálicos, especialmente o Zn^{2+} . A MesoAmp apresentou uma diminuição de sua atividade de aproximadamente 90% na presença de Zn^{2+} e outros cátions como Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{2+} , porém, mostrou elevada dependência a íons de Mn^{2+} e Co^{2+} , aumentando a atividade catalítica em 8 e 17 vezes respectivamente (Tabela 6). Todos os outros íons metálicos testados (em ordem de classificação $Mg^{2+} > Ni^{2+} > Mg^{2+} > I^{2+}$) apresentaram efeitos estimuladores sobre a atividade enzimática. Membros da família M29 como AmpS de *Staphylococcus aureus*, BsAmp II de *B. stearothermophilus* e Lmo1603 de *L. monosytogenes* têm Co^{2+} e Mg^{2+} como cofatores. O efeito de Co^{2+} na atividade das amino-peptidases foi descrito na literatura muitas vezes, incrementando a atividade relativa em 3 (KUO et al., 2003), 5 (DONG et al., 2005) e até em 26 vezes (WANG et al., 2012) maior do que a atividade normal. Estudos em teorias de densidade funcional (ZHU et al., 2012) determinaram que a natureza eletrônica de cobalto e manganês ativa as moléculas de água, influenciando a geração do estado intermediário (enzima-substrato), o que consequentemente aumenta a taxa de reação.

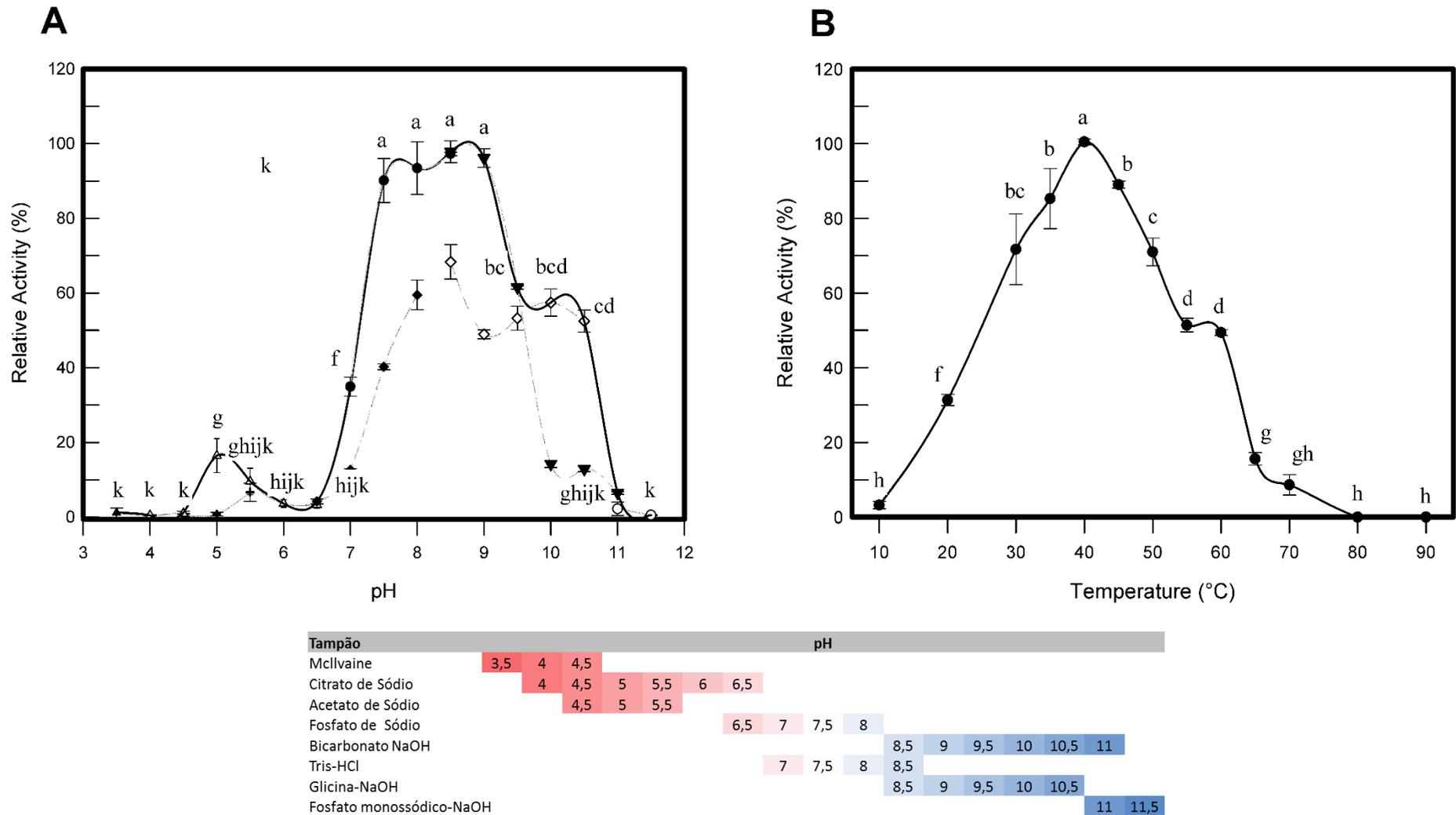


Figura 19. Análise físico-química da MesoAmp. **A.** O efeito do pH sobre a atividade enzimática usando diferentes tampões: Mcllvaine (▲); Citrato de sódio (Δ); Fosfato de sódio (◆); Tris-HCl (●); Bicarbonato de sódio-hidróxido (▼); Glicina-hidróxido de sódio (◇); Fosfato monossódico-hidróxido de sódio (○). **B.** Efeito da temperatura sobre a atividade da MesoAmp determinada com 100 mM de tampão Bicarbonato de sódio-hidróxido (pH 8,5). As letras minúsculas na parte superior dos valores (a-k) indicam a diferença significativa entre cada condição testada, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tabela inferior: faixa de pH e os diferentes tampões testados para a determinação do pH ótimo.

Tabela 6. Efeito dos diferentes cátions bivalentes sobre a atividade da MesoAmp.

Íon metálico		Atividade relativa (%)	
Controle		100	ghij
Al ²⁺	2mM	5.43±0.84	k
Ba ²⁺	2mM	19.50±0.97	ijk
Ca ²⁺	2mM	7.36±0.71	k
Cd ²⁺	2mM	13.93±2.76	jk
Mg ²⁺	2mM	152.07±5.28	gh
Zn ²⁺	2mM	11.29±2.64	jk
Cu ²⁺	2mM	65.21±9.81	hijk
I ²⁺	2mM	108.50±6.37	ghi
Li ²⁺	2mM	76.78±3.48	hijk
Ni ²⁺	2mM	179.00±6.29	fg
Mn ²⁺			
	1 mM	844.01±77.52	c
	2 mM	284.29±26.63	e
	3 mM	295.93±49.85	e
	4 mM	334.36±26.71	e
	5 mM	473.02±41.11	d
Co ²⁺			
	1 mM	171.19±13.95	fg
	2 mM	412.86±63.63	d
	3 mM	1460.93±88.51	b
	4 mM	1768.09±133.65	a
	5 mM	1597.07±59.58	b

As letras minúsculas na direita dos valores (a-k) indicam a diferença significativa entre cada condição testada, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Depois de determinar a temperatura e o pH ótimos, a atividade da MesoAmp foi testada com Leu-p-NA a pH 8,5 e 40°C na presença de 4 mM de Co²⁺. Os valores de *K_m*, *V_{max}* e *K_{cat}* foram calculados em 0,2364 ± 0,0182 mM, 1,098 ± 0,020 mM.s⁻¹

¹ e $11,86 \pm 1,46 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) foi calculada em $50,25 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$. (Tabela 7)

Tabela 7. Valores de K_m e K_{cat} de amino-peptidases ou leucina-amino-peptidases presentes em outros micro-organismos.

K_m (mM)	K_{cat} (mM.s⁻¹)	Micro-organismo
0,57	41,3	<i>Streptomyces septatus</i>
1,72	30,0	<i>Treponema denticola</i>
0,34	0,7	<i>Vibrio proteolyticus</i>
0,658	10180	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>
0,25	N/A	<i>Brevibacterium linens</i>
0,236	11,86	<i>Mesorhizobium</i> sp J5*

K_m e K_{cat} foi determinado usando a Leu-p-Na, os dados foram obtidos através do banco de dados Brendan.

*Os dados de *Mesorhizobium* J5 foram obtidos neste trabalho.

5.9 Análise de dicroísmo circular e termoestabilidade

O espectro de CD da proteína recombinante apresentou dois picos negativos na região de 208 nm e 222 nm, conforme o esperado para a estrutura secundária das alfa/beta hidrolases (Figura 20A). A MesoAmp mostrou uma temperatura de fusão (T_m) de $53,2^\circ\text{C}$ na presença e na ausência de íon Co^{2+} . Temperaturas acima de 40°C induziram a desnaturação da estrutura α -helicoidal de MesoAmp, mostrando uma transição para o estado irreversível (Figura 20B). Os dados estão correlacionados com os resultados apresentados na Figura 21, em que temperaturas superiores a T_m tem um efeito negativo (diminuição de 40 até 80%) na atividade da enzimática, por perda das estruturas secundárias e terciárias.

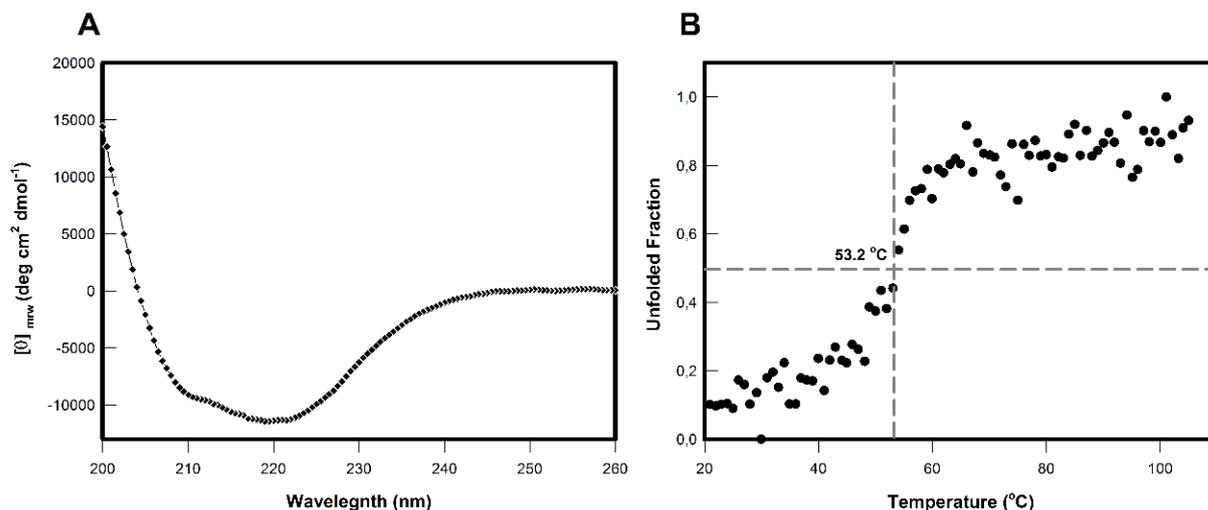


Figura 20. Análise espectroscópica e de desnaturação térmica de MesoAmp. **A.** O espectro de dicroísmo circular em tampão 100 mM de Bicarbonato de sódio-hidróxido (pH 8,5). **B.** Perfil de desnaturação térmica da estrutura secundária de MesoAmp. As alterações na elipticidade a 222 nm foram representadas graficamente como uma função da temperatura a pH 8,5. A intercepção das linhas pontilhadas indica a temperatura de fusão (T_m) estimada pelo ajuste dos dados utilizando a função sigmoide.

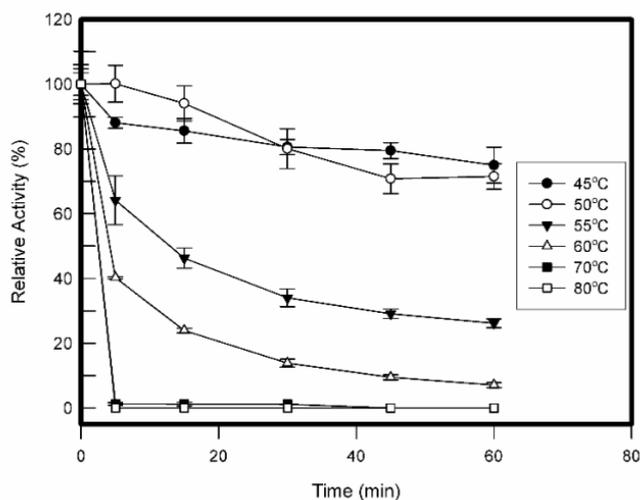


Figura 21. Termoestabilidade de MesoAmp usando Leu-p-NA como substrato. A enzima foi incubada a diferentes temperaturas (45 a 80°C) por em intervalos de tempo.

5.10 Efeito de reagentes desnaturantes e inibidores na atividade da MesoAmp

A enzima foi ligeiramente inibida por PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) e ácido iodo acético, e altamente inibida por reagentes quelantes de metal, tais como EDTA, confirmando que MesoAmp é uma enzima dependente de íons metálicos. Também foi avaliada a atividade da enzima na presença de agentes desnaturantes (Tabela 8). A atividade da MesoAmp foi muito sensível à concentração de guanidina-HCl entre 0,5 e 2,0 M, o que indica que perturbações na estrutura secundária da proteína afetam enormemente a atividade desta. No entanto, o tratamento com ureia não apresentou efeito substancial na atividade em concentrações de 0,5 M e 1 M, mas reduziu a atividade pela metade na concentração de 2 M. ZHUO e DIXON, (1997) descobriram que alguns reagentes sulfurados tem a capacidade de quelar pequenas quantidades de íons metálicos. Para evitar esse mecanismo quelante foram determinados o efeito do DTT e do β -mercaptoetanol na atividade da enzima sem a presença de íons metálicos.

Como mostrado na Tabela 8, o DTT e o β -mercaptoetanol diminuíram consideravelmente a atividade enzimática. No entanto, a análise da sequência de aminoácidos e do modelo tridimensional de MesoAmp não indicam ligações dissulfeto (Figura 22). Este resultado sugere que a redução da ligação dissulfeto não é o único mecanismo pelo qual o DTT pode alterar a função da proteína (TIAN et al., 2015). É bem conhecido que o DTT pode interagir com domínios da proteína ou resíduos do sítio ativo na ausência de resíduos de cistina (ALLIEGRO, 2000). Nossos dados suportam a declaração de que "o grupo tiol num estado oxidado é necessário para a atividade catalítica das amino-peptidases da família M29" (RUL, 2013) não é inteiramente verdade.

5.11 MesoAmp mantém sua atividade na presença de altas concentrações de sal, detergentes e solventes orgânicos

As condições hipersalinas favorecem a agregação da maioria das proteínas, interferindo nas interações eletrostáticas entre os resíduos, e diminuindo a disponibilidade de moléculas de água. As enzimas halófilas, em vez de serem desdobradas por estas condições, parecem ser dependentes da presença de sais. A

MesoAmp apresentou características halófilas, aumentando a atividade em até 1,2 vezes (Tabela 8) na presença de NaCl, em comparação com o controle.

O sal tem vários efeitos importantes sobre a estabilidade de proteínas, principalmente por modificação de carga na superfície da proteína e/ou alteração de cargas entre o substrato e a enzima (MERHEB-DINI et al., 2009), o qual pode, subsequentemente, aumentar sua atividade. Alguns relatórios sugerem que para permanecer dobrada e ativa a altas concentrações de NaCl as proteínas tem evoluído, modificando sua composição de aminoácidos (MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000; ORTEGA et al., 2011), de um modo geral, a halo-tolerância de uma enzima reforça a ideia da predominância de resíduos de aminoácidos ácidos (glutamato e aspartato são encontrados em enzimas halófilas em maior frequência em comparação com os seus homólogos mesófilos), acompanhado por um baixo número de resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas volumosas e um aumento da quantidade de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos pequenos (glicina, alanina, e valina), e uma quantidade diminuída de resíduos de aminoácidos alifáticos (ETYORINI et al., 2006; ORTEGA et al., 2011).

Tabela 8. Efeito de inibidores e agentes desnaturantes sobre a atividade da MesoAmp*.

Inibidor		Atividade Relativa (%)	
Controle		100	bc
EDTA			
	5mM	48.76±3.39	ij
	10mM	32.29±0.56	kl
	20mM	18.41±0.76	mn
PMSF 10mM		96.89±1.75	bc
Ácido Iodoacético 10mM		97.93±2.89	bc
Reagentes desnaturantes		Atividade Relativa (%)	
Controle		100	bc
β-Mercaptoethanol			
	1mM	80.16 ±4.18	de
	5mM	61.67±1.22	jk
	10mM	32.29±0.56	lm
DTT			
	1mM	10.07±0.93	no
	5mM	2.12±0.07	o
	10mM	1.41±0.06	o
Guanidina-HCl			
	0.5M	67.78±0.40	fg
	1M	29.10±1.11	lm
	2M	3.50±0.34	o
Ureia			
	0.5M	92.65±7.78	bc
	1M	73.36±6.25	ef
	2M	54.11±3.27	hi
NaCl			
	0.5M	127.31±9.11	a
	1M	125.94±3.49	a
	2M	121.81±0.16	a
	3M	103.45±2.76	bc
	4M	87.54±1.56	ef

*A medição da atividade enzimática foi feita com tampão Bicarbonato – NaOH a 100 mM, pH 8,5,40°C.

As letras minúsculas na direita dos valores (a-k) indicam a diferença significativa entre cada condição testada, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

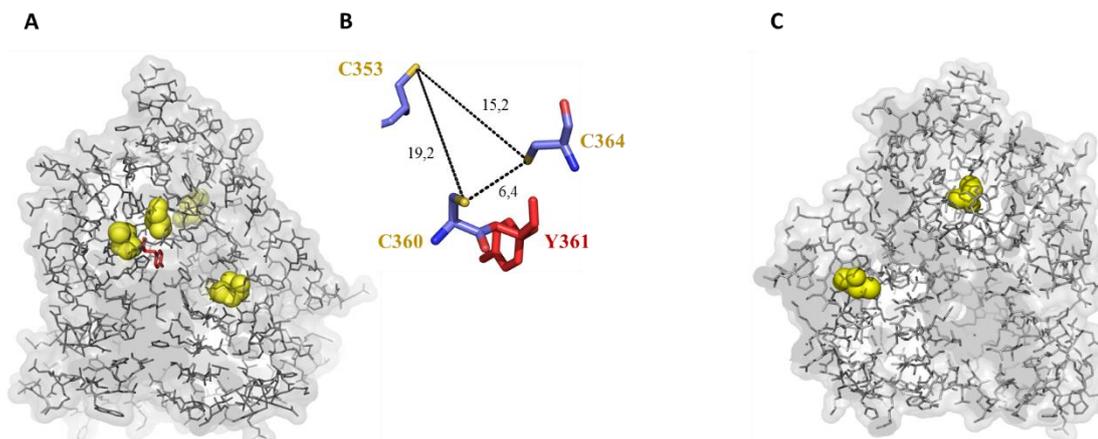


Figura 22. Modelo tridimensional de MesoAmp. **A.** MesoAmp, Esferas amarelas indicam a posição das cisteínas no modelo. **B.** Cisteínas (C353, C360, C364) localizadas próximas ao resíduo catalítico de tirosina (Y316). Os números sinalizam a distância (em Å) entre os átomos de enxofre presentes na proteína. **C.** Estrutura tridimensional de PepS (PDB4ICQ). Esferas amarelas indicam a posição das cisteínas na estrutura.

As enzimas halófilas como MesoAmp possuem vantagens desejáveis na indústria como: (a) redução dos custos por não requerer água fresca (pode ser usada água de mar), (b) processos realizados em altas concentrações de NaCl evitam a contaminação de micro-organismos e eliminam o processo de esterilização intensivo e constante, aumentando a eficiência da produção (YIN et al., 2015), e ainda reduzindo o impacto no ambiente por diminuição do uso da energia elétrica e água.

A presença de agentes tenso ativos não-iônicos, tais como Tween (20 e 80) e Triton (X-100 e X-114), não apresentaram um efeito significativo sobre a atividade enzimática (Tabela 9), no entanto, os tenso ativo iônicos e catiônicos (SDS e CTAB) causaram a perda completa da atividade enzimática de MesoAmp (dados não mostrados). Relatos anteriores indicaram que o efeito inibitório de SDS ou CTAB poderia ser provocado pela ligação com a enzima em mais de um ponto, modificando a estrutura terciária e alterando a distribuição de cargas (WANG et al., 2014b).

Tabela 9. Efeito dos detergentes na atividade da MesoAmp*.

Detergentes		Relative Activity (%)	
Controle		100	a
Triton X100	0.5%	76,81±3,236	de
	1%	73,74±5,970	ef
	2%	70,15±1,688	g
Triton X114	0.5%	81,64±4,532	cd
	1%	75,89±4,341	de
	2%	83,47±1,751	cd
Tween 20	0.5%	73,77±1,840	de
	1%	71,20±2,962	fg
	2%	69,54±2,090	g
Tween 80	0.5%	77,24±3,491	de
	1%	84,43±5,220	cd
	2%	90,25±2,714	bc

*A medição da atividade enzimática foi feita com tampão Bicarbonato – NaOH 100 mM, em pH 8,5 e a 40 °C.

As letras minúsculas na direita dos valores (a - g) indicam a diferença significativa entre cada condição testada, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Uma das características mais interessantes da MesoAmp é sua estabilidade na presença de solventes orgânicos, tal como é apresentado na Figura 23. A enzima manteve sua atividade nas concentrações de 5% e 10% (v/v) de etanol, metanol, 2-propanol e butanol, e apresentou um pequeno aumento da atividade em 20% (v/v) de etanol e metanol. No entanto, em concentrações maiores dos solventes (40%) a enzima foi completamente inativa. Na presença de acetona, DMSO e butanol em concentrações acima de 10%, a atividade enzimática diminuiu em 50%, seguida de inativação completa em concentrações mais elevadas de solventes. A resistência relativa na presença de solventes polares e não polares é um fenômeno que foi observado inúmeras vezes (DOUKYU; OGINO, 2010). No entanto, a razão para tal tolerância não foi estabelecida até o momento. Até certo ponto, o aumento na atividade enzimática na presença de solvente pode ser pelo aumento na flexibilidade conformacional da proteína. Outra hipótese estabelece que a abundância relativa de

resíduos hidrofóbicos localizados na superfície de uma molécula desempenha um papel importante na estabilidade estrutural das proteínas na presença de solventes orgânicos (DOUKYU; OGINO, 2010; GAUR et al., 2010).

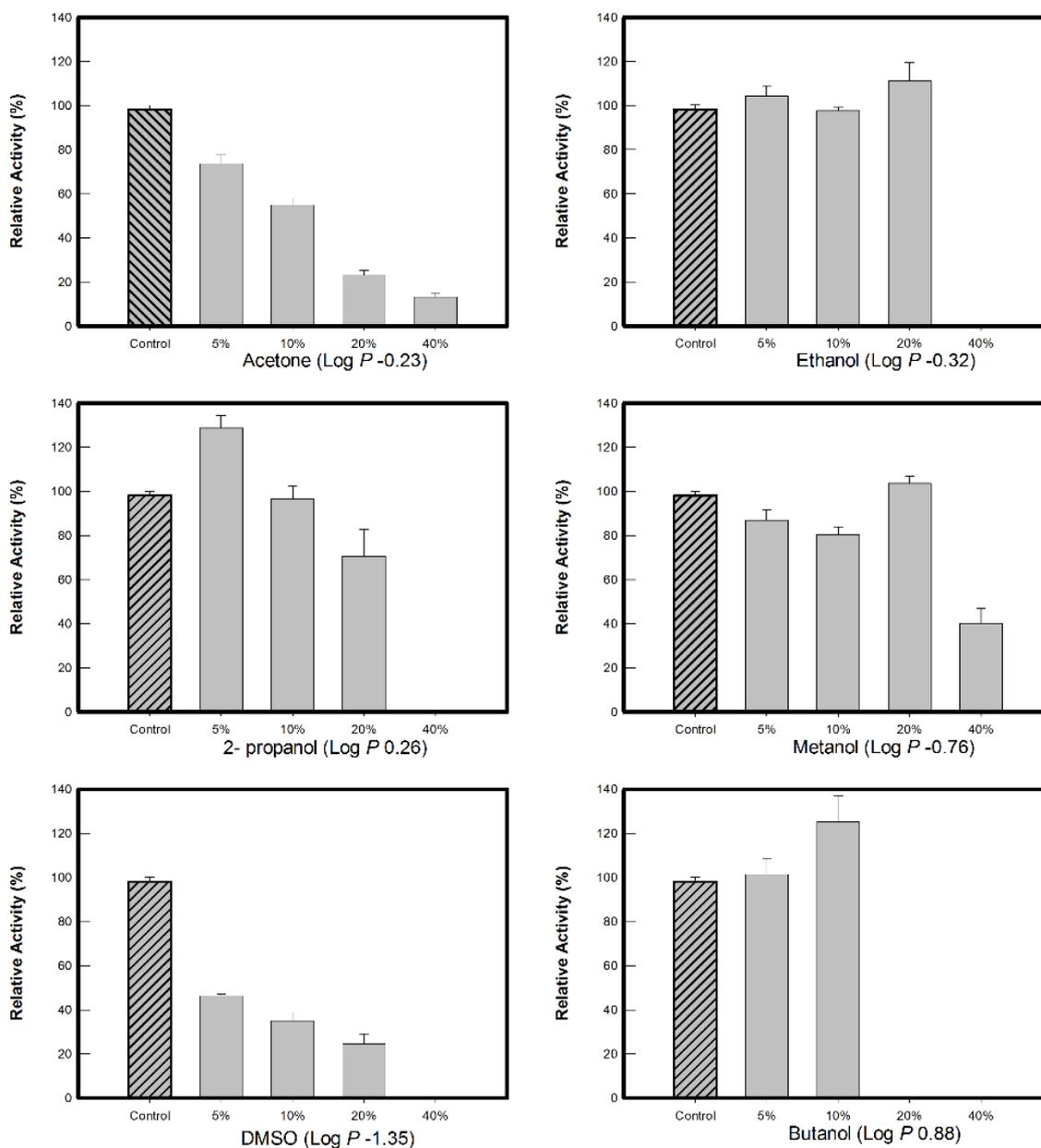


Figura 23. Efeito de solventes orgânicos (a diferentes concentrações) na atividade da MesoAmp.

O Log P é o logaritmo do coeficiente de partição de um solvente particular, entre n-octanol e água, resultando nos valores de determinação do grau de hidrofobicidade do solvente. Valores negativos: solvente hidrófilo e valores positivos: solvente hidrofóbico.

5.12 MesoAmp foi imobilizada e reutilizada com sucesso

A porcentagem de imobilização de MesoAmp foi de 95%, o que indica que a imobilização pela resina de Ni-NTA foi bem-sucedida. Como mostrado na Figura 24, o complexo Ni-NTA-MesoAmp (enzima imobilizada na resina) apresentou estabilidade operacional, mantendo 60% da sua atividade após 20 ciclos. Calculou-se que 0,5% da atividade de MesoAmp foi perdida após cada lavagem. A queda da atividade foi provavelmente devido à perda de pequenas quantidades de material, que ocorre durante os passos de centrifugação e lavagem, e pela degradação enzimática (FREY et al., 2010), embora a força de ligação entre 6XHis-MesoAmp e Ni-NTA seja relativamente forte (constante de dissociação entre 10-13 M) (WANG; WANG; LI, 2011). Assim, a imobilização de MesoAmp na superfície da resina Ni-NTA é um excelente suporte para aumentar a disponibilidade da enzima, além da reciclagem desta, sem perda apreciável de atividade catalítica.

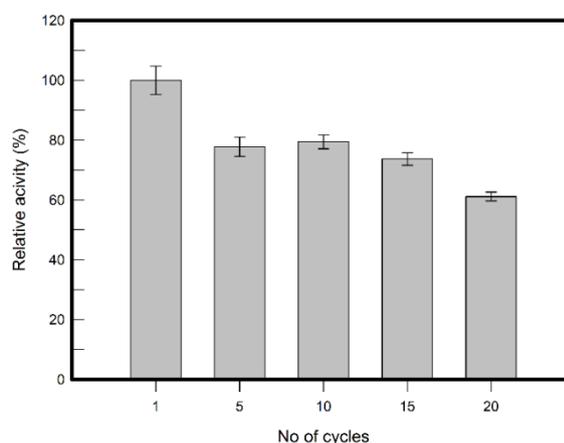


Figura 24. Estabilidade operacional de MesoAmp imobilizada. A atividade enzimática em cada ciclo foi realizada com Tris-HCl pH 8,0; 2 mM de Cobalto e 2 mM de Leu-*p*-NA e 40 °C, durante 15 min ou até atingir o estado estacionário.

5.13 Impacto da MesoAmp sobre a fisiologia do *Mesorhizobium sp J5*.

O impacto da enzima amino-peptidases da família M29 na fisiologia dos micro-organismos tem sido pouco estudado, no entanto, trabalhos desenvolvidos recentemente tem apresentado dados surpreendentes sobre a capacidade

multifuncional desta proteína. Na Tabela 10, são apresentados estudos preliminares relacionados com a amino-peptidase M29 e seu impacto na invasão celular, síntese da parede celular e resistência ao estresse osmótico.

Tabela 10. Estudos relacionados com a amino-peptidase M29 e seu impacto na fisiologia bacteriana.

Título	Efeito no metabolismo celular	Referência
Toda Amino-peptidase da família M29 age como um novo fator de virulência intracelular em infecções de <i>Listeria monocitogenes</i> (EGD-e)	Requerida para a invasão e sobrevivência dentro de células epiteliais humanas	(CHENG et al., 2015)
Leucina amino-peptidase de <i>Staphylococcus aureus</i> (USA300) localizada no citosol bacteriano com ampla faixa de substratos que se estende além da leucina	Principal amino-peptidase celular com 95% de atividade leucina amino-peptidase da célula.	(CARROLL et al., 2013)
A função da amino-peptidase PepS no desenvolvimento de <i>Streptococcus thermophilus</i> (CNR21066) não está limitada a nutrição do nitrogênio	Função pleiotrópica relacionada com a nutrição do nitrogênio e o metabolismo do peptidoglicano	(THOMAS et al., 2010)
Identificação de genes de tolerância ao estresse em solos desérticos hiper áridos usando metagenômica funcional	Confere tolerância ao estresse salino quando é expressa em <i>E. coli</i> BL21(DE3).	(JAGER, 2015)*

*teses de mestrado

A fim de obter uma visão geral do sistema proteolítico e identificar as proteínas únicas e comuns associadas a cada micro-organismo, foi realizada uma análise de diagrama de Venn. A Figura 25 ilustra todas as relações lógicas possíveis entre os sistemas proteolíticos das bactérias *Staphylococcus aureus* USAD300, *Streptococcus thermophilus* CNR21066, *Listeria monocitogenes* EGD-e e *Mesorhizobium sp huakuii* 7653R.

Os resultados sugerem que pelo menos 10 peptidases são comuns entre os sistemas proteolíticos (incluindo a amino-peptidase M29) dos quatro micro-organismos, correspondendo a 3,8% das peptidases totais identificadas, e compartilhando até 10,2% das peptidases com *S. aureus*, e 8,8 % com *L. monocitogenes*. Estas análises podem nos oferecer uma visão aproximada das outras funções da amino-peptidase M29, no entanto, outras análises teriam que ser realizadas para corroborar as hipóteses.

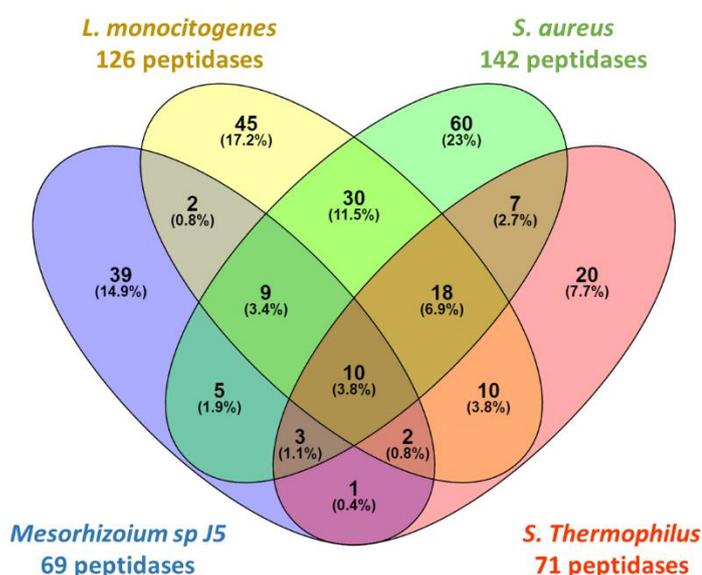


Figura 25. Diagrama de Venn do sistema proteolítico de *S. aureus* (*Staphylococcus aureus* USAD300); *S. thermophilus* (*Streptococcus thermophilus* CNR21066); *L. monocitogenes* (*Listeria monocytogenes* EGD-e) e *Mesorhizoium sp J5*. Números embaixo de cada nome indicam a quantidade de peptidases presentes em cada micro-organismo. As peças sobrepostas de diferentes elipses representam o número de peptidases em comum desses grupos em comparação.

Para avaliar a importância da *mesoamp* na fisiologia de *Mesorhizobium sp. J5* e sua possível função pleiotrófica, decidimos gerar um mutante deste gene. Para a deleção total do gene *mesoamp* do genoma, a construção pNPTS138- Δ *mesoamp* foi eletroporada em células de *Mesorhizobium sp. J5* competentes e submetidas à recombinação genômica sendo a deleção do gene confirmada por PCR (com oligonucleotídeos A e D da Tabela 3.). Na Figura 26 podemos observar, em géis de agarose corados com brometo de etídeo, os tamanhos das ampliações obtidas para colônias de *Mesorhizobium sp. J5* selvagem (WT) e para colônias de Δ *mesoamp*, onde o gene foi deletado em sua totalidade, mantendo uma mínima porção N-terminal e C-terminal, a fim de não afetar o início da leitura do gene *downstream*.

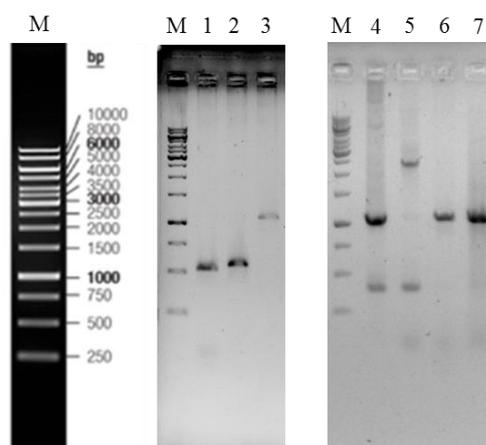


Figura 26. Eletroforograma para confirmar a mutação no gene *mesoamp*. 1: Produto de PCR com os oligonucleotídeos A+B; 2: Produto de PCR com os oligonucleotídeos C+D; 3: Produto de PCR de superposição com os oligonucleotídeos A+D; 4: PCR do plasmídeo pNPTS138 Δ *mesoamp*; 5: PCR do DNA genômico de *Mesorhizobium sp. J5*, usando os oligonucleotídeos A+D; 6 e 7: PCR do DNA genômico da linhagem Δ *mesoamp* (dois mutantes), usando os oligonucleotídeos A+D; M: Marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder (Fermentas)

Conforme mencionado no item 5.1, a maquinaria proteolítica tem uma redundância funcional entre várias enzimas. O *Mesorhizobium sp. J5* apresenta quatro enzimas com uma possível função metabólica similar, segundo a bases de dados Brenda (CHANG et al., 2015): Dipeptidase AC, Citosol amino-peptidase, Amino-peptidase PepB e leucine-aminopeptidase. Para testar a contribuição relativa da MesoAmp na atividade de leucina-amino-peptidase celular foram realizados ensaios

de hidrólise do Leu-p-NA utilizando lisados de células inteiras a partir de *Mesorhizobium sp.* J5 (cepa selvagem) e do mutante com a deleção de *mesoamp* (linhagem Δ *mesoamp*), padronizando a quantidade de proteína total colocada em cada ensaio. Foi possível verificar que a MesoAmp mostrou ser a responsável por 40% da atividade global de leucina amino-peptidase intracelular (Figura 27).

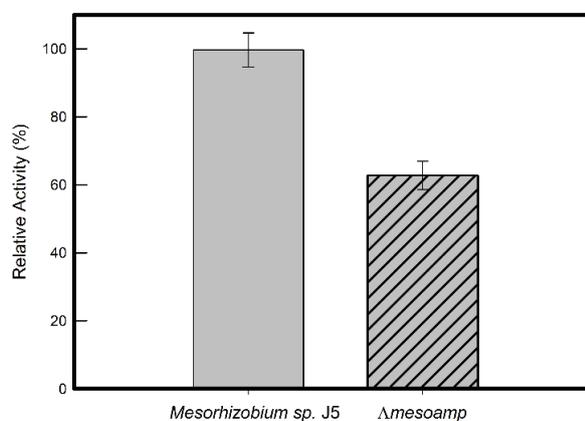


Figura 27. Atividade de leucina amino-peptidase global do *Mesorhizobium sp.* J5 e da linhagem Δ *mesoamp*. A atividade amino-peptidase foi normalizada usando a mesma concentração de proteína total (1 mg/ml).

Uma diminuição de 40% da atividade amino-peptidase intracelular poderia impactar negativamente o desenvolvimento de um micro-organismo. Para avaliar esse impacto, o crescimento do *Mesorhizobium sp.* J5 e do mutante Δ *mesoamp* foram monitorados em meio líquido TY (meio usado para evitar a formação de exopolissacarídeos) a 30°C e, posteriormente, alíquotas para a medição da D.O._{600nm} foram coletadas (Figura 28).

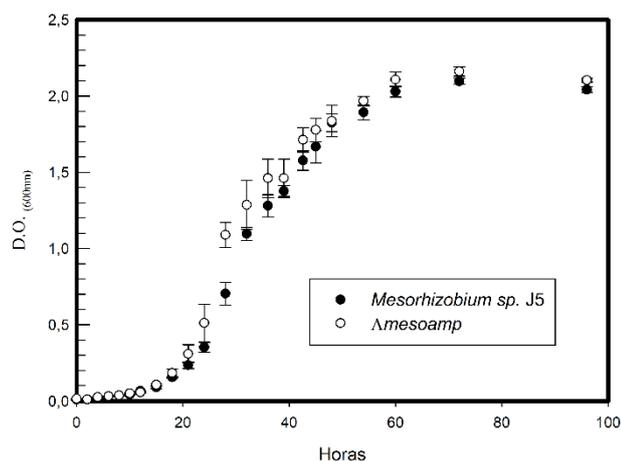


Figura 28. Crescimento do *Mesorhizobium sp. J5* e da linhagem Δ mesoamp em meio líquido TY. O ensaio foi realizado em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão.

Pela análise da Figura 28 é possível notar que a taxa de crescimento em ambas as bactérias foi similar (Figura 28). Este resultado sugere que a MesoAmp não está envolvida no crescimento em meios sintéticos. Podemos concluir que na ausência da MesoAmp, as outras enzimas com atividade de amino-peptidase podem suprir a demanda de aminoácidos intracelulares requeridos para o desenvolvimento bacteriano (síntese de proteínas). Assim, a MesoAmp não é indispensável ao metabolismo global, mas pode ter outras funções além da degradação de peptídeos intracelulares e manutenção do “pool” de aminoácidos, como resistência celular ao estresse salino, produção de peptidoglicano ou EPS e invasão celular.

Para conhecer um pouco mais o efeito da MesoAmp sobre o metabolismo bacteriano, temos que entender um pouco do metabolismo da leucina. A leucina é o aminoácido mais abundante nas proteínas (9,1% de prevalência). Como tal, parece ser uma molécula repórter adequada para monitorar a disponibilidade de substratos para a síntese de proteínas e peptídeos (SCULLY et al., 2015). O catabolismo da leucina é amplamente difundido entre as bactérias, gerando produtos intermediários que nutrem outras vias do metabolismo central, por exemplo, em ambientes oligotróficos com ausência de fontes de carbono, a leucina pode ser usada para a geração de acetil-CoA e produção de energia. (DÍAZ-PÉREZ; DÍAZ-PÉREZ; CAMPOS-GARCÍA, 2015). Para este efeito a leucina e outros aminoácidos são reciclados a partir de proteínas por proteases intracelulares e extracelulares, gerando

peptídeos pequenos que são posteriormente processados por amino-peptidases em aminoácidos livres, que por sua vez podem ser diretamente assimiladas pelos micro-organismos (BERGGREN et al., 2010).

A concentração intracelular de leucina está relacionada a processos de colonização (AHN; YANG; COOKSEY, 2007), virulência, sinalização (EITINGER et al., 2011), resistência sistêmica (HAN et al., 2006), adaptação alcalina (TAKAMI; TAKAKI; UCHIYAMA, 2002), halo-tolerância (HOSHINO; KOSE-TERAI; URATANI, 1991) e a sobrevivência em condições extremas, tais como baixas temperaturas (FONSECA; MORENO; ROJO, 2011).

5.14 Halo-tolerância de *Mesorhizobium* sp J5 e da linhagem Δ mesoamp

O *Mesorhizobium* sp J5 apresentou uma maior tolerância ao estresse salino em relação ao mutante Δ mesoamp (Figura 29). As bactérias do solo possuem mecanismos para se adaptar rapidamente às mudanças de pressão osmóticas geradas pelas plantas, a fim de sobreviver e se proliferar (MILLER; WOOD, 1996). Os organismos em geral tem a capacidade de utilizar os aminoácidos intracelulares livres para compensar parcialmente as alterações na osmolaridade do líquido extracelular (MEASURES, 1975). Para manter o *pool* aminoácidos, as bactérias usam estratégias como: (a) introdução de aminoácidos por transportadores ABC; (b) síntese *de novo* de aminoácidos; (c) introdução e/ou degradação de proteínas e peptídeos intracelulares e liberação de aminoácidos. A análise de componentes principais foi possível observar uma relação inversa entre a presença do gene aminopeptidase M29 e os transportadores ABC de aminoácidos principalmente nas Proteobacteria (Figura 30). No gênero *Mesorhizobium*, *L. monocitogenes*, *S. aureus* e *S. thermophilus*, ausência dos transportadores ABC de aminoácidos sugere uma baixa capacidade destas bactérias em introduzir aminoácidos livres do meio externo. Esta deficiência tem que ser compensada por outros mecanismos acima mencionados.

Por ser uma bactéria do solo, os *Mesorhizobium* tem evoluído para adaptar-se a ambientes oligotróficos, com uma baixa concentração de carboidratos e aminoácidos disponíveis. Porém, esta capacidade diminuída tem que ser compensada pelos outros mecanismos. Ao ter a principal enzima com atividade amino-peptidase

deletada, provavelmente o *pool* de aminoácidos intracelulares poderia diminuir até o ponto de afetar o mecanismo de tolerância em ambientes salinos. Estudos para determinar a concentração intracelular de aminoácidos serão feitos para corroborar esta hipótese.

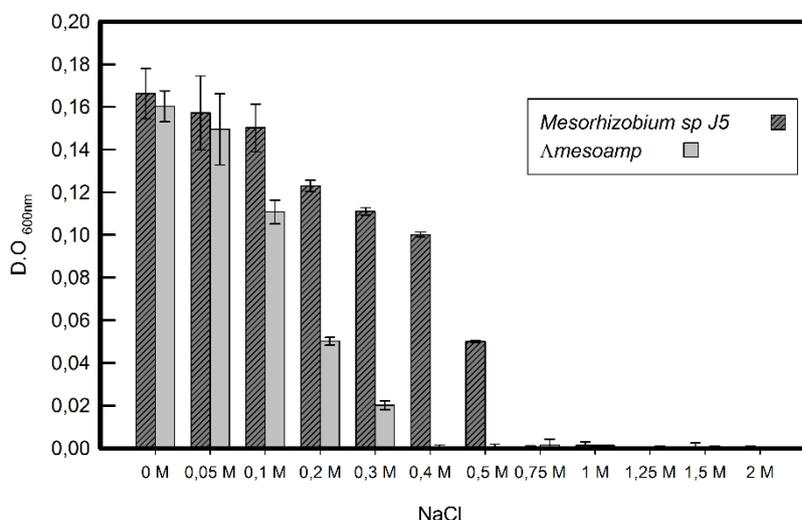


Figura 29. Efeito do estresse salino no desenvolvimento do *Mesorhizobium sp J5* e da linhagem Δ mesoamp.

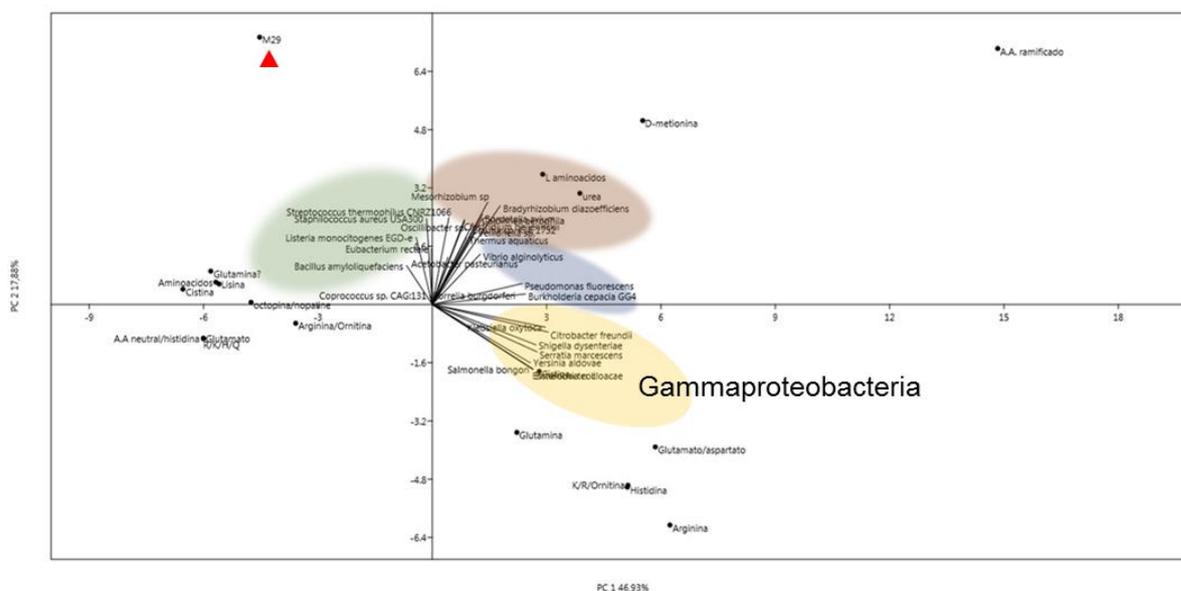


Figura 30. Análises dos componentes principais (PCA) dos transportadores ABC de aminoácidos e aminopeptidase M29. Foi possível observar que bactérias que não possuem a enzima aminopeptidase M29 apresentaram uma tendência a possuir uma maior quantidade de transportadores ABC de aminoácidos. Seta vermelha sinaliza a M29.

5.15 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Para avaliar a produção de EPS pelo *Mesorhizobium sp* J5 e pela linhagem Δ *mesoamp*, as cepas foram cultivadas em meio PSY por 144 h para a posterior extração com solventes orgânicos. A produção de EPS foi medida em mg/ml de meio, sendo os resultados obtidos similares (9,45 mg/ml para a cepa selvagem e 8,67 mg/ml para o mutante). Assim, a produção de EPS não foi afetada pela deleção da enzima, no entanto, as características reológicas do EPS (viscosidade) mudaram significativamente (Figura 31), possivelmente por alterações na estrutura secundária ou conformações da molécula (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014), sugerindo que a MesoAmp possa estar envolvida na síntese de EPS. No entanto, a análise reológica e da natureza química dos exopolissacarídeos precisam ser realizadas.

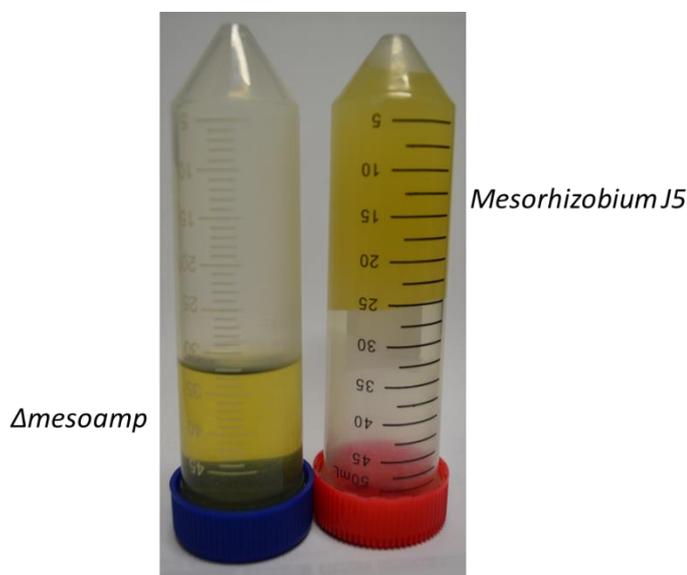


Figura 31. Produção do exopolissacarídeos (EPS) do *Mesorhizobium* J5 e do linhagem Δ *mesoamp*. As características reológicas do EPS (viscosidade), foram modificadas pela deleção do gene *mesoamp*.

5.16 Produção de biofilme

A maioria das espécies de bactérias prefere a formação do biofilme como o sistema de socialização e desenvolvimento para-se proteger do ambiente (SAYEM et

al., 2011), no entanto, sua formação e manutenção são processos multifatoriais influenciados principalmente pela produção e natureza dos polissacarídeos intra e extracelulares (BEENKEN; BLEVINS; SMELTZER, 2003). A fim de avaliar a produção de biofilme por *Mesorhizobium sp. J5* e pela linhagem $\Delta mesoamp$ utilizou-se o protocolo de placa de microtitulação (HASSAN et al., 2011). A Figura 32 mostra uma diminuição significativa da capacidade na formação do biofilme nos meios PGE (glicose como fonte de carbono) e PGY (glicerol como fonte de carbono) para a linhagem $\Delta mesoamp$. Estes resultados indicam que a produção do biofilme não só está correlacionado com a produção do EPS, como também a outros fatores, como: a natureza do exopolissacarídeo (estrutura primária e características reológicas) e a fonte de carbono, sendo indispensáveis para o estabelecimento, formação e manutenção do biofilme em *Mesorhizobium*. No entanto, o efeito direto do gene *mesoamp* sobre produção do EPS ainda é desconhecido.

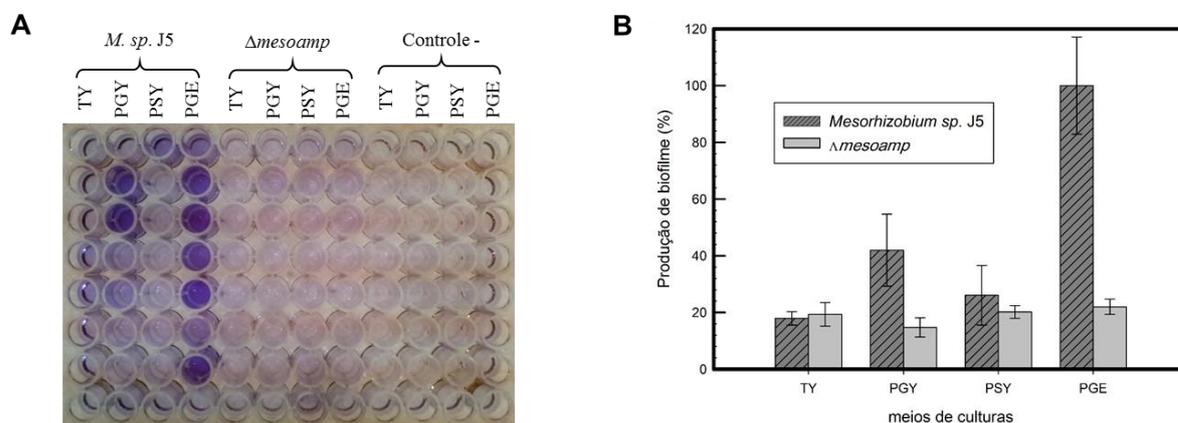


Figura 32. Produção de biofilme. **A.** teste *in vitro* da produção de biofilme por *Mesorhizobium sp. J5*. (*M. sp J5*) e o mutante com a deleção no gene *mesoamp* ($\Delta mesoamp$). **B.** Porcentagem da produção de biofilme. Os dados de absorbância foram normalizados e tratados usando a equação 3.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível identificar quatro ORFs codificadoras de enzimas proteolíticas no genoma de *Mesorhizobium* sp J5 com possíveis aplicações biotecnológicas e, ainda, desenvolver a caracterização funcional e avaliar o impacto da enzima amino-peptidase da família M29 sobre o metabolismo desta bactéria. Os resultados obtidos com os ensaios experimentais empregados nos permitem concluir que:

- Os genes *mesoamp*, *mesoleu* e *mesocarx* foram corretamente clonados para expressão heteróloga em *E. coli*;
- A proteína recombinante MesoAmp, referente ao produto do gene *mesoamp*, foi expressa solúvel e ativa como homo-dímero em *E. coli*;
- A atividade leucil-aminopeptidolítica de MesoAmp é sensível ao SDS e β -mercaptoetanol e depende de sua forma dimérica para a atividade.
- A enzima MesoAmp possui atividade ótima em pH 8,5 e a 45°C, o que a caracteriza como termofílica;
- A MesoAmp é uma enzima altamente dependente de íons metálicos, principalmente Co^{2+} e Mn^{2+} .
- O padrão de inibição indica que a MesoAmp é uma metalo-peptidase;
- A desestabilização da estrutura terciária da MesoAmp em função da temperatura está bem correlacionada com a perda de sua atividade;
- A atividade da MesoAmp quase não foi alterada na presença dos solventes testados, sugerindo uma aplicação compatível com solventes orgânicos.
- A MesoAmp apresentou modelos estruturais da família das alfa/beta hidrolases, com uma região altamente conservada na cavidade catalítica da enzima.
- O estudo *in silico* da MesoAmp forneceu detalhes quanto a sua estrutura terciária; localização da tríade catalítica; da região de ligação ao substrato; da característica da cavidade interna e a localização da tríade
- Estudos preliminares revelaram que atividade de peptidase da MesoAmp, não está limitada a manter o *pool* de aminoácidos.

- O gene *mesoamp* apresenta pleiotrópismo além da codificação da enzima MesoAmp, como: tolerância ao estresse salino, modificações na estrutura de exopolissacarídeos e formação de biofilme.

7. REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 16 jan. 2014.
- AHN, S.-J.; YANG, C.-H.; COOKSEY, D. A. Pseudomonas putida 06909 genes expressed during colonization on mycelial surfaces and phenotypic characterization of mutants. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 1, p. 120–32, jul. 2007.
- ALLIEGRO, M. C. Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 282, n. 1, p. 102–106, 2000.
- ARUNACHALAM, C.; SARITHA, K. Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 12, p. 29–32, 2009.
- ASHKENAZY, H. et al. ConSurf 2010: Calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 529–533, 2010.
- BACHMANN, B. O.; VAN LANEN, S. G.; BALTZ, R. H. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making? **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 175–184, 2014.
- BAILEY, S. et al. Agrobacterium tumefaciens VirB8 structure reveals potential protein-protein interaction sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2582–2587, 21 fev. 2006.
- BARRETT, A. J. [1] Enzyme Nomenclature In Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. In: BARRETT, A. J. (Ed.). **Methods in enzymology**. London: Academic Press, 1992. v. 244p. 1–15.
- BEENKEN, K. E.; BLEVINS, J. S.; SMELTZER, M. S. Mutation of sarA in Staphylococcus aureus Limits Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4206–4211, 1 jul. 2003.
- BERGGREN, M. et al. Efficient aquatic bacterial metabolism of dissolved low-molecular-weight compounds from terrestrial sources. **The ISME Journal**, v. 4, n. 3, p. 408–416, 12 mar. 2010.
- BERINGER, J. E. R factor transfer in Rhizobium leguminosarum. **Journal of general microbiology**, v. 84, n. 1, p. 188–98, set. 1974.
- BERTIN, P. B. et al. The thermophilic, homohexameric aminopeptidase of Borrelia burgdorferi is a member of the M29 family of metallopeptidases. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2253–2261, 2005.
- BRITTEN, R. J.; MCCLURE, F. T. The amino acid pool in Escherichia coli. **Bacteriological reviews**, v. 26, p. 292–335, 1962.
- CARROLL, R. K. et al. The Staphylococcus aureus leucine aminopeptidase is localized

to the bacterial cytosol and demonstrates a broad substrate range that extends beyond leucine. **Biological Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1199–1216, 1 jan. 2013.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. D. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, n. October, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; OTOBONI, A. M. M. B.; LEMOS, E. G. DE M. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Rhizobia Species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1566–1575, dez. 2015.

CHANG, A. et al. BRENDA in 2015: exciting developments in its 25th year of existence. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D439–46, 2015.

CHENG, C. et al. Aminopeptidase T of M29 Family Acts as A Novel Intracellular Virulence Factor for *Listeria monocytogenes* Infection - Material suplementar. **Scientific Reports**, v. 5, p. 17370, 2015.

CONSORTIUM, T. U. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D204–D212, 2015.

DAS, S. K. et al. Mutation in the *lysA* gene impairs the symbiotic properties of *Mesorhizobium ciceri*. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 1, p. 69–77, 2010.

DEANGELIS, P. L.; WHITE, C. L. Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type D. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7209–13, 1 mar. 2002.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.**, 2004.

DÍAZ-PÉREZ, A. L.; DÍAZ-PÉREZ, C.; CAMPOS-GARCÍA, J. Bacterial l-leucine catabolism as a source of secondary metabolites. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 15, p. 1–29, 2015.

DIOUF, F. et al. Genetic and Genomic Diversity Studies of Acacia Symbionts in Senegal Reveal New Species of *Mesorhizobium* with a Putative Geographical Pattern. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117667, 6 fev. 2015.

DONG, L. et al. The leucyl aminopeptidase from *Helicobacter pylori* is an allosteric enzyme. **Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 2017–2023, 2005.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 270–282, 2010.

EITINGER, T. et al. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 3–67, jan. 2011.

ETYORINI, E. S. et al. Purification and Characterization of Two Novel Halotolerant Extracellular proteases from *Bacillus subtilis* Strain FP-133. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 433–440, 2006.

EVERS, S.; COURVALIN, P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene

expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 5, p. 1302–9, mar. 1996.

FISER, A.; SALI, A.; ŠALI, A. MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. **Methods in Enzymology**, v. 374, p. 461–491, jan. 2003.

FONSECA, P.; MORENO, R.; ROJO, F. Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 329–339, jun. 2011.

FREDERIKS, W. M.; MOOK, O. R. F. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 52, n. 6, p. 711–22, jun. 2004.

FREY, S. T. et al. Immobilization of the Aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* on Mg²⁺/Al³⁺ Layered Double Hydroxide Particles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 10, p. 2828–2832, 27 out. 2010.

GAUR, R. et al. Purification and characterization of a solvent stable aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: Cloning and analysis of aminopeptidase gene conferring solvent stability. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 757–764, 2010.

GHOBAKHLOU, A.-F. et al. Microarray transcriptional profiling of Arctic *Mesorhizobium* strain N33 at low temperature provides insights into cold adaption strategies. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 383, dez. 2015.

GONG, J.-S. et al. Metagenomic technology and genome mining: emerging areas for exploring novel nitrilases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6603–6611, 2013.

GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOUIY, J. Bacterial aminopeptidases: Properties and functions. **FEMS microbiology Reviews**, v. 18, p. 319–344, 1996.

GUPTA, A.; KHARE, S. K. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1788–1793, out. 2006.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, jun. 2002.

HAN, S. H. et al. Multiple determinants influence root colonization and induction of induced systemic resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6. **Molecular plant pathology**, v. 7, n. 6, p. 463–72, nov. 2006.

HASSAN, A. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 305–311, 2011.

HE, Y.-C. et al. Biosynthesis of Ethyl (S)-4-Chloro-3-Hydroxybutanoate by NADH-

Dependent Reductase from *E. coli* CCZU-Y10 Discovered by Genome Data Mining Using Mannitol as Cosubstrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 8, p. 2042–2053, 2014.

HOLM, L. et al. Searching protein structure databases with DaliLite v.3. **Bioinformatics**, v. 24, n. 23, p. 2780–2781, 1 dez. 2008.

HOSHINO, T.; KOSE-TERAI, K.; URATANI, Y. Isolation of the *braZ* gene encoding the carrier for a novel branched-chain amino acid transport system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 6, p. 1855–61, mar. 1991.

HU, X.-P.; YANG, Y.; MA, B.-G. Amino Acid Flux from Metabolic Network Benefits Protein Translation: the Role of Resource Availability. **Scientific reports**, v. 5, n. January, p. 11113, 2015.

HUO, Y.-X. et al. Conversion of proteins into biofuels by engineering nitrogen flux. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 346–351, abr. 2011.

HUO, Y.-X. X.; WERNICK, D. G.; LIAO, J. C. Toward nitrogen neutral biofuel production. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 406–13, jun. 2012.

ISHIKAWA, K. et al. Novel Bifunctional Hyperthermostable Carboxypeptidase / Aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 Novel Bifunctional Hyperthermostable Carboxypeptidase / Aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 2, p. 673–679, 2001.

JAGER, G. J. DE. **Identifying stress-tolerance genes in hyperarid desert soils using functional metagenomics**. [s.l.] Pretoria, 2015.

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 895–898, 1997.

JENAL, U.; HENGGE-ARONIS, R. Regulation by proteolysis in bacterial cells. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 163–172, 2003.

JOHNSON, S.; PELLECCIA, M. Structure- and fragment-based approaches to protease inhibition. **Current top Medical Chem**, v. 6, p. 317–329, 2006.

KANG, C. et al. Cloning and expression of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus oryzae* and its application in beer stabilization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 263–272, 2014.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Critical reviews in microbiology**, v. 37, n. 3, p. 262–76, ago. 2011.

KELLY, S. J. **Requirement for Exopolysaccharide in the Mesorhizobium-Lotus Symbiosis**. [s.l.] University of Otago, Dunedin, 2012.

KIM, J. et al. Cloning and characterization of a novel β -transaminase from *Mesorhizobium* sp. strain LUK: A new biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure ??-amino acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1772–

1782, 2007.

KIRSTEIN, J. et al. Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 589–599, ago. 2009.

KONOVALOVA, A.; SØGAARD-ANDERSEN, L.; KROOS, L. Regulated proteolysis in bacterial development. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 3, p. 493–522, 2014.

KRICK, A. et al. A Marine Mesorhizobium sp. Produces Structurally Novel Long-Chain N-Acyl-L-Homoserine Lactones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3587–3594, 1 jun. 2007.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 7, p. 809–816, 2011.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. **Critical reviews in microbiology**, v. 38, n. 4, p. 330–8, nov. 2012.

KUO, L. Y. et al. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II by hydrogen peroxide and site-directed mutagenesis of methionine residues on the enzyme. **The protein journal**, v. 23, n. 4, p. 295–302, 2004.

KUO, L.-Y. et al. Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. **Current microbiology**, v. 47, n. 1, p. 40–45, 2003.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 15 ago. 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>>

LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 2–17, jan. 2014.

LE, S. Q.; GASCUEL, O. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1307–1320, 3 abr. 2008.

LI, S. et al. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.

LUO, X.-J. Genomic Data Mining: An Efficient Way to Find New and Better Enzymes. **Enzyme Engineering**, v. 01, n. 01, p. 1–4, 2012.

MADERN, D.; EBEL, C.; ZACCAI, G. Halophilic adaptation of enzymes. **Extremophiles**, v. 4, n. 2, p. 91–98, 14 abr. 2000.

MARUTHIAH, T. et al. Purification and characterization of moderately halophilic

alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU 6. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 116–119, abr. 2013.

MAURER, K.-H. H. Detergent proteases. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330–4, ago. 2004.

MCGUFFIN, L. J.; BUENAVISTA, M. T.; ROCHE, D. B. The ModFOLD4 server for the quality assessment of 3D protein models. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W368–W372, 1 jul. 2013.

MCNAMARA, J. C. et al. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 37, n. 3, p. 193–208, 2004.

MEASURES, J. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. **Nature**, v. 257, p. 398–400, 1975.

MEENA, P. et al. Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 210–216, jul. 2013.

MEGURO, H. et al. Putative role of cellulosomal protease inhibitors in *Clostridium cellulovorans* based on gene expression and measurement of activities. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 19, p. 5527–30, out. 2011.

MENGES, D. A. et al. Continuous assay of proteases using a microtiter plate fluorescence reader. **Analytical biochemistry**, v. 254, n. 1, p. 144–147, 1997.

MERHEB-DINI, C. et al. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9210–9217, 2009.

MILLER, K. J.; WOOD, J. M. Osmoadaptation by Rhizosphere bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 50, p. 101–136, 1996.

MITCHELL, A. et al. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D213–D221, 28 jan. 2015.

MUGO, A. N. et al. Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1834, n. 6, p. 953–63, 2013.

NANDAN, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. Extracellular proline aminopeptidase production by *Streptomyces lavendulae* ATCC14162 under solid-state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 72, n. 9-10, p. 591–595, 2013.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14002–14015, 2012.

ODINTSOV, S. G. et al. Substrate access to the active sites in aminopeptidase T, a representative of a new metallopeptidase clan. **Journal of Molecular Biology**, v. 354, n. 2, p. 403–412, 2005a.

- ODINTSOV, S. G. et al. Staphylococcus aureus aminopeptidase S is a founding member of a new peptidase clan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27792–27799, 2005b.
- OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 252–63, 2013.
- OLIVEIRA, S. H. P. et al. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. **BMC bioinformatics**, v. 15, p. 197, 2014.
- ORTEGA, G. et al. Halophilic enzyme activation induced by salts. **Scientific reports**, v. 1, p. 6, 2011.
- OVERBEEK, R. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D206–D214, 2014.
- PERALTA-YAHYA, P. P. et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 320–8, 16 ago. 2012.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 29 set. 2011.
- PLOTKA, M. et al. Novel Highly Thermostable Endolysin from *Thermus scotoductus* MAT2119 Bacteriophage Ph2119 with Amino Acid Sequence Similarity to Eukaryotic Peptidoglycan Recognition Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 886–895, 1 fev. 2014.
- POLANIA, J.; MACCABE, A. **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. v. 254
- PRASAD, M. P.; SETHI, R. Optimization of cellulase production from a novel bacterial isolate *Mesorhizobium* sp. from marine source. **Journal of Enzyme Research**, v. 4, n. 1, p. 39–45, 2013.
- RAJASEKHAR, A. et al. Thermostable Bacterial Protease - A New Way for Quality Silk Production. **International Journal of Bioscience and biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 43–58, 2011.
- RAJU, R. M.; GOLDBERG, A. L.; RUBIN, E. J. Bacterial proteolytic complexes as therapeutic targets. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 10, p. 777–89, 2012.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, set. 1998.
- RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 343–350, 2014.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 183–228, 1995.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. **Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine**

Peptidases. [s.l: s.n.]. v. 244

RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (EDS.). **Handbook of Proteolytic Enzymes.** 3. ed. London: Academic Press, 2013. v. 8

RAY, A. Protease Enzyme- Potential Industrial Scope. **International Journal Technology**, v. 2, n. 1, p. 1–4, 2012.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578–592, 2010.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 12 ago. 2003.

ROUF, S. M. A. et al. Propeptide processing and proteolytic activity of proenzymes of the staphylococcal and enterococcal GluV8-family protease. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 49, n. 6, p. 421–7, dez. 2012.

RUL, F. PepS Aminopeptidase. In: RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (Eds.). . **Handbook of Proteolytic Enzymes.** Third ed. San Diego, CA: Academic Press publications - Elsevier, 2013. p. 1677–1678.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3. ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SAYEM, S. et al. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 74, 2011.

SCHAECHTER, M. et al. Proteases, Production. In: SCHAECHTER, E.-C. M. (Ed.). . **Applied Microbiology: Industrial In Encyclopedia of Microbiology.** 3. ed. Oxford: Academic Press, 2009. p. 495–511.

SCULLY, S. M. et al. Branched-chain alcohol formation by thermophilic bacteria within the genera of *Thermoanaerobacter* and *Caldanaerobacter*. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 809–818, 22 jul. 2015.

SHARMA, U. **Genetic basis of the activation of the cryptic dct genes in *Mesorhizobium loti*.** [s.l: s.n.].

SHEN, Y. et al. Biochemical properties and potential applications of recombinant leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 11, p. 7609–7625, 2011.

SILVER, R. P.; AARONSON, W.; VANN, W. F. The K1 capsular polysaccharide of *Escherichia coli*. **Reviews of infectious diseases**, v. 10 Suppl 2, p. S282–6, 1988.

SJÖDAHL, J. et al. Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). **Protein expression and purification**, v. 26, n. 1, p. 153–61, out. 2002.

STONER, M. R. et al. Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizers and protease inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 2, p. 114–125, fev. 2004.

TA, H. M. et al. Structure-based elucidation of the regulatory mechanism for

aminopeptidase activity. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 69, n. 9, p. 1738–1747, 1 set. 2013.

TAKAMI, H.; TAKAKI, Y.; UCHIYAMA, I. Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 18, p. 3927–35, 15 set. 2002.

TAKATA, G. et al. Characterization of *Mesorhizobium loti* L -Rhamnose Isomerase and Its Application to L -Talose Production. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 1006–1009, 23 maio 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–9, out. 2011.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, jun. 2013.

TENG, Y. et al. Isolation of the PCB-degrading bacteria *Mesorhizobium* sp. ZY1 and its combined remediation with *Astragalus sinicus* L. for contaminated soil. **International journal of phytoremediation**, v. 20, 20 ago. 2015.

THOMAS, S. et al. The role of aminopeptidase PepS in the growth of *Streptococcus thermophilus* is not restricted to nitrogen nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 148–157, 2010.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–80, 11 nov. 1994.

TIAN, G.; FINLEY, D. Cell biology: Destruction deconstructed. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 170–171, 2012.

TIAN, R. et al. Expression and Characterization of a Novel Thermo-Alkalistable Lipase from Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1482–97, 2015.

TYE, A J. et al. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 2-3, p. 190–7, jul. 2002.

UECHI, K. et al. Gene Cloning and Characterization of L-Ribulose 3-epimerase from *Mesorhizobium loti* and its Application to Rare Sugar Production. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 3, p. 511–515, 2013.

VENKATACHALAM, G. et al. Characterization and applications of cyclic β -(1,2)-glucan produced from *R. meliloti*. **RSC Advances**, v. 4, n. 22, p. 11393, 2014.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J.; VIEILLE, C. Thermostability Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

WANG, F. et al. Biochemical Properties of Recombinant Leucine Aminopeptidase II from *Bacillus stearothermophilus* and Potential Applications in the Hydrolysis of Chinese Anchovy (*Engraulis japonicus*) Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 165–172, 11 jan. 2012.

WANG, S. et al. Whole-genome sequencing of *Mesorhizobium huakuii* 7653R provides molecular insights into host specificity and symbiosis island dynamics. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 440, 2014a.

WANG, T.-F. et al. Biophysical characterization of a recombinant aminopeptidase II from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Biological Physics**, v. 40, n. 1, p. 25–40, 2014b.

WANG, W.; WANG, D. I. C.; LI, Z. Facile fabrication of recyclable and active nanobiocatalyst: purification and immobilization of enzyme in one pot with Ni-NTA functionalized magnetic nanoparticle. **Chemical Communications**, v. 47, n. 28, p. 8115, 2011.

WERNICK, D.; LIAO, J. Protein-based biorefining: metabolic engineering for production of chemicals and fuel with regeneration of nitrogen fertilizers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1397–1406, 2013.

WEST, L.; YANG, D.; STEPHENS, C. Use of the *Caulobacter crescentus* Genome Sequence To Develop a Method for Systematic Genetic Mapping. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 8, p. 2155–2166, 15 abr. 2002.

YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2014.

YIN, J. et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1433–1442, nov. 2015.

YIN, L. J.; CHOU, Y. H.; JIANG, S. T. Purification and characterization of acidic protease from *aspergillus oryzae* BCRC 30118. **Journal of Marine Science and Technology (Taiwan)**, v. 21, n. 1, p. 105–110, 2013.

ZHU, X. et al. Mechanism of peptide hydrolysis by co-catalytic metal centers containing leucine aminopeptidase enzyme: A DFT approach. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 209–222, 2012.

ZHUO, S.; DIXON, J. E. Effects of sulfhydryl reagents on the activity of lambda Ser/Thr phosphoprotein phosphatase and inhibition of the enzyme by zinc ion. **Protein engineering**, v. 10, n. 12, p. 1445–52, dez. 1997.

8. ANEXOS

Anexo 1. Amino-peptidases da família M29 usadas no análises de ConSurf.

MEROPS Accession	Nome	Subfamilia	Microorganismo
MER001285	amino-peptidase T	M29.001	<i>Thermus aquaticus</i>
MER001286	amino-peptidase T	M29.001	<i>Thermus thermophilus</i>
MER240296	amino-peptidase T	M29.001	<i>Deinococcus proteolyticus</i>
MER346091	amino-peptidase T	M29.001	<i>Bartonella birtlesii</i>
MER001287	amino-peptidase II	M29.002	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
MER127244	amino-peptidase II	M29.002	<i>Atopobium parvulum</i>
MER100581	amino-peptidase II	M29.002	<i>Bacillus sp. SG-1</i>
MER002700	amino-peptidase II	M29.002	<i>Clostridium beijerinckii</i>
MER062356	PepS amino-peptidase	M29.004	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
MER294030	PepS amino-peptidase	M29.004	<i>Acetobacter tropicalis</i>
MER294038	PepS amino-peptidase	M29.004	<i>Bradyrhizobium sp. ORS 375</i>
MER251940	PepS amino-peptidase	M29.004	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>
MER118867	amino-peptidase S	M29.005	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
MER346118	amino-peptidase S	M29.005	<i>Bacillus macauensis</i>
MER141311	amino-peptidase S	M29.005	<i>Clostridium butyricum</i>
MER160371	amino-peptidase S	M29.005	<i>Staphylococcus carnosus</i>
MER346205	non-peptidase homologues	M29.UNW	<i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i>
MER182494	non-peptidase homologues	M29.UNW	<i>Thermococcus sibiricus</i>
MER107756	non-peptidase homologues	M29.UNW	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>
MER258687	non-peptidase homologues	M29.UNW	<i>uncultured bacterium</i>
MER259147	unassigned peptidases	M29.UPW	<i>Thermacetogenium phaeum</i>
MER258311	unassigned peptidases	M29.UPW	<i>uncultured bacterium</i>
MER294286	unassigned peptidases	M29.UPW	<i>uncultured Desulfobacterium sp.</i>
MER142019	unassigned peptidases	M29.UPW	<i>Verrucomicrobiae bacterium DG1235</i>

Anexo 2. Peptidases no genoma de *Mesorhizobium sp. J5*

Resultado Blast	Nome	Número de Acesso MEROPS	Identidade no genoma de <i>Mesorhizobium sp.</i>	E-valeu	Família	Homólogos de peptidase - Micro-organismo	Função	Ubiquação	Mecanismo catalítico
MER427002 - subfamily A24A unassigned peptidases (Mesorhizobium sp opportunistum)	Subfamily A24A unassigned peptidases	MER427002	64.74%	8.80e-48	A24/AD	Tipo IV Prepilin Peptidase - <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Biogênese pilus e secreção de proteínas extracelular	Membrana Citoplasmatica - fora	Aspartato
MER017898 - subfamily A24A unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Subfamily A24A unassigned peptidases	MER017898	60.37%	9.00e-46	A24A/AD	Tipo 4 prepilin peptidase 1 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biogênese pilus e secreção de proteínas extracelular	Membrana Citoplasmatica - fora	Aspartato
MER052114 - family A24 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Family A24 unassigned peptidases	MER052114	84.09%	5.60e-53	A24X/AD	Tipo 4 prepilin peptidase 1 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biogênese pilus e secreção de proteínas extracelular	Membrana Citoplasmatica - fora	Aspartato
MER014360 - family A26 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Family A26 unassigned peptidases	MER014360	97.64%	2.30e-159	A26/AF	Leo peptidase - <i>Legionella pneumophila</i>	Degradacao de proteínas extracelulares	Membrana Citoplasmatica - fora	Aspartato
MER014377 - family A8 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Family A8 unassigned peptidases	MER014377	88,75%	1.80e-72	A8/AC	signal peptidase II - <i>Escherichia coli</i>	Hidrolises de péptideos sinal de proteínas extracelulares	Membrana Citoplasmatica - intermembrana	Aspartato
MER031247 - family C14 non-peptidase homologues (Mesorhizobium sp loti)	Family C14 non-peptidase homologues	MER031247	86.84%	6.40e-116	C14X/	Familia C14 homólogos não-peptidase	endopeptidase citosol	Citoplasma	<i>Cisteina</i>
MER463229 - family C82 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp opportunistum)	Family C82 unassigned peptidases	MER463229	94.7%	5.10e-68	C82/CL	L,D-transpeptidase - <i>Enterococcus-type</i>	participam na síntese da parede bacteriana	Parede celular	<i>Cisteina</i>
MER234808 - family I1 unassigned peptidase inhibitors (Mesorhizobium sp ciceri)	Family I1 unassigned peptidases inhibitors	MER234808	92.31%	1.80e-17	I1	Agalychnis callidryas Kazal trypsin inibidor	inibidor de tripsina	Citoplasma	Inibidor
MER245604 - family I87 unassigned peptidase inhibitors (Escherichia coli)	Family I87 unassigned peptidases inhibitors	MER245604	59.3%	7.80e-79	I87	HfIC - <i>Klebsiella sp.</i>	inibidor de subunidade ribossomal 30S e 50S	Citoplasma	Inibidor

MER245615 - family I87 unassigned peptidase inhibitors (Escherichia coli)	Family I87 unassigned peptidases inhibitors	MER245615	48.2%	4.00e-52	I87	HflC - <i>Klebsiella sp.</i>	inibidor de subunidade ribossomal 30S e 50S	Citoplasma	Inibidor
MER409374 - family I87 unassigned peptidase inhibitors (Archaeoglobus fulgidus)	Family I87 unassigned peptidases inhibitors	MER409374	50.24%	6.50e-52	I87	QmcA proteina	inibidor de subunidade ribossomal 30S e 50S	Citoplasma	Inibidor
MER234890 - alanyl amino-peptidase (Mesorhizobium sp ciceri)	Alanyl amino-peptidase	MER234890	89.76%	2.00e-206	M1/MA	alanyl amino-peptidase - <i>Escherichia coli</i>	degradação de péptidos intracelulares gerados pela degradação de proteínas	membrana interna da célula; proteína de membrana periférica; citoplasmática	Metalo
MER014384 - vanX D-Ala-D-Ala dipeptidase (Mesorhizobium sp loti)	VanX D-Ala-D-Ala dipeptidase	MER014384	95.00%	2.30e-72	M15D/MD	zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase - <i>Streptomyces albus</i>	metabolismo do peptidoglicano	Parede celular	Metalo
MER015261 - YMXG peptidase (Mesorhizobium sp loti)	YMXG peptidase	MER015261	99.14%	1.10e-122	M16B/ME	pitrilysin - <i>Escherichia coli</i>	Degradacao de peptideos pequenos como glucagon e insulina	Periplasma	Metalo
MER026462 - subfamily M16B non-peptidase homologues (Mesorhizobium sp loti)	Subfamily M16B non-peptidase homologues	MER026462	96.65%	3.10e-116	M16B/ME	pitrilysin - <i>Escherichia coli</i>	Degradacao de peptideos pequenos como glucagon e insulina	Periplasma	Metalo
MER014371 - mitochondrial processing peptidase beta-subunit (Mesorhizobium sp loti)	Mitochondrial processing peptidase beta-subunit	MER014371	99.56%	1.00e-117	M16B/ME	pitrilysin - <i>Escherichia coli</i>	Degradacao de peptideos pequenos como glucagon e insulina	Periplasma	Metalo
MER016654 - PepB amino-peptidase (Mesorhizobium sp loti) [M17.004]	PepB amino-peptidase	MER016654	86,31%		M17/MF	Amino-peptidase PepB - <i>Escherichia coli</i>	Degradação de dipéptidos e tripéptidos intracelular.	Periplasma	Metalo
MER251584 - similar to cytosol amino-peptidase (Mesorhizobium sp opportunistum)	Similar to cytosol amino-peptidase	MER251584	86.49%	5.10e-194	M17/MF	semelhante a amino-peptidase citosol - <i>Rattus norvegicus</i>	Processamento e regulacao de proteínas intracelulares. Catalisa a remoção dos aminoácidos N-terminais.	Periplasma	Metalo
MER016655 - cisteinylglycinase (Mesorhizobium sp loti)	Cisteinylglycinase	MER016655	87.11%	7.60e-216	M17/MF	cisteinylglycinase - <i>Treponema denticola</i>	Processamento e regulacao de proteínas intracelulares. Catalisa a remoção dos aminoácidos N-terminais.	Periplasma	Metalo

MER014373 - dipeptidase AC (Mesorhizobium sp loti)	Dipeptidase AC	MER014373	94.6%	2.60e-174	M19/MJ	dipeptidase AC - <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	degradacao de dipeptideos	Membrana	Metalo
MER024185 - Mername-AA292 peptidase (Mesorhizobium sp loti)	Mername-AA292 peptidase	MER024185	92%	1.30e-85	M23/MO	Beta-lytic metallopeptidase - <i>Achromobacter lyticus</i>	Cleavage of N-acetylmuramoyl- -Ala	Secreted	Metalo
MER251337 - DipM g.p. (Mesorhizobium sp opportunistum)	DipM g.p.	MER251337	91.82%	4.90e-102	M23B/MO	lysostaphin - <i>Staphylococcus simulans</i>	Hidrolises de enlace entre Ac muramico - glucosamine	Parede celular	Metalo
MER024195 - Mername-AA292 peptidase (Mesorhizobium sp loti)	Mername-AA292 peptidase	MER024195	98.27%	2.00e-89	M23B/MO	lysostaphin - <i>Staphylococcus simulans</i>	Hidrolises de enlace entre Ac muramico - glucosamine	Parede celular	Metalo
MER024183 - Mername-AA292 peptidase (Mesorhizobium sp loti)	Mername-AA292 peptidase	MER024183	99.39%	2.60e-87	M23B/MO	Mername-AA292 peptidase - <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Hidrolises de enlace entre Ac muramico - glucosamine	Parede celular	Metalo
MER014372 - methionyl amino-peptidase 1 ((Escherichia)-type) (Mesorhizobium sp loti)	Methionyl amino-peptidase 1 ((Escherichia)-type)	MER014372	99.23%	3.00e-141	M24A/MG	methionyl amino-peptidase 1 - <i>Escherichia coli</i>	Hidrolises de peptideos e arilamida e liberacao de metionina	Membrana celular - Interna	Metalo
MER026528 - subfamily M24B non-peptidase homologues (Mesorhizobium sp loti)	Subfamily M24B non-peptidase homologues	MER026528	91.1%	4.00e-114	M24B/MG	amino-peptidase P - <i>Escherichia coli</i>	A libertação de qualquer aminoácido N-terminal, incluindo prolina a partir de um dipéptido e tripéptido	Citoplasma	Metalo
MER251939 - subfamily M24B non-peptidase homologues (Mesorhizobium sp opportunistum)	Subfamily M24B non-peptidase homologues	MER251939	99.58%	4.80e-127	M24B/MG	amino-peptidase P - <i>Escherichia coli</i>	A libertação de qualquer aminoácido N-terminal, incluindo prolina a partir de um dipéptido e tripéptido	Citoplasma	Metalo
MER026529 - subfamily M24B non-peptidase homologues (Mesorhizobium sp loti)	Subfamily M24B non-peptidase homologues	MER026529	93.28%	1.20e-116	M24B/MG	amino-peptidase P - <i>Escherichia coli</i>	A libertação de qualquer aminoácido N-terminal, incluindo prolina a partir de um dipéptido e tripéptido	Citoplasma	Metalo
MER026519 - subfamily M24B non-peptidase homologues	Subfamily M24B non-peptidase homologues	MER026519	99.16%	5.30e-128	M24B/MG	methionyl amino-peptidase 1 - <i>Escherichia-type</i>	Hidrolises de peptideos e arilamida e liberacao de metionina	Membrana celular - Interna	Metalo

(<i>Mesorhizobium</i> sp loti)									
MER250815 - amino-peptidase P1 (<i>Mesorhizobium</i> sp opportunistum)	Amino-peptidase P1	MER250815	92.72%	1.10e-267	M24B/MG	methionyl amino-peptidase 1 - <i>Escherichia coli</i>	Hidrolises de peptideos e arilamida e liberacao de metionina	Membrana celular - Interna	Metalo
MER026541 - subfamily M24B non-peptidase homologues (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Subfamily M24B non-peptidase homologues	MER026541	96.23%	8.90e-126	M24B/MG	Amino-peptidase P - <i>Escherichia coli</i>	modificacoes pós-traducional de proteinas	Citoplasma	Metalo
MER026527 - subfamily M24B non-peptidase homologues (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Subfamily M24B non-peptidase homologues	MER026527	95.65%	3.50e-115	M24B/MG	methionyl amino-peptidase 1 - <i>Escherichia</i> -type	Hidrolises de peptideos e arilamida e liberacao de metionina	Membrana celular - Interna	Metalo
MER234460 - PepS amino-peptidase (<i>Mesorhizobium</i> sp ciceri)	PepS amino-peptidase	MER234460	95.54%	3.20e-208	M29/MQ	PepS g.p. - <i>Streptococcus thermophilus</i>	Degradacao de peptideos pequenos (2 ate 10 aa)	Citoplasma	Metalo
MER014370 - family M32 unassigned peptidases (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Family M32 unassigned peptidases	MER014370	97.16%	1.70e-264	M32/MA	carboxypeptidase Taq - <i>Thermus aquaticus</i>	Degradacao de proteinas no extremo C-terminal	Citoplasma	Metalo
MER001902 - peptidyl-dipeptidase Dcp (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Peptidyl-dipeptidase Dcp	MER001902	94.56%	0.00e+00	M3A/MA	thimet oligopeptidase - <i>Rattus norvegicus</i>	degradacao de peptideos de 20 aa	Citoplasma	Metalo
MER252922 - subfamily M3B unassigned peptidases (<i>Mesorhizobium</i> sp opportunistum)	Subfamily M3B unassigned peptidases	MER252922	98.58%	7.60e-152	M3B/MA	oligopeptidase F - <i>Lactococcus lactis</i>	Hidrolise de peptideos contendo entre 7 e 17 aminoácidos com um tamanhos especifico.	Citoplasma	Metalo
MER296340 - subfamily M48B non-peptidase homologues (<i>Mesorhizobium</i> sp amorphae)	Subfamily M48B non-peptidase homologues	MER296340	91.8%	4.00e-123	M48B/MA	HtpX peptidase - <i>Escherichia coli</i>	Degaradacao de proteinas de membrana	Membrana celular - Interna	Metalo
MER026547 - subfamily M48C unassigned peptidases (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Subfamily M48C unassigned peptidases	MER026547	93.58%	3.70e-127	M48C/MA	Oma1 peptidase - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	endopeptidase	extracelular	Metalo

MER026546 - family M48 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Family M48 unassigned peptidases	MER026546	92.31%	1.10e-111	M48X/MA	HtpX peptidase - <i>Escherichia coli</i>	Degradacao de proteinas de membrana	Membrana celular - Interna	Metalo
MER234855 - subfamily M50B unassigned peptidases (Mesorhizobium sp ciceri)	Subfamily M50B unassigned peptidases	MER234855	88.12%	2.50e-162	M50B/MM	fator de esporulação SpoIVFB - <i>Bacillus subtilis</i>	degradacao de proteinas na parede celular para a formacao da esporos	Membrana celular - Interna	Metalo
MER013983 - murein endopeptidase (Mesorhizobium sp loti)	Murein endopeptidase	MER013983	96.98%	1.10e-145	M74/MD	Mureine peptidase - <i>Escherichia coli</i>	degradacao de Ala-D-Glu-meso-diaminopimelate	membrana plasmatica - externa	Metalo
MER510185 - DmpA amino-peptidase (Rhizobium sp. IRBG74)	DmpA amino-peptidase	MER510185	48.56%	4.00e-59	P1/PE	DmpA amino-peptidase - <i>Ochrobactrum anthropi</i>	degradacao de peptideos no extremo N-terminal	Citoplasma	Mixed
MER500340 - BapF peptidase (Pseudomona sp.)	BapF peptidase	MER500340	48.21%	2.50e-66	P1/PE	DmpA amino-peptidase - <i>Ochrobactrum anthropi</i>	degradacao de peptideos no extremo N-terminal	Citoplasma	Mixed
MER510083 - pantetheinyl hydrolase ThnT precursor (Rhizobium sp. IRBG74)	Pantetheinyl hydrolase ThnT precursor	MER510083	45.57%	1.30e-67	P1/PE	DmpA amino-peptidase - <i>Ochrobactrum anthropi</i>	degradacao de peptideos no extremo N-terminal	Citoplasma	Mixed
MER013935 - family S11 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Family S11 unassigned peptidases	MER013935	87%	6.40e-171	S11/SE	D-alanyl-d-alanine carboxypeptidase - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	liberacao da alanina do peptidoglicano no extremo C-terminal	membrana plasmatica - externa	Serine
MER252131 - family S11 non-peptidase homologues (Mesorhizobium sp opportunistum)	Family S11 non-peptidase homologues	MER252131	94.69%	1.10e-177	S11/SE	D-alanyl-d-alanine carboxypeptidase - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	liberacao da alanina do peptidoglicano no extremo C-terminal	membrana plasmatica - externa	Serine
MER352127 - family S11 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp australicum)	Family S11 unassigned peptidases	MER352127	94.78%	2.30e-111	S11/SE	D-alanyl-d-alanine carboxypeptidase - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	liberacao da alanina do peptidoglicano no extremo C-terminal	membrana plasmatica - externa	Serine
MER013938 - family S11 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Family S11 unassigned peptidases	MER013938	98.05%	4.60e-129	S11/SE	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase A - <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	liberacao da alanina do peptidoglicano no extremo C-terminal	membrana plasmatica - externa	Serine
MER014352 - peptidase Clp (type 1) (Mesorhizobium sp loti)	Peptidase Clp (type 1)	MER014352	98.99%	1.00e-101	S14/SK	Peptidase Clp (type 1) - <i>Escherichia coli</i>	endopeptidases - degradacao e regulacao de proteinas - dependentes de ATP	Citoplasma	Serine

MER016653 - peptidase Clp (type 1) (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Peptidase Clp (type 1)	MER016653	100%	6.00e-104	S14/SK	peptidase Clp (type 1) - <i>Escherichia coli</i>	endopeptidases - degradacao e regulacao de proteinas - dependentes de ATP	Citoplasma	Serine
MER054907 - family S14 non-peptidase homologues (<i>Nitrobacter</i> winogradskyi)	Family S14 non- peptidase homologues	MER054907	71.29%	1.90e-77	S14/SK	peptidase Clp (type 1) - <i>Escherichia coli</i>	endopeptidases - degradacao e regulacao de proteinas - dependentes de ATP	Citoplasma	Serine
MER013944 - Lon-A peptidase (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Lon-A peptidase	MER013944	99.6%	4.60e-129	S16/SJ	Lon-A peptidase - <i>Escherichia coli</i>	endopeptidases - degradacao e regulacao de proteinas - dependentes de ATP	Citoplasma	Serine
MER014364 - subfamily S1A unassigned peptidases (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Subfamily S1A unassigned peptidases	MER014364	92.2%	5.00e-148	S1A/PA	chymotrypsin A - <i>Bos</i> <i>taurus</i>	endopeptidases - degradacao e regulacao de proteinas	Citoplasma	Serine
MER016326 - subfamily S1B unassigned peptidases (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Subfamily S1B unassigned peptidases	MER016326	98.56%	2.50e-114	S1B/PA	glutamyl peptidase I - <i>Staphylococcus aureus</i>	degradacao de proteina extracelulares	Secretada	Serine
MER016327 - subfamily S1B unassigned peptidases (<i>Mesorhizobium</i> sp loti)	Subfamily S1B unassigned peptidases	MER016327	99.11%	2.80e-122	S1B/PA	glutamyl endopeptidase I - <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	degradacao de proteina extracelulares	Secretada	Serine
MER252019 - subfamily S1B non- peptidase homologues (<i>Mesorhizobium</i> sp opportunatum)	Subfamily S1B non- peptidase homologues	MER252019	91.53%	2.70e- 117	S1B/PA	toxina esfoliativa ExhD - <i>Staphylococcus hyicus</i>	degradacao de proteina extracelulares	Secretada	Serine
MER234813 - HtrA peptidase (<i>Mesorhizobium</i> sp ciceri)	HtrA peptidase	MER234813	97.56%	3.70e-120	S1C/PA	DegP peptidase - <i>Escherichia coli</i>	Degrada transitoriamente proteinas desnaturadas e desdobrou ou deformadas que se acumulam no periplasma seguinte choque térmico ou de outras condições de estresse . DegP também está	Membrana celular - Interna	Serine

MER252342 - DegQ peptidase (Mesorhizobium sp opportunistum)	DegQ peptidase	MER252342	96.65%	1.10e-175	S1C/PA	chymotrypsin A (cattle-type) - <i>Bos taurus</i>	envolvida na biogénese de proteínas de membrana externa (OMP parcialmente dobrados). endopeptidases - degradacao e regulacao de proteínas	secretada	Serine
MER250857 - DegQ peptidase (Mesorhizobium sp opportunistum)	DegQ peptidase	MER250857	86.67%	2.80e-177	S1C/PA	DegP peptidase - <i>Escherichia coli</i>	Degrada transitoriamente proteínas desnaturadas e desdobrou ou deformadas que se acumulam no periplasma seguinte choque térmico ou de outras condições de estresse . DegP também está envolvida na biogénese de proteínas de membrana externa (OMP parcialmente dobrados).	Membrana celular - Interna	Serine
MER234833 - DegQ peptidase (Mesorhizobium sp ciceri)	DegQ peptidase	MER234833	92.33%	8.70e-167	S1C/PA	DegP peptidase - <i>Escherichia coli</i>	Degrada transitoriamente proteínas desnaturadas e desdobrou ou deformadas que se acumulam no periplasma seguinte choque térmico ou de outras condições de estresse . DegP também está envolvida na biogénese de proteínas de membrana externa (OMP parcialmente dobrados).	Membrana celular - Interna	Serine
MER208157 - DegQ peptidase (Mesorhizobium sp opportunistum)	DegQ peptidase	MER208157	90.61%	1.90e-155	S1C/PA	DegQ peptidase - <i>Escherichia coli</i>	Degrada transitoriamente proteínas desnaturadas e desdobrou ou deformadas que se acumulam no periplasma seguinte	periplasma	Serine

MER013948 - repressor LexA (Mesorhizobium sp loti)	Repressor LexA	MER013948	100%	7.80e-56	S24/SF	repressor LexA - <i>Escherichia coli</i>	choque térmico ou de outras condições de estresse . DegP também está envolvida na biogênese de proteínas de membrana externa (OMP parcialmente dobrados). Degrada a LexA , levando a desrepressão do regulão SOS e, eventualmente, a reparação do ADN.	citosol	Serine
MER026322 - subfamily S26A unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Subfamily S26A unassigned peptidases	MER026322	100%	1.50e-116	S26A/SF	sipC g.p. - <i>Bacillus caldolyticus</i>	Degradador de peptideo sinal	Membrana celular - externa	Serine
MER026348 - family S33 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Family S33 unassigned peptidases	MER026348	94.35%	2.60e-158	S33/SC	prolyl amino-peptidase - <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	degrada substratos ricos em prolina	Periplasma	Serine
MER013951 - prolyl amino-peptidase (Mesorhizobium sp loti)	Prolyl amino-peptidase	MER013951	97.11%	3.60e-170	S33/SC	prolyl amino-peptidase - <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	degrada substratos ricos em prolina	Periplasma	Serine
MER250743 - C-terminal processing peptidase-3 (Mesorhizobium sp opportunistum)	C-terminal processing peptidase-3	MER250743	99.69%	2.10e-165	S41A/SK	C-terminal processing peptidase-1 - <i>Escherichia coli</i>	degradador de proteínas incorrectamente sintetizadas com a etiqueta Leu-Ala-Ala	Periplasma	Serine
MER036999 - subfamily S49C unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Subfamily S49C unassigned peptidases	MER036999	81.77%	1.90e-77	S49C/SK	sub familia S49C peptidases não atribuídas	degradador de peptideos sinal	Membrana celular - externa	Serine
MER026387 - RhoII peptidase Mesorhizobium sp loti	RhoII peptidase	MER026387	86%	1.20e-100	S54/ST	RhoII peptidase - <i>Haloferax volcanii</i>	Glicosilacao de proteínas de membrana	Membrana celular - externa	Serine
MER013931 - prolyl endopeptidase (Mesorhizobium sp loti)	Prolyl endopeptidase	MER013931	97.84%	2.50e-146	S9A/SC	prolyl endopeptidase - <i>Myxococcus xanthus</i>	Degradacao de proteínas	Periplasma	Serine
MER025184 - At1g69020 g.p. (Mesorhizobium sp loti)	At1g69020 g.p.	MER025184	93.73%	1.60e-144	S9A/SC	prolyl endopeptidase - <i>Myxococcus xanthus</i>	Degradacao de proteínas	Periplasma	Serine

MER323710 - PfHsIV peptidase (Mesorhizobium sp australicum)	PfHsIV peptidase	MER323710	90.64%	2.70e-76	T1B/PB	HslUV peptidase - <i>Escherichia coli</i>	Proteossoma - degradacao de proteinas	Citoplasma	Treonia
MER014380 - gamma- glutamyltransferase 1 (bacterial-type) (Mesorhizobium sp loti)	Gamma- glutamyltransferase 1 (bacterial-type)	MER014380	91.32%	1.60e-268	T3/PB	gamma- glutamyltransferase 1 - <i>Escherichia coli</i>	degradacao de glutaciona	periplasma	Treonia
MER026400 - family T3 unassigned peptidases (Mesorhizobium sp loti)	Family T3 unassigned peptidases	MER026400	88.78%	6.20e-253	T3/PB	gamma- glutamyltransferase 1 - <i>Escherichia coli</i>	degradacao de glutaciona	periplasma	Treonia