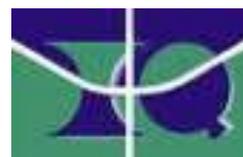




Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Químicas
e Biológicas



PRODUÇÃO HETERÓLOGA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO *AFP 1.5* EM
PICHIA PASTORIS

Iara Holanda Valença
Orientador: Prof. Dr^a Nádia Skorupa Parachin



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Químicas
e Biológicas



PRODUÇÃO HETERÓLOGA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO *AFP 1.5* EM
PICHIA PASTORIS

Dissertação de Mestrado, área de concentração tecnologias químicas e biológicas, apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Iara Holanda Valença
Orientador: Prof. Dr^a Nádia Skorupa Parachin

2015, Brasília, Distrito Federal



Universidade de Brasília – Instituto de Química



Comunicado

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a): Iara Holanda Valença, intitulada “**Produção heteróloga do peptídeo antimicrobiano AFP 1.5 em *Pichia pastoris***”, apresentada ao Instituto de química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 6 de julho de 2015.

Prof.^a Dra. Nádia Skorupa Parachin
Presidente da banca – UnB

Prof.^a Dra. Kelly Leite Mulder
Membro titular – UnB

Prof. Dr. Túlio César Ferreira
Membro titular – UnB

Prof. Dr^a Viviane Castelo Branco Reis
Membro suplente – UnB

Brasília – DF
2015

“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas.”

Johann Goethe

Dedico este trabalho a minha família e amigos que estavam sempre ao meu lado nos momentos difíceis. Especialmente a minha mãe e meu noivo Luiz Carlos, por me acompanharem em todos os momentos. Mais especial ainda ao meu Pai Edil Holanda, que mesmo não estando conosco a tantos anos estaria muito feliz e orgulhoso em ver essa minha nova conquista. Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento é a Deus, por me conceder saúde e sabedoria para lidar com as adversidades e superar os obstáculos durante esta caminhada.

A minha família, minha mãe Maria José, minha irmã Karine, ao meu noivo Luiz Carlos e minha sogra Laura pelo apoio, amor e carinho.

A Professora Nádia, que me acolheu no Laboratório, me concedeu oportunidade e apoio que tem sido para mim, desde o início, exemplo de dedicação, determinação e profissionalismo. Obrigada por sua paciência e pelos ensinamentos! Muito obrigada!

A professora Kelly por sua ajuda em diversas dúvidas que tive ao longo do período e que me atendeu tão prontamente em todas elas.

A colega Hέλvia e Camila pelo apoio no processo de seleção e nas aulas de química.

Aos Colegas de laboratório, Nadielle, Virgilio, Lucas, Jέssica, Fábio, Stephan, Daniel, Kelly, Milton que me ajudaram de forma impagável na realização deste trabalho. Obrigada a estes parceiros.

Aos técnicos de laboratório Adevilton e Davi.

Aos Professores, Nádia Skorupa Parachin, Kelly Mulder, Túlio César Ferreira e Viviane Castelo Branco Reis por aceitarem participar da banca, muito obrigada!

A Universidade de Brasília e Universidade Católica de Brasília pela oportunidade da realização do trabalho.

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos são importantes moléculas do sistema imune inato dos organismos. Essas moléculas podem interagir com membranas lipídicas, levando a formação de poros ou a desestabilização da mesma, resultando no extravazamento e morte celular. Essa característica revela que os peptídeos antimicrobianos apresentam um possível potencial contra microrganismos patogênicos. No entanto, adquirir essas moléculas para serem imediatamente aplicadas na indústria farmacêutica de seu habitat natural é inviável, já que as quantidades obtidas são muito baixas. Sendo assim, uma opção é a produção por meio da utilização de sistemas heterólogos de expressão. A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é um dos sistemas de expressão heterólogos mais utilizados. Os peptídeos anticongelantes (*antifreeze peptide – AFP*), são uma classe de peptídeos antimicrobianos multifuncionais isolados de animais de regiões polares, onde essas moléculas impedem a *formação* de cristais de gelo nos fluídos corporais desses organismos. O sintético *AFP 1.5* é um peptídeo anticongelante retirado do peixe *Pleuronectes americanus*. Esse peptídeo foi expresso no sistema heterólogo de produção *Pichia pastoris*. Foi realizada uma expressão com indução por metanol à 0,5% por 48 horas e um ensaio antimicrobiano por disco de difusão contra *Escherichia coli*. O ensaio antimicrobiano contra *E. coli* apresentou resultados positivos, com a formação de halos de inibição nos sobrenadantes dos clones 1, 2 e 4. Com o resultado positivo em *E. coli* se torna necessário novos testes de expressão, a fim de melhorar a produção da proteína recombinante.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, peptídeos anticongelantes (*AFP*), *AFP 1.5*, *Pichia pastoris*, produção heteróloga.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides are important molecules of the innate immune system of the organisms. These molecules may interact with lipid membranes, leading to pore formation or the destabilization of the membrane, resulting in leakage and consequently cell death. This feature reveals that the antimicrobial peptides are potential drug candidates for antimicrobial diseases. However, in order to apply those molecules in the pharmaceutical industry it is not feasible to isolate them from its natural habitat since the relevant amounts are very low. Thus, one option is its production using heterologous expression systems. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is one of the most utilized heterologous expression systems. The antifreeze peptides - AFP are a class of multifunctional antimicrobial peptides isolated from animals polar regions, where these molecules prevent the formation of ice crystals in the body fluids of these organisms. The synthetic AFP 1.5 is an antifreeze peptide removed from the fish *Pleuronectes americanus*. This peptide was produced in *Pichia pastoris*. An expression induction with 0.5% methanol for 48 hours and an antimicrobial disc diffusion assay against *Escherichia coli* was performed. The antimicrobial test against *E. coli* showed positive results with the formation of inhibition zones in the supernatants of clones 1, 2 and 4. With a positive result in *E. coli*, it is necessary to test new expression, in order to improve production of the recombinant protein.

Keywords: Antimicrobial peptides, antifreeze peptides (AFP) AFP 1.5, *Pichia pastoris*, heterologous production.

ABREVIATURAS

µg - Microgramas

µL – Microlitro

µM - Micromolar

°C – Graus Celsius

aa – Aminoácido

AFP – *Antifreeze peptide* (peptídeo anticongelante)

AOX – Álcool oxidase

CLSI - Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* - Anvisa

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ELP – *Elastin-like peptides*

g/L – Gramas por litro

M – Molar

mg – Miligrama

min – Minuto

ml - Mililitro

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

pb – Pares de bases

pH – Potencial hidrogênio iônico

rpm – Rotações por minuto

TBE – Tris borato EDTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.....	19
Figura 2 - Esquema de agregação de <i>ELPs</i> por diferença de temperatura.	26
Figura 3 - Esquema de <i>splicing</i> de proteínas.	27
Figura 4 - Principais etapas realizadas durante este trabalho.....	31
Figura 5 - Cassete de expressão com a <i>GyrA</i> inteína, contendo o peptídeo <i>AFP</i> 1.5	35
Figura 6 - Cassete de expressão com a <i>GyrA</i> inteína, contendo o peptídeo <i>AFP</i> 1.5 e os novos sítios de restrição.	36
Figura 7 - Gel de agarose 1% ; Troca do sítio de restrição por PCR..	47
Figura 8 - Gel de agarose 1 % - ligação do vetor de expressão ao produto de PCR.....	48
Figura 9 - Gel de agarose 1% - PCR da extração plasmidial dos quatro clones transformantes.	49
Figura 10 - Gel de agarose 1%; DNA linearizado para integração a levedura.....	50
Figura 11 - Placa de meio YPD com zeocina à 500 µg/mL com a seleção dos clones de <i>Pichia pastoris</i>	51
Figura 12 - Ensaio antimicrobiano contra <i>E. coli</i>	53
Figura 13 - Ensaio antimicrobiano contra <i>S. aureus</i>	54
Figura 14 - Marcador ladder. Fonte: lifetechnologies	69
Figura 15 - Vetor de expressão pPICzα. Fonte: Invitrogen	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos antimicrobianos produzidos em microrganismos recombinantes, microrganismo produzido, organismo isolado, referência.	19
Tabela 2. Linhagens mais utilizadas de <i>P. pastoris</i> . Adaptado de Batista, 2012.	23
Tabela 3. Microrganismos, linhagem, genótipo e fabricante utilizados para clonagem e expressão.	33
Tabela 4. Enzima e sítio de clivagem.....	33
Tabela 5. Enzimas e fabricante.....	34
Tabela 6. Vetor, marca de seleção, características e fabricante	34
Tabela 7. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a troca do sítio de restrição.....	35
Tabela 8. Reagentes e volume utilizados para a reação de polimerase em cadeia. ..	36
Tabela 9. Condições utilizadas para a reação de polimerase em cadeia	36
Tabela 10. Reação de restrição do gene contendo <i>AFP</i> 1,5 e do plasmídeo Ppic α B.	38
Tabela 11. Reação de ligação do gene ao plasmídeo.....	38
Tabela 12. Reação de linearização do plasmídeo recombinante.	40
Tabela 13. Oligonucleotídeos utilizados para a confirmação da integração do vetor ao genoma.....	43
Tabela 14. Reagentes e volumes utilizados para a reação de polimerase em cadeia a fim de confirmar a integração.	43
Tabela 15. Condições utilizadas para a reação de polimerase em cadeia.	43

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1.	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	18
3.1.1.	<i>Peptídeos antimicrobianos de peixes.....</i>	<i>21</i>
3.2.	<i>PICHIA PASTORIS</i> COMO SISTEMA DE PRODUÇÃO HETERÓLOGO	22
3.3.	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	25
4.	PARTE EXPERIMENTAL	29
4.1.	ESTRATÉGIA DE TRABALHO	30
4.2.	MATERIAL	31
4.2.1.	<i>Meios de cultura</i>	<i>31</i>
4.2.2.	<i>Microrganismos utilizados</i>	<i>33</i>
4.2.3.	<i>Enzimas</i>	<i>33</i>
4.2.4.	<i>Vetores</i>	<i>34</i>
4.3.	MÉTODOS	34
4.3.1.	<i>Construção para o peptídeo antimicrobiano AFP 1.5</i>	<i>34</i>
4.3.2.	<i>Mudança do sítio de restrição por reação da polimerase em cadeia (PCR)</i>	<i>35</i>
4.3.3.	<i>Purificação de PCR (E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit).....</i>	<i>36</i>
4.3.4.	<i>Análise em gel de agarose</i>	<i>37</i>
4.3.5.	<i>Purificação de inserto em gel de agarose</i>	<i>37</i>
4.3.6.	<i>Construção do vetor de expressão.....</i>	<i>38</i>
4.3.7.	<i>Transformação por eletroporação em E. coli</i>	<i>39</i>
4.3.8.	<i>Extração de DNA plasmidial.....</i>	<i>39</i>
4.3.9.	<i>Sequenciamento de DNA</i>	<i>40</i>
4.3.10.	<i>Linearização do plasmídeo recombinante</i>	<i>40</i>
4.3.11.	<i>Transformação por eletroporação em Pichia pastoris</i>	<i>40</i>
4.3.12.	<i>Extração de DNA genômico de levedura</i>	<i>42</i>
4.3.13.	<i>Confirmação da integração do vetor ao genoma da levedura.....</i>	<i>42</i>
4.3.14.	<i>Indução do peptídeo AFP 1.5.....</i>	<i>44</i>
4.3.15.	<i>Ensaio antimicrobiano.....</i>	<i>44</i>
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1.	MUDANÇA DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO E LIGAÇÃO AO VETOR DE EXPRESSÃO	47

5.2.	INTEGRAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO AO GENÔMA DA LEVEDURA <i>PICHA PASTORIS</i>	50
5.3.	EXPRESSÃO GÊNICA DO PEPTÍDEO <i>AFP 1.5 EM PCHIA PASTORIS</i>	52
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	58
7.	BIBLIOGRAFIA	60
8.	ANEXOS	68
8.1.	MARCADORES	69
8.2.	VETORES	69

1. INTRODUÇÃO

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas candidatas para o desenvolvimento de agentes de defesa tanto com aplicações farmacêuticas, quanto para o desenvolvimento de novas classes de defensivos para a agroindústria. Os *AFPs* (*antifreeze peptide*) ou peptídeos anticongelantes são encontrados em peixes das regiões polares do planeta. Esses peptídeos evitam o congelamento dos fluídos corporais desses animais. Dentre os *AFPs* os mais utilizados em estudos são os *AFPs* da família tipo 1, encontrados no peixe linguado polar. Recentemente os *AFPs* tem demonstrado atividade contra microgasnismos.

Tendo em vista o potencial contra microrganismos que os peptídeos apresentam é necessário a obtenção de maiores quantidades dessas moléculas para o estudo de suas propriedades biológicas, químicas e estruturais e dos seus mecanismos de ação. No entanto, as quantidades isoladas a partir dos organismos que os produzem, como peixes e insetos, por exemplo, são muito baixas, necessitando a retirada de muitos organismos de seu hábitat, gerando problemas ambientais. Sendo assim, existem formas de obter esses peptídeos, uma delas é a partir da produção heteróloga em microrganismos.

A levedura *Pichia pastoris* tem sido amplamente utilizada para produção heteróloga, já que esse organismo apresenta fácil manipulação e custo de produção relativamente baixo, quando comparada a outros sistemas eucariotos. Esse organismo consegue secretar quantidades da proteína alvo suficientes para o estudo de suas propriedades químicas e biológicas e em alguns casos quantidade suficiente para uma produção industrial.

Após a expressão da proteína alvo é necessário a purificação da mesma, existindo diferentes técnicas para esse fim. No entanto, o custo de muitos processos de purificação são elevados, deixando o custo final do processo inviável para comercialização. A fim de melhorar o processo de purificação e reduzir os custos pode-se utilizar a combinação dos processos inteínas (proteínas internas) e *elastin-like peptides- ELPs* (sequência de repetições de nucleotídeos), sendo essa combinação uma alternativa nos processos de purificação.

O presente trabalho consiste em realizar a produção heteróloga do peptídeo antimicrobiano *AFP 1.5* em *Pichia pastoris*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa a produção do peptídeo antimicrobiano *AFP 1.5* em *Pichia pastoris*.

A fim de que esse objetivo seja alcançado são propostos os seguintes objetivos específicos:

- Construção do vetor de expressão em *P. pastoris*;
- Avaliação da produção do peptídeo antimicrobiano *AFP 1.5* em *P.pastoris*,
- Realização de testes de purificação e bioensaio para determinação da atividade antimicrobiana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Recentemente, muitos microrganismos desenvolveram resistência a antibióticos comumente utilizados, o que resulta em aumento no número de infecções bacterianas causando danos a saúde e onerando o sistema hospitalar por prolongar o tempo que o paciente permanece internado (Austin et al., 1999).

Dentre as diferentes formas de um dado organismo defender-se de patógenos está a resposta imune inata (Murphy et al., 2006). As reações da resposta imune inata incluem barreiras epiteliais, células fagocitárias (como os neutrófilos e macrófagos) e células leucocitárias (como os mastócitos). Muitas dessas estruturas produzem peptídeos que possuem função antimicrobiana (Brogden, 2005). Nas últimas décadas, peptídeos antimicrobianos têm sido encontrados em todos os tipos de organismos vivos (Brogden, 2005; Brown e Hancock, 2006). Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são considerados componentes essenciais do sistema imune inato, atuando como a primeira linha de defesa contra patógenos. Eles têm sido isolados a partir de uma grande variedade de organismos (tabela 1), exibindo uma variedade de sequências de aminoácidos, propriedades físico-químicas e estruturas. A maioria dos PAMs possuem cadeias curtas, contendo até 30 aminoácidos (Silva et al., 2011). Um dos mecanismos de ação consiste na permeabilização da membrana celular, por meio da formação de poros ou desestabilização da membrana plasmática, resultando no vazamento do citoplasma e conseqüentemente, causando a morte celular (Figura 1) (Brogden, 2005; Nascimento, 2014). Além disso, alguns peptídeos atravessam a membrana e induzem a morte celular por ativação de um ou mais alvos intracelulares, como a floculação de componentes intracelulares ou pela inibição da síntese de proteínas. (Brogden, 2005; Brown e Hancock, 2006).

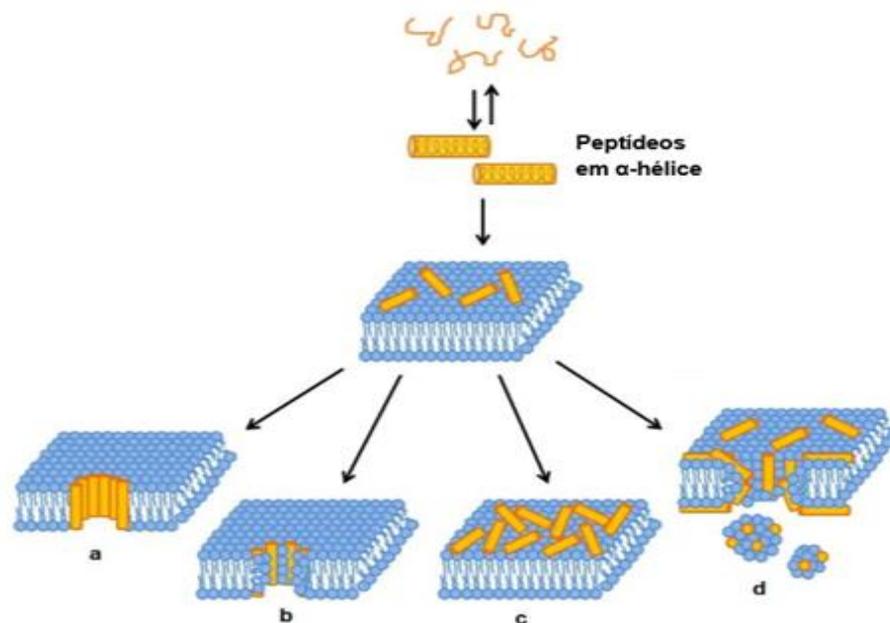


Figura 1 - Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos. Formação de poro sobre a membrana plasmática (a) - modelo barril e (b) poro toroidal ou por desestabilização da membrana (c) modelo tapete e (d) modelo detergente. Adaptado de Nascimento 2014.

Tabela 1. Peptídeos antimicrobianos produzidos em microrganismos recombinantes.

Peptídeo antimicrobiano	Expressão recombinante	Fonte de origem	Referência
B – defensin 2	<i>E. coli</i>	Carrapato Bovino	Zhong et al., 2006
CM4	<i>E. coli</i>	Bicho-da-seda	Zhou et al., 2009
Histonin	<i>E. coli</i>	Sapo	Kim et al., 2008
Indolicidin	<i>E. coli</i>	Boi	Morin et al., 2006
ABP-CM4	<i>P. pastoris</i>	Bicho-da-seda	Zhang et al., 2006
Antifungal Protein	<i>P. pastoris</i>	<i>Aspergillus giganteus</i>	Lopez- Garcia et al., 2010
Cecropin A	<i>P. pastoris</i>	Mosca doméstica	Jin et al., 2006
α Defensin (HD5)	<i>P. pastoris</i>	Homem	Wang et al., 2009
β Defensin-1	<i>S. cerevisiae</i>	Homem	Cipokava e Hostinova, 2005

PAMs normalmente têm ampla atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Além disso, PAMs podem também apresentar atividade contra vírus envelopados, exo e endoparasitas (Li et.al., 2010). Alguns PAMs possuem também ações que podem resultar na inibição da resposta inflamatória e estimular a proliferação e o recrutamento de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T, ajudando na resposta imune (Hancock e Sahl, 2006; Nijnik e Hancock, 2009). Todas essas atividades que os peptídeos antimicrobianos apresentam, os tornam excelentes candidatos para o desenvolvimento de novos medicamentos (Mookherjee e Hancock, 2007).

Para avaliar as formas de ação, estrutura e função dos PAMs e, principalmente, o potencial farmacêutico que eles podem apresentar é necessário a obtenção de uma quantidade adequada de moléculas ativas (Li et al., 2008; Driedonks et al., 1995). No entanto, os PAMs são isolados em quantidades limitadas a partir do seu organismo de origem. Atualmente existem dois métodos para obtenção de maiores quantidades dessas moléculas: síntese química e a síntese por produção heteróloga. Cada um desses métodos apresentam vantagens e desvantagens e sua respectiva escolha deve levar em consideração a quantidade e a natureza requerida do peptídeo (Lloyd-Williams et al., 1997, Machado et al., 2004). A síntese química tem sido tradicionalmente utilizada para sintetizar moléculas curtas e simples, ou seja, que apresentam até 20 aminoácidos e tem permitido a produção de peptídeos naturais e sintéticos (Zhou et al., 2009). No entanto, esta estratégia é praticamente inviável economicamente para a síntese de moléculas contendo mais de 20 resíduos de aminoácidos (Parachin et al., 2012; Tay et.al., 2011). Em vista do limite do método descrito acima, um método promissor é através da produção heteróloga, utilizando sistemas de expressão, por se obter uma maior concentração do peptídeo, facilitando assim sua utilização e testes em larga escala (Silva et al., 2011). No entanto, a escolha do sistema de expressão tem que ser bem estudada, já que alguns sistemas apresentam baixo rendimento, possuem um número limitado de vetores, realizam hiperglicosilação e podem secretar proteases, demonstrando

que existem desvantagens na má utilização desse método (Mulder et al., 2013; Parachin et al., 2012).

3.1.1 Peptídeos antimicrobianos de peixes

O baixo índice de infecção bacteriana observado em peixes, estimulou estudos relacionados ao seu sistema de defesa inato. Os PAMs isolados de peixe, tanto de rios e lagos como de ambientes marinhos, vem recebendo uma atenção especial nas últimas décadas, principalmente por essas moléculas apresentarem atividade antimicrobiana (Ravichandran et al., 2010). Os PAMs isolados e identificados desses animais são principalmente de células da epiderme, secreções da pele, guelras e intestino de peixes ósseos. Alguns desses peptídeos antimicrobianos têm homologia com sequências de outras proteínas, entretanto com outra função, o que sugere uma derivação de produtos de clivagem de proteínas maiores, tais como histonas e proteínas ribossomais reforçando ainda mais a idéia de multifuncionalidade (Robinette et al., 1998; Birkemo et al., 2003; Fernandes et al., 2004).

Atualmente, cerca de 10% de peptídeos antimicrobianos presentes no Antimicrobial Database (APD) foram isolados de peixes. (Wang, Li e Wang, 2009) Quase todos os peptídeos que já foram isolados e caracterizados demonstraram atividade antibacteriana diante de várias linhagens de bactérias Gram-negativas e Gram-Positivas (Lin et al., 2009). Por exemplo, o peptídeo Chrysopsin-1, isolado a partir das brânquias de peixes, demonstrou ter atividade antimicrobiana contra a bactéria *Escherichia coli* (Ivanov et al., 2012). Outro peptídeo, a epinecidina-1 demonstra o rompimento da membrana de bactérias Gram-negativas (Lin et al., 2009). Já o peptídeo H2B, apresenta funções antibacteriana e antifúngica contra *Aeromonas hydrophilia*, bactérias Gram-negativa e *Saprolegnia* spp (Bergsson et al., 2005).

Uma outra classe de peptídeos que tem sido estudada, porém com menor intensidade, são os peptídeos anticongelantes (*antifreeze peptides* – *AFPs*). Estes são encontrados nos tecidos de organismos que vivem em ambientes congelados, inibindo o crescimento de cristais de gelo em seus fluidos. A família de *AFPs* tipo I tem sido caracterizada a partir do peixe linguado

polar (*Pleuronectes americanus*). A estrutura tridimensional deste peptídeo demonstra a semelhança com outros PAMs, consistindo de uma α -hélice rica em alanina composta por 11 aminoácidos com três motivos de repetições imperfeitas (Kuiper et al., 2002). Estudos revelam que os AFPs podem interagir com membranas biológicas, através de interações eletrostáticas, sendo esta interação dependente da composição lipídica da membrana, desestabilizando-a, levando ao extravasamento e morte celular (Tomczak et al., 2002; Nascimento, 2014). A partir da família dos AFP tipo 1 é possível o isolamento do peptídeo AFP HPLC-6 (Gong et al., 1996).

3.2. *PICHIA PASTORIS* COMO SISTEMA DE PRODUÇÃO HETERÓLOGO

Existem diversos sistemas de expressão que podem ser utilizados para a produção de peptídeos antimicrobianos, tais como, expressão em células de bactérias, leveduras, plantas e em células de animais . Esses sistemas permitem produzir peptídeos com diferentes tamanhos e complexidades. A escolha de um sistema de expressão adequado para super produção de PAMs deve levar em consideração algumas características tais como tamanho, localização intracelular, secreção e padrão de glicosilação (Desai et al., 2010).

Dentre os diversos sistemas, *Pichia pastoris* tem sido utilizada com frequência para a produção de PAMs (Parachin et al., 2012). *Pichia pastoris* se destaca como um bom sistema de expressão devido ao fato de ser uma levedura metilotrófica, ou seja, que é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono (Sreekrishna et al., 1997). Ela pode ser geneticamente modificada para produzir um grande número de proteínas heterólogas. Utilizando esse sistema mais de 400 proteínas já foram expressas, apresentando diferentes graus de sucesso (Cereghino et al., 2002).

Dentre as vantagens na utilização desse sistema estão: fácil manipulação, apresenta taxa de crescimento rápido, produz e secreta altos níveis da proteína desejada e faz modificações necessárias no polipeptídeo, como glicosilação (Cereghino et al., 2002). Esse sistema é também considerado rápido, fácil e mais econômico em relação aos sistemas de expressão derivados de

eucariotos, como os sistemas baseados em culturas de células de mamíferos (Gellissen, 2000). Além disso, *P. pastoris* é considerada ainda uma levedura com capacidade fermentativa pobre, tendo preferência por crescimento respiratório. Isto é vantajoso por resultar em cultivos com densidades celulares extremas sem que os produtos de fermentação causem danos de toxicidade para as células (Cereghino et al., 2002).

A característica metilotrófica de *P. pastoris* se deve a presença de um promotor da própria levedura, o AOX que codifica a enzima álcool oxidase (Ahn et al., 2007). Essa enzima permite a utilização de metanol como única fonte de carbono pela levedura, onde o metanol é catabolizado pela álcool oxidase e este álcool é convertido a formaldeído e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é convertido em H₂O e O₂ e o formaldeído será dirigido para outras vias para geração de energia ou formação de componentes celulares (Cregg, et al., 2000). Dois genes codificam a duas formas da álcool oxidase, AOX1 e AOX2. Apesar de serem muito similares quanto suas sequências e funções, a maior parte da atividade de álcool oxidase na célula é atribuída ao produto do gene AOX1 (Cregg et al. 1993).

Existem várias linhagens de *P. pastoris* fazendo com que seja possível escolher um fenótipo adequado para cada aplicação (Tabela 2). Cada linhagem possui mecanismos diferentes para a produção do peptídeo. Uma das linhagens mais utilizadas é a linhagem selvagem X-33 (Daly e Rearn, 2005).

Tabela 2. Linhagens mais utilizadas de *P. pastoris*. Adaptado de Batista, 2012.

Linhagem	Genótipo	Fenótipo
X-33	Selvagem	Selvagem
GS115	his4	Mut ⁺ , His ⁻
SMD1168	His4, pep4	Mut ⁺ , His, pep4 ⁻
MC100-3	arg4 his4 aox1::ARG4 aox2::his4	Mut ⁻ , His ⁻

Existe uma grande disponibilidade de promotores, onde os principais sistemas de expressão de *P. pastoris* são baseados no promotor pAOX1 do gene AOX1 (Ahn, et al., 2007). A utilização desse promotor em *P. pastoris*, é

vantajosa por duas razões. A primeira, é o forte promotor usado para transcreever genes heterólogos, derivado do gene da álcool oxidase (AOX1) de *P. pastoris*. Esse promotor é regulado transcricionalmente por metanol, um indutor relativamente barato. Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. A segunda característica é que pAOX1 é um promotor induzível, importante para a produção de PAMs, já que existem PAMs que possuem atividade antifúngica (Cregg et.al., 2000; Cregg et.al., 2009).

Entretanto, o promotor AOX1 é firmemente regulado e reprimido sob condições de crescimento sem metanol. Uma vez que a maioria das proteínas heterólogas são de alguma forma deletérias para a célula, quando produzidas em altos níveis, a habilidade de manter a cultura em um estado reprimido é extremamente desejável. Para ser ativado, o promotor AOX1 necessita de metanol e, conseqüentemente na ausência desse indutor, ele torna-se inativo. Além de metanol, o sistema AOX1 necessita da ausência de glicose para ser completamente ativado. Por ser controlado pela manipulação das fontes de carbono adicionados ao meio de cultura, o promotor AOX1 permite que o crescimento e a indução de cepas de *P. pastoris*, que expressam proteínas heterólogas, sejam facilmente obtidas em todas as escalas, ou seja, desde estudos básicos em laboratórios como na produção em grandes fermentadores (Cereghino e Cregg, 2000). A manipulação de *P. pastoris* envolve técnicas de genéticas bem desenvolvidas. A seleção de transformantes pode ser feita através do uso de plasmídeos com marcas auxotróficas e com marcas dominantes (Cereghino et al., 2001; Cereghino e Cregg, 2000), onde a utilização de plasmídeos contendo marca de seleção auxotrófica deve conter um alelo do tipo selvagem, permitindo assim o restabelecimento de determinada via Biosintética após transformação (Cereghino et al., 2001).

A seleção de um vetor de expressão para *P. pastoris* deve conter as seguintes características: capacidade de propagação em *E. coli*, utilizada na construção do cassete de expressão, e em *P. pastoris*, marcas de seleção

funcionais, origem de replicação bacteriana, um promotor para a expressão da proteína heteróloga, um terminador eficiente, um sítio múltiplo de clonagem a fim de inserir o gene e um sinal de secreção para a proteína heteróloga (Cereghino e Cregg, 2000).

Dentre os diversos vetores para clonagem em *P. pastoris* os da série pPICZ alpha (Invitrogen®) possuem alguns elementos que favorecem a expressão heteróloga de proteínas como: sequência do promotor AOX1, induzível por metanol, sequência com múltiplos sítios de clonagem a fim da inserção do gene de interesse, sinal de secreção do fator alfa de acasalamento de *Saccharomyces cerevisiae*, marca de resistência a zeocina (Sh ble) com o comando dos promotores TEF1 (para a expressão em levedura) e EM7 (para a expressão em bactéria), o que permite a obtenção de multicópias de transformantes, origem de propagação em *E. coli*; região terminadora, que permite um processamento eficiente do mRNA, e região C-terminal contendo o epítipo do anticorpo anti-myc e uma região que codifica uma cauda de polihistidina, onde esses podem ser utilizados na detecção ou purificação da proteína recombinante (Daly e Rearn, 2005; INVITROGEN, 2010).

A maioria dos genes expressos tiveram seus produtos secretados para o meio extracelular e alguns podem ser expressos em ambiente intracelular (Lima, 2000). Como exemplos da diversidade de peptídeos expressos em *P. pastoris* temos a do peptídeo recombinante Psd1 (Lobo et al., 2007), peptídeos sintéticos para o diagnóstico da febre aftosa (Ribeiro et al. 2011), clonagem e expressão de um PAM de *Pediococcus* spp (Kumar et al., 2011), peptídeo abaecina (Luiz, 2011) , entre outros.

3.3. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A separação e purificação de uma determinada proteína, presente numa dada amostra, pode ser feita com base em uma ou mais características da sua molécula que as diferenciem dos restantes constituintes da amostra. Assim, pode-se recorrer a diferentes métodos, como por exemplo pela precipitação – com base em diferenças de solubilidade em função do pH, força iónica e constante dieléctrica do solvente (Boyer, 1986; Walker, 1984).

Os pepídeos antimicrobianos usualmente são expressos com proteínas carreadoras, por geralmente serem tóxicos ao sistema heterólogo em que são expressos (Li, 2011). Após a expressão, as proteínas carreadoras podem ser removidas de forma enzimática ou química (Parachin et al., 2012), no entanto esse processo costuma ser caro, principalmente quando existem muitos passos de purificação, ou o uso de reagentes de alto custo, enzimas ou resinas de afinidade (Banki e wood, 2005).

Uma alternativa a esses processos de purificação é o uso combinado de duas tecnologias: a adição de um domínio de polipeptídeos semelhantes à elastina (*elastin-like peptides - ELPs*) e a separação do peptídeo por uma inteína (Sousa, 2014).

O sistema *ELP* consiste em inserir uma série de repetições de nucleotídeos (de 20 à 330 repetições) ao gene que codifica à proteína de interesse (Hassouneh et al., 2010). Após a expressão, essa série de repetições se agregam através da mudança de temperatura e são separadas no meio de cultura por centrifugação ou filtragem, deixando em solução apenas a proteína de interesse (Figura 2) (Sousa, 2014; Fong et al., 2009).

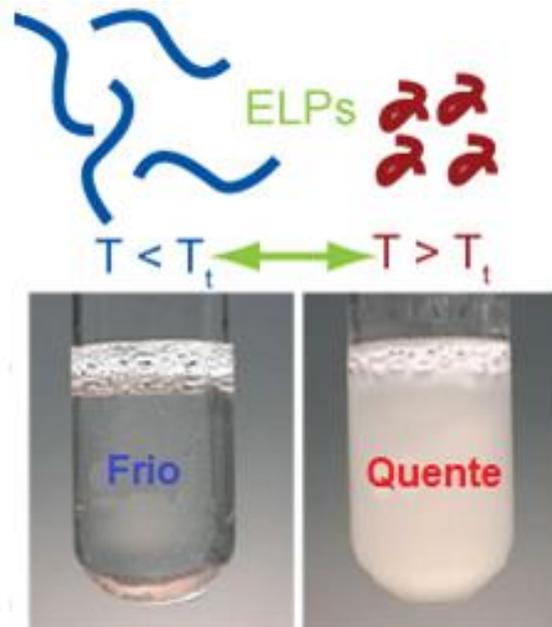


Figura 2 - Esquema de agregação de *ELPs* por diferença de temperatura. Adaptado de Hassouneh et al., 2010

Apesar de ser uma alternativa, o uso de *ELP* apresenta fatores limitantes durante a recuperação da proteína nativa, demonstrando, por exemplo, clivagem indesejada da proteína e remoção incompleta ou lenta do *ELP*. (Wu et al., 2006)

Inteínas são sequências internas de proteínas que juntamente a proteína alvo, são transcritas e traduzidas. Após a tradução, ocorre o processo de *splicing* da inteína, ou seja, a inteína é capaz de auto-excisar da proteína alvo e catalisa uma ligação peptídica entre os elementos externos (exteínas). (Figura 3) (Elleuche et al., 2010; Cooper e Stevens, 1995).

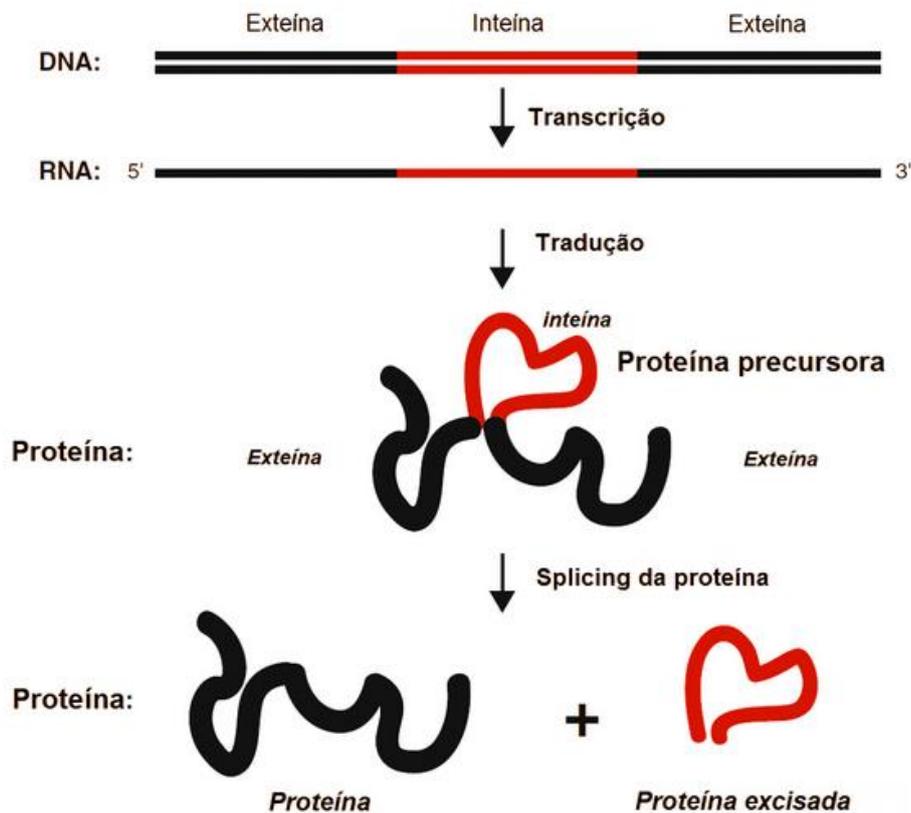


Figura 3 - Esquema de splicing de proteínas. A sequência é transcrita e depois traduzida na forma de uma proteína precursora. Depois ocorre o splicing da proteína, onde a inteína é excisada e as exteínas unidas. Adaptado de Elleuche, 2010 (Elleuche et al., 2010).

A fim de resolver problemas com a utilização de ELP ligados a proteína alvo, pode-se utilizar inteínas entre a proteína e o ELP, pois essa técnica permite que após a expressão, o ELP seja separado da proteína de interesse por mudança de pH ou temperatura (Sousa, 2014; Wu et al., 2006).

O peptídeo antimicrobiano usado nesse trabalho é um derivado sintético do *AFP* HPLC-6, modificado para a utilização, dentre elas a diminuição no número de aminoácidos de 38 aa para 28 aa e mudanças que visem favorecer a formação de uma estrutura secundária na forma de hélice, para permitir uma melhor agregação do peptídeo a camada lipídica. Além disso, ligado ao peptídeo existe um sistema *ELP* junto a uma inteína, onde a inteína apresenta uma modificação na região C-terminal, a fim de que, após a purificação fique ligada ao *ELP* restando apenas a proteína madura (Sousa, 2014).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. ESTRATÉGIA DE TRABALHO

As principais etapas a serem realizadas nesse trabalho estão exemplificadas na figura 3.

A estratégia se pautou na inserção do gene de interesse no vetor pBSK e depois no vetor pPICzαB. Inicialmente o gene foi levado à uma reação de polimerase em cadeia, a fim de realizar a troca do sítio de restrição e amplificação do gene. Os *primers* utilizados foram desenhados contendo as enzimas *Pst*I e *Xba*I para a ligação no vetor pPICzαB. Logo após, a clonagem no vetor desejado realizou-se a transformação e expressão em *P. pastoris*.

Para a purificação do peptídeo a estratégia utilizada foi a inserção da inteína (*GyrA*) modificada na região C-terminal ligada a um *ELP* (*elastin-like polypeptides*), onde a inteína mantém-se unida ao *ELP* clivando apenas na região ligada ao peptídeo. No final dos ciclos de purificação o *ELP* e a inteína são precipitados e o peptídeo fica em solução. A purificação do gene contendo *GyrA* é realizada numa temperatura de 16 °C.

Após a purificação, realiza-se testes de atividade antimicrobiana do peptídeo, para saber sua atividade contra microrganismos.

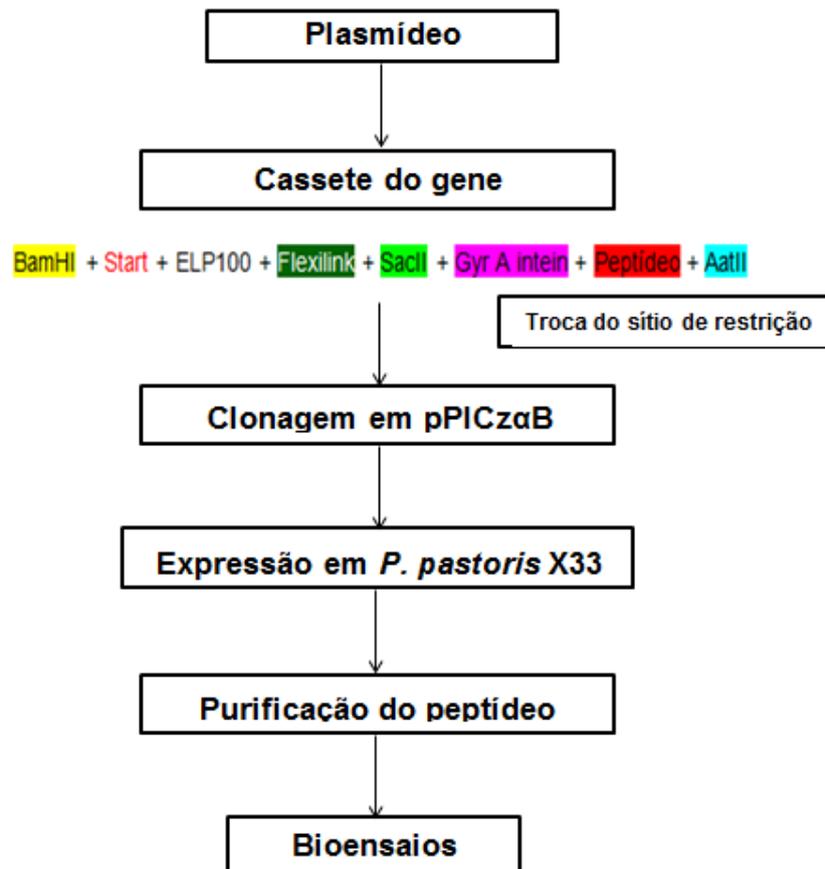


Figura 4 - Principais etapas realizadas durante este trabalho.

4.2. MATERIAL

4.2.1. Meios de cultura

Os meios e soluções foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave por 20 min a 120°C. Quando necessário foram adicionado o antibiótico zeocina (100 µg/ml.). As soluções foram empregadas de acordo com a metodologia.

- Meio Luria–Bertani (Meio LB)

Peptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L

- Meio Luria-Bertani ágar

Peptona	10 g/L
---------	--------

Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Ágar	15g/L
- Meio YPD	
Peptona	20g/L
Extrato de levedura	10g/L
Glicose	20g/L
- Meio YPD ágar	
Peptona	20g/L
Extrato de levedura	10g/L
Glicose	20g/L
Ágar	15g/L
- Meio YPGly	
Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Glicerol	1 % (v/v)
- Meio SOB	
Peptona	20g/L
Extrato de levedura	5g/L
NaCl	0,5g/L
- Meio SOC	
Meio SOB	100 mL
Glicose (20%)	1,8 mL
MgCl (1M)	1, 0 mL
- Solução salina (0,9%)	
NaCl	9 g/L
- TBE (5x)	
Tris base	54 g/L
Ácido bórico	27,5 g/L
EDTA (0,5 M)	20 mL

4.2.2. Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados para a clonagem e expressão do peptídeo AFP 1.5 estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 3. Microrganismos, linhagem, genótipo e fabricante utilizados para clonagem e expressão.

Microrganismo	Linhagem	Genótipo	Fabricante
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	recA1endA1gyrA96thi-1hsdR17supE44relA1lacI[F'proAB	Invitrogen™
<i>Pichia pastoris</i>	Linhagem X33	genótipo Wild-type	Invitrogen™

4.2.3. Enzimas

As enzimas de restrição utilizadas nesse trabalho estão demonstradas na tabela 4. As enzimas *PstI* e *XbaI* foram utilizadas para a digestão do plasmídeo e da sequência gerada a partir da reação da polimerase em cadeia (PCR) para realização de uma ligação. A enzima *SacI* foi utilizada na linearização do plasmídeo recombinante.

Além das enzimas de restrição, outras duas enzimas foram utilizadas (tabela 5), a enzima T4 ligase, utilizada para promover a ligação entre os nucleótidos de duas moléculas de DNA e a Rnase utilizada para inativar as moléculas de RNA, ficando apenas as moléculas de DNA na amostra e a taq polimerase, utilizada para a amplificação de fragmentos de DNA na reação da polimerase em cadeia (PCR).

Tabela 4. Enzima e sítio de clivagem

Enzima	Sítio de clivagem (5' → 3')	Concentração
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	1 u/μL
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA	1 u/μL
<i>SacI</i>	GAGCT↓C	1 u/μL

Tabela 5. Enzimas e fabricante

Enzimas	Fabricante	Concentração
T4 ligase	Life technologies	5 u/ μ L
Rnase	Life technologies	10 μ g/ μ L
Taq polimerase	PHt neutra	5 u/ μ L

4.2.4. Vetores

A Tabela abaixo mostra as características do vetor utilizado:

Tabela 6. Vetor, marca de seleção, características e fabricante

Vetor	Marca de seleção	de Características	Fabricante
pPICZ α B	Ble	Tamanho:3.6 Kb Possui fator- α como sinal de secreção, promotor e região terminadora do gene AOX1 de <i>P. pastoris</i> e o gene Sh ble de resistência a zeocina como marca de seleção para bactérias e leveduras.	Invitrogen™

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Construção para o peptídeo antimicrobiano *AFP 1.5*

A construção do peptídeo antimicrobiano *AFP 1.5* foi feita por Daniel Amaro, doutorando da Universidade de Brasília, por meio do programa Clone manager da empresa em bioinformática Sci-Ed.

O cassete de expressão continha em sua sequência, a partir da porção 5', um sítio de *Bam*HI, seguido de uma sequência iniciadora, um *ELP* de 100

repetições do pentapeptídeo VPGXG, uma sequência ligante, um sítio de *SacII*, seguido da inteína *Mxe GyrA*, modificada para possibilitar a clivagem do C-terminal mantendo o N-terminal intacto, seguida do peptídeo *AFP 1.5* e do sítio *AatII*, conforme ilustrado na figura 5.

BamHI + **Start** + ELP100 + **Flexilink** + **SacII** + **Gyr A intein** + **Peptídeo** + **AatII**

Figura 5 - Cassete de expressão com a *GyrA* inteína, contendo o peptídeo *AFP 1.5*

4.3.2. Mudança do sítio de restrição por reação da polimerase em cadeia (PCR)

A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada com o objetivo da mudança no sítio de restrição da construção original nas porções iniciadoras e terminadoras.

Os oligonucleotídeos foram construídos contendo na porção iniciadora o sítio para a enzima *PstI* e na porção terminadora o sítio para a enzima *XbaI* (tabela 7). Anteriormente havia na sequência original as enzimas *BamHI* (porção 5') e *AatII* (porção 3').

Os sítios para as enzimas de restrição foram trocadas para permitir a ligação da sequência ao plasmídeo pPICzαB.

Os reagentes e volumes utilizados para a reação de PCR estão descritos na tabela 8, com volume final de 20µl.

As condições da reação de polimerase estão descritas na tabela 9.

O cassete de expressão contendo os novos sítios de restrição está representado na figura 6.

Tabela 7. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a troca do sítio de restrição

Oligonucleotídeo	Sequência
Primer F	5' GAC CCG GGG ATA CTG CAG ATG GTT CCT 3'
Primer R	5' ATA TCT AGA TCA AAG TTT AGC AGC AGC AGC AGC AGC 3'

Tabela 8. Reagentes e volume utilizados para a reação de polimerase em cadeia.

Reagente	Volume (μL)	Concentração final
Tampão 10x	2,0	1x
dNTP 2,5 mM	1,6	0,2 mM
Oligonucleotídeo iniciador 10 μM	2,0	1,0 μM
Oligonucleotídeo terminador 10 μM	2,0	1,0 μM
DNA	1,0	-
Taq DNA Polimerase (5 U/ μL)	0,25	0,5 U
Água Mili-Q autoclavada	11,15	-

Tabela 9. Condições utilizadas para a reação de polimerase em cadeia

Tipo de ciclo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Ciclo 1 – desnaturação	95 °C	4 min	1x
Ciclo 2 – desnaturação	95 °C	1:30 min.	25x
Ciclo 2 – anelamento	61 °C	1 min	25x
Ciclo 2 – polimerização	72 °C	3 min	25x
Ciclo 3 – extensão e polimerização final	72 °C	10 min	1x
Ciclo 4 – término da PCR	10 °C	∞	-

PstI + Start + ELP100 + Flexilink + SacII + Gyr A intein + Peptideo + XbaI

Figura 6 - Cassete de expressão com a GyrA inteína, contendo o peptídeo AFP 1.5 e os novos sítios de restrição.

4.3.3. Purificação de PCR (E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit)

A quantidade que foi retirada da máquina de PCR deve ser multiplicada por 5, e esse valor deve ser colocado de CP buffer junto ao DNA (ex. 40 μL de DNA X 5 = 200 μL de CP buffer). Vortexar o conteúdo 10 vezes. Centrifugar por 1 min à 13,4 mil rpm. Após centrifugar, colocar o sobrenadante na coluna. Lavar com 700 μL de tampão de lavagem de DNA com etanol e centrifugar por 1 min à 13,4 mil rpm. Descartar o escoamento. Lavar a coluna com 500 μL de tampão de

lavagem de DNA com etanol e centrifugar por 1 min à 13,4 mil rpm. Descartar o escoamento. Centrifugar novamente por 1 min à 13,4 mil rpm, para retirar o restante de reagente. Transferir a coluna para um tubo de microcentrifuga. Adicionar 50 µL de tampão de eluição no centro da coluna e aguardar 2 min. Centrifugar por 1 min à 13,4 mil rpm e armazenar o DNA eluído.

4.3.4. Análise em gel de agarose

A amostra de DNA foi submetida á eletroforese em gel contendo 0,3g de agarose dissolvido em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 50mM). A mistura foi aquecida em forno microondas até a completa solubilização da agarose, sendo então nela acrescentado brometo de etídio (4µL). Foi adicionada à amostra de DNA.

4.3.5. Purificação de inserto em gel de agarose

A extração da banda do gel de agarose que continha o inserto foi realizada seguindo as instruções do Ultra Clean GelSpin DNA purification Kit (Mo Bio). Primeiramente, utilizando um bisturi, a banda foi cortada do gel de agarose, transferida para um tubo de microcentrifuga com 200 µl de tampão de captura, e levada ao banho-maria para completa dissolução (aproximadamente 15 min). Posteriormente, o conteúdo do tubo de microcentrifuga, foi transferido para uma coluna contendo um tubo coletor e centrifugada por 1 min a 13,4 mil rpm. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e foi adicionado na coluna, 750 µl de tampão de lavagem. A seguir o sistema foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e o tubo coletor foi descartado. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e nela foi adicionado 30 µl de tampão de eluição, deixando este sistema incubado em temperatura ambiente por 1 min. Após foi realizada uma nova centrifugação para eluir o DNA e armazená-lo.

4.3.6. Construção do vetor de expressão

Após a purificação da amostra de DNA a partir do gel de agarose, foi realizada a digestão do inserto (cassete de expressão – conforme o da figura 6) com as enzimas de restrição *Pst*I e *Xba*I, tendo um volume final de 40 μ L. A reação está descrita na tabela 10.

Foi também realizada a digestão do plasmídeo com as mesmas enzimas e parâmetros utilizados na digestão do gene. (Tabela 10). O tempo da reação de restrição foi de 2 horas à 37 °C.

Tabela 10. Reação de restrição do gene contendo AFP 1,5 e do plasmídeo Ppicz α B.

Reagentes	Volume (μ L)
Tampão 10x	4,0
Enzima <i>Pst</i> I	3,0
Enzima <i>Xba</i> I	3,0
DNA	30,0

Após a digestão de ambos, vetor e inserto, foi realizada uma reação de ligação para inserir o cassete contendo o AFP 1.5 no plasmídeo pPICz α B. A reação foi realizada na proporção 5:1, sendo a quantidade do inserto (cassete) 5 vezes maior que a do plasmídeo, tendo um volume final de 10 μ L. A reação está descrita na tabela 11. A ligação foi realizada a uma temperatura de 22 °C durante 16 horas.

Tabela 11. Reação de ligação do gene ao plasmídeo.

Reagentes	Volume (μ L)
Tampão 10x	1,0
T4 ligase	0,5
Vetor digerido	1,0
Inserto digerido	6,45

4.3.7. Transformação por eletroporação em *E. coli*

Foram colocados 5 µL do sistema de ligação em um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 25 µL de células competentes de *E. coli* para eletroporação. A mistura foi deixada no gelo por 1 minuto e passada para uma cubeta de eletroporação, e depois levado ao eletroporador sob as seguintes condições: 1,8kV, 200Ω e 25µF. Após o choque, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC, transferidas para um tubo eppendorf de 1,5 mL e colocadas na estufa a 37 °C, para recuperação das células transformadas, durante 1 hora.

Após 1 hora, as células foram centrifugadas por 1 min à 13,4 mil rpm, descartando 700 µl do sobrenadante e em seguida o pellet foi ressuspensado no sobrenadante restante. As células foram plaqueadas em meio LB ágar acrescido do antibiótico zeocina (50 µg/ml). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 à 20 horas, para o crescimento das colônias.

4.3.8. Extração de DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial de bactérias em pequena escala (mini preparação) foi utilizado o PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, conforme as instruções do fabricante (Invitrogen™). As culturas de células de *E.coli* transformadas com os plasmídeos de interesse foram centrifugadas por 2 min a 13,4 mil rpm, sendo o sobrenadante desprezado no descarte. Foram adicionados 250µL de solução de ressuspensão e vortexado para a suspensão do pellet. Foram adicionados 250µL de solução de lise e misturado delicadamente invertendo o tubo por 6 vezes, sem vortexar, pois isso resultaria no corte do DNA. Foram adicionados 350µL de solução neutralizante e misturado delicadamente invertendo o tubo por 6 vezes. Foram centrifugados por 5 min na rotação máxima (13,4 mil rpm). O sobrenadante foi aplicado em colunas. A coluna foi centrifugada por 1 min até a completa utilização do sobrenadante. Foi descartado o que ficou no tudo de coleta abaixo das colunas. Foi adicionado 500µL de solução de lavagem a coluna e centrifugada por 1 min. Foi descartado o escoamento. Foi adicionado novamente 500µL de solução de lavagem e centrifugada por 1 min, descartando o escoamento. Foi centrifugado durante 1 min adicional para

remover algum resíduo. A coluna foi colocada em um tubo limpo de microcentrífuga. Para diluir o DNA foi adicionado 50µL de solução de eluição no centro da coluna, aguardando 2 min e em seguida centrifugando por 1 min. Armazenou-se.

4.3.9. Sequenciamento de DNA

Após a ligação do vetor ao DNA, transformação e extração plasmidial e seleção do clone contendo o cassete de expressão, o DNA foi submetido a um sequenciamento. O sequenciamento utilizou na porção iniciadora o oligonucleotídeo AOX1 5' e na porção terminadora o primer R. O sequenciador utilizado foi o sequenciador automático ABI 3130xl da Applied Biosystems.

4.3.10. Linearização do plasmídeo recombinante

Após a confirmação do vetor recombinante por restrição e sequenciamento, o mesmo foi linearizado com a enzima *SacI* para ser integrado no genoma de *P. pastoris*. A reação está descrita na tabela 12. A confirmação da linearização foi realizada através da análise de gel de agarose 1 %. A linearização foi realizada a 37 °C durante 3 horas.

Tabela 12. Reação de linearização do plasmídeo recombinante.

Reagentes	Volume (µL)
Tampão 10x	6,0
<i>SacI</i>	4,0
DNA	50,0
Volume final	60,0

4.3.11. Transformação por eletroporação em *Pichia pastoris*

Foram utilizadas para a transformação de *Pichia pastoris* a linhagem X-33. Uma colônia isolada de X-33 foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido em um erlenmeyer de 125 mL durante a noite em 30 °C, sob agitação de 250 rpm

(pré-inóculo). Foi inoculado 0,1 a 0,5 mL do pré-inóculo em 50 mL de meio YPD líquido. A cultura foi crescida durante a noite a 28 °C, sob agitação de 250 rpm até se obter uma absorbância (OD_{600}) de 1,3-1,5. Depois as células foram centrifugadas a 1.500 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 50 mL de água gelada estéril. As células foram novamente centrifugadas nos mesmos parâmetros anteriores, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 25 mL de água estéril gelada. Mais uma vez as células foram submetidas as mesmas condições, ou seja, centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células ressuscitadas em 25 mL de água gelada estéril. Após esses passos, as células foram centrifugadas novamente nas mesmas condições, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 2 mL de Sorbitol 1M gelado. Após a suspensão das células, as mesmas foram transferidas para um tubo de centrífuga menor, centrifugando novamente a 1.500xg por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas em 200 µL de Sorbitol 1M, para a obtenção de um volume final de 1,5 mL de então células eletro-competentes. A reação para a transformação continha num tubo de 1,5 mL, 80 µL de células competentes e de 5 a 10 µg de DNA linearizado ressuscitado em 5 a 10 µL de água deionizada (Milli-Q). A solução foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm, Gene Pulser Curvette (Bio-Rad) e deixada no gelo por 5 min, sendo então eletroporadas no equipamento Gene Pulser (Bio Rad) sendo as condições utilizadas para a eletroporação: Capacitância de 25 µF; resistência mínima de 400 Ω; voltagem de 1500 V. Imediatamente após a eletroporação foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado a cubeta. A solução foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril, incubando as células transformadas a 30° C por 2 horas. As células foram plaqueadas em meio YPD sólido, contendo o antibiótico zeocina (100 µg/mL). As placas foram levadas para a estufa a 30° C e incubadas cerca de 2 dias. As colônias obtidas foram então semeadas em uma nova placa de meio YPD sólido, contendo antibiótico zeocina (500 µg/mL).

4.3.12. Extração de DNA genômico de levedura

Foram selecionados quatro clones e estes foram inoculados em tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de meio YPD, incubados durante a noite. As culturas de células foram centrifugadas a 13 mil rpm por 2 min, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 100 µL de Tampão I (Sorbitol 1M; EDTA-Na₂ 0,1M pH 7,5) e adicionado 10 µL de liticase a 20 mg/mL, os tubos foram incubados por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação foi adicionado 100 µL de Tampão II (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA-Na₂ 20 mM; SDS 0,35 M) e os tubos incubados a 65 °C por 5 min. Foram adicionados 80 µL de acetato de potássio 5 M, o conteúdo foi misturado por inversão de 5 a 6 vezes, e incubados a -20 °C por 10 min. Os tubos foram centrifugados a 13 mil rpm por 15 min, os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo contendo 250 µL de isopropanol e incubados à temperatura ambiente por 5 min. Após esse período os tubos foram centrifugados por 2 min a 13 mil rpm, os sobrenadantes foram descartados e o pellet lavado com 500 µL de etanol a 70%. Após a lavagem os tubos foram centrifugados a 13 mil rpm, o sobrenadante descartado e o pellet foi deixado para secar. Após esse processo o pellet foi ressuspensão em 100 µL de água MiliQ.

4.3.13. Confirmação da integração do vetor ao genoma da levedura

A confirmação da integração do vetor ao genoma foi realizada através da reação da polimerase em cadeia (PCR) a partir do DNA genômico extraído dos clones selecionados.

A reação utilizou os oligonucleotídeos AOX1 5' e Primer R, descritos na tabela 13.

A quantidade de cada reagente está descrita na tabela 14, tendo um volume final de 20 µL. As condições utilizadas para a reação da polimerase em cadeia estão descritas na tabela 15.

Tabela 13. Oligonucleotídeos utilizados para a confirmação da integração do vetor ao genoma.

Oligonucleotídeo	Sequência
5' AOX1	5'- GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC -3'
Primer R	5' ATA TCT AGA TCA AAG TTT AGC AGC AGC AGC AGC AGC 3'

Tabela 14. Reagentes e volume utilizados para a reação de polimerase em cadeia a fim de confirmar a integração.

Reagente	Volume (μL)	Concentração final
Tampão 10x	2,0	1x
dNTP 2,5 mM	1,5	0,18 mM
Oligonucleotídeo iniciador 10 μM	1,0	0,5 μM
Oligonucleotídeo terminador 10 μM	1,0	0,5 μM
DNA	1,0	-
Taq DNA Polimerase (5 U/ μL)	0,5	1,0 U
Água Mili-Q autoclavada	13,0	-

Tabela 15. Condições utilizadas para a reação de polimerase em cadeia.

Tipo de ciclo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Ciclo 1 – desnaturação inicial	95 °C	4 min	1x
Ciclo 2 – desnaturação final	95 °C	0:30 min	25x
Ciclo 2 – anelamento	61 °C	0:30 min	25x
Ciclo 2 - polimerização	72 °C	2 min	25x
Ciclo 3 – extensão e polimerização final	72 °C	8 min	1x

Ciclo 4 – término da PCR	10 °C	∞	-
---------------------------------	-------	---	---

4.3.14. Indução do peptídeo *AFP 1.5*

Os quatro clones, previamente semeados em placa contendo alta concentração de zeocina (500 µg/mL), foram selecionados e juntamente com uma colônia não transformada de X33 foram inóculados em 50 mL de meioYPGly, em frasco de 500 mL. As culturas foram crescidas em uma incubadora a 28 °C e agitação a 200 rpm durante 24 horas. Após 24 horas de crescimento iniciou a indução, adicionando metanol às culturas de células em uma concentração final de 0,5%. Esse processo teve duração de 48 horas, onde a cada 12 horas era adicionado metanol a 0,5%. Além da adição de metanol, a cada 12 horas foi feita a coleta de alíquotas de 1,5 mL das cinco culturas, centrifugadas a 13 mil rpm, separando o pellet do sobrenadante e armazenando, este último a -80 °C. Esse procedimento foi realizado em 12 horas, 24 horas, 36 horas e 48 horas. Ao final das 48 horas, a cultura restante foi centrifugada a 5000 rpm, separando o pellet do sobrenadante e foram armazenados a -80 °C.

4.3.15. Ensaio antimicrobiano

O ensaio antimicrobiano foi realizado para testar a atividade antimicrobiana dos sobrenadantes coletados de cada clone durante a indução.

No ensaio foi utilizado as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa). Utilizou-se teste em disco de difusão, assim como recomendado pelo protocolo CLSI M2-A8, padronizado pela Anvisa. O controle positivo foi cloranfenicol na concentração de 5 mg/mL, e para o controle negativo, foi utilizado o sobrenadante da cultura com a levedura não transformada (X33). Os sobrenadantes de 1,5 mL foram concentrados até 700 µL. Não foi realizado a quantificação de proteína recombinante nos sobrenadantes, apenas quantificou-se a proteína total, obtendo-se 2 mg/ml de proteína total no sobrenadante de X33 não transformada e 3 mg/ml de proteína total nos sobrenadantes das colônias 1, 2, 4 e 22.

Colônias de *S. aureus* e *E. coli* foram selecionadas em placas de ágar Mueller – Hinton, ressuspensas em solução salina a 0,9% e espalhadas em outras placas contendo o mesmo meio. Sobre essas placas foram adicionados os discos de difusão e sobre os discos aplicadas 10 µL dos sobrenadantes concentrados. Essas placas foram crescidas entre 12 a 16 horas e após esse tempo obteve-se os resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MUDANÇA DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO E LIGAÇÃO AO VETOR DE EXPRESSÃO

A sequência inicial do peptídeo *AFP* 1.5 continha nas porções 5' e 3' os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Aat*II. Foi realizada a troca dos sítios de restrição por PCR, conforme descrito em 4.3.2, inserindo os novos sítios: *Pst*I e *Xba*I. Duas construções foram utilizadas no processo de PCR – *MTU* e *Gyra*, onde essas construções referem-se ao tipo de inteína presente no cassete do gene, em diferentes temperaturas de anelamento. Ao final do processo os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, obtendo um fragmento de DNA com tamanho entre 650 a 850 pares de bases (figura 7). A construção *MTU* foi descartada pois não houve amplificação do gene em tamanhos esperados para a ligação no vetor de expressão.

O tamanho esperado da amplificação por PCR das construções seria de aproximadamente 2100 pares de bases. No entanto, as construções apresentam um *ELP* que consiste numa repetição de vários pares de bases, mostrando que o *primer forward* anelou nas porções finais do *ELP* (Stirling, 2003), tornando a amplificação das construções menores, conforme mostrado nos poços 3, 4, 5 e 6 da figura 7.

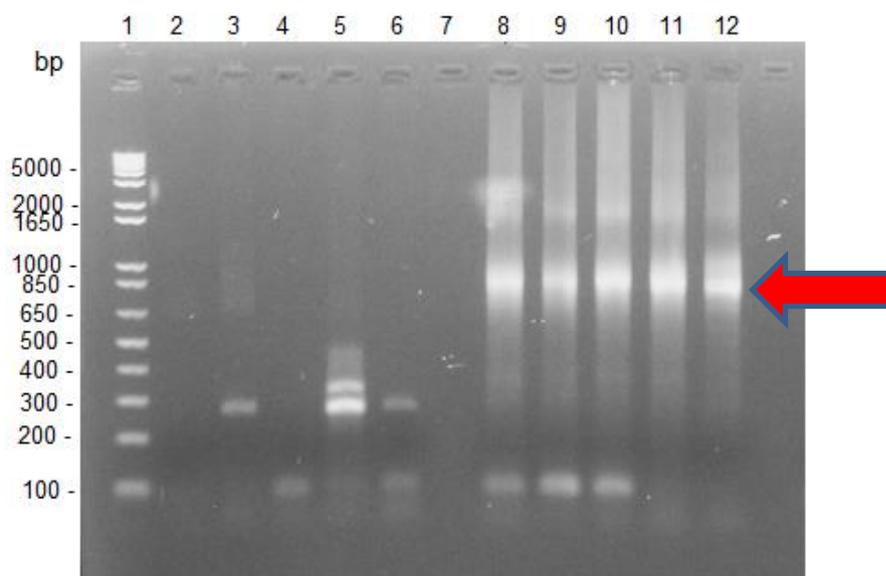


Figura 7 - Gel de agarose 1% ; Troca do sítio de restrição por PCR. 1- Marcador ladder; 2 a 6 – PCR *MTU*: 2 – 52°C, 3 – 55°C, 4 – 58°C, 5 – 61°C, 6 – 64°C; 7 – poço

vazio; 8 a 12 – PCR *GyrA*: 8 – 52° C, 9 – 55° C, 10 – 58° C, 11 – 61° C, 12 – 64° C. Seta vermelha indica o inserto amplificado.

O produto de PCR da construção *GyrA* purificado, obtido após a troca do sítio de restrição, foi ligado ao vetor expressão pPICzαB, conforme descrito em 4.3.6. O tamanho final do vetor recombinante é de aproximadamente 4400 pb, sendo 3600 pb do vetor de expressão e aproximadamente 800 pb do gene obtido no produto de PCR. O sistema de ligação foi aplicado (3μL) em gel de agarose 1 % para a análise e confirmação (Figura 8).

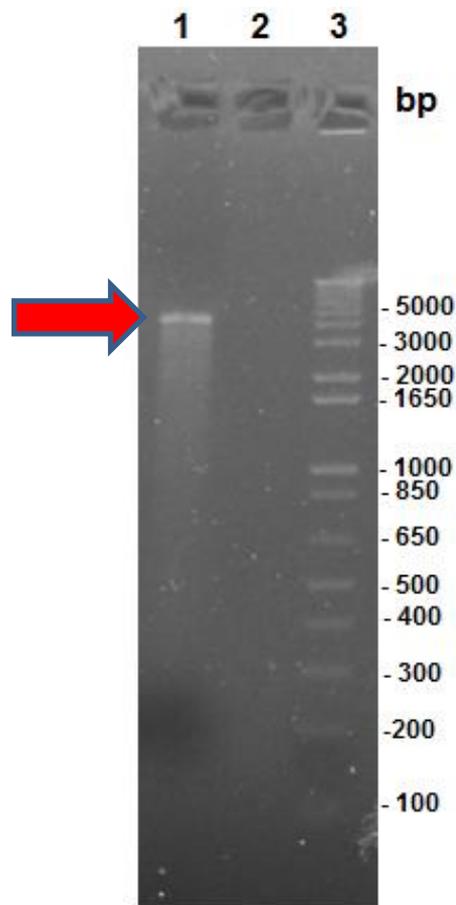


Figura 8 - Gel de agarose 1 % - ligação do vetor de expressão ao produto de PCR. 1 – sistema de ligação; 2 – poço vazio; 3 – marcador ladder. Seta vermelha indica a ligação do vetor ao gene (4400 pb).

Após a confirmação por gel de agarose, conforme a figura 8 da construção do vetor de expressão, o vetor foi inserido em *E.coli* através da

técnica de transformação por eletroporação, a fim de aumentar a quantidade de DNA. Após a transformação foi realizada uma extração de DNA plasmidial do microrganismo *E. coli*, conforme o item 4.3.8, das quatro colônias provenientes da transformação. Para confirmar a presença do vetor de expressão nas colônias transformantes, foi realizada uma PCR do DNA plasmidial com os oligonucleotídeos da tabela 7, seguindo os mesmos passos da reação da tabela 8 e o ciclo de reação da tabela 9. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose à 1% (figura 9). Na figura 9 observa-se um produto de PCR do DNA plasmidial dos quatro clones obtidos, onde o tamanho do gene está entre 650 pb e 850 pb.

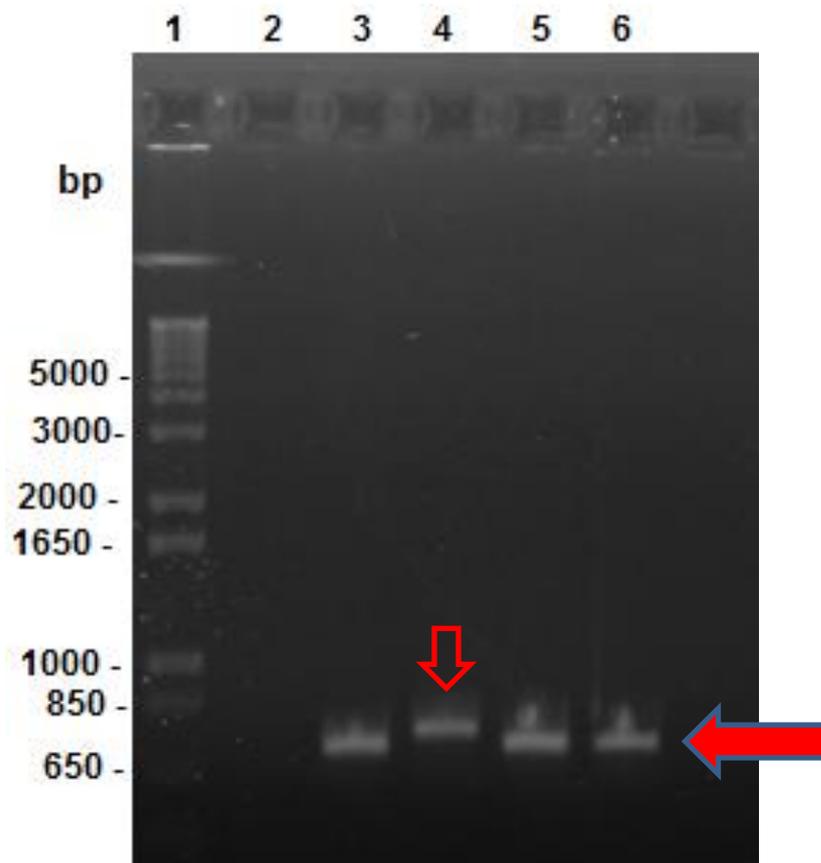


Figura 9 - Gel de agarose 1% - PCR da extração plasmidial dos quatro clones transformantes. 1 - Marcador ladder; 2 - poço vazio; 3 a 6 - PCR da extração plasmidial dos 4 clones de *E. coli*. A seta vermelha indica os tamanhos dos genes ao final da PCR.

Após a obtenção do DNA plasmidial e a análise no gel de agarose, notou-se que a colônia número 2 (poço 4) apresentava um tamanho maior e

parecido ao obtido na troca do sítio de restrição (figura 7). Esse clone foi selecionado e a sequência do vetor foi confirmada por sequenciamento de DNA, conforme o método mostrado em 4.3.9. Após a confirmação, esse mesmo clone foi utilizado para o processo de integração ao genoma da levedura.

5.2. INTEGRAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO AO GENOMA DA LEVEDURA *PICHA PASTORIS*

Após a construção do vetor de expressão e seleção do clone 2 obtido por extração plasmidial e confirmação por PCR e sequenciamento, o mesmo foi linearizado, conforme a reação em 4.3.10, a fim de ser integrado ao genoma da levedura *P. pastoris*. A figura 10 mostra um gel de agarose a 1% contendo o vetor parcialmente linearizado.

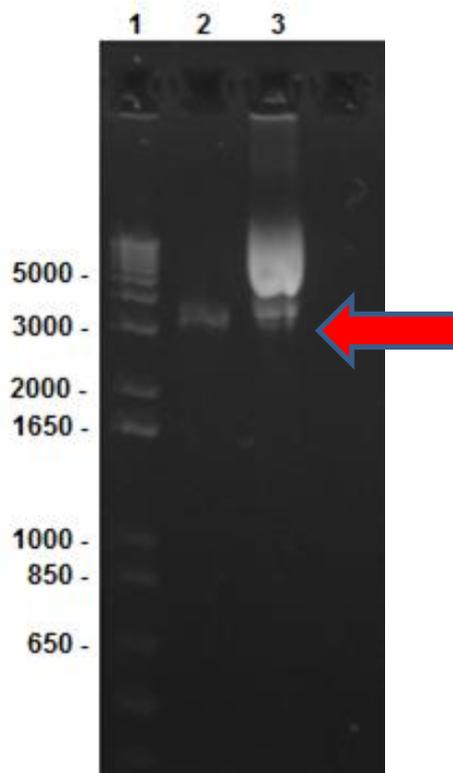


Figura 10 - Gel de agarose 1%; DNA linearizado para integração a levedura; 1 – marcador ladder; 2 – plasmídeo pPICzαB; 3 – linearização. Seta vermelha mostra o vetor parcialmente linearizado.

Após confirmar a linearização do vetor, o mesmo foi inserido por transformação na levedura *P. pastoris*, conforme descrito no item 4.3.11. Os

clones obtidos a partir da transformação foram selecionados em placa contendo meio YPD e concentração de 500 µg/mL de zeocina, onde na figura 11 estão mostradas as colônias obtidas nessa seleção.

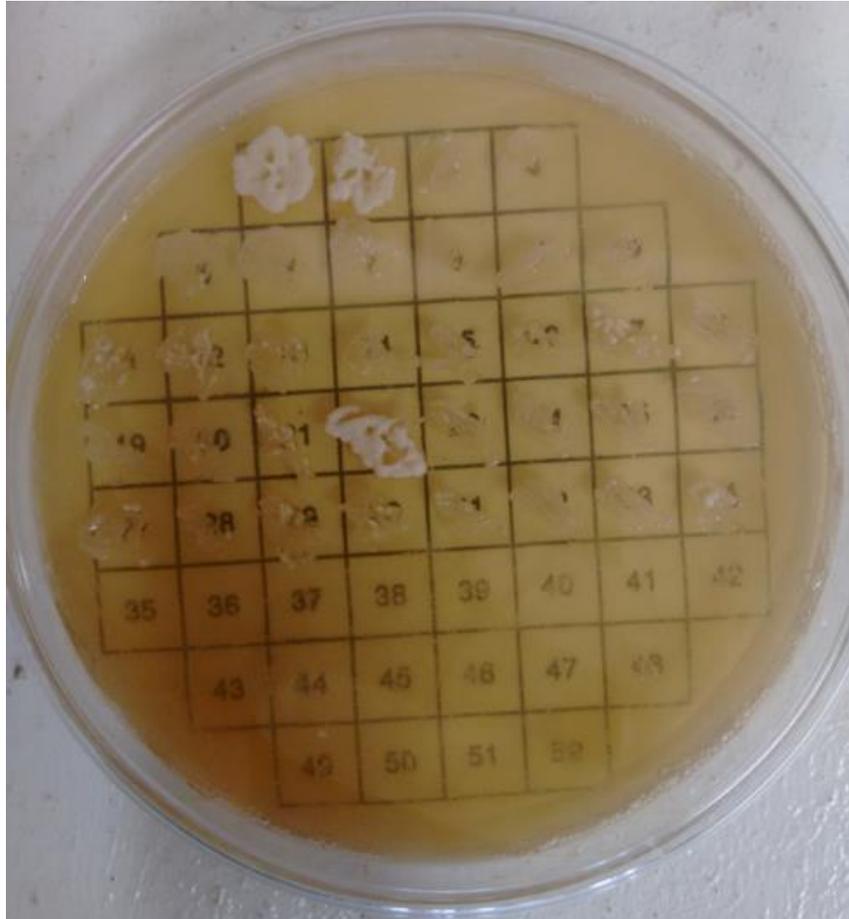


Figura 11 - Placa de meio YPD com zeocina à 500 µg/mL com a seleção dos clones de *Pichia pastoris*. Clones escolhidos: 1, 2, 4, 22.

Dos clones obtidos na seleção, foram escolhidos quatro desses clones para realização da extração de DNA genômico dos mesmos. A extração foi realizada conforme item 4.3.12. Os clones escolhidos foram os 1, 2, 4 e 22. Após a extração, o DNA foi submetido a uma PCR com os oligonucleotídeos da tabela 13. Para a PCR foi utilizado um controle positivo (DNA plasmidial contendo o vetor de expressão), um controle negativo (DNA total da colônia X33 não transformada) e o DNA genômico dos clones 1, 2, 4 e 22. A reação de PCR está descrita em 4.3.13. A PCR foi verificada em gel de agarose 1% (dados não demonstrados). Pela análise o vetor recombinante foi integrado no genoma da

levedura, pois no produto de PCR foi verificado bandas com tamanhos próximos a 1150 pares de bases, sendo 800 pb do gene obtido na troca dos sítios de restrição e 352 pb do sítio AOX até o sítio *PstI* do vetor de expressão.

5.3. EXPRESSÃO GÊNICA DO PEPTÍDEO AFP 1.5 EM *PICHIA PASTORIS*

Após a confirmação da integração, os quatro clones selecionados e um controle negativo (X33 não transformada) foram submetidos a expressão em frasco, conforme item 4.2.14. Durante 48 horas foram coletadas aliquotas do sobrenadante dos frascos, nos tempos: 12 horas, 24 horas, 36 horas e 48 horas.

Os sobrenadantes coletados foram utilizados num ensaio de atividade antimicrobiana, contra *S. aureus* e *E. coli*, conforme descrito no item 4.3.15. O tempo de 36 horas foi descartado para economia de material. Neste ensaio a proteína utilizada ainda está fusionada ao sistema *ELP* e inteína.

Os resultados do ensaio antimicrobiano podem ser observados nas figuras 12 e 13. Observando a figura 12 percebe-se que o ensaio antimicrobiano contra *E. coli* foi realizado com sucesso já que observou-se halo de inibição ao redor do disco contendo cloranfenicol (5mg/mL) – controle positivo. Nesse mesmo ensaio antimicrobiano de *E. coli* no tempo de 48 horas, pode-se observar pequenos halos de inibição nos sobrenadantes das colônias 1, 2 e 4, demonstrando que o peptídeo foi expresso e que existe atividade microbicida. Observando a figura 13 percebe-se que o ensaio antimicrobiano contra *S. aureus* não obteve sucesso, já que obteve-se halo de inibição apenas ao redor do disco contendo cloranfenicol (5mg/mL). Comparando os dois resultados, percebe-se que diferente do ensaio contra *E. coli*, no ensaio antimicrobiano contra *S. aureus* não foi observado halo de inibição do sobrenadante em nenhum dos diferentes tempos, não demonstrando atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

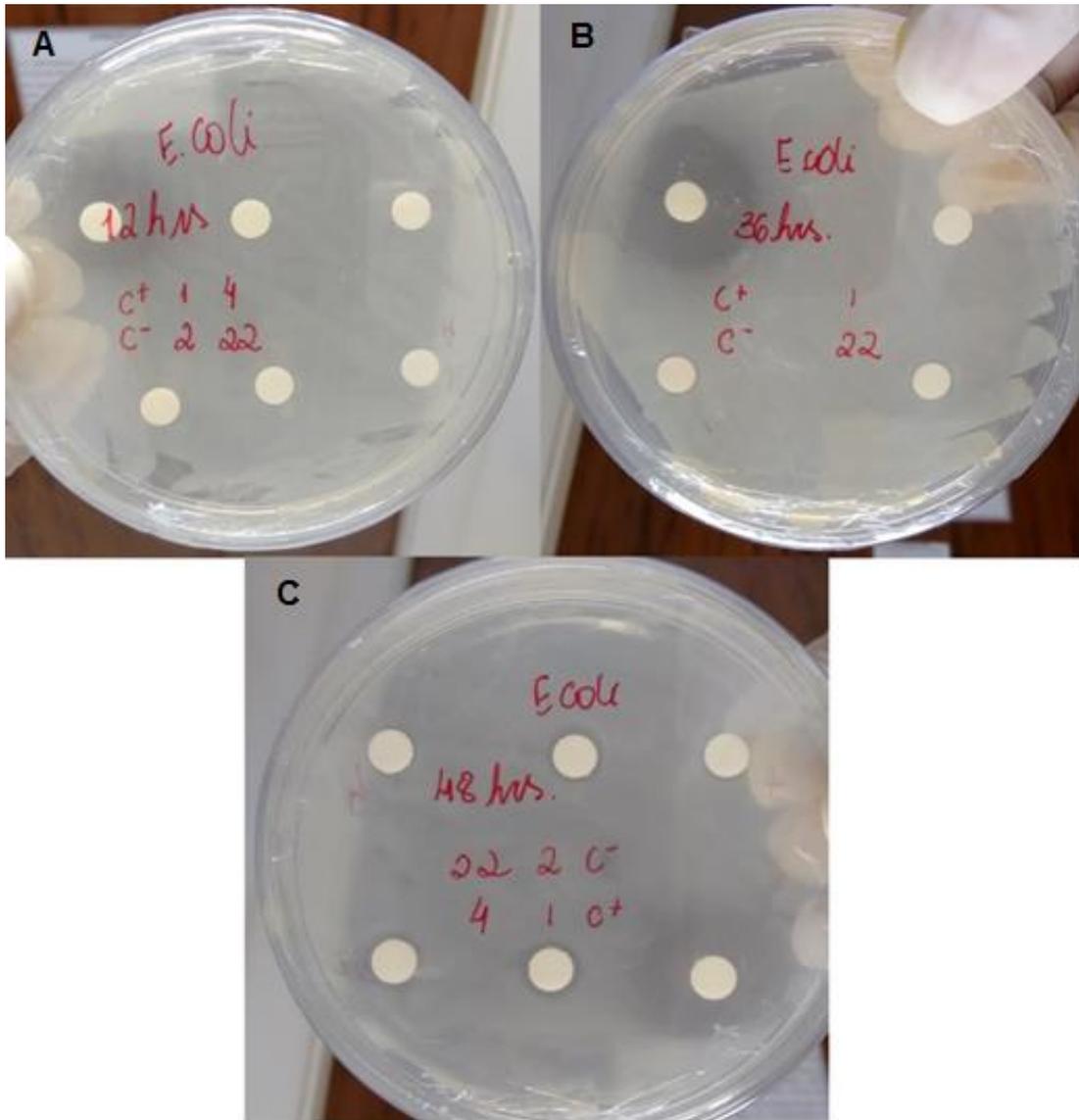


Figura 12 - Ensaio antimicrobiano contra *E. coli*. Figura A: 12 horas, figura B: 36 horas e figura C: 48 horas.

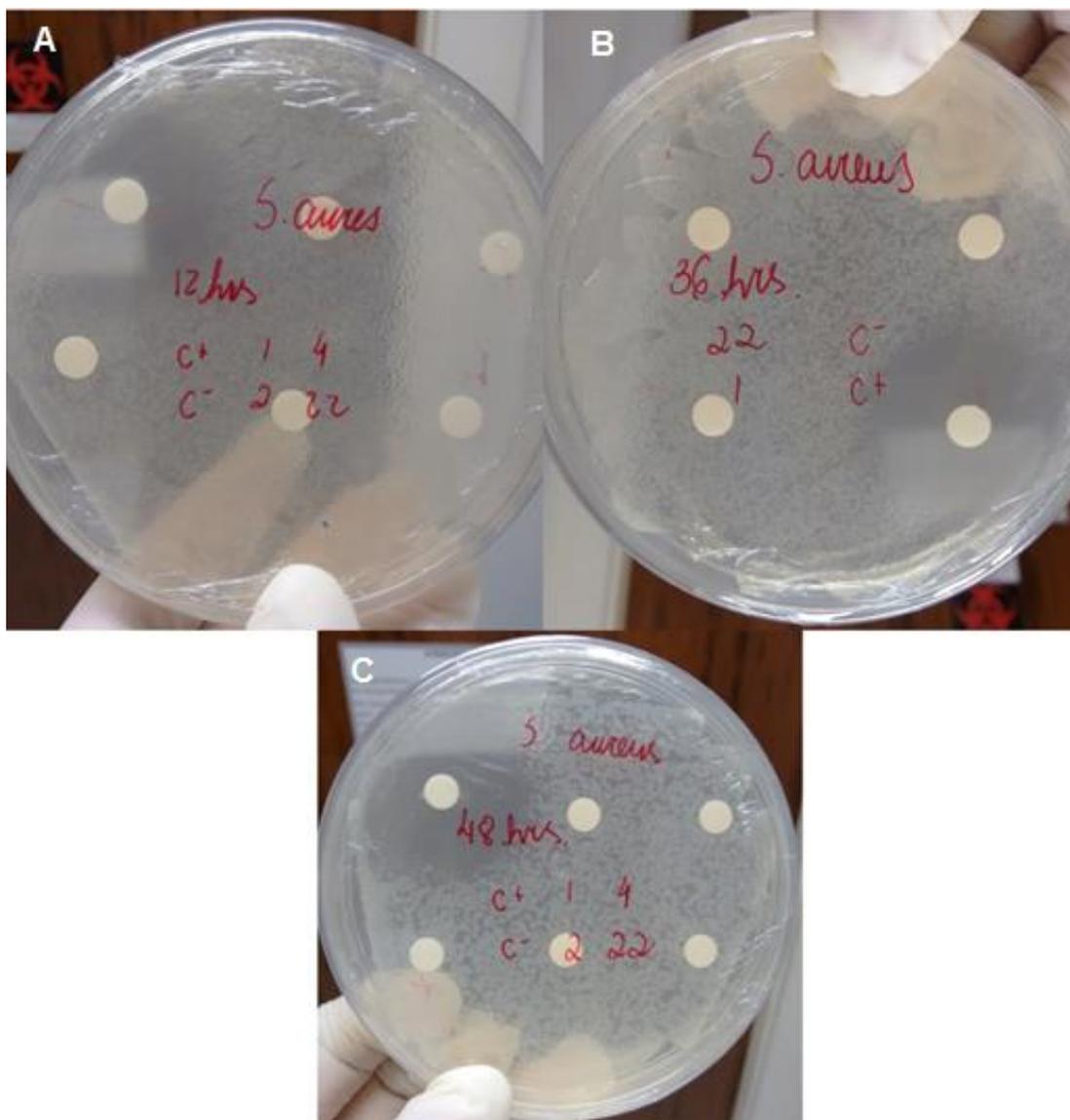


Figura 13 - Ensaio antimicrobiano contra *S. aureus*. Figura A: 12 horas, figura B: 36 horas e figura C: 48 horas.

Em trabalho anterior (Sousa, 2014) o peptídeo *AFP 1.5* apresentou atividade microbiana contra *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, nas concentrações de 3 μM e 25 μM , respectivamente, mas não apresentou atividade contra *S. aureus* nas concentrações testadas no trabalho. O trabalho de Sousa (2014) reforça os resultados apresentados nesse trabalho, revelando que o peptídeo *AFP 1.5* apresenta atividade contra *E. coli* (bactéria Gram-negativa), mas não apresenta atividade contra *S. aureus* (bactéria Gram-positiva).

O trabalho de Migliolo (2013) testou a atividade antimicrobiana, antitumoral, antifúngica e antiviral de peptídeos anticongelantes sintéticos retirado de *Pleuronectes americanus* revelando que outros peptídeos anticongelantes também apresentam atividade contra *E. coli*, mas nenhum dos peptídeos testados apresentaram atividade contra *S. aureus*.

Além dos peptídeos anticongelantes outras classes de peptídeos antimicrobianos apresentaram atividades contra microrganismos. As defensinas são uma classe de peptídeos encontradas em diversos organismos e apresentam ampla atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (Pelegri e Franco, 2005). Peptídeos de origem animal como a magainina e LL-37 também apresentam múltipla ação contra vírus e bactérias, por exemplo (Zasloff, et al. 1988; Lee et al. 2011). Além disso, peptídeos antimicrobianos isolados de peixes apresentam múltiplas atividades. A pardaxina, hepcidina, epinecidina e piscidina apresentam características muito bem descritas na literatura de atividades contra bactérias, fungos e vírus (Park et al., 1997; Douglas et al., 2003; Vad et al., 2010; Chang et al., 2011).

As atividades antimicrobianas dos peptídeos anticongelantes acontecem na interação das membranas lipídicas das células, gerando um efeito carpete na membrana plasmática do organismo, levando ao extravazamento celular (Nascimento, 2014). Esses peptídeos apresentam alta taxa de hidrofobicidade, o que torna-os mais efetivos contra bactérias Gram-negativas, já que ocorre uma maior estabilização do peptídeo na membrana desses organismos, num sistema de ancoragem (Migliolo, 2013). Essas questões reforçam o que foi apresentado nesse trabalho a respeito da atividade microbicida do peptídeo *AFP 1.5*, onde o mesmo apresentou atividade apenas contra *E. coli* (bactéria Gram-negativa) e não contra *S. aureus* (bactéria Gram-positiva), devido a diferença existente nas membranas desses grupos de bactérias.

As atividades antimicrobianas do peptídeo *AFP 1.5* revelam a importância do mesmo para um possível desenvolvimento farmacêutico, sendo necessário modos de obter maiores quantidades do peptídeo. Como não foi verificada a quantidade de proteína expressa, sugere-se alterações nas

mudanças de parâmetros de expressão, a fim de obter maiores quantidades do peptídeo em *P. pastoris*. Em estudos apresentados existem diferentes formas de melhorar a expressão gênica em *P. pastoris*.

No trabalho de Santana (2014), que visou a produção de quimases de mastócitos de camundongo em *P. pastoris*, observou-se que a mudança nos parâmetros de crescimento e indução melhoram a expressão das quimases. Santana alterou a temperatura de crescimento de 30 °C para 20 °C, mostrando que a 23 °C obte-se um aumento de três vezes a quantidade de proteína produzida. Zhang e colaboradores (2006) durante a produção do peptídeo antimicrobiano ABP-CM4 em *P. pastoris*, reduziram a temperatura de cultivo de 30 °C para 20 °C, tendo um aumento significativo na produção do peptídeo. Li e colaboradores (2011) também afirmam que a redução da temperatura para 23 °C melhora a produção de proteínas em *P. pastoris*. Diminuir a temperatura durante a indução diminui a atividade proteolítica e a lise celular (Jahic et al., 2003).

Além disso, aumentar a quantidade de metanol no meio resulta em uma melhor indução da expressão de proteínas heterólogas. O padrão de metanol utilizado nesse trabalho foi de 0,5%. No entanto trabalhos demonstram que o aumento de metanol de 0,5% à 1,5% melhora o processo de indução e por consequência a expressão da proteína recombinante (Santana, 2014; Khatri e Hoffmann, 2006).

Pichia pastoris é uma levedura com preferência por crescimento respiratório, onde os produtos da fermentação como etanol e ácido acético não se acumulam rapidamente no meio, permitindo a obtenção de altas densidades celulares da cultura (Cereghino et al., 2002; Baltz et al., 2010; Heyland et al., 2010). Essa característica permite sugerir que é possível o aumento da densidade celular. O aumento da densidade celular está diretamente relacionado ao aumento da produção da proteína heteróloga, já que muitas vezes são situações diretamente proporcionais. Sendo assim, aumentar a densidade celular durante a fase de crescimento demonstra uma melhoria na produção final (Baltz et al., 2010; Terrazas, 2012)

O tempo de indução também é importante na expressão de algumas proteínas. No trabalho de Luiz (2011) que visou a produção de abaecina de *Apis*

mellifera em *Pichia pastoris*, mostrou que a proteína heteróloga só foi expressa a partir do tempo de 72 horas. Araújo (2008) também apresentou dados em que a proteína quimosina apresenta melhor expressão nos tempos de indução de 72 e 96 horas.

O peptídeo *AFP 1.5* é um sintético dos peptídeos anticongelantes tipo 1 (Sousa, 2014) que demonstra atividade contra microrganismos, mas ainda não existem parâmetros para comparação da produção heteróloga desse peptídeo em *P. pastoris*. Todos esses fatores demonstram a necessidade de novos estudos sobre a produção heteróloga do peptídeo *AFP 1.5* em *Pichia pastoris*, a fim de ampliar os estudos a respeito de sua atividade microbicida e realizar testes de novos parâmetros de indução para melhorar a expressão gênica.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os dados obtidos no trabalho revelam que o cassete de expressão do peptídeo antimicrobiano *AFP* 1.5 foi inserido e clonado no vetor pPICzαB.

O vetor de expressão contendo o gene *AFP* 1.5 foi inserido na levedura *Pichia pastoris*.

Observando os ensaios antimicrobianos, nota-se que houve atividade antimicrobiana dos sobrenadantes retirados da expressão gênica em *Pichia pastoris* contra *E. coli* mas não houve contra *S. aureus*. Outros trabalhos concluem que esse peptídeo apresenta atividade contra *E. coli*, mas não apresenta contra *S. aureus*. Mesmo com atividade contra *E. coli* é necessário novos estudos para obtenção de maiores quantidades do peptídeo através da expressão e novos testes de atividade microbiana.

Sendo assim, os próximos passos a serem trabalhados devem explorar as mudanças nos parâmetros de crescimento e indução da levedura, onde após esses ajustes espera-se obter maiores concentrações do peptídeo *AFP* 1.5, para outros testes de bioensaio e produção industrial do mesmo como um possível fármaco. Além disso, os testes de purificação com a inteína *GyrA* ligada ao *ELP* também devem ser realizados para testar a eficiência desse método de purificação para o gene de *AFP* 1.5.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Ahn, J.; Hong, J.; Lee, H.; Park, M.; Lee, E.; Kim, C.; Choi, E.; Jung, J. Translation elongation factor 1- α gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2007**, v. 74, p. 601- 608.
2. Araújo, J. A. Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris*. Pós-graduação em biologia molecular. Dissertação de mestrado, **2008**.
3. Austin, D.J.; Kristinsson, K.G.; Anderson, R.M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1999**, v. 96(3), p.1152–1156.
4. Baltz, R.; Davies, J. E.; Demain, A. L. (editors in chief). Manual of industrial microbiology and biotechnology. *Washington: ASM Press*, **2010**, 3th ed.
5. Banki, M. R.; Wood, D. W. Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up. *Microb Cell Fact*, **2005**, v. 4, p. 32.
6. Batista, V. D. F. Construção de um vetor para a expressão heteróloga em *Pichia pastoris*. Programa de pós-graduação em Biologia molecular. Dissertação de mestrado, **2012**.
7. Bergsson, G.; Agerberth, B.; Jornvall, H.; Gudmundsson, G. H. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *FERBS J*, **2005**, v. 272, n. 19, p. 4960-4969.
8. Birkemo, G. A.; Luderst, T.; Andesen, O.; Nes, J. F.; Nissen-Meyer, J. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Biochim biophys Acta*, **2003**, v. 1646, n. 1-2, p. 207-215.
9. Boyer, R. Modern Experimental Biochemistry, *Addison-Wesley Publishing Company*, **1986**.
10. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, **2005**, v. 3, p. 238–250.
11. Brown, K. L.; Hancock, R.E.W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immuno*, **2006**, v. 18, p. 24-30.
12. Cereghino, G. P. L.; Cereghino, J. L.; Ilgen, C.; Cregg, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, v. 13, p. 329-332.
13. Cereghino, G. P. L.; Cereghino, J. L.; Sunga, A. J.; Johnson, M. A.; Lim, M.; Gleeson, M. A. G.; Cregg, J. M. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*, **2001**, v. 263, p. 159-169.

14. Cereghino, J.L.; Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, **2000**, v. 24, p. 45- 66.
15. Chang, W. T.; Pan, C.Y.; Rajanbabu, V.; Cheng, C. W.; Chen, J.Y. Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) antimicrobial peptide, hepcidin 1-5, shows antitumor activity in cancer cells. *Peptides*, **2011**, v. 32, n. 2, p. 342-352.
16. Cipakova, I.; Hostinova, E. Production of the human-beta-defensin using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Protein Peptide Lett*, **2005**, v. 12, p. 551–554.
17. Cooper, A. A.; Stevens, T. H. Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level. *Trends biochem Sci*, **1995**, v. 20, n. 9, p. 351-56.
18. Cregg, J. M.; Cereghino, J. L.; Shi, J.; Higgins, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, **2000**, v. 16, p. 23-52.
19. Cregg, J. M.; Tolstorukov, I.; Kusari, A.; Sunga, J.; Madden, K.; Chappell, T. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol*, **2009**, v. 463, p. 169–189.
20. Cregg, J. M.; Vedvick, T. S; Raschke, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, **1993**, v. 11, p. 905–910.
21. Daly, R.; Hearn, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, **2005**, v. 18, p. 119–138.
22. Desai, P.N.; Shrivastava, N.; Padh, H. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *BiotechnolAdv*, **2010**, v. 28, p. 427–435.
23. Douglas, S. E. et al. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev com immunol*, **2003**, v. 27, n. 6-7, p. 589-601.
24. Driedonks, R. A.; Toschkap, H. Y.; Van Almkerk, J. W.; Schaffers, I. M.; Verbakels, J. M. A. Expression and Secretion of Antifreeze Peptides in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **1995**. V. 11, p. 849-864.
25. Elleuche, S.; Poggeler, S. Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2010**, v. 87, n. 2, p. 479-489.

26. Fernandes, J. M. *et.al.* Isolation and characterisation of oncorhynchin II, a histone H 1- derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*. *Dev camp immunol*, **2004**, v. 28, n. 2, p. 127 – 138.
27. Fong, B. A.; Wu, W. Y.; Wood, D. W. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. *Protein Expr Purif*, **2009**, v. 66, n. 2, p. 198-202.
28. Gellissen,G. Heterolous protein production in methylotrophic yeast. *Appl. Microbiolbio. Biotechnol.* **2000**, v. 54, p. 741-750.
29. Gong, Z.; Ewart, K. V.; Hu, Z.; Fletcher, G. L.; Hew, C. L. Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences. *J Biol Chem*, **1996**, v. 271, n. 8, p. 4106-4112.
30. Hancock, R.E.; Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, **2006**, v. 24, p. 1551–1557.
31. Hassouneh, W.; Christensen, T.; Chilkoti, A. Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci*, **2010**, v. Chapter 6, p. Unit 6 11.
32. Heyland, J.; Fu, J.; Branco, L. M.; Schimd, A. Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. *Biotechnology Bioengineering*, **2010**, v. 107, n. 2, p. 357-368.
33. INVITROGEN. pPICZ α A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins. **2010**, p. 195-200.
34. Ivanov, I. E.; Morrison, A. E.; Cobb, J. E.; Fahey, C. A., Camesano T.A. Creating antibacterial surfaces with the peptide chrysopsin 1. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2012**, v. 11, n. 28.
35. Jahic, M.; Gustavsson, M.; Jansen, A. K.; Martinelle, M.; Enfors, S. O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fedbatch processes. *Journal Biotechnology*, **2003**, v. 102, n.1, p. 45-53.
36. Jin, F.; Xu, X.; Zhang, W.; Gu, D. Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, **2006**, v. 49, p. 39–46.
37. Khatri, N. K.; Hoffmann, F. Oxygen-limited control of methanol uptake for improved production of a single-chain antibody fragment with

- recombinant *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2006**, v. 93, n. 5, p. 871 -79.
38. Kim, J.M.; Jang, S.A.; Yu, B.J.; Sung, B.H.; Cho, J.H.; Kim, S.C. High-level expression of an antimicrobial peptide histonin as a natural form by multimerization and furin-mediated cleavage. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2008**, v.78, p. 123–130.
 39. Kuiper, M.J.; Fecondo, J.V.; Wong, M.G.. Rational design of alpha-helical antifreeze peptides. *Journal Peptide Research*, **2002**, v. 59, p. 1-8.
 40. Kumar, B.; Balgir, P.P.; Kaur, B.; Garg, N. (2011) Cloning and expression of bacteriocins of *Pediococcus* spp: a review. *Arch ClinMicrobiol*, **2011**, v. 2, p.1–18.
 41. Lee C.C.; Sun, Y.; Qian, S.; Huang, H. W. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophys J*, **2011**, v. 100, n. 7, p. 1688-1696.
 42. Li, C.; Blencke, H.M.; Paulsen, V.; Haug, T.; Stensvag, K. Powerful workhorses for antimicrobial peptide expression and characterization. *Bioeng Bugs*, **2010**, v. 1, p. 217–220.
 43. Li, C.; Haug, T.; Styrvold, O.B.; Jorgensen, T.O.; Stensvag, K. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev Comp Immunol*, **2008**, v. 32, p.1430–1440.
 44. Li, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein ExprPurif* , **2011**, v. 80, p. 260–267.
 45. Lima, P.S. Clonagem, expressão heteróloga e caracterização molecular de um gene de lacase de *Pycnoporus sanguineus*. Departamento de biologia molecular. Programa de pós graduação em biologia molecular. Dissertação de mestrado, **2000**.
 46. Lin, W.; Chien, Y.; Pan, C.; Lin, T.; Chen, J.; Chiu, S.; Hui, C. Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (*Epinephelus coioides*) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells. *Peptides*, **2009**, v. 30, n. 2, p. 283-290.
 47. Lloyd-William, P.; Alberício, F.; Giralt, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. *Boca Raton: CRC Press*, **1997**, 278p.
 48. Lobo, D.S.; Pereira, I.B.; Fragel Madeira, L.; Medeiros, L.N.; Cabral, L.M.; Faria, J.; Bellio, M.; Campos, R.C.; Linden, R.; Kurtenbach, E. Antifungal *Pisum*

- sativatum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle . *Biochemistry*, **2007**, v. 46, n. 4. p. 987-996.
49. Luiz, D.P. Expressão heteróloga de abaecina de *Apis mellifera* em *Pichia pastoris*. Instituto de genética e bioquímica. Programa de pós graduação em genética e bioquímica. Dissertação de mestrado. **2011**.
50. Machado, A.; Liria, C. W.; Proti, P. B; Remuzco, C.; Miranda, M. T. M. Síntese química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. *Química nova*, **2004**, v. 27, p. 781 – 789.
51. Migliolo, L. Caracterização molecular e funcional de peptídeos sintéticos multifuncionais derivados de peptídeos anticongelantes de *Pleuronectes americanus*. Programa de pós-graduação em ciências genômicas e Biotecnologia. Tese de doutorado, **2013**.
52. Mookherjee, N.; Hancock, R.E. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci*, **2007**, v. 64, p. 922–933.
53. Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. *Imunobiologia de janeway*. *Artmed*, **2006**. v. 7.
54. Nascimento, J. M. Estudo da integração de peptídeos multifuncionais em modelos de biomembranas . Programa de pós-graduação em inovação terapêutica. Tese de doutorado, **2014**.
55. Nijnik, A.; Hancock, R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J*, **2009**, v. 2:e1.
56. Parachin, N. S.; Mulder, K. C.; Viana, A. A. B.; Dias, S. C.; Franco, O.L. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides*, **2012**, v.38, p. 446-456.
57. Park, C. B.; Lee, J. H.; Park, I.Y; Kim, M. S.; Kim, S. C. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS lett*, **1997**, v. 411, n. 2-3, p. 173-178.
58. Pelegrini, P. B.; Franco, O. L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, **2005**, v. 37, n. 11, p. 2239-2253.
59. Ravichandran, S.; Kumaravel, K.; Rameshkumar, G.; Ajithkumar, T. T. Antimicrobial peptides from the marine fishes. *Research J Immunol*, **2010**, v. 3, n. 2, p. 146-156.

60. Ribeiro, E.L.; Camargos, M.F.; Sales, E.B.; Oliveira, A.M.; Franco, J.A.; Ueira-Vieira, C.; Goulart Filho, L.R.; Heinemann, M.B. Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico da Febre Aftosa. *O Biológico*, **2011**, v.73, p. 35.
61. Robinette, D.; Wada, S.; Arroll, T.; Levy, M. G.; Miller, W. L.; Noga, E. J. Antimicrobial activity in the skin of chammel catfish ictalurus punctatus: chacterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cell mol life Sci*, **1998**, v. 54, n. 5, p. 467- 475.
62. Santana, A. C. Expressão e caracterização das quimases recombinantes específicas de mastócitos de camundongos (mMCP4 e 5). Programa de pós graduação em biologia molecular e celular, dissertação de mestrado, **2014**.
63. Silva, O.N.; Mulder, K.C.; Barbosa, A.E.; Otero-Gonzalez, A.J.; Lopez-Abarrategui, C.; Rezende, T.M., et al. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Front Microbiol*, **2011**, v. 2, p. 232.
64. Sousa, D. A. Desenvolvimento de um sistema de expressão em larga escala para peptídeos antimicrobianos baseado em ELPS e inteínas. Pós-graduação em patologia molecular. Qualificação de doutorado, **2014**.
65. Sreerashtra, K.; Brankamp, R.G.; Kropp, K. E.; Blankenship, D. T.; Tsay, J.; Smith, P. L.; Wierschke, J. D.; Subramaniam, A.; Birkenberger, L.A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **1997**, v. 190, n. 1, p.55-62.
66. Stirling, D. Technical notes for sequencing difficult templates. *Methods Mol Biol*, **2003** v. 226, p. 401-402.
67. Tay, D.K.; Rajagopalan, G.; Li, X.; Chen, Y.; Lua, L.H.; Leong, S.S. A new bioproduction route for anovel antimicrobial peptide. *Biotechnol. Bioeng*, **2011**, v.108, p. 572–581
68. Terrazas, W. D. M. Fatores que influenciam a produção de biomassa e glicerol quinase pela levedura recombinante *Pichia pastoris*. Programa de pós-graduação em alimentos e nutrição. Tese de doutorado, **2012**.
69. Tomczak, M.M.; Hinch, D.K.; Estrada, S.D.; Wolkers, W.F.; Crowe, L.M.; Feeney, R.E.; Tablin, F.; Crowe, J.H. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophysical Journal*, **2002**, v. 82, p. 874-881.

70. Vad, B. S.; Bertelsen, K.; Johansen, C. H.; Pederson, J. M.; Skrydstrup, T. Nielsen, N. C.; Otzen, D. E. Pardaxin permeabilizes vesicles more efficiently by pore formation than by disruption. *Biophys J*, **2010**, v. 323, n. 2, p. 178-193.
71. Walker, J. M. Methods in Molecular Biology. I – proteins, *Humana Press*, **1984**.
72. Wang, A.; Wang, S.; Shen, M.; Chen, F.; Zou, Z.; Ran, X.; et al. High level expression and purification of bioactive human alpha-defensin 5 mature peptide in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2009**, v. 84, p. 877–884.
73. Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD 2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic acids res*, **2009**, v. 37, n. database issul, p. D933-37.
74. Wu, W. Y.; Mee, C.; Califano, F.; Banki, R.; Wood, D. W. Recombinant protein purification by self-cleaving aggregation tag. *Nat Protoc*, **2006**, v. 1, n. 5, p. 2257-2262.
75. Zaha, A. Biología molecular básica. *Mercado abierto*, **1996**, p.56.
76. Zasloff, M.; Martin, B.; Chen, H. C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc Natl Acad Sci*, **1988**, v. 85, n.3, p. 910-913.
77. Zhang, J.; Zhang, S. Q.; Wu, X.; Chen, Y. Q.; Diao, Z. Y. Expression and characterization of antimicrobial peptide ABP-CM4 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, **2006**, v. 41, p. 251–256.
78. Zhong, Z.; Xu, Z.; Peng, L.; Huang, L.; Fang, X.; Cen, P. Tandem repeat mhBD2 gene enhance the soluble fusion expression of hBD2 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2006**, v. 71, p. 661–667.
79. Zhou, L.; Lin, Q.; Li, B.; Li, N.; Zhang, S. Expression and purification the antimicrobial peptide CM4 in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, **2009**, v. 31, p. 437–441.

8. ANEXOS

8.1. MARCADORES

Marcadores de DNA 1 kb plus *Ladder*

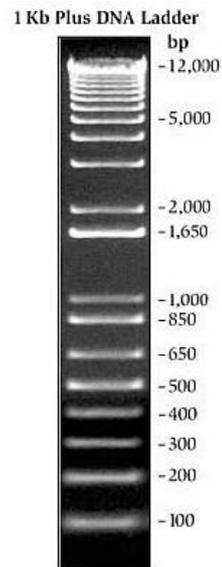


Figura 14 - Marcador ladder. Fonte: lifetechnologies

8.2. VETORES

Vetor de expressão pPICZ α

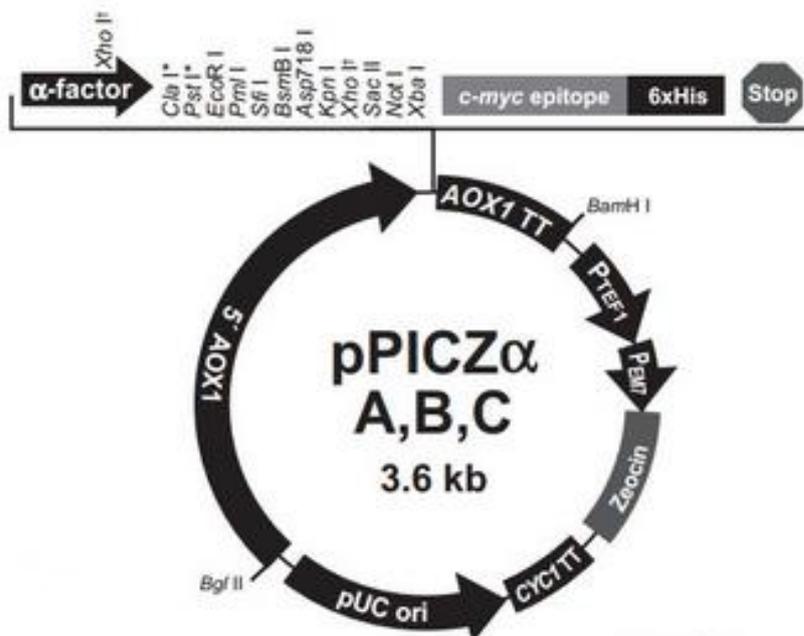


Figura 15 - Vetor de expressão pPICZ α . Fonte: Invitrogen