



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Expressão heteróloga de abaecina de
Apis mellifera em *Pichia pastoris***

Aluno: Denis Prudencio Luiz

Orientador Dr. Carlos Ueira Vieira

Uberlândia – MG
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Expressão heteróloga de abaecina de
Apis mellifera em *Pichia pastoris***

Aluno: Denis Prudencio Luiz

Orientador Dr. Carlos Ueira Vieira

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética)

Uberlândia – MG
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L953e Luiz, Denis Prudencio, 1985-
Expressão heteróloga de abaecina de *Apis mellifera* em *Pichia pastoris* [manuscrito] / Denis Prudêncio Luiz. – 2011.
40 f. : il.

Orientador: Carlos Ueira Vieira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Abelha - Genética - Teses. I. Vieira, Carlos Ueira. II.
Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 595.799-115



**Expressão heteróloga de abaecina de
Apis mellifera em *Pichia pastoris***

ALUNO: Denis Prudencio Luiz

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr Carlos Ueira Vieria

Examinadores:

Dra Ana Maria Bonetti

Dr. Luiz Fernando Almeida Machado

Data da Defesa: 27 /06 /2011

Declaro que as sugestões da comissão organizadora e as normas da PGGB para o formato da dissertação foram contempladas

Carlos Ueira Vieira

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, pela a oportunidade de participar desse projeto, pela atenção e por todo o ensinamento durante esses dois anos, a MSc. Juliana Franco Almeida, por me co-orientar, ensinar, sanar minhas dúvidas com toda paciência e trabalhar juntamente comigo durante a execução desse trabalho. A Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti, por sempre estar solicita a auxiliar, ensinar, em todos os momentos, e pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Genética. Aos demais alunos do Laboratório de Genética, que me acompanharam nos momentos difíceis e de felicidade.

Agradeço ao Prof. Dr. Luís Ricardo Goulart Filho , por disponibilizar todo o Laboratório de Nanobiotecnologia para que esse projeto fosse realizado, sem o qual não teria sido possível, e por toda sua equipe que sempre me ajudou durante a execução dos experimentos. A Prof^a. Dr^a. Veridiana de Mello Rodrigues Ávila e sua equipe por disponibilizar os equipamentos necessários para a pesquisa. O secretário da pós-graduação Gerson Fraissat por toda disponibilidade e atenção dispensada a nós alunos.

A Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) por fornecer auxílio para a concretização dessa pesquisa.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Apresentação..... | 1 |
| Capítulo I Fundamentação teórica | 2 |
| 1. Fundamentação teórica..... | 3 |
| 1.1 Abelha <i>Apis mellifera</i> | 3 |
| 1.2 Expressão heteróloga de proteína em <i>Pichia pastoris</i> | 5 |
| 1.3 Resistência a antimicrobianos | 6 |
| 2. Referencia bibliográfica..... | 8 |
| Capítulo 2 | 13 |
| 1. Introdução | 16 |
| 2. Objetivos | 18 |
| 3. Material e Métodos | 19 |
| 3. 1. Desenho e síntese do gene codificador de abaecina | 19 |
| 3. 2. Subclonagem do gene sintético no vetor de expressão pPic9..... | 20 |
| 3.3 Expressão do peptídeo recombinante | 20 |
| 3.5 Análises Estatísticas..... | 21 |
| 4. Resultados..... | 22 |
| 4. 1. 1. Desenho e síntese do gene e otimização de codons | 22 |
| 5. Discussão | 28 |
| 6. Referências bibliográficas | 31 |

Apresentação

O avanço no desenvolvimento de novos antibióticos para o controle de doenças infecciosas despertou o interesse da área da genética molecular para a produção desses fármacos. Com a análise e sequenciamento dos genes é possível descobrir suas propriedades funcionais e podendo empregá-los em diversas pesquisas. Técnicas de engenharia genética e bioquímica possibilitam manipular novos genes de forma a aperfeiçoar seus produtos para o benefício do ser humano. Esse trabalho emprega técnicas moleculares com o objetivo de expressar um peptídeo do himenóptero *Apis mellifera* em levedura *Pichia pastoris* para produção da proteína recombinante e análise em cultura de bactéria gram-negativa, para verificar sua eficácia em inibir o crescimento bacteriano.

Esse trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo, denominado Fundamentação Teórica, apresenta um levantamento de dados bibliográficos sobre o tema a ser tratado no segundo capítulo. O segundo capítulo trata da síntese química do gene abaecina encontrado no genoma da abelha da espécie *Apis mellifera*, clonagem e expressão em levedura da espécie *Pichia pastoris*, para teste de inibição de crescimento da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* DH5α.

Capítulo I

Fundamentação teórica

1. Fundamentação teórica

1.1 Abelha *Apis mellifera*

As abelhas da espécie *Apis mellifera* pertencem pertencem à ordem Hymenoptera e família Apidae, são indivíduos eusociais e vivem em colônias (Winston, 1987). Entre as abelhas *A. mellifera* são encontrados machos, que são haplóides, desenvolvem-se a partir de ovos não fecundados e são responsáveis pela atividade reprodutiva (Rueppell et al., 2005) e as fêmeas, diplóides que se desenvolvem a partir de ovos fecundadas e apresentam duas castas: rainha e operárias. A rainha é fértil, participa da reprodução, é responsável pela postura da maioria dos ovos e atua na organização e interação entre os indivíduos da colônia, pela produção de feromônios. As operárias são fêmeas responsáveis pelas tarefas de manutenção da colônia e, eventualmente, pela postura de ovócitos que darão origem a machos ou que serão utilizados como alimento pela rainha (Wilson, 1971).

Em insetos sociais, o comportamento de cada indivíduo foi selecionado para promover o crescimento e a reprodução da colônia (Snodgrass, 1956 Winston, 1987, Page and Peng, 2001, Beye et al., 2003). Na falta da rainha e da prole, operárias podem ativar ovários rudimentares e ovipor, dando origem a machos (Hoover et al., 2006).

A divisão de trabalho nas operárias está relacionada com as diferentes características morfológicas, fisiológicas e comportamentais da casta, típicas de idades específicas, em um processo denominado polietismo etário. As operárias geralmente realizam na segunda e na terceira semana de vida adulta atividades dentro da colônia, como cuidar da cria, estocar a comida, e fazer a manutenção da colônia. Nas últimas semanas de sua vida, defendem a colônia e saem em busca de alimento, comportamento denominado forrageamento (Winston, 1987).

Apesar desse padrão bem estabelecido, a idade da realização de cada tarefa específica é extremamente flexível e as operárias podem acelerar, atrasar ou reverter esse padrão de comportamento (Robinson, 1992). O

controle hormonal está vinculado ao início das atividades comportamentais, como no caso da síntese do hormônio juvenil (HJ) que é associado à atividade de forragear (Fluri et al., 1982) e provoca a inibição da síntese de vitelogenina (Pinto et al., 2000). A escassez de alimentos pode dar estímulos para o início dessa atividade (Nelson et al., 2007).

A organização da colônia e sua dinâmica são importantes características também, para a imunidade social, ou seja, na cooperação dos membros em combater a transmissão de doenças. Apesar de poucos trabalhos abordarem a imunidade social, estudos recentes têm revisado os mecanismos contra a invasão de parasitas e proposto modelos de transmissão de patógenos em insetos sociais baseados na organização da colônia (Naug e Camazine, 2002, Cremer et al., 2007).

A estrutura e a organização da colônia influenciam na propagação de doenças. Como um exemplo, as interações entre os indivíduos por meio de cuidados com as crias aumentam a dispersão de patógenos.

Os insetos sociais são alvos atrativos para os agentes infecciosos uma vez que apresentam alta densidade de indivíduos, com grande homogeneidade genética, além de viverem em um ambiente relativamente homeostático com a presença de estoques de alimento (Schmid-Hempel, 1998).

Assim, os insetos desenvolveram estratégias de grupo e, também, individuais no combate às doenças. Dentre as estratégias de grupo estão vários comportamentos, entre eles, o comportamento higiênico, que foi o primeiro a ser descrito em abelhas (Rothenbuhler, 1964) e é um exemplo clássico de defesa social, onde as operárias identificam e removem larvas infectadas entre as sadias (Spivak e Reuter, 2001).

Outros tipos de defesa incluem a construção da colônia com material antimicrobiano (Christe et al., 2003), o desenvolvimento da cria em local estéril (Burgett, 1997), o aquecimento da colônia em resposta à doença (Starks et al., 2000) e a transferência de características de imunidade (Traniello et al., 2002; Sadd et al., 2005) Os membros da colônia também possuem defesas individuais como ocorre em outros insetos, incluindo a resposta imune contra

agentes infecciosos (Casteels-Josson et al., 1994; Evans, 2004; Evans et al., 2006).

1.2 Expressão heteróloga de proteína em *Pichia pastoris*

O primeiro sistema desenvolvido para a expressão de genes heterólogos em fungos foi baseado na levedura do pão, *Saccharomyces cerevisiae*. Esse sistema recebeu o status de GRAS (Generally Recognized As Safe) ou seja, visto como seguro, que não causa danos à saúde, rótulo designado pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration) à aditivos de comida que são considerados seguros e foi utilizada, com sucesso, na produção de vários fármacos aprovados pelo órgão, incluindo a insulina (Melman, 2005) e a primeira vacina recombinante, o antígeno viral da hepatite B (Harford et al., 1987)

A quantidade massiva de informações sobre esse microorganismo nas áreas da genética, biologia molecular, fermentação, bioquímica, microbiologia e fisiologia a tornou a espécie mais bem caracterizada do sistema eucariótico. Esse conhecimento possibilitou a utilização da engenharia genética para modificar o microorganismo como um todo e alterar o fluxo metabólico visando à produção de proteínas específicas. Por esses motivos a *S. cerevisiae* se tornou um dos principais sistemas de expressão (Gellissen et al., 1997). Para expressão heteróloga de proteínas são utilizadas, também, as leveduras metilotróficas que metabolizam o metanol pela mesma via. As reações acontecem inicialmente em organelas especializadas, os peroxissomos e depois no citoplasma. O metanol entra nos peroxissomos e é oxidado, por oxidases específicas, em formaldeído e peróxido de hidrogênio, que é decomposto em água e oxigênio molecular por uma catalase. O formaldeído gerado pelas oxidases entra tanto na via catabólica para obtenção de energia, quanto na via anabólica para obtenção de biomassa.

A *Pichia pastoris* possui dois genes, AOX1 (álcool oxidase 1) e AOX2 (álcool oxidase 2). A enzima AOX2 possui a mesma atividade específica que a AOX1, porém seu nível de expressão é menor, devido ao fato do seu promotor

ser mais fraco. A enzima AOX1 possui baixa afinidade por oxigênio, o que é compensado pela super-expressão dessa enzima, cuja abundância pode chegar até 30% do conteúdo de proteína celular total. O forte promotor AOX1 pode ser utilizado para direcionar a expressão de proteínas recombinantes a altos níveis. O promotor é estritamente regulado pelas fontes de carbono disponíveis no meio de cultura e isso possibilita o controle preciso da expressão de proteínas recombinantes sob o controle desse promotor (Romanos et al., 1992; Ellis et al., 1985; Koutz et al., 1989; Tschopp et al., 1987).

O gene *histidinol dehydrogenase* de *Pichia pastoris* (HIS4), essencial para a biossíntese do aminoácido histidina, funciona como marcador de seleção em linhagens de *Pichia pastoris* His-. Essas linhagens, defectivas em HIS4 (mutantes auxotróficos), crescem normalmente em meio complexo, mas são incapazes de proliferar em meio de cultura sem histidina. Nesse modelo, a pressão seletiva exercida pelo meio mínimo é baixa e uma única cópia do gene HIS4 é suficiente para restabelecer as funções normais da célula, sendo que somente 1 a 10% dos transformantes possui mais que uma cópia do gene (Higgins e Cregg, 1998).

1.3 Resistência a antimicrobianos

Há contínuo aumento de infecções hospitalares causadas por bactérias resistentes o que é um grande desafio no controle hospitalar para combater esses patógenos, no mundo inteiro (Arnold et al., 2003; DeLisle e Perl, 2002). Em casos clínicos, onde ocorre infecção bacteriana, o quadro de mortalidade dobra quando há identificação de resistência pelos patógenos, sendo necessário a administração de coquetéis de antibióticos (Séveno et al., 2002; Baquero et al., 2008).

A produção de enzimas como a β-Lactamase é um dos principais mecanismos de resistência bacteriana, a espécie *Haemophilus influenzae*, bactéria gram-negativa, apresentou, de 2000 a 2003, variações nas taxas de resistência, em diferentes países, por exemplo, 15% no Reino Unido (Morrissey

et al., 2005) 26% nos Estados Unidos (Heilmann et al., 2005) e 35% na França (Blosser-Middleton et al., 2003).

A resistência à ampicilina, em 2003, aumentou 20% na Alemanha, 28% no México, 35% nos Estados Unidos, 43% na França, 6% África do Sul, 11% Itália e 14% Espanha (Rennie e Ibrahim, 2005). Taxas de resistência à penicilina por *Escherichia coli*, em 2008, foram maiores do que 30% nos países europeus. Somente Finlândia, Noruega e Suécia apresentaram taxa de resistência menor que 40%. Dos 28 países pesquisados 20 apresentaram taxas maiores que 50% (ECDC, 2010).

O CDC (Centro para Prevenção e Controle de Doenças) está monitorando, em 2011, o surto da cepa *Escherichia coli* O104:H4, na Alemanha. A característica da virulência dessa cepa assemelha-se a de *E. coli* Enteroagregativa (EAEC). O Instituto Robert Koch reportou 642 casos de pacientes com o quadro clínico de Síndrome Hemolítico-Urêmica, uma insuficiência renal causada por *E. coli* Shigatoxigênicas (STEC), com registro de 15 mortes (CDC, 2011).

O aumento de cepas bacterianas resistentes à antibióticos está agravando o quadro de infecção na população mundial. O uso indiscriminado desses fármacos promove seleção das cepas resistentes, levando à administração de novas drogas. A detecção de peptídeos antimicrobianos de insetos abre a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, com diferentes espectros de ação e que poderão controlar surtos de bactérias resistentes.

2. Referencia bibliográfica

ARNOLD, M.S.; DEMPSEY, J.M.; FISHMAN, M.; MCAULEY, P.J.; TIBERT, C.; VALLANDE, N.C. The best hospital practices for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: on the cutting edge. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. v. 23, p. 69-76, 2002.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.L.; CANTÓN, R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**. V. 19, p. 260 -265, 2008.

BEYE, M; HASSELMANN, M.; FONDRK, M.K.; PAGE JR, R.E.; OMHOLT, S.W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. **Cell**. v. 114, p. 419–429, 2003.

BLOSSER-MIDDLETON, R.; SAHM, D.F.; THORNSBERRY, C.; JONES, M.E.; HOGAN, P.A.; CRITCHLEY, I.A.; KARLOWSKY, J.A. Antimicrobial susceptibility of 840 clinical isolates of *Haemophilus influenzae* collected in four European countries in 2000–2001. **Clinical Microbiology and Infection**. V. 95, p. 431–6, 2003

BURGETT, D.M. (1997) Antibiotic systems in honey, nectar, and pollen. In: MORSE, R.A; FLOTTUM, K. (eds.), Honey Bee Pest, Predators, and Diseases. **A.I. Root Co., Medina, OH**. p. 455-468, 1997.

CASTEELS-JOSSON, K.; ZHANG, W.; CAPACI, T.; CASTEELS, P.; TEMPST, P. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269, p. 28569-28575, 1994

CENTRO PARA CONTROLE DE DOENÇAS E PREVENÇÃO (CDC) 2011. Investigation Update: Outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* O104 (STEC O104:H4) Infections Associated with Travel to Germany <www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO104/> acesso em: 09 de jun. de 2011.

CORONA, M.; VELARDE, R.A.; REMOLINA, S.; MORAN-LAUTER, A.; WANG, Y; HUGHES, K.A.; ROBINSON, G.E. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, p. 7128-7133, 2007.

CREMER, S.; ARMITAGE, S.A.O.; SCHIMID-HEMPEL, P. Social Immunity. *Current Biology*. v.17, p.693-702, 2007.

CHRISTE, P.; OPPLIGER, A.; BANCALÀ, F.; CASTELLA, G.; CHAPUISAT, M. Evidence for collective medication in ants. *Ecology Letters*. v. 6, p.19-22, 2003.

DELISLE, S.; PERL, T.M. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest* v. 123, p. 504-518, 2003.

ELLIS, S.B.; BRUST, P.F.; KOUTZ, P.J.; WATERS, A.F.; HARPOLD, M.M.; GINGERAS, T.R. Isolation of Alcohol Oxidase and Two other Methanol Regulatable Genes from the Yeast, *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*. 5:1111-1121, 1985.

EUROOPEN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe: Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. *Surveillance Report*. p. 167-172, 2010.

EVANS, J. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 85, p.105-111, 2004.

EVANS, J.D.; ARONSTEIN, K.; CHEN, Y.P.; HETRU, C.; IMLER, J-L.; JIANG, H.; KANOST, M.; THOMPSON, G.; ZHOU, C.; HULTMARK, D. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*. 15:645-656, 2006.

FLURI, P.; LÜSCHER, M.; WILLE, H.; GERIG, L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone and vitellogenin in worker honeybee. *Journal of Insect Physiology*. V. 28, p.61-68, 1982.

GELLISEN, G.; HOLLENBERG, C.P. Application of yeasts in gene expression studies: A comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. *Gene*. v. 190, p. 87-97, 1997.

HARFORD, N.; CABEZON, T.; COLAU, B.; DELISSE, A.M.; RUTGERS, T.; DE WILDE, M. Construction and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain (RIT4376) expressing hepatitis B surface antigen. **Postgraduate Medical Journal.** v. 63, p. 65-70, 1987

HEILMANN, K.P.; RICE, C.L.; MILLER, A.L.; MILLER, N.J.; BEEKMANN, S.E.; PFALLER, M.A.; RICHTER, S.S.; DOERN, G.V. Decreasing prevalence of beta-lactamase production among respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 49, p. 2561-2564. 2005

HOOVER, S.E.R.; HIGO, H.A.; WINSTON, M.L. Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. **Journal of Comparative Physiology B.** v. 176, p. 55-63, 2006.

HIGGINS, D.R.; CREGG, J.M. Methods in molecular biology. **Pichia Protocols** **Humana Press.** p. 103, 1998.

KOUTZ, P. J.; DAVIS, G. R.; STILLMAN, C.; BARRINGER, K.; CREGG, J. M.; THILL, G. Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. **Yeast.** v. 5, p. 167-177, 1989.

MELMER, G. Biopharmaceuticals and the industrial environment. In Production of recombinant proteins - Novel microbial and eukaryotic expression systems Edited by: Gellisen G. Weinheim: **Wiley-VCH.** p. 361-383, 2005.

MORRISSEY, I.; ROBBINS, M.; VILJOEN, L.; BROWN, D.F. Antimicrobial susceptibility of community-acquired respiratory tract pathogens in the UK during 2002/3 determined locally and centrally by BSAC methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 55, p. 200–208, 2005.

NAUG, D.; CAMAZINE, S. The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. **Journal of Theoretical Biology.** v. 215, p. 427-439, 2002.

NELSON, M.P.; VUCETICH, J.A.; PHILLIPS, M.K. Normativity and the meaning of endangered: a response to Waples et al. 2. **Conservation Biology**. v. 21, p. 1646–1648, 2007.

PAGE JR, R.E.; PENG, Y-SC. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**. v. 36, p. 695–711, 2001.

PINTO, L.Z.; BITONDI, M.M.G.; SIMÕES, Z.L.P. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. **Journal of Insect Physiology**. v. 46 p.153-160, 2000.

RENNIE, R.P.; IBRAHIM, H. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*: how can we prevent the inevitable? Commentary on antimicrobial resistance in *H. influenzae* based on data from the TARGETed surveillance program. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 234–238, 2005.

ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. **Foreign Gene Expression in Yeast: A Review Yeast** v. 8, p. 423-488, 1992.

ROTHENBUHLER, W.C. Resistance to American foulbrood in honey bees: I. Differential survival of larvae of different genetic lines. **Am Zool**. v. 4, p. 111-123, 1964.

RUEPPELL, O.; FONDRK, M.K.; PAGE JR, R.E. Biodemographic analysis of male honey bee mortality. **Aging Cell**. v. 4, p. 13–19, 2005.

SCHMID-HEMPPEL, P. Parasites in Social Insects. **Princeton NJ, Princeton University Press**. 1998.

SADD, B.M.; KLEINLOGEL, Y.; SCHMID-HEMPPEL, R.; SCHMID-HEMPPEL, P. Transgenerational immune priming in a social insect. **Biology Letters**. v. 1, p. 386-388, 2005.

SÉVENO, N.A.; KALLIFIDAS, D.; SMALLA, K.; VAN ELSAS, J.D.; COLLARD, J.M.; KARAGOUNI, A.D.; WELLINGTON, E.M.H. Occurrence and reservoirs of

antibiotic resistance genes in the environment. **Reviews in Medical Microbiology**. v. 13, p. 15–27, 2002.

Snodgrass, R.E. Anatomy of the Honey Bee. **Ithaca Comstock Publishing Associates**. 1956

SPIVAK, M.; REUTER, G.S. Varroa destructor infestation in untreated honey bee (Hymenopter: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. **Journal of Economic Entomology**. v. 94, p. 326-331, 2001.

Starks, P.T.; Blackie, C.A.; Thomas, D.; Seeley, P.T. Fever in honeybee colonies. **Naturwissenschaften**. v. 87, p. 229-231, 2000.

TOTH, A.L.; ROBINSON, G.E. Worker nutrition and division of labour in honeybees. **Animal Behaviour**. v. 69. p. 427-435, 2005.

TRANIELLO, J.F.; ROSENGAUS, R.B.; SAVOIE, K. The development of immunity in a social insect: evidence for the group facilitation of disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 99, p. 6838-6842, 2002.

TSCHOPP, J.F.; BRUST, P.F.; CREGG, J.M.; STILLMAN, C.; GINGERAS, T.R. Expression of the lacZ Gene from Two Methanol Regulated Promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**. v. 15, p. 3859-3876, 1987.

Winston, M.L. The Biology of the Honey Bee. **Harvard University Press**. 1987.

Wilson, E.O. The Insect Society. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA

Capítulo 2

**Expressão heteróloga do
peptídeo abaecina de *Apis
mellifera* em *Pichia pastoris***

Resumo

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) fazem parte da defesa imune que os insetos apresentam para proteção contra patógenos. Nesse trabalho foi feito a expressão do peptídeo antimicrobiano abaecina do himenóptero *Apis mellifera* em levedura *Pichia pastoris*. Foi desenhado um gene contendo elementos para clonagem, purificação e término de tradução baseado na sequência de abaecina de *Apis mellifera* seguido de otimização de códons e posterior síntese química do gene. Esse gene foi克lonado em pUC57 e após sequenciamento para confirmação, o inserto foi subclonado em vetor de expressão pPIC9 e transformado em *Pichia pastoris*. Após seleção de clones positivos, a expressão foi induzida por adição de metanol. O sobrenadante foi analisado em diferentes tempos para determinação do tempo ótimo de produção do peptídeo recombinante. A análise da atividade inibitória de crescimento mostrou que houve inibição significativa do crescimento da bactéria *Escherichia coli* no tempo de 24 hora nas concentrações de 10 e 25 µg de peptídeo. Os resultados mostram que o peptídeo abaecina de *Apis mellifera* produzido em *Pichia pastoris* tem atividade antimicrobiana.

Palavra-Chave

Abaecina, *Pichia pastoris*, *Apis mellifera*, Expressão heteróloga

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are part of the immune defense that insects have developed to protect hymenoptera against pathogens. This work was done the expression of antimicrobial peptide Abaecina of *Apis mellifera* in fungi *Pichia pastoris*. A gene containing elements for cloning, purification and termination of translation was designed based on the sequence of *Apis mellifera* abaecina then was optimization of codons and subsequent chemical synthesis of the gene. This gene was cloned into pUC57 and after sequencing for confirmation, then the insert was subcloned into expression vector pPIC9 and realized the transformation into *Pichia pastoris*. After selection of positive clones expression was induced by adding methanol. The supernatant was analyzed at different times to determine the optimum time of production of the recombinant peptide. The growth inhibition test showed that there was significant inhibition of growth of the bacterium *Escherichia coli* DH5 α in time of 24 hours at concentrations of 10 and 25 mg of peptide. The results showed that the peptide abaecina of *Apis mellifera* produced in *Pichia pastoris* has antimicrobial activity.

KEYWORD

Abaecin, *Apis mellifera*, *Pichia pastoris*, Heterologous expression

1. Introdução

O sistema imune dos insetos possui duas características: a memória e a especificidade. A especificidade é relacionada com o fator que impede a autodestruição, removendo a possibilidade de gerar uma doença autoimune. Quando o corpo sofre a invasão por um mesmo patógeno, em uma co-infecção, os anticorpos podem destruir o corpo estranho e esta ação está relacionada com a memória (Boman, 1995).

Quando é detectado um intruso, o sistema comeceia uma resposta por três vias: a primeira é um estímulo para produção de peptídeos antimicrobianos, a segunda é uma encapsulação e fagocitose através de resposta celular e a terceira via é uma reação da fenoloxidase, pela qual é depositada melanina escura em volta das feridas do tecido e do patógeno (Hultmark, 2003).

Os peptídeos antimicrobianos (AMP) são moléculas presentes no sistema imune do organismo multicelular, que atuam na defesa contra invasores como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Izadpanah e Gallo, 2005). São classificados como cecropina/sarcotoxina de 4kDa, que são responsáveis por desestabilizar a estrutura física da parede celular bacteriana, lisando-as (Li et al., 1988). O outro grupo é formado pela lisoenzima de insetos de 13-23 kDa (Boman and Hultmark, 1987), um terceiro grupo são as atacinas de 20 kDa (Engstrom et al, 1984). O quarto grupo de peptídeo de 8 kDa são as dipterícinas e o quinto formado pelas defensinas/sapecinas de 4 kDa (Lambert et al., 1989; Matsuyama and Natori, 1988)

O peptídeo abaecina é um peptídeo que possui 34 aminoácidos, com 10 prolinas (29%), e nenhum resíduo ácido e de cisteína. A carga total é 4⁺, agrupadas nas posições 12, 13, 27 e 29. As prolinas são uniformemente distribuídas no comprimento da proteína, isto exclui a possibilidade do peptídeo assumir uma conformação α-helicoidal (Chou e Fasman, 1978).

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, capaz de metabolizar metanol como única fonte de carbono. O primeiro passo no metabolismo do metanol é a oxidação do metanol em formaldeído usando molécula de

oxigênio, pela enzima álcool oxidase. Esta reação gera peróxido de hidrogênio e formaldeído. Para evitar a toxicidade do peróxido de hidrogênio, a organela peroxissomo sequestra os produtos tóxicos dos restos celulares pelo metabolismo do metanol. A enzima álcool oxidase tem baixa afinidade por oxigênio e a *P. pastoris* compensa isso gerando grandes quantidades da enzima. O promotor regula a produção de álcool oxidase que leva a expressão heteróloga da proteína, na levedura (Romanos et al., 1992).

A expressão do gene AOX1 é regulado e induzido por metanol a altos níveis, aproximadamente $\geq 30\%$ da proteína total solúvel em crescimento celular. O promotor do gene AOX1 é usado para expressão do gene de interesse (Ellis et al., 1985; Koutz et al., 1989; Tschopp et al., 1987).

Neste trabalho visamos, por meio de síntese química, produzir um gene sintético para a expressão do peptídeo abaecina, que faz parte do sistema imune da abelha *Apis mellifera*. Foi escolhido o sistema de levedura *Pichia pastoris* para otimizar a expressão, que além de ser um sistema barato e rápido, é um organismo eucarioto assim como a abelha, o que favoreceu os processos de formação da proteína. O objetivo maior é otimizar a expressão desse peptídeo, afim de fornecer dados para a produção em larga escala e desenvolvimento de um novo fármaco baseado no peptídeo recombinante.

2. Objetivos

Gerais

Expressão do peptídeo recombinante abaecina de *Apis mellifera* em *Pichia pastoris*.

Específicos

- Desenho, otimização de códons e síntese química de um gene codificador da abecina.
- Subclonagem em vetor de expressão pPIC9 e transformação em *Pichia pastoris*
- Produção de abaecina em *Pichia pastoris*.
- Teste de inibição de proliferação de *E. coli*

3. Material e Métodos

3. 1. Desenho e síntese do gene codificador de abaecina

A sequência codificadora de peptídeo foi desenhada baseado na sequência depositada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) NP_001011617.1, do peptídeo abaecina de *Apis mellifera*, à qual foram adicionadas sequências com a finalidade de facilitar a clonagem e otimização a expressão dessa proteína em levedura *Pichia pastoris*. Foram adicionados dois sítios de restrição, um na posição 5', foi adicionado sitio para enzima EcoR I e outro na posição 3' para enzima Not I, uma calda de hexahistidina (Histag) para purificação e um códon de parada. O peptídeo sinal da sequência de *Apis mellifera* foi removido.

Foi feita dedução da sequência de nucleotídeo codificador do polipeptídeo a partir do seguinte desenho EcoRI-YVPLPNVPQPGRRPFPTFPQQGPFPNPKIKWPQGY-HHHHHH-Stop-NotI. Para otimização de códons foi realizado o cálculo do índice de adaptação de códons (CAI, acrônimo da expressão Codon Adaptation Index) que estima o grau de extensão da utilização diferencial de códons em genes altamente expressos (Sharp & Li, 1987a) e é uma medida utilizada para as preferências de códons em procariotos (Eyre-Walker & Bulmer, 1993; Gutierrez et al., 1994; Perrière et al., 1994) e eucariotos (Akashi, 1994). Todos os cálculos foram feitos utilizando o programa OptimumGeneTM (GenScript Corporation).

Após as análises e dedução da sequência de DNA otimizada, foi feito a síntese química do minigene, clonado em pUC57 e sequenciado para confirmação da sequência de nucleotídeos, pela GenScript Corporation.

3. 2. Subclonagem do gene sintético no vetor de expressão pPic9

O Inserto clonado no vetor pUC57 (pUC-Aba), foi retirado utilizando os sítios de restrição para as enzimas NotI e EcoRI. O vetor pPIC9 também, foi digerido com as mesmas enzimas, quantificado e defosforilado com enzima SAP. Foram utilizado 2,6ng de inserto na reação de ligação com 28,8 ng de vetor pPIC9 e o produto dessa ligação foi denominado pPic-Aba. Em seguida bactérias *E. coli* Top 10 foram transformada com a ligação e os clones foram isolados. Foi feita a extração plasmidial das colônias, que cresceram em meio LB contendo 50 µg/ml de Ampicilina, utilizando kit Quiaprep (Qiagen). Esse vetor foi linearizado com enzima SacI, purificado com fenol/clorofórmio e utilizado para transformar a levedura *Pichia pastoris* cepa GS115.

Antes da transformação a cepa GS115 foi cultivada em placa YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) a 28ºC por dois dias, posteriormente foi feito um pré-inoculo dessa colônia em 10ml de meio líquido YPD e um inóculo de 200ml, ambos sob rotação de 250rpm. Foi realizada a transformação com 10µg de DNA e 100µl de solução com as células competentes em sorbitol 1M e eletroporado em BioRad GenePulser, conforme protocolo *A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in Pichia pastoris* (Invitrogen). A transformação foi verificada por PCR e eletroforese em gel de agarose 1,5%. Após a confirmação de colônias transformadas foi realizado a otimização da expressão.

3.3 Expressão do peptídeo recombinante

Uma colônia recombinante foi inoculada em Meio Mínimo Tamponado com adição de Glicerol nomeado BMG (100 mM fosfato de potássio pH 6.0, 1.34% (p/v) de YNB, 4 x 10-5% (p/v) de biotina 1% (p/v) glicerol) durante dois dias a 28ºC. Sem seguida as células foram centrifugadas e resuspendidas em meio para expressão Meio Mínimo Tamponado com adição de Metanol nomeado BMM (100 mM fosfato de potássio pH 6.0, 1.34% (p/v) YNB, 4 x 10-5% (p/v) biotina, 0.5% (p/v) metanol) em uma OD₆₀₀ = 1,0, na temperatura de 28º a 250rpm.

Para verificar o melhor tempo de indução de expressão alíquotas de sobrenadantes foram coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas com adição de 0.5% (p/v) metanol nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. A confirmação da expressão foi analisada através de eletroforese Tricina–SDS-PAGE (Schägger, 2006).

3.4. Teste de inibição de crescimento

O teste de inibição de crescimento foi realizado utilizando placa de 96 poços para a análise das amostras. Todas as amostras feitas em quadruplicatas. A primeira fileira de poços foi utilizado somente meio LB (100 µL) sem bactéria, a segunda foi utilizado 50 µL de meio LB e 50 µL de meio mais bactéria *Escherichia coli* DH5α OD=0,3. Na terceira coluna foi administrado 1 µg de abaecina, na quarta coluna 10 µg e na quinta 25 µg (completados com LB até 50 µL), e adicionado 50 µL de meio com bactéria para um final de 100 µL em cada poço.

O leitor de placas foi ajustado para uma leitura ótica de 590nm, e a densidade ótica (OD) inicial das bactérias para o tempo zero foi de OD₅₉₀ 0,3. As leituras foram feitas no tempo 0 hora (logo após a adição do peptídeo na amostra contendo bactéria), posteriormente nos tempos 6, 12, 24, e 48 horas.

3.5 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados pelo aplicativo Prisma 4.0. Para os dados que apresentaram dispersão Gaussiana, foram utilizados testes e análise de variância (ANOVA) com repetição e testes Bonferroni para comparação do valor obtido de p com o valor esperado p<0.05.

4. Resultados

4. 1. 1. Desenho e síntese do gene e otimização de codons

Após a dedução e otimização da sequência do gene sintético foi feita alinhamento utilizando Clustal W para mostrar as regiões não modificadas e os codons otimizados (Figura 1). O gene sintetizado quimicamente denominado Aba com tamanho de 143pb foi ligado ao vetor de clonagem pUC57.



Figura 1. Alinhamento da sequência do gene Abaecina em *Apis mellifera* e sequência otimizada para expressão em *Pichia pastoris*. Nucleotídeos preservados em ambos os genes destacado em vermelho.

4. 2. Subclonagem do gene sintetizado no vetor de expressão pPic9

O inserto clonado em pUC-Aba foi cortado enzimaticamente, subclonado em pPic9 e linearizado para a transformação dos esferoplastos de *Pichia* GS115. A confirmação da linearização do clone do gene sintético ligado ao vetor de expressão pPic9 foi feito por eletroforese 0,8%. O vetor linearizado migra juntamente com a banda de 6000pb do marcador e apresenta-se como banda única característico de plasmídeos linearizados.

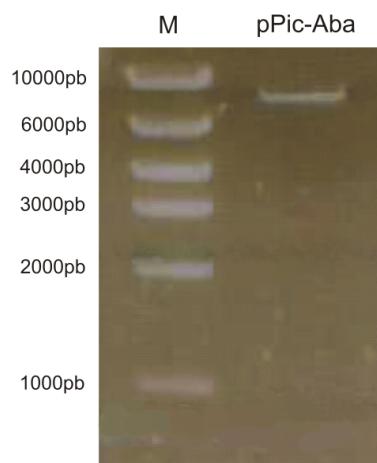


Figura 2. Eletroforese (agarose a 0,8%). M: marcador - High DNA Mass Ladder; pPic-Aba: Gene sintético subclonado em vetor pPic9 linearizado.

4. 3. Expressão de peptídeo recombinante

Uma colônia de *Pichia pastoris* transformada com Aba-pPIC9 foi colocada em Meio Mínimo Tamponado com adição de Glicerol (BMG) para crescimento dos clones e posteriormente em Meio Mínimo Tamponado com adição de Metanol (BMM) para expressão. Sobrenadantes foram coletados do meio de expressão em diferentes tempos. A figura 3 mostra PAGE de sobrentantes. No tempos T3 e T4 é possível visualizar a banda de 5.291Da mostrando que o clone selecionado produz o peptídeo recombiante nesses tempos.

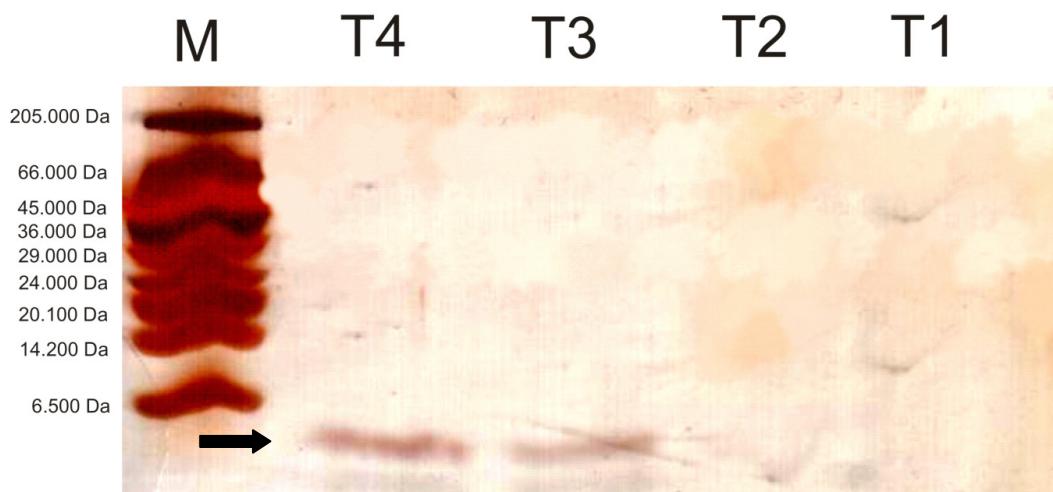
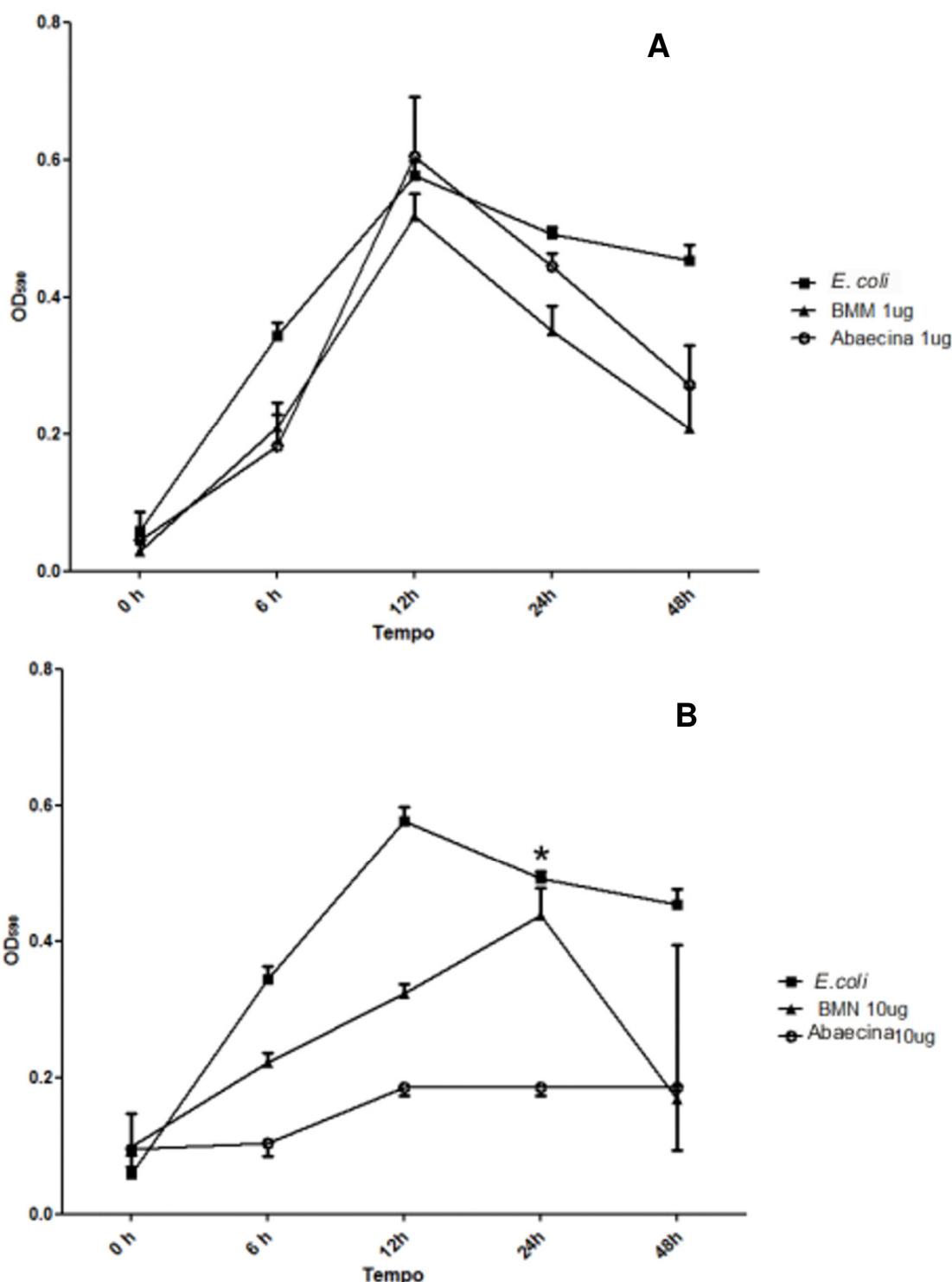


Figura 3: → Produção do Peptídeo Abaecina 5.291 Da. Tempo de expressão: T1 = 24h; T2 = 48h; T3 = 72h; T4 = 96h, com adição de metanol 0,5% em todos os tempos. O início da expressão do peptídeo ocorreu às 72 horas de incubação a 30ºC. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE. M = marcador de alto peso molecular de 6,5 a 205 KDa (Sigma-Aldrich).

4. 4. Teste de inibição de crescimento

Após a confirmação da produção do peptídeo recombinante, o sobrenadante contendo peptídeo foi liofilizado e utilizado em cultura de *E. coli* em placas de microtitulação para confirmação da atividade antimicrobiana.

O teste mostrou que as concentrações testadas de 10 e 25 µg de meio liofilizado contendo peptídeo recombinante foi suficiente para inibir significativamente o crescimento de *E. coli* após 24 horas de tratamento (Figura 4, B e C). A concentração de 1 µg não inibiu o crescimento bacteriano (Figura 4, A).



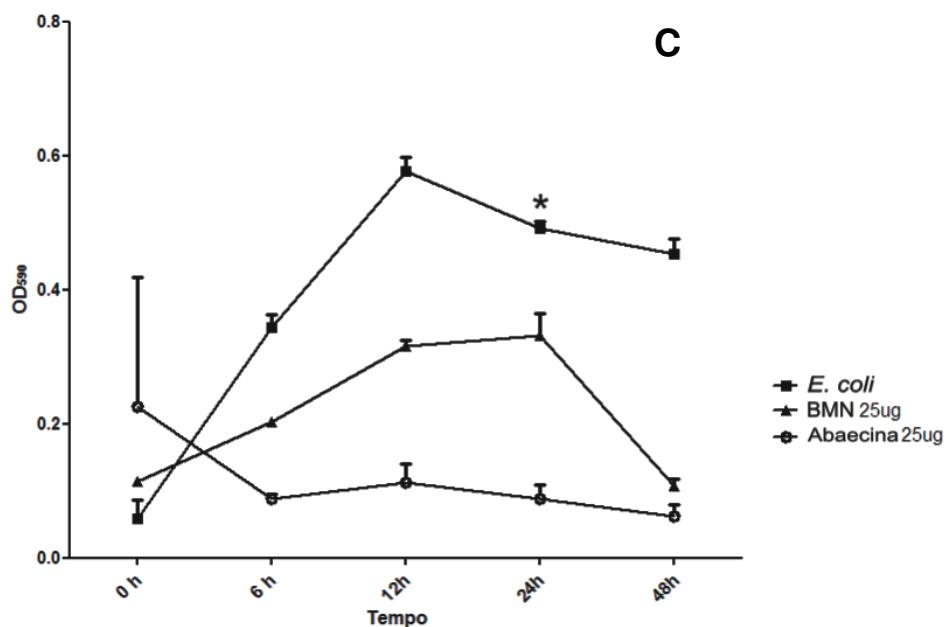


Figura 4:

- *E. coli* = Controle
- *E. coli* em meio LB, BMM = controle para o meio de cultivo
E. coli + Abaecina + BMM = sobrenadante contendo o peptídeo Abaecina
- A** Exposição à 1 µg de Abaecina
 - B** Exposição à 10 µg de Abaecina
 - C** Exposição à 25 µg de Abaecina

*Diferença significativa em comparação à amostra de BMM na mesma concentração ($P < 0,01$, Bonferroni teste) e *E.coli* ($P < 0,001$, Bonferroni teste) no tempo de 24 horas.

5. Discussão

O sistema de expressão de proteínas por bactéria *E. coli* foi muito utilizado devido sua fácil manutenção e rápido crescimento em cultura (Huang et al. 2009). Nesse trabalho não foi possível utilizar *E. coli* como sistema de expressão porque o produto recombinante é tóxico para essa bactéria. Foi utilizado nesse trabalho, o sistema de expressão em levedura *Pichia pastoris*, que por ser um eucarioto tem várias vantagens em um sistema de expressão de proteínas assim como seu processamento, seu enovelamento e suas modificações pós-traducionais. Outra vantagem é sua fácil manipulação em comparação à expressão em *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. A metodologia é rápida e barata em comparação a outros sistemas de expressão como o caso de baculovírus ou cultura de tecidos e possibilita alto grau de expressão. (Buckholz e Gleeson, 1991; Cregg et al., 1993).

A síntese química do gene abaecina de *Apis mellifera*, visando à expressão do peptídeo em levedura *P. pastoris*, possibilitou a produção do peptídeo antimicrobiano. O sistema de levedura demonstrou ser de fácil manutenção e produção rápida do produto, para chegar ao resultado esperado. A utilização do vetor de expressão pPic9, permitiu que o peptídeo fosse expresso de maneira extracelular, facilitando e diminuindo passos na metodologia para sua manipulação. A otimização da expressão mostrou que o tempo necessário para a produção do peptídeo é de 72 horas, o que permite transformar essa metodologia em uma produção de peptídeos recombinantes em larga escala, em pouco tempo.

Rees et al., 1997 isolaram quatro peptídeos antimicrobianos da abelha *Bombus pascuorum*, o primeiro com 12 resíduos conservados do peptídeo defensina de *A. mellifera* mostrando atividade antifúngica e atividade contra bactéria gram-positiva. Outro peptídeo com 17 resíduos, de apidaecina, apresentando atividade contra bactéria gram-negativa e um peptídeo com 39 resíduos de Abaecina, foi identificado e testado, mostrando atividade contra bactérias gram-positivas e negativas e, por último, um com características de heminoptaecina que mostrou atividade somente contra bactérias Gram-negativa.

Xiaojing et al. 2010 identificaram um clone cDNA em vespas endoparasitóide da espécie *Pteromalus puparum* com aminoácidos similares aos da abaecina, denominado PP30. Testado em bactérias gram-positivas e negativas, demonstrou atividade inibitória em cultura de *E.coli*.

Li et al., 2005 clonaram o peptídeo *Ch-penaeidina* de *Penaeid shrimp*, uma espécie de camarão, em vetor pPIC9K e transformou em *P. pastoris*, produzindo uma proteína recombinante de 6.100 Da em grande escala. Posteriormente sua atividade anti-microbiana foi testada apresentando inibição de crescimento tanto para bactérias gram-positivas quanto para negativas.

Em 2006 Jin et al. expressaram o peptídeo (cecropinaA-magainina2) combinação de segmentos de dois peptídeos de *Hyalophora cecropia* uma espécie de borboleta e *Xenopus laevis*, uma espécie de sapo, utilizando o sistema de expressão de *P. pastoris*. Apresentando um grande espectro de propriedade antimicrobiana contra fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por se tratar de um peptídeo de 3,0 KDa, o sistema de levedura comprovou ser muito eficaz para expressão de pequenas proteínas.

Em 2007 SANG et al., expressaram os genes dos peptídeos Drosomicina e Drosomicina-like C de *Drosophila melanogaster* e Tanatia de *Podisus maculiventris* em *P. pastoris*, utilizando para a clonagem o vetor pPICZαA e os produtos das expressões demonstraram forte atividade contra os fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, e *Colletotrichum capsici* e as bactérias *E. coli* e *Staphylococcus aureus*.

Chen et al., (2011) expressaram o peptídeo hPAB-β derivado de beta-defensina 2 humana, clonado no vetor pPIC9K e transformado em *P. pastoris*. Sua atividade antimicrobiana foi testada e comprovada contra *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) e o sistema de expressão demonstrou ser adequado para expressão em larga escala dessa proteína.

Para atividade do peptídeo Abaecina baseado no gene de *A. mellifera*, em amostras de *E.coli*, o período de incubação ótimo foi de 24 horas, após este tempo a densidade óptica das amostras analisadas diminuem, supostamente

pelo crescimento bacteriano atingir uma concentração alta nas amostras, promovendo a morte bacteriana devido à falta de suprimento e baixas condições ambientais da amostra (Robinson et al., 2001).

A carga elétrica do peptídeo Abaecina pode facilitar à interação com a carga negativa da superfície bacteriana, formando poros através da membrana lipídica, permitindo a saída de metabólitos essenciais, pertubando a integridade da membrana e levando à lise bacteriana (Dathe et al., 1997, Shai, 2002, Xiaojing et al. 2010).

O resultado da metodologia demonstrou que há variação na inibição do crescimento microbiano da bactéria *E.coli* DH5 α no tempo de 24 horas. A purificação do peptídeo composto em larga escala e análise de atividade antimicrobiana da proteína recombinante pressupõe mais estudos, que visam a produção de um antibiótico com esse composto como base.

Os resultados demonstraram que o peptídeo Abaecina de *Apis mellifera* produzido em *Pichia pastoris* tem atividade antimicrobiana contra *E. coli* e tem potencial biotecnológico para produção de novos fármacos com atividade contra bactérias resistentes às drogas atuais disponíveis no mercado.

6. Referências bibliográficas

- Akashi H (1994). Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy. *Genetics* 136:927–935
- Izadpanah A e Gallo RL (2005). Antimicrobial peptides. San Diego, California, *Journal American Academy of Dermatology* 52:381-390
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk, MK, Page Jr RE, Omholt SW (2003) The gene csd is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114:419–429
- Boman HG e Hultmark D (1987) *Annu Rev Microbiol* 41,103-126
- Boman HG (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. 1995. *Annual Review of Immunology*. 13:61-92
- Buckholz, RG e Gleeson MAG (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology* 9:1067-1072
- Chen Z, Wang D, Cong Y, Wang J, Zhu J, Yang J, Hu Z, Hu X, Tan Y, Hu F, Rao X (2011) Recombinant antimicrobial peptide hPAB-B expressed in *Pichia pastoris*, a potential agent active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:281-291
- Chou PY e Fasman GD. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Annu Rev Biochem* 47:251 -276
- Cregg JM, Vedvick TS e Raschke WC (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11: 905-910
- Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL., Beyermann, M, Bienert M, (1997) Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett* 403:208–212.

Hultmark D (2003) Drosophila immunity: paths and patterns. Current Opinion in Immunology 15:12-19

Engstrom P, Carlsson A, Engstrom A, Tao Z-j e Bennich H. (1984) The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *Embo J* 3:3347-3351

Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold M M. Gingeras TR. (1985). Isolation of Alcohol Oxidase and Two other Methanol Regulatable Genes from the Yeast, *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1111-1121.

Eyre-Walker A and Bulmer M (1993). Reduced synonymous substitution rate at the star of Enterobacterial genes. *Nucleic Acids Res* 21:4599-4603

Gutierrez AP, Mills NJ, Schreiber SJ e Ellis CK (1994) A physiologically based tritrophic perspective on bottom-up top-down regulation of populations. *Ecology* 75:2227-2242

Hou ZC and Yang N (2002) Analysis of factors shaping *S. pneumoniae* codon usage. *Acta Gen Sinica* 29:747-752 (verificar año)

Huang L, Leong SS, Jiang R (2009) Soluble fusion expression and characterization of bioactive human beta-defensin 26 and 27. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:301-308.

Ikemura T (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* system. *Journal Mol Biol* 151: 389-409

Ikemura T and Ozeki H (1982) Codon usage and transfer RNA contents: organism specific codon choice patterns in reference to the isoacceptor contents. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47: 1087-1097

Ikemura T (1985) Codon usage and transfer-RNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 2:13-34

Izadpanah A e Gallo RL (2005) Antimicrobial peptides. J Am Acad Dermatol 52:381–390

Jin F, Xu X, Wang W, Zhang W e GU D (2006) Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1–8)–magainin2(1–12) in Pichia pastoris: Purification and characterization Protein Expression and Purification 50:147–156

Kotsopoulos E, Bosteels H, Chim YT, Pegman P, Stephen G, Thornhill SI, Faulkner JD, Uden M. (2010) Optimised mammalian expression through the coupling of codon adaptation with gene amplification: Maximum yields with minimum effort. J Biotechnol 146:186–193

Koutz PJ, Davis GR, Stillman C, Barringer K, Cregg J M, Thill G. (1989). Structural Comparison of the Pichia pastoris Alcohol Oxidase Genes. Yeast 5, 167-177.

Lambert J, Keppi E, Dimarcq J-L, Wicker C, Reichart J-M, Dunbar B, Lepage P, Van Dorsselaer A, Hoffmann J, Fothergill J e Hoffmann D. (1989) Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran Phormia terraenovae of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. Proc Natl Acad Sci 86:262-266

Lee JH, Kim JH, Hwang SW, Lee WJ, Yoon HK, Lee HS, Hong SS (2000) High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. Biochem Biophys Res Commun 277:575-580

Li Z-q, Merrifield RB, Boman A, Boman HG (1988) Effects on electrophoretic mobility and antibacterial spectrum of removal of two residues from synthetic sarcotoxin IA and addition of the same residues to cecropin B (1988) FEBS Lett 231:299-302.

Matsuyama K e Natori S (1988) J Biol Chem 263:17112-17116

Lia L, Wanga J-X, Zhaoa X-F, Kang C-J, Liua N, Xiangb J-H, Lib F-H, Suedac S, Kondoc H (2005) High level expression, purification, and characterization of

the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification 39:144–151

Naya H, Romero H, Carels N, Zavala A e Musto H (2001) Translational selection shapes codon usage in the GC-rich genomes of *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett 501:127-130

Nelson MP, Vucetich JA, e Phillips MK (2007) Normativity and the meaning of endangered: a response to Waples et al. 2. Conservation Biology 21:1646–1648

Perrière G, Gouy M e Gojobori T (1994) NRSub: a non-redundant data base for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic Acids Res* 25:5525-5529

Rees JA, Moniatte M, Bulet P (1997) Novel Antibacterial Peptides Isolated from a European Bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea) Insect Biochem Molec Biol 27:413-422.

Reichhart JM, Meister M, Dimarcq JL, Zachary D, Hoffmann D, Ruiz C, Richards G, Hoffmann JA (1992) Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* diptericin promoter. Embo J 11:1469-1477

Robinson TP, Aboaba OO, Kaloti A, Ocio MJ, Baranyi J, Mackey BM (2001) The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 70:163–173

Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. (1992). Foreign Gene Expression in Yeast: A Review. Yeast 8, 423-488.

Sang Y, Deng X, Yang W, Wang W, Wen S, Liu W, Huang Y e Cao Y (2007) Secretive Expression of Insect Antifungal Peptide-Encoded Genes in *Pichia pastoris* and Activity Assay of the Products. Agricultural Sciences in China 6:1209-1216

Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. 2006. Nature Protocols. 1:16-22

Sharp PM e LI WH (1987) The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. Nucleic Acids Res 15: 1281-1295

Schulz, DJ, Huang, Z-Y e Robinson GE (1998) Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. Behav Ecol Sociobiol 42:295-303.

Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman C, Gingeras TR (1987). Expression of the lacZ Gene from Two Methanol Regulated Promoters in Pichia pastoris. Nucleic Acids Res. 15, 3859-3876.

Xiaojing Shen, Gongyin Ye, Xiongying Cheng, Chunyan Yu, Illimar Altosaar e Cui Hua (2010) Characterization of an abaecin-like antimicrobial peptide identified from a Pteromalus puparum cDNA clone. Journal of Invertebrate Pathology 105:24–29

Zhuo-Cheng H (2003) Factor affecting codon usage in Yersinia pestis. Acta Bioch Biophys Sinica 35:580-586.