

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Carina Louise Drescher

**ESTUDOS PARA A CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE
TRANSGLUTAMINASE DE *Paenibacillus* sp. JDR-2 EM *Pichia pastoris***

Porto Alegre

2016

Carina Louise Drescher

**ESTUDOS PARA A CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE
TRANSGLUTAMINASE DE *Paenibacillus* sp. JDR-2 EM *Pichia pastoris***

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Porto Alegre

2016

Carina Louise Drescher

**ESTUDOS PARA A CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE
TRANSGLUTAMINASE DE *Paenibacillus* sp. JDR-2 EM *Pichia pastoris***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cíntia de David

Departamento de Tecnologia de Alimentos - UFRGS

Profa. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - UFRGS

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Departamento de Tecnologia de Alimentos - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marco Antônio Záchia Ayub pela orientação, por fornecer todas as ferramentas necessárias para a realização do trabalho e por acreditar nesse projeto.

Ao professor Plinho Fransisco Herz do ICTA-UFGRS por disponibilizar seus equipamentos para as análises, além de se mostrar sempre disponível para discutir o andamento do projeto.

Ao professor Rafael Costa Rodrigues, por ceder reagentes para a realização do teste da transglutaminase.

Ao CNPq pelo auxílio no projeto e pela bolsa provida.

Aos amigos do laboratório 212 e 216 por me auxiliarem em todas as minhas dúvidas, por me ajudarem em todas as técnicas e estimularem a sempre seguir em frente mesmo que os resultados não fossem os esperados.

A todos do laboratório 210, em especial a Jéssie da Natividade Schöffner por ter me ensinado e auxiliado sempre que precisei

Ao Matheus Quintana Barreto por ter tido paciência e me ensinado cada processo empregado neste projeto, além de conduzir tudo com leveza, tornando tudo mais simples.

Aos meus amigos que sempre me acompanharam e auxiliaram de alguma forma, por todas as palavras de incentivo, pelos momentos de descontração e por me fazerem crescer como pessoa.

Aos meus pais por sempre me apoiarem e me darem condições de realizar a graduação sem maiores preocupações. Obrigada por sempre me ajudarem a superar as dificuldades e ir em busca de aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Ao meu irmão e a Cathy por todas as inúmeras palavras de incentivo, pelo carinho e pelo auxílio, mesmo de longe. Obrigada por sempre expandirem meu ponto de vista, por todas as experiências que vivenciamos juntos, por todos os conselhos e apoio que me deram.

Aos meus colegas pela troca de conhecimento, conselhos, sugestões e pelo companherismo de sempre.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A transglutaminase é uma enzima de grande importância para a indústria de alimentos, uma vez que catalisa a formação de reações de acil-transferência entre grupos γ -carboxamida em resíduos de glutamina, provocando alterações nas propriedades protéicas. O *Paenibacillus* sp. JDR-2 é uma bactéria gram-positiva, que está relacionada filogeneticamente com o gênero *Bacillus*, assim como com outros microorganismos produtores de transglutaminase, portanto, supõe-se que este é um possível produtor desta enzima. O trabalho teve o intuito de identificar genes codificadores de transglutaminase no genoma do *Paenibacillus* sp. JDR-2 *in silico* e expressar algumas dessas sequências em sistema heterólogo. Foi realizada uma busca por genes codificadores de transglutaminase através da procura de ORFS que continham domínio de transglutaminase, estas foram anotadas e depositadas no NCBI. Foram verificadas a presença de dez possíveis transglutaminases codificadas pelo genoma do *Paenibacillus* sp. JDR-2, sendo que uma desta não apresentava aminoácido iniciador, e, portanto, foi descartada. As sequências 4870 e 5011 foram escolhidas para utilização neste trabalho, uma vez que o peso molecular preditos, correspondem às características encontradas nas transglutaminases bacterianas. Primers foram desenhados para a amplificação destas sequências e deveriam ser clonados no vetor pPICZ α . Primeiramente, tentou-se clonar pelo método de ligação em *E. coli* DH10B, entretanto, as colônias formadas não apresentaram evidências que continham os insertos escolhidos. Após, foi realizada a clonagem por CPEC, já que esta técnica apresenta maior especificidade. Mais uma vez a clonagem não foi efetiva, não apresentando o crescimento de colônias. Os próximos passos seriam realizar novas tentativas e, se estas fossem positivas, realizar a transformação dos plasmídeos purificados em *Pichia pastoris*, considerando este sistema mais eficiente para modificações pós-traducionais.

Palavras chave: transglutaminase, *Paenibacillus* sp. JDR-2

ABSTRACT

Transglutaminase is an important enzyme that catalyzes acyl-transfer reaction between γ -carboxamide groups of glutamine residues causing modifications in the protein properties. *Paenibacillus* sp. JDR-2 is a gram-positive bacterium that is phylogenetically related with *Bacillus* gender and to other microorganisms that produce transglutaminase. Therefore this microorganism could be a possible producer of this enzyme. The aim of the present research was to identify possible genes sequences encoding transglutaminase, *in silico*, in the *Paenibacillus* sp. JDR-2 genome and to express some of them in a heterologous system. We searched for predicted genes encoding transglutaminase domains from *Paenibacillus* sp. JDR-2, which were noted and deposited in the NCBI database. There were ten observed possible transglutaminases encoded by the genome of *Paenibacillus* sp. JDR-2, but one of them did not present an essential amino acid (primer), being discharged. In this study, the sequences 4870 and 5011 were chosen, since they present the predicted molecular weight, which corresponds to features found in bacterial transglutaminases. Primers were designed for the amplification of these sequences, which could be cloned into the vector pPICZ α . First, we tried to clone by ligation in *E. coli* DH10B; however, the colonies showed no evidence of containing the chosen inserts. Therefore, we tried the cloning by CPEC methodology, since this technique introduces higher specificity. Again cloning was not effective, showing no growth of colonies. The next step would be to perform new attempts at cloning, and, if positive, performing the processing of purifying the plasmids and introduce them in *Pichia pastoris*, considering this system more efficient for post-translational modifications.

Key words: transglutaminase, *Paenibacillus* sp. JDR-2

LISTA DE ABREVIACOES

mTG	Transglutaminase microbiana (microbial transglutaminase)
ORF	Fase aberta de leitura (open reading frame)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
pI	Ponto isoelétrico
PCR	Reação em cadeia de polimerase (polymerase chain reaction)
Z-gln-gly	Carbobenzoxi-glutaminil-glicinil
pH	Potencial Hidroeninico
CPEC	Clonagem por polimerase de extensão circular(Circular Polymerase Extension Cloning)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração das reações catalisadas pela transglutaminase.....	12
Figura 2. Representação da estrutura da mTG.....	13
Figura 3. Representação vetor pPICZ α e os segmentos que o compõem.....	22
Figura 4. Mapa do plasmídeo 4870 construído.....	23
Figura 5. Mapa do plasmídeo 5011 construído.....	23
Figura 6. ORFs de <i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2 anotadas como transglutaminase.....	27
Figura 7. Amplificação das sequências 4870 e 5011.....	29
Figura 8. Resultado da clivagem com enzimas de restrição.....	29
Figura 9. Resultado do PCR das colônias.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers desenhados para amplificação das sequências 4870 e 5011 de <i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2.....	20
Tabela 2: ponto isoelétrico (pI) e peso molecular estimado das sequências peptídicas preditas.....	28

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Transglutaminases.....	12
1.2 Aplicação das transglutaminases na indústria.....	13
1.3 <i>Paenibacillus sp. JDR-2</i>	15
1.4 Expressão de proteínas heterólogas.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVO.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Materiais utilizados.....	19
4.2 Busca por sequências codificadoras de transglutaminase.....	19
4.3 Extração de DNA genômico.....	20
4.4 Desenho de iniciadores e amplificação das sequências de interesse.....	20
4.5 Clivagem de sequências amplificadoras por PCR e de vetores com enzimas de restrição.....	21
4.6 Clonagem das sequências codificadoras das proteínas putativas 4870 e 5011 de <i>Paenibacillus sp. JDR-2</i> em vetor de expressão <i>PpicZα</i>	22
4.7 Preparação de células competentes.....	24
4.8 Transformação da cepa de <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	24
4.9 Transformação de diferentes cepas de <i>Pichia Pastoris</i>	25
4.10 Seleção e Análise dos plasmídeos recombinantes.....	25
4.11 Teste de atividade enzimática.....	25
5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	34

8. PERSPECTIVAS.....	35
9. REFERÊNCIAS.....	36
APÊNDICE A.....	39
APÊNDICE B.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transglutaminases

Transglutaminases são enzimas que catalisam reações de acil-transferência (entre grupos γ -carboxamida em resíduos de glutamina), deamidações e ligações cruzadas intra e intermoleculares entre proteínas e peptídeos (Figura 1) (Yokoyama et al., 2004). Dessa forma, altera as propriedades químicas e físicas das proteínas, além de atuar em funções biológicas.

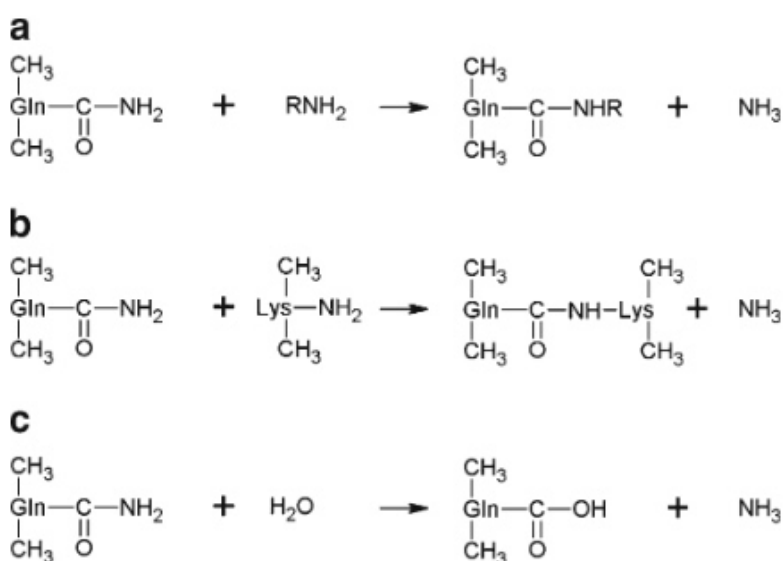


Figura 1. Ilustração das reações catalisadas pela transglutaminase. Em (a) está representada reação de acil transferência, (b) ligação cruzada entre resíduos de Gln e Lys e peptídeos e (c) reação de desaminação. Fonte: Marek Kieliszek & Anna Misiewicz, 2004.

As transglutaminases estão presentes em vertebrados, invertebrados, plantas e diversos microorganismos, sendo responsáveis por mecanismos de coagulação, cicatrização, modificação das proteínas do cloroplasto e por mecanismos de apoptose. (Serafini-Fracassini et al., 2008) (Yang et al., 2011).

Esta enzima foi descoberta em 1957 por Heinrich Waelsch, sendo primeiramente isolada do fígado do porquinho-da-índia, o qual possui grande quantidade de transglutaminase. Novas fontes animais foram exploradas, entretanto, estas não apresentavam quantidade significativa da enzima, além de necessitarem de adição de

trombina para ativá-la (Beninati et al., 2009). Portanto, microorganismos produtores de transglutaminase foram investigados e em 1989 foi descrita a transglutaminase microbiana (mTG) produzida por *Streptovericillium mobaraense* (Ando et al., 1989).

A transglutaminase microbiana apresenta 331 aminoácidos, peso molecular de 37,9 kDa e apresenta atividade ótima em pH de 5 a 8. A mTG de *S. mobaraense* é composta por oito folhas-beta circundadas por onze alfa-hélices (Figura 2). Ela adota a forma de disco e apresenta uma fenda, onde está localizado seu sítio catalítico, caracterizado pelo resíduo Cys64 (Kashiwagi et al., 2002). Esta é inibida por Zn^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} e Pb^{+2} , os quais se ligam no cisteína do centro catalítico (Ando et al, 1989).

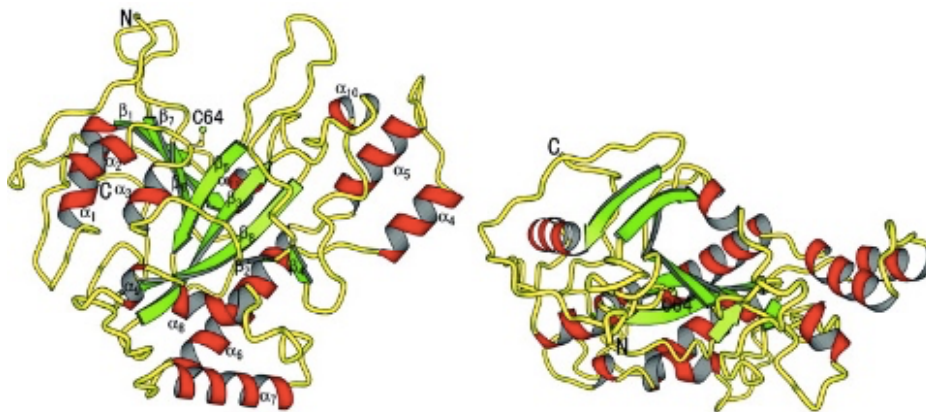


Figura 2. Representação da estrutura da mTG. Imagem da esquerda visão frontal e da direita visão superior da proteína. Fonte: Kashiagi et al., 2002.

Estas características, somadas a independência de cálcio, a maior velocidade de reação e baixo peso molecular, tornam a transglutaminase microbiana muito vantajosa para uso industrial (Kashiagi et al., 2002).

1.2 Aplicações de transglutaminases na indústria

As reações catalisadas pela transglutaminase provocam modificações nas propriedades químicas e físicas das proteínas, dentre as quais aumento da viscosidade, estabilidade térmica e elasticidade (Kieliszek M. & Misiewicz A., 2014). Estas alterações aplicadas para a

indústria de alimentos, tornaram-se muito importantes, agindo como agentes de texturização e formação de biopolímeros (Carvajal et al. 2011). Além disso, elas têm grande potencial biológico, atuando em diferentes cascatas metabólicas como a coagulação, regulando apoptose e crescimento celular, assim como na prevenção de alergias, despertando também o interesse da indústria farmacêutica (Lorand and Graham 2003).

Em relação aos alimentos, esta enzima se torna imprescindível para o aumento da qualidade e valor nutricional do mesmo, pela possibilidade de adição de aminoácidos essenciais (Ajinomoto, 2013; Ali et al 2010; Damodaran & Agyare, 2013; Kuraishi et al., 2001), assim como pode diminuir o potencial alergênico de algumas proteínas, como na transformação de alfa-caseína em uma caseína de peso molecular mais elevado, que diminui a possibilidade de reação imune cruzada (Yamauchi et al., 1991). Ainda, diferentes tipos de proteínas podem ser substrato para a transglutaminase, possibilitando alteração em alimentos cárneos, laticínios, derivados de soja e cereais (Bönisch et al 2007; Hong & Xiong, 2012).

A transglutaminase produzida por mamíferos foi primeiramente estudada, por estar relacionada a mecanismo de coagulação sanguínea, uma vez que esta produz ligações cruzadas entre as proteínas, estancando o fermento e são catalisadas pelo fator XIIIa, uma forma ativada de transglutaminase no plasma (Chung et al., 1974 e Hornyak et al., 1989). Atualmente, sabe-se da importância da transglutaminase em doenças crônicas inflamatórias, no reparo de tecidos, no desenvolvimento de reações auto-imunes, em doenças degenerativas crônicas, além de provocar mudanças nas proteínas de membrana gp41 e gp120, as quais são responsáveis pela penetração do vírus HIV na célula (Shleikin and Danilov 2011; Tabolacci et al. 2012). Outrossim, sabe-se que a indução de atividade de transglutaminase intracelular pode ter relevantes propriedades anti-neoplásicas (Lentini et al, 2010).

No início dos anos 80, transglutaminases de origem animal foram utilizadas para o melhoramento de alimentos, entretanto, de forma limitada, uma vez que há quantidade de enzima extraída não era significativa para aplicação industrial. (Motoki et al., 1998). Tal fato, deu origem a busca de novas fontes alternativas de transglutaminases e iniciou-se a produção de transglutaminase recombinante. (Ando et al., 1989).

Apesar dos esforços e avanços nas técnicas em biologia molecular, a produção de transglutaminase recombinante apresenta grandes dificuldades técnicas, além de alto custo de recuperação da enzima. Ainda hoje a transglutaminase de *S. mobaraensis* é a principal fonte

da enzima para indústria (Arrizubieta M. J., 2007), sendo produzida comercialmente somente por uma empresa. Portanto é necessário que novas fontes de transglutaminase sejam investigadas, a fim de manter e melhorar a qualidade de nossos produtos protéicos e alavancar resultados na indústria farmacêutica.

1.3 *Paenibacillus* sp JDR-2

O *Paenibacillus* é uma bactéria gram-positiva isolada de tronco da árvore-do-âmbar (*Liquidambar styraciflua*) que possui várias enzimas de degradação de xilano para a completa utilização dos polissacarídeos das plantas (Chow et al., 2012). Seu genoma apresenta cerca de 7Mb de tamanho e cerca de 6.400 genes, dos quais dez apresentam domínios de transglutaminase.

Análises filogenéticas demonstraram que o *Paenibacillus* sp. JDR-2 está relacionado com o gênero *Bacillus*, e que ambos produzem esporos. Além disso, sabe-se que a transglutaminase está envolvida no processo de esporulação por *Bacillus subtilis* e como tal, o *Paenibacillus* sp. JDR-2 pode ser produtor desta enzima (Kobayashi et al., 1996)

1.4 Expressão de proteínas heterólogas

A fim de expressar a transglutaminase recombinante de maneira efetiva, deve-se escolher um microorganismo com condições simples de crescimento, que o faça rapidamente sem produzir substâncias tóxicas, e principalmente, que não seja patogênico. Além disso, é importante que este expresse a proteína de forma eficiente, a fim de facilitar a recuperação e purificação (Soetaert and Vandamme, 2010).

Normalmente são utilizados os microorganismos *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* para estes fins, entretanto ambos apresentam limitações. Outros estudos já demonstraram que ao utilizar *E. coli*, a transglutaminase acumula-se dentro do citoplasma da célula em corpos de inclusão, sendo, então necessário outros métodos de *refolding* protéico (Salis et al, 2015). Já a *S. cerevisiae* apresenta problemas na secreção de proteínas heterólogas, além de comumente hiperglicosilá-las (Wan, T. Y. et al, 2013).

Em contrapartida, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é vantajosa para uso industrial, uma vez que possui um forte e altamente regulável promotor álcool oxidase 1

(AOX1) e apresenta alta capacidade de secreção de proteínas recombinantes. Ainda, o sistema de expressão da *P. pastoris* permite que a proteína sofra rearranjos pós traducionais como a glicosilação. (Potvin et al, 2012). Para, então, realizar uma expressão heteróloga eficiente, seleciona-se plasmídeos de interesse, como o pPICZ α . Este plasmídeo apresenta o qual contém uma cauda de histidina que auxilia na purificação do proteína de interesse. Este é usado em *P. pastoris*, apresenta cerca de 3,600pb, conta com o promotor AOX1, com gene de resistência a Zeocina e cauda de hexahistidina a fim de facilitar o processo de purificação da proteína expressa (TermoFischer, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, as transglutaminases são imprescindíveis na indústria de alimentos, alterando as propriedades físicas e químicas do mesmo a fim de melhorar sua qualidade e valor nutricional. Da mesma forma, esta enzima pode ser utilizada com o intuito de prevenir reações alérgicas, que são comuns em algumas classes de alimentos. Ainda, a indústria farmacêutica tem investigado várias aplicações desta enzima, inclusive como o seu potencial anti-neoplásico. Apesar de todos os benefícios, a obtenção desta enzima é de alto custo e não apresenta alto rendimento e, por isso, é muito importante investigar novos microorganismos produtores da mesma e desenvolver novas técnicas que facilitem sua produção e purificação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Expressar transglutaminase bacteriana obtida de *Paenibacillus sp. JDR-2* em *Pichia Pastoris*.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Identificar sequências codificadoras de transglutaminase em *Paenibacillus sp. JDR-2*.
- 3.2.2 Amplificar e clonar estas sequências em vetor de expressão pPICza.
- 3.2.3 Transformar diferentes cepas de *Pichia pastoris*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

Paenibacillus sp. JDR-2 foi obtido através do Banco Genético de *Bacillus* (Columbus, OH, EUA). As cepas comerciais de *E. coli* DH10B e as cepas X-33, GS115 e KM71 de *Pichia pastoris* foram obtidas da ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EUA). O vetor pPIC α foi obtido da empresa Novagen (Darmstadt, Alemanha).

As enzimas T4 DNA ligase e Taq polimerase Platinum hot-start, os kits Purelink® Quick Plasmid Miniprep® e Purelink® Quick Gel Extraction and PCR Purification e o corante SYBR® Safe DNA Gel Stain foram obtidos da empresa ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EUA). O kit Wizard® DNA Genomic Purification e a tripsina foram obtidos da Promega (Madison, WI, EUA). As enzimas de restrição KpnI, Xba e EcoRI foram obtidas New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). Os primers foram sintetizados pela empresa Invitrogen (CA, EUA).

Lisozima, ácido-L-glutâmico-Y-hidroxâmico, zeocina, cloreto de cálcio (CaCl₂), glicerol, cloreto de sódio (NaCl), tris, Z-gln-gly, glicina, glutationa reduzida foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Metanol, ácido clorídrico, triptona e extrato de levedura foram obtidos da empresa Neogen (Lansing, MI, EUA). TEMED foi obtido da Acros Organics (New Jersey, NY). Ácido tricloroacético e cloreto de ferro (III) foram comprados da Synth).

4.2 Busca por sequências codificadoras de transglutaminase

A busca por sequências codificadoras de transglutaminase no genoma de *Paenibacillus* sp. JDR-2 deu-se através da procura por fases abertas de leitura (ORFs) anotadas a partir da sequência do genoma desta bactéria depositadas no NCBI. As sequências nucleotídicas geradas foram traduzidas a partir do portal de recursos de bioinformática ExpASy (<http://web.expasy.org/translate/>) e a análise dos domínios presentes nestas sequências foi feita através do banco de dados de domínios conservados (CDD) no NCBI. As sequências nucleotídicas foram analisadas por BLASTp a fim de verificar similaridade com outras transglutaminases descritas, além disso, foi verificado a presença de peptídeo sinal a partir do programa SignalP4.1 com o intuito de prever se a proteína é secretada pela célula. Ainda,

foi realizado inferência da massa molecular e do ponto isoelétrico (pI) de cada umas das proteínas codificadas usando o algoritmo Compute pI/mW no ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/).

4.3 Extração de DNA genômico

O DNA de *Paenibacillus* sp. JDR-2 foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic Purification Kit. Foi realizada incubação prévia com lisozima e após foi seguido o protocolo de extração de material genômico de bactérias Gram-positivas.

4.4 Desenho de iniciadores e amplificação das sequências de interesse

As sequências nucleotídicas das fases de leitura (ORFs) 4870 e 5011 do genoma do *Paenibacillus* sp. JDR-2, que codificam supostamente uma transglutaminase, foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Portanto, oligonucleotídeos iniciadores (primers) foram desenhados, a partir do programa SnapGene, de maneira que a temperatura de anelamento preditiva dos primers com o genoma do microorganismo ficasse entre 50 e 60C. Foram adicionadas sequências de restrição para as enzimas KpnI, EcoRI e Xba, na extremidade 5' de cada um dos primers, direto (forward) e reverso (reverse), assim como a adição de cinco bases aleatória (destacadas em negrito) para facilitar a clonagem.

Tabela 1: primers desenhados para a amplificação das sequências 4870, 5011 de *Paenibacillus* sp. JDR-2.

Primers	Sequências
Pjdr_5011F	5' CCGTCTCGGATCG gtacc ATGCGAAAAACAGGTTGGAAAATAGCG
Pjdr_5011R	5' ATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGT ctaga TGATAATCCAGCTGAACCTG
Pjdr_4870F	5' AGAAAAGAGAGGCTGAAGCT Gaattc ATGATGGAATGGATTCGCGCTGGGAC
Pjdr_4870R	5' AGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGT ctaga ACTGCCCGGATATGAGTCTTG

As condições de amplificação compreenderam: 1) 5 minutos a 95°C para a ativação da enzima Taq Polimerase hot-start; 2) 1 minuto a 95°C para desnaturação das fitas de DNA; 3)

1 minuto a 60°C para o anelamento dos primers; 4) 1 minuto e 15 segundos a 72°C para amplificação dos primers; 5) repetição dos passos de 2 a 4 por 35 vezes e 6) 10 minutos extras a 72°C para amplificação de qualquer primer que tenha restado. Os produtos da PCR foram verificados por gel de agarose 1%, corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain e visualizados no sistema de fotodocumentação L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia). A ORF 4870 foi amplificada com os primers Pjdr_4870R e Pjdr_4870F e a ORF 5011 foi amplificada com os primers Pjdr_5011R e Pjdr_5011F.

A purificação dos fragmentos amplificados foi feita utilizando-se o kit Purelink Quick Gel Extraction and PCR Purification, utilizando aproximadamente 100uL de reação de PCR, seguindo protocolo do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados com espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific).

4.5 Clivagem de sequências amplificadoras por PCR e de vetores com enzimas de restrição

Como forma de criar extremidades coesivas e facilitar o processo de clonagem, tanto os insertos amplificados por PCR, quanto o vetor selecionado, foram clivados com enzimas de restrição KpnI, XbaI e EcoRI.

Para realizar a clivagem das sequências 4870 amplificada por PCR, incubou-se 35ng desta com 1uL da enzima EcoRI, 1uL da enzima XbaI e 3uL de tampão NEB 2.1, de acordo com as instruções do fabricante. Da mesma forma, a sequência 5011 foi incubada com 1uL da enzima KpnI e 1uL da enzima XbaI e 5uL de tampão NEB 2.1. A reação ocorreu em um período de 3h a 37°C seguidos de 20 minutos a 65°C para desnaturação das enzimas de restrição. Os produtos clivados foram verificados em gel de agarose 1%, purificados por kit Purelink Quick Gel Extraction and PCR Purification, quantificados em espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific) e armazenados a -20°C. Da mesma forma, 10ng do vetor pPICZα foi incubado com 1uL de cada enzima com 1uL de tampão 2.1 NEB, seguindo as mesmas condições dos insertos, e posteriormente verificados, purificados e quantificados.

4.6 Clonagem das sequências codificadoras das proteínas putativas 4870 e 5011 de *Paenibacillus* sp. JDR-2 em vetor de expressão PpicZα.

Para realizar a expressão heteróloga das sequências de *Paenibacillus sp* JDR-2 em *Pichia pastoris*, o vetor pPICZ α foi o escolhido. Este vetor possui 3329 pb, opera sob ação do promotor AOX1, possui gene que confere resistência a Zeocina para a seleção de transformantes e uma cauda de hexahistidinas na extremidade carbóxi do polipeptídeo formado, o que facilita a purificação das proteínas expressas.

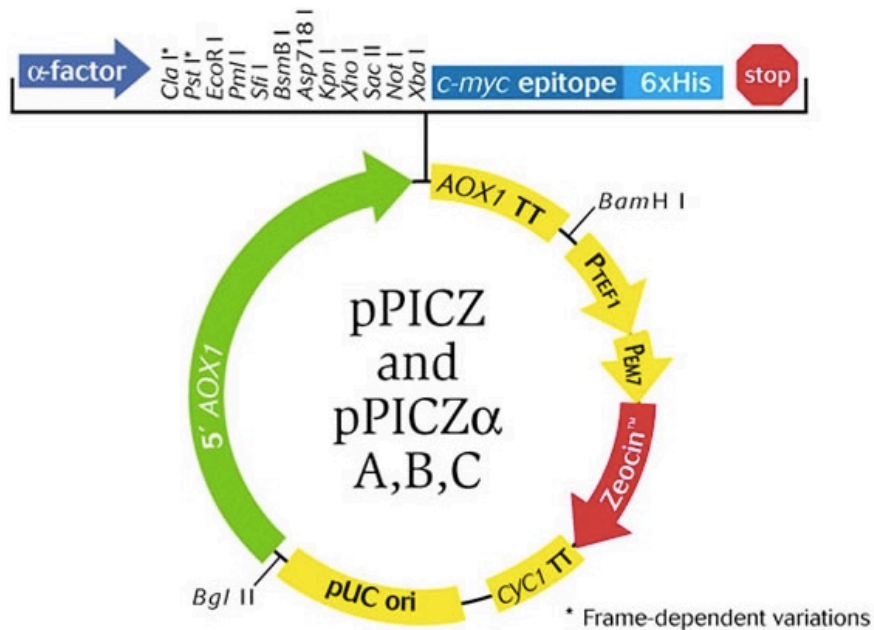


Figura 3. Vetor pPICZ α : representação do vetor pPICZ α e os segmentos que o compõem. Em verde seu promotor e em vermelho o gene que confere resistência a zeocina.

A ligação das sequências de interesse foram realizadas através de reação de ligação e através de CPEC. A reação de ligação foi feita incubando-se as sequências 4870, 5011 com 10ng do vetor pPICZ α clivado em uma razão molar de 1:3 utilizando a enzima T4 DNA ligase em uma reação de 20uL. Para realização do CPEC adicionou-se 5ul de tampão, 0,5uL de dNTP, 0,71uL do vetor pPICZ α clivado, 0,62uL do inserto, 0,25uL de DNA-polimerase e 17,92uL de H₂O. As condições foram: 1) 30 segundos iniciais a 98°C para ativação da enzima 2) 5 segundos a 98°C para o pareamento 3) 15 segundos a 50°C para emparelhamento 4) repetição dos passos 2 e 3 por 18 vezes 5) 15 segundos a 72°C para emparelhar vetores e insertos que ainda pudessem restar.

A partir disso, esperava-se produzir os plasmídeos pPICZ4870 e pPICZ5011.

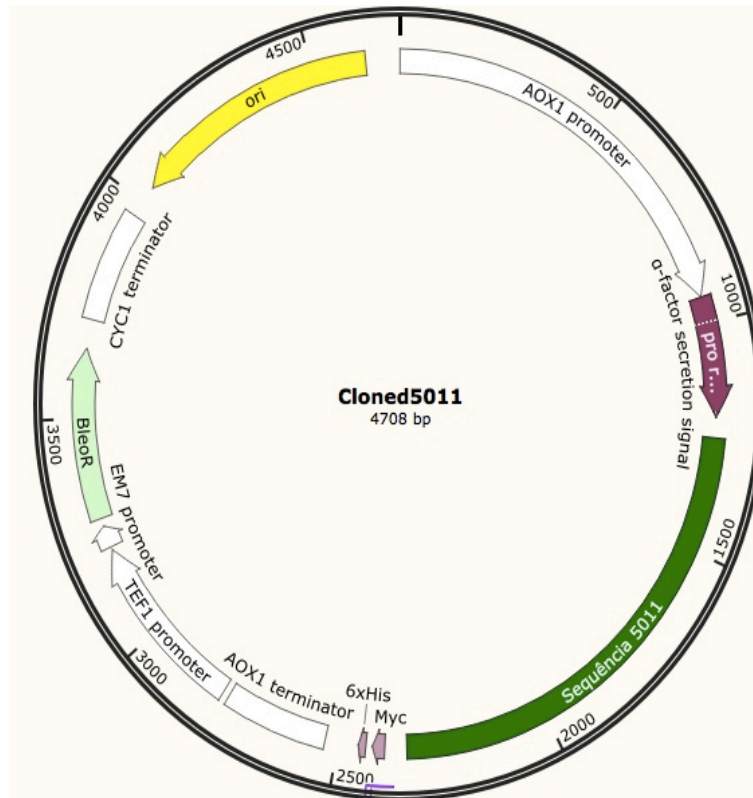


Figura 4. Mapa dos plasmídeos recombinantes construídos: estrutura do vetor pPICZ α após a inserção da ORF 5011 entre os sítios de restrição para KpnI/XbaI. Em verde escuro é possível ver onde cada ORF foi inserida no vetor com relação aos demais elementos.

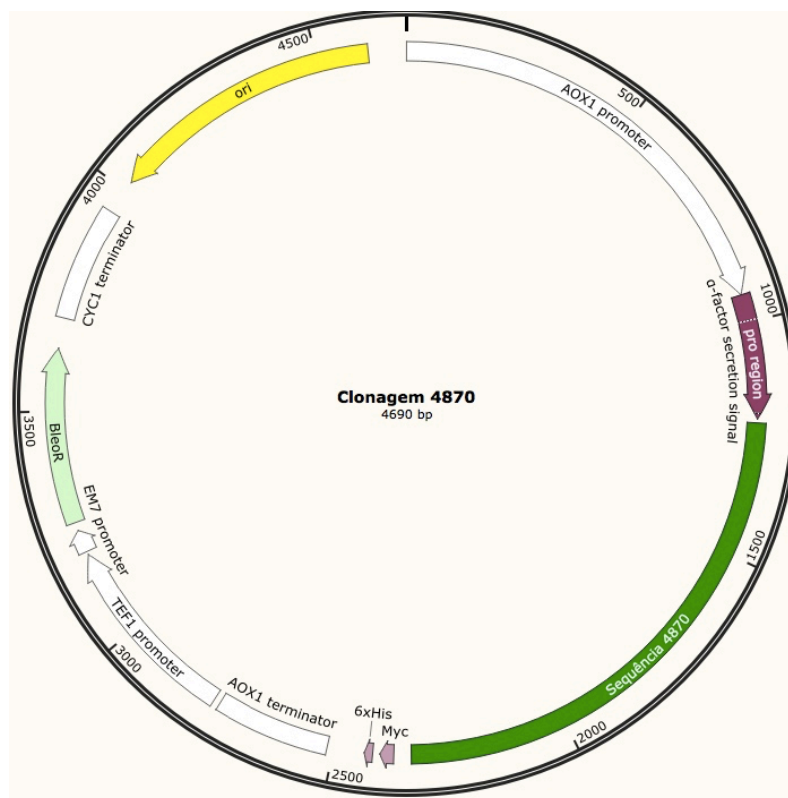


Figura 5. Mapa dos plasmídeos recombinantes construídos: estrutura do vetor pPICZ α após a inserção da ORF 4870 entre os sítios de restrição para EcoRI/XbaI. Em verde escuro é possível ver onde cada ORF foi inserida no vetor com relação aos demais elementos.

4.7 Preparação de células competentes

A cepa de clonagem *E. coli* DH10B foi transformada utilizando o método químico e eletroporação para ligação e propagação dos plasmídeos. Enquanto cepas de *P. pastoris* X-33, GS115 e KM71 serão transformadas pelo método de eletroporação para a expressão da transglutaminase recombinante.

Para a produção de células químio e eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, foi feito um pré-inóculo da bactéria em meio LB-Miller (10g/L NaCl, 10g/l de triptona e 5g/L de extrato de levedura), crescendo-a a 37°C e 180rpm por 16h em agitador horizontal. Após esse período foi feito o inóculo, colhendo uma alíquota de 1/100 (v/v) do pré-inóculo, colocado pra crescer novamente em meio LB-Miller, nas mesmas condições até que atingisse uma OD₆₀₀ de 0,6.

4.8 Transformação da cepa de Escherichia coli DH10B

A transformação por método químico foi realizada incubando 5uL da reação de ligação com 50uL da cepa DH10B de *E. coli* por 31 minutos em gelo, seguido de 1 minuto a 42°C seguidos de mais 2 minutos no gelo. Após, foi adicionado 250uL de meio LB-Miller nas células e estas foram incubadas a 37°C com agitação de 180rpm de 30 a 60min. Então, 100uL de células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB-Miller sólido com 100uL de Zeocina para selecionar as células que receberam o plasmídeo corretamente, conferindo assim resistência a este antibiótico.

A transformação por eletroporação foi realizada adicionando 1uL do produto purificado da CPEC com 50uL da cepa DH10B de *E. coli* às cubetas 2mm de eletroporação deixadas previamente no gelo. As cubetas foram levadas ao eletroporador e a voltagem foi ajustada a 2500V e um pulso foi dado. Após a eletroporação foi adicionado rapidamente 1mL de meio LB-Miller e o conteúdo foi transferido para um ependorf e colocado no shaker a 37°C e agitação de 180rpm por 60 minutos. Um volume de 100uL das células transformadas foi plaqueado em LB-Miller sólido contendo Zeocina.

4.9 Seleção e Análise dos plasmídeos recombinantes

Como forma de verificar se as colônias das placas foram devidamente clonadas, realizou-se PCR de cada colônia seguindo os métodos já descritos.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação de possíveis sequências codificadoras de transglutaminase utilizando ferramentas de bioinformática

A fim de identificar transglutaminases codificadas pelo genoma do *Paenibacillus* sp. JDR-2 foi realizada uma busca entre as ORFs de *Paenibacillus* sp. JDR-2 anotadas automaticamente e depositadas no NCBI utilizando-se as palavras “Transglutaminase” e *Paenibacillus* sp. JDR-2. Foram identificadas dez ORFs: 0339, 0834, 0937, 1245, 1489, 3259, 4024, 4765, 4870 e 5011 como sendo transglutaminases como mostra a figura 6.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> Pjdr2_4765 ID: 8126076	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (5482158..5483045, complement)	Pjdr2_4765
<input type="checkbox"/> Pjdr2_0937 ID: 8129903	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (1115571..1116179, complement)	Pjdr2_0937
<input type="checkbox"/> Pjdr2_4024 ID: 8127942	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (4565733..4568003, complement)	Pjdr2_4024
<input type="checkbox"/> Pjdr2_4870 ID: 8127408	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (5592903..5594060, complement)	Pjdr2_4870
<input type="checkbox"/> Pjdr2_0834 ID: 8125814	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (980768..983239)	Pjdr2_0834
<input type="checkbox"/> Pjdr2_5011 ID: 8129746	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (5732770..5733912, complement)	Pjdr2_5011
<input type="checkbox"/> Pjdr2_1489 ID: 8128228	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (1781222..1783861)	Pjdr2_1489
<input type="checkbox"/> tgl ID: 8127845	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (404157..404921)	Pjdr2_0339
<input type="checkbox"/> Pjdr2_3259 ID: 8128471	transglutaminase [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (3725799..3726722)	Pjdr2_3259
<input type="checkbox"/> Pjdr2_1235 ID: 8126175	hypothetical protein [<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2]	NC_012914.1 (1479396..1479839)	Pjdr2_1235

Figura 6: ORFs de *Paenibacillus* sp. JDR-2 anotadas como transglutaminase.

A partir da identificação de transglutaminases putativas do genoma de *Paenibacillus* sp JDR-2, as sequências peptídicas geradas foram submetidas a análises de domínios conservados, além de se verificar a similaridade com outras transglutaminases já descritas. Os resultados demonstram que a enzima apresenta similaridade somente com outras transglutaminases preditas em microorganismos do mesmo gênero. Todas as sequências apresentam, no mínimo um domínio de transglutaminase predito.

Foram preditos o ponto isoelétrico e peso molecular das transglutaminases codificadas por cada ORF encontrada, revelando que a maioria possui pI entre 5 e 6, sendo que apenas

uma apresentou pI básico. Ainda, o peso molecular predito para as transglutaminases ficou entre 30 e 40kDa, entretanto três peptídeos apresentaram peso molecular acima de 80kDa. A sequência 0937 não apresenta um aminoácido iniciador, ou seja, é uma proteína truncada e foi então descartada das predições seguintes.

Tabela 2: ponto isoelétrico (pI) e peso molecular estimado das sequências peptídicas preditas.

ORF	pI predito	Peso molecular estimado (Daltons)
0339	4.98	29204.58
0834	5.36	87554.38
0937	-	-
1235	10.36	16501.68
1489	5.04	99339.89
3259	9.62	34260.21
4024	5.37	85895.47
4765	5.34	33359.30
4870	5.82	42099.33
5011	5.68	42723.22

5.2 Amplificação e clonagem das sequências 4870 e 5011 de *Paenibacillus* sp. JDR-2 em *Pichia pastoris*

A partir das predições por bioinformática, foram escolhidas as sequências 4870 e 5011 que apresentam peso molecular em torno de 40kDa e pI de aproximadamente 5, corroborando com as características das transglutaminases microbianas já descritas. Estas sequências foram amplificadas e purificadas com êxito, e analisadas em gel de agarose 1%, como representado na figura 7.

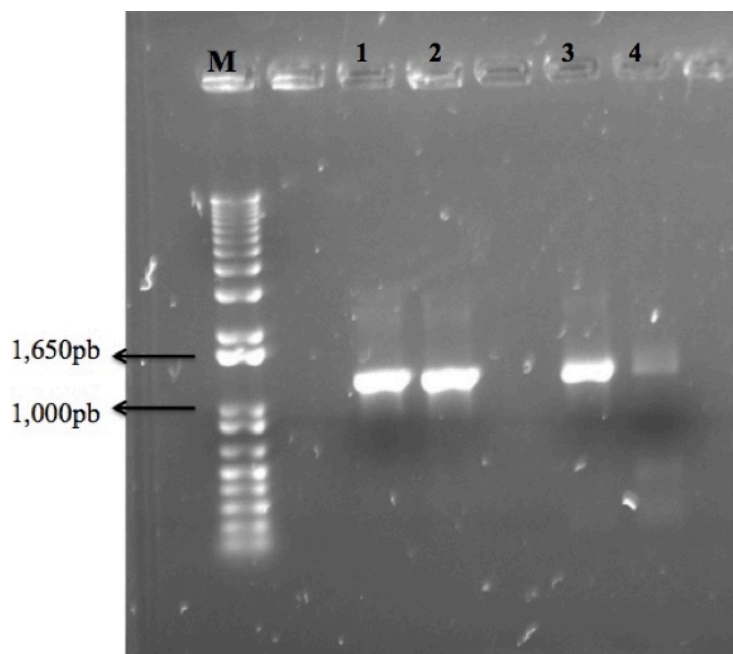


Figura 7. Amplificação das seqüências 4870 e 5011. Demonstração de quatro bandas nos tamanhos preditos: canaletas indicadas como 1 e 2 seqüência 4870 e canaletas indicadas como 3 e 4 seqüência 5011.

Após a amplificação e purificação dos fragmentos, os insertos foram clivados com suas enzimas de restrição específicas, assim como o plasmídeo pPICZ α . A seqüência 4870 foi clivada com as enzimas EcoRI e XbaI, enquanto a seqüência 5011 foi clivada com KpnI e XbaI, conforme descrito na metodologia e os fragmentos gerados foram purificados com kit. O plasmídeo foi clivado com as mesmas enzimas, a fim de formar extremidades coesivas. Foram então selecionados no gel, recortados e purificados de acordo com o tamanho de fragmento gerado, de aproximadamente 3,600pb, como demonstrado por análise em gel de agarose 1% na figura 8.

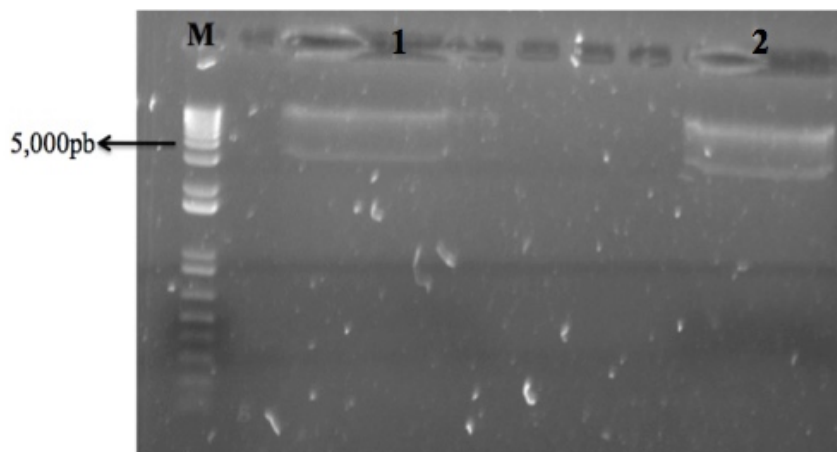


Figura 8. Resultado da clivagem com enzimas de restrição. Presença de duas bandas, sendo a inferior corresponde ao vetor clivado, sendo representado por 1 o plasmídeo clivado com EcoRI e XbaI e 2 o plasmídeo clivado com KpnI e XbaI.

Primeiramente realizou-se transformação pelo método químico, sendo verificados crescimento de poucas colônias nas placas, a metodologia foi repetida, gerando um numero maior de colônias. A partir disto foi realizado PCR e verificou-se que a clonagem não foi efetiva, como demonstrado a partir de análise em gel de agarose 1% na figura 9. Somente vê-se uma banda correspondente ao inserto na primeira caneleta, a qual é o controle positivo.

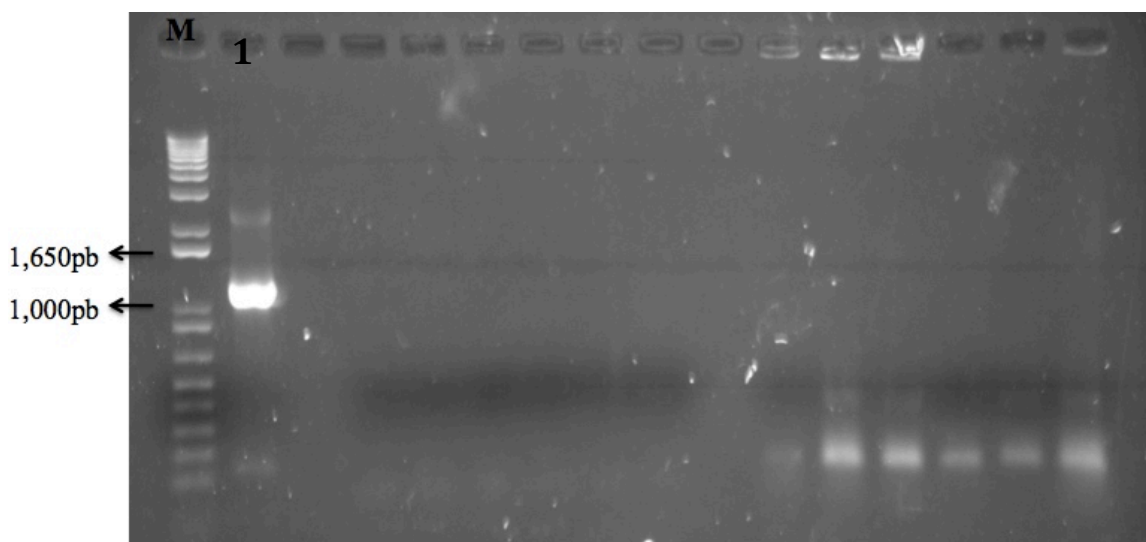


Figura 9. Resultado do PCR das colônias. Na primeira caneleta, vê-se o controle positivos e nas demais somente percebe-se uma banda de baixo peso molecular, provavelmente correspondendo aos primers da reação.

A transformação por eletroporação não foi efetiva, uma vez que ao dar o pulso, as células foram imediatamente rompidas. Novas tentativas foram feitas, mas infelizmente, nenhuma colônia cresceu nas placas.

Os próximos passos descritos na metodologia não foram possíveis de serem realizados, já que a clonagem tanto por mecanismos de ligação quanto CPEC não foram efetivas. Novas tentativas em ambas as técnicas precisam ser realizadas, com modificações de proporção inserto e vetor na reação de ligação, assim como menor concentração do produto de CPEC a fim de evitar o rompimento celular.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, sabe-se que as transglutaminases tem diversas funções, atuando como modificador das propriedades físicas e químicas de proteínas e regulando diversas funções biológicas. O interesse e os estudos por esta enzima, cresceu ao longo do tempo (Rachel; Pelletier, 2013), demonstrando não só a sua importância na indústria de alimentos, como também na farmacêutica, destacando o seu potencial para prevenção de alergias, (Yamauchi et al., 1991) além de ser investigado sua atividade anti neoplásica (Lentini et al, 2010).

Este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar novas transglutaminases codificadas por *Paenibacillus* sp. JDR-2. Sabe-se que esta espécie recentemente descoberta possui enzimas que degradam xilanos (Chow et al, 2012) e que no presente momento não há muitas informações sobre este microorganismo, de forma que novos estudos precisam ser realizados para investigar seu potencial biotecnológico.

Esta bactéria gram-positiva e formadora de endósporo, está relacionada com outros microorganismo produtores de transglutaminase, e por isso, investigou-se o seu potencial frente a produção desta enzima. Pelas análises *in silico* do seu genoma, identificou-se dez ORFs que contem domínio de transglutaminase. Este é um número elevado, visto que o gênero *Bacillus* possui somente um domínio para esta enzima (Suzuki et al., 2000). Além disso, observamos diferenças significativas entre as dez transglutaminases putativas encontradas.

Dentre elas observamos diferenças no pI, sete delas apresentam pI ácido, enquanto que duas apresentam pI básico. As transglutaminases bacterianas costumam ter pI básico, como a de *S. moboraense* que possui pI 8.9 (Ando et al, 1989). Entretanto, pode-se observar que a transglutaminase atua numa variação de pH entre 5-8, não apresentando comprometimento da sua função catalítica (Zhang et al, 2012).

Ainda elas diferem em peso molecular, sendo que cinco delas (0330, 3259, 4765, 4870 e 5011) apresentam peso molecular em torno de 30 e 40kDa, o qual é predito para a transglutaminase bacteriana, enquanto outras três apresentaram peso molecular acima de 80kDa, o que corrobora com dados encontrados em transglutaminase eucariota (Lorand; Graham, 2003). Por fim, uma das sequências preditas apresentou tamanho de 16.5kDa, o que é muito abaixo do inferido para qualquer outra transglutaminase. Verificou-se também que as sequências 3259 e 5011 foram as únicas que apresentaram um peptídeo sinal. A partir desses

dados, foi difícil prever quais sequências seriam mais fidedignas às características apresentadas pela enzima.

As ORFs 4870 e 5011 foram selecionadas para a realização da clonagem em pPICZ α a fim de verificar se estas produziam transglutaminase. A escolha deu-se através do peso molecular predito para elas, que corrobora com a transglutaminase microbiana já descrita.

A primeira tentativa de clonagem, deu-se através de reação de ligação, entretanto, esta não foi efetiva. Embora colônias tenham crescido na placa com o antibiótico de seleção, todas elas apresentaram resultados de PCR negativo, ou seja, não apresentaram as sequências de interesse inseridas no plasmídeo selecionado. Novamente foi feita uma tentativa, aumentando a proporção vetor:inserto de 1:3 para 1:5. Houve aumento significativo no número de colônias, mas, da mesma forma estas se mostraram negativas. Em ambas as tentativas, foi realizado PCR das colônias diretamente, assim como PCR através de extração de DNA das colônias por método de fervura.

A realização de clonagem por CPEC foi a segunda escolha, já que esta técnica apresenta menos chance de erro, assim como alta especificidade (Quan, 2011). Da mesma forma, as células foram transformadas por eletroporação por ser uma técnica relativamente fácil e muito eficiente (Gardner et al., 2016). Na primeira tentativa, ao dar o pulso as células eletrocompetentes se romperam, o que pode ter acontecido pela baixa viabilidade das células, ou até mesmo pela quantidade de sais que poderiam estar presentes na amostra. Novamente foi repetido o procedimento com novas células e este, ao primeiro momento, se mostrou efetivo. Entretanto, nenhuma colônia cresceu na placa com o antibiótico de seleção.

Ainda, outra dificuldade comumente encontrada em trabalhos de expressão heteróloga de transglutaminases é obtê-la na forma solúvel. Trabalhos anteriores em *E. coli* demonstraram expressão desta enzima em corpos de inclusão, sendo necessárias aplicações de técnicas de *refolding* protéico, a fim de obter-se atividade enzimática (Salis et al, 2015). Novas maneiras de obter a transglutaminase de forma ativa e solúvel estão sendo pesquisadas e a abordagem mais efetiva seria de modificar o pró-peptídeo da transglutaminase bacteriana (Rickert et al., 2015).

A escolha de um microorganismo que apresenta mecanismos de modificações pós-traducionais das proteínas, como a *Pichia pastoris* também é significativo para a produção da enzima ativa. O trabalho de Gunduz teve êxito em realizar tal processo e para isso ele utilizou

uma sequência pró-peptídica (adiciona de sítios de clivagem) de *Streptomyces mobaraensis*, a qual foi clonada em vetor pPICZ α e expressa em *P. pastoris*. Dessa forma, obteve-se a enzima solúvel e ativa, com atividade enzimática significativa (Gunduz B., 2012).

Outro fator que pode influenciar a efetividade da expressão de proteínas heterólogas, são as cepas utilizadas. A cepa X33 é uma de tipo selvagem, portanto, não há nenhuma alteração gênica na mesma, a outra cepa escolhida e a mais utilizada para expressão de proteínas foi a GS115, uma vez que cresce em meio sem adição de histidina e possui os genes AOX1 e 2 funcionais, facilitando a expressão. Já a cepa KM71 apresenta ruptura do gene AOX1, possuindo somente AOX2 e por isso utiliza metanol lentamente, não sendo necessário a adição de grandes quantidades do mesmo. Infelizmente, não foi possível testar as melhores condições das cepas selecionadas, mas provavelmente seria possível observar variações no mecanismo de expressão de cada uma delas.

Vários fatores podem ter contribuído para os resultados apresentados neste trabalho, portanto, são necessárias novas tentativas utilizando as técnicas já descritas. Além disso, será necessário uma investigação mais aprofundada a respeito do *Paenibacillus* sp. JDR-2, porque este apresentou dez ORFs que codificam transglutaminase, entretanto, não há evidências bibliográficas a respeito de nenhuma delas, o que dificulta a escolha de uma sequência efetiva.

7. CONCLUSÃO

Até o presente momento foi possível:

- Identificar 9 possíveis ORFs codificadoras de transglutaminase no genoma de *Paenibacillus* sp. JDR-2.
- Amplificar eficientemente dois ORFs de *Paenibacillus* sp. JDR-2 anotadas como transglutaminase e depositadas no NCBI, confirmando sua presença no genoma deste microorganismo;

8. PERSPECTIVAS

Como sequência a este trabalho, serão realizadas:

- Novas tentativas de clonagem das sequências 4870 e 5011 em *Pichia pastoris*;
- Realização de RT-PCR de *Paenibacillus* sp. JDR-2 a procura de RNAm que codificam transglutaminase;
- Investigação de outros microorganismos produtores de transglutaminase;
- Seqüenciamento e predição de possíveis ORFs codificadores de transglutaminase de *Bacillus circulans* coletado da Amazônia.

9. BIBLIOGRAFIA

ARRIZUBIETA M. J. Transglutaminases, in industrial enzyme: structure, function and applications. **Springer**, pp 567- 581. 2007.

Ajinomoto (2016). Ajinomoto Foods Europe SAS. Germany. Disponível em: <<http://transglutaminase.com>>. Acesso em: 06 maio 2016.

ALI, N. A., et al. Effect of transglutaminase cross linking on the functional properties as a function of NaCl concentration of legumes protein isolate. **International Journal of Biological and Life Sciences**, 6(1), 8–13. 2010.

ANDO, H. et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, 53(10), 2613–2617. 1989.

BENINATI, S. et al. An overview of the first 50 years of transglutaminase research. **Amino Acids**, 36: 591-598. 2009.

BONISCH, M. P. et al. Transglutaminase cross- linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. **International Dairy Journal**, 17(11), 1360–1371. 2007.

CARVAJAL et al. Activity of maize transglutaminase overexpressed in *Escherichia coli* inclusion bodies: an alternative to protein refolding. **Biotechnol Prog**. 2011.

CHOW V. et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus* sp. strain JDR-2. **Standards in Genomic Science**, v. 6, n.1, p 1-10, 2012.

DAMODARAN, S., & AGYARE, K. K. Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, 30(1), 12–18. 2013.

GARDNER et al. Electroporation of Alphavirus RNA Translational Reporters into Fibroblastic and Myeloid Cells as a Tool to Study the Innate Immune System. **Methods Mol Biol**.1428:127-137. 2016.

GUNDUZ B. Recombinant transglutaminase production by metabolically engineered *Pichia pastoris*. degree of Master of Science in Biotechnology, Middle East Technical University. 2012.

HONG, G. P., & XIONG, Y. L. Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins. **Meat Science**, 91(1), 36–42. 2012.

HONGBO L. et al. Characterization of recombinant *Zea mays* transglutaminase expressed in *Pichia pastoris* and its impact on full and non-fat yoghurts. **J. Sci Food Agric**. 94:1225–1230. 2014.

- HORNYAK et al. α -Thrombin-catalyzed activation of human platelet factor XIII: relationship between proteolysis and factor XIIIa activity. **Biochemistry** 28:7326–7332. 1989.
- KASHIWAGI, T. et al. Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*. **The Journal of Biological Chemistry**, 277: 44252–44260. 2002.
- KIELISZEK M. & MISIEWICZ A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia Microbiol.** 59:241–250. 2014
- KURASHI, C. et al. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, 17(2), 221–246. 2001.
- KOBAYASHI et al. E-(γ -Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, 144, p. 157-160, 1996.
- LENTINI et al. Phytochemicals and protein-polyamine conjugates by transglutaminase as chemopreventive and chemotherapeutic tools in cancer. **Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale.** 48(7):627-633. 2010.
- LORAND L & GRAHAM R.M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4, 2003.
- MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 204–210, 1998.
- POTVIN, G. et al. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, 2012.
- QUAN J. & TIAN J. Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways. **Gene Libraries and Pathways.** PLoS ONE 4(7): e6441. 2009.
- RICKERT et al. Production of soluble and active microbial transglutaminase in *Escherichia coli* for site-specific antibody drug conjugation. **Protein Sci.** 25(2):442-55. 2016
- SOETART, W., & VANDAMME, J. Industrial biotechnology sustainable growth and economic success. **Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA**, 2010.
- SALIS et al. High-level expression of a recombinant active microbial transglutaminase in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnonology**, DOI 10.1186/s12896-015-0202-4, 2015.

SERAFINI-FRACASSINI, D., & DUCA, S. D. (2008). Transglutaminases: Widespread Cross-linking Enzymes in Plants. **Annals of Botany** , 102: 145-152. 2008.

SHLEIKIN A. G. & DANILOV N. P. Evolutionary-biological peculiarities of transglutaminase. Structure, physiological functions, application. **Zh Evol Biokhim Fiziol.** 47(1):3–14. 2011.

SUZUKI, S. et al. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 2000.

TABOLACCI C, et al. Evidences for a role of protein cross-links in transglutaminase-related disease. **Amino Acids** 975–986. 2012.

THERMOFISCHER SCIENTIFIC. Acesso em junho de 2016. << <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V19520>>>

YANG, M.-T. et al. Crystal Structure and Inhibition Studies of Transglutaminase from *Streptomyces mobaraense*. **The Journal of Biological Chemistry**, 286: 7301- 7307. 2011.

YOKOYAMA, K., et al. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004.

WAN, T. Y. et al. Systematic screening of glycosylation- and trafficking-associated gene knockouts in *Saccharomyces cerevisiae* identifies mutants with improved heterologous exocellulase activity and host secretion. **BMC Biotechnology**, doi 10.1186/1472-6750-13-71, 2013.

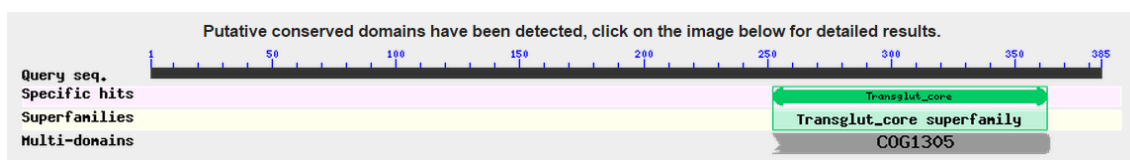
APÊNDICE A – Identificação *in silico* da sequencia 4870 como uma transglutaminase:

os dados demonstram a sequência nucleotídica da ORF 4870 (a), o peptídeo codificado por ela (b), a predição dos domínios presentes neste peptídeo (c) e a comparação com outras proteínas por BLASTp (d).

a) ATGATGGAATGGATTTCGCGCTGGGACGGTATGGGAGCCGGTCTCGCTTATCGTTCTTCTCCTTCTGCTTGTTCGCTGCTGCAAGGAATGAG AAGAGGCGCGTCGGGTTACGCGAGGCGCCTTTTCTTTTTTGTATGGGACGGTATTCTGTTAATCGTTTGTCTTGTGCTTGCCGGGAAAATTGCG GGCAGCTTGTCCCATTTGGCAGCGGATTGGCTGAGCGGGCATGTAACCTGCCGAGAAGGAAATGGGTGCAACCTCCAGGCTTGGTATACGT TTATAACAAGCCTGCGCGATTTTGCCTGCTCCGGTACGGCATCTGTTTTGTCTCGTATTGCTGCTTCCGCTGGCTGCTTCCCTTTCTTGCG CCTCTGGTGAAACGCTGTTTCCAGCAGACAGCAACGCGGCAGACATGAGAGCATGGAGCGTCTCCGGGAGGAGGGCGGCAAGCCGCGCAG CCGGAGCGGTTTTTCGGCACGGTTTATGGTCCGGACGGGCATTTGTATTTGTAGCCGCTTTGTTCAATTTATGTCTCGCTGGCGCAAACGGCCTC TGGTCCGGATTGATTCAGCAATCTCCGTTATACATGAAGGCATCGGATGTCTTGAACCGGTTGCCGGAGATATGCTGGCCGGACGTGGCCCCG TTCTGGCTGAAGCCGTGCAGGAAGAGTTCAGAATGTGCTGCAGCGCAAATACGAGATTATCGATTACAATATCCCGTCGGATATTGAGCAGGC AGCCCTGCAGGTTACGAAGGACAAGAATAGCGAAGAAGACAAGGCAAGGGCTTTGTATGACTGGTTAGGCAGCCGGATCGCCTATGACTGGGAC AAGGCTGATAATTATGTAGACAACGGAGTATGGAAGGAACAGAACCCGGAAGAGACGTTTGTACTCCGAAAAGCGGTATGTATCGACGTTGCT AGGCTGTACGCCGTAATGGCGCGCCTCAGGTCTGGATGTGAAGTCTGTTACCGGCACAGGACTTGACGGGCGCGGAGGCTCCGGGCCGATGC CTGGAACGAAGTGAAGGTAGCGGAGACGGCGGTACCTGGATTCCGCTCGATGCGACATGGGCATCTCCGGCGATTGGTTCAACCCGGTTGAT TTCGACAAGACTCATATCCGGGCAGTATAA

b) MMEWIRAGTVWEPVSLIVLLLLLVSLLQGMRRGASGSARRLFFFVWDGILLIVCLVLGKIAGSLSPAADWLSGHVNPQKEMGATSQAWY TFIITSLRDFALLRYGILFLLSLLRLAASFLAPLVETLFASRQQRGRHESMERLPGGGAASRAAGAVFGTVHGAGRAVFVVAALFIYVSLAPNGLW SGLIQSPLYMKASDVLEPVAGDMLAGRGPVLAEAVQEEFQNVLRQRYEIIIDYNIPIESDIEQAALQVTKDKNSEEDKARALYDWLGSRIAYDWDKA DNYVDNGVWKEQNPEETFATRKGVCIDVARLYAVMARASGLDVKVVVTGTGLDGRGGSPHAWNEVKVGGDGGTWIPLDATWASSGDWFPV DFDKTHIRAV

c)



d)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> transglutaminase [Paenibacillus sp. JDR-2]	778	778	100%	0.0	100%	WP_015846420.1
<input type="checkbox"/> transglutaminase [Paenibacillus harenae]	496	496	99%	2e-171	67%	WP_029192224.1
<input type="checkbox"/> Transglutaminase domain protein [Paenibacillus sp. P22]	427	427	97%	3e-144	60%	WP_021880865.1
<input type="checkbox"/> Transglutaminase domain protein [Paenibacillus sp. P22]	427	427	97%	4e-144	60%	CDN42170.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Paenibacillus pinihum]	402	402	99%	1e-134	57%	WP_028559855.1
<input type="checkbox"/> transglutaminase [Paenibacillus curdianolyticus]	396	396	99%	3e-132	59%	WP_006040497.1
<input type="checkbox"/> transglutaminase [Thermobacillus composti]	382	382	98%	1e-126	54%	WP_015253806.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Paenibacillus daejeonensis]	373	373	99%	2e-123	52%	WP_020616079.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Paenibacillus sp. PAMC_26794]	370	370	99%	5e-122	48%	WP_017692392.1
<input type="checkbox"/> transglutaminase [Paenibacillus sp. FSL H7-689]	369	369	99%	1e-121	48%	ETT55900.1

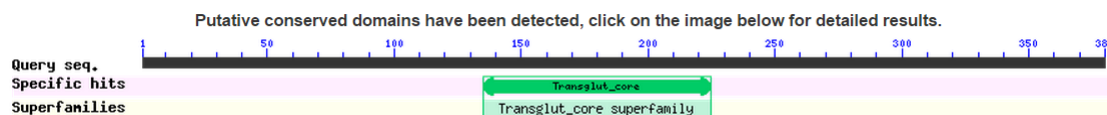
APÊNDICE B – Identificação in silico da sequência 5011 como uma transglutaminase:

os dados mostram a sequência nucleotídica da ORF 5011 (a), o peptídeo codificado por ela (b), a predição dos domínios presentes neste peptídeo (c) e a comparação com outras proteínas por BLASTp (d).

a) ATGCGAAAAACAGGTTGGAAAATAGCGACAGTAGCGGCCTTGCTTGCCGTTGCCATTGGTTTAAATATGAAATCCGATCTG
 TTCTCTGTTTTTTCGCTCTGCGTCAAGCGGGCGGAGGCGGTACGATCGATCAGCTTGAGGATGAGCTGGCATCGCAATTTCAAAG
 CAGATCCGAGCATTTTACGCTTCAATATAAAGGAGACAAGCACAAGCTTTCCGACGGCTTGCAAAAATACGATTAATCTGGCG
 CTTGCGCAGGATGATTACACCGCGTATATCCTTGACTCCTATCTTTATACAATCCGACAGCTGGGGTAATCTGCCACCATAAA
 GCTGGAGGCCAGATACCGCGAAAACGACGGACCAGACCGCTGCCGTTGATGCAATGGTGAGCAAAGCGATCAAGCAGATTAT
 TACCCCGCAGATGAATGAGCATGAGAAGGTGAAGGCGATCCACGACTGGATTGTTAATAGACTTCAGTATGACGAGACCCTA
 AAGCATTACACCGCTTACGATGCTCTCACAACGGGAACCGCTGTATGTCAAGGTTATTCGCTACTTGCTTATAAAAATGCTAAA
 AGCTGTCGGAATTCCTGTTCTTATTGCCGAGGGCAAAGTTAAGACCGGCGACCATGCCTGGAATATGGTGACGCTCGGCGGC
 AATTGGTATCATCTCGATATGACCTGGGATGATCCCCTTGTAAGCAAGCCGCGACGACAGACCGAGTCCCGTCTCAGCT
 ATAATTATTATTTGAAGACGGATGACGAGATGCGCGTCGATCATCAATGGATCAAAACCTATCCAACGGCGAACCATTCCTA
 CGGCAGCGAGCTCAGCAAGCTGAAGAGCACGGACAGCGGGAAGGCGGATGTTTACGCTAAGCTCATCACCGATCTTGGCCTG
 CATTGGACGGAGCCGAAAATACGGTAGCAAGCCTGGTAGAGCTGGAGCAGGAGATCCGCGAGGCTGTAATGGAGCAGCAG
 ACGGGCATGAAGTCCGTTATCTGCAAGGTTCCGACGCTTGCACCGATCTGCCGACGGCCTTTAAGGTAGCGCATGTATCCGT
 TCGCTATTCGGCTCGTACGAGCCATACGGCAATGACGGTTCGATGCTTGTGCAGGTTTCAGCTGGATTATCAATAA

b) MRKTGWKIATVAALLAVAIGLNMKSDLFSVFASSGGGTTIDQLEDELASQFQSRSEHFTLQYKGDHKHLS DGLQNTINLAL
 AQDDYTAYILDSYL YTIRSWG NLSSTIKLEARYRETTDQTA AV DAMVSKAIKQIITPQMNEHEKVKAIHDWIVNRLQYDETLKH
 YTA YDALTTGTAVCQGYSLAYKMLKAVGIPVLIAEGKVKTDHAWNMVQLGGN WYHLDMTWDDPVVKQAGTQQTESRLSYNY
 Y LKTDDEMRVDHQWIKTYPTANHSYGSLSK LKSTDSGKADVYAKLITDLGLHWTEPENTVASLVELEQEIREAVMEQQTGMKFR
 YLQGSQ L ATDLPTAFKVAHVSRYRSARYEPY GNDG SMLVQVQLDYQ

c)



d)

<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Paenibacillus sp. JDR-2]	785	785	100%	0.0	100%	WP_015846560.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [Paenibacillus harenae]	417	417	99%	1e-140	51%	WP_029192338.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Thermobacillus composti]	325	325	87%	9e-105	48%	WP_015255990.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase domain protein [Paenibacillus curdianolyticus]	275	275	85%	6e-85	43%	WP_006037572.1
<input type="checkbox"/>	Transglutaminase domain protein [Paenibacillus sp. P22]	252	252	60%	3e-77	50%	WP_021881667.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Paenibacillus polymyxa]	252	252	93%	3e-76	40%	WP_023990307.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Paenibacillus polymyxa]	251	251	92%	5e-76	41%	WP_013373078.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Paenibacillus polymyxa]	251	251	92%	5e-76	41%	KEO77185.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [Paenibacillus terrigena]	251	251	91%	6e-76	41%	WP_018757525.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Paenibacillus polymyxa]	251	251	92%	6e-76	42%	WP_013311962.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Paenibacillus sp. UNCC152]	251	251	93%	6e-76	40%	WP_028541832.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Paenibacillus polymyxa]	251	251	92%	6e-76	41%	WP_019688614.1
<input type="checkbox"/>	transglutaminase [Paenibacillus polymyxa]	251	251	92%	6e-76	41%	WP_031462242.1