

Universidade de Brasília – UnB

Departamento de Biologia Celular

**Expressão e Purificação de Proteína de
Glândula Sericígena da Aranha *Parawixia
bistriata* em Bactérias Geneticamente
Modificadas**

**Dissertação de Mestrado apresentada à banca examinadora do
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade
de Brasília**

Otávio Bravim da Silva

Orientador: Elíbio Leopoldo Rech Filho

Co-orientador: André Melro Murad



**Recursos Genéticos e
Biotecnologia**



Brasília, fevereiro de 2014

Otávio Bravim da Silva

Expressão e Purificação de Proteína de Glândula
Sericígena da Aranha *Parawixia bistriata* em
Bactérias Geneticamente Modificadas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação “*Stricto Sensu*” em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Elíbio Leopoldo Rech Filho, PhD

**Brasília
2014**

ATA DE DEFESA

Dissertação de autoria de Otávio Bravim da Silva, intitulada: “Expressão e Purificação de Proteína de Glândula Sericígena da Aranha *Parawixia bistriata* em Bactérias Geneticamente Modificadas.”, requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular, defendida e aprovada em 27 de Fevereiro de 2014, pela banca examinadora constituída por:

Elíbio Leopoldo Rech Filho, PhD, orientador
(Embrapa, Cenargen)

Cristiano Lacorte, PhD
(Embrapa, Cenargen)

Sônia Maria de Freitas, PhD, membro interno
(Universidade de Brasília)

Nicolau Brito da Cunha
(Embrapa, Cenargen)

Brasília

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Charles Darwin, que mostrou que pequenas diferenças entre as gerações são responsáveis por grandes mudanças. E assim é a humanidade.

Agradecimentos

Primeiramente ao Dr. Elíbio por ter me aceitado em seu laboratório e me orientado.

À Valquíria, por ter iniciado o projeto e ter aceitado me incluir em parte dele.

Ao André, pela co-orientação, pela paciência, pelas risadas, pelos conselhos, mas, acima de tudo, pela amizade.

Aos membros da banca Dr. Nicolau, Dr. Cristiano Lacorte e Dra Sônia Freitas por terem aceitado meu convite. Obrigado pela participação e contribuição em meu crescimento.

Aos pesquisadores e técnicos que me emprestaram um pouco do seu tempo para me ajudar e acabaram se tornando amigos, Luciano, Ana Cristina, Eduardo Melo, Arnaldo, Simone, Joseilde, Gláucia e Simoni.

Aos meus amigos de todas as horas, Andrei, Victor Maciel, Victor Fuchs, Rodrigo, Fernanda, Juliana Jobim, Marcus, Thiago, Ricki, Tatiana, Ronan, Thaina, Rafael Franca, Paulo, Karla, Karenina, Fernando, Isadora, Jéssica, Israel, e é claro, à minha namorada Andressa, por todas as vezes que compreenderam que simplesmente não podia vê-los, que estava ocupado e que sim, eu trabalho domingo quando preciso. À vocês todo meu afeto.

Aos meus amigos de laboratório, Cintia, Débora, Jéssica, Giovanni, Marly, Juliane, Rojeanne. É um prazer trabalhar com vocês

Ao meu pai Sérgio, pelo amor desmedido, por ser ouvinte de todas as horas, pelo interesse em meu trabalho e principalmente por ser a pessoa maravilhosa que é. Todo meu amor.

À minha mãe Alba, pelo afeto, pelos olhares amorosos quando não estou olhando e por apoiar desmedidamente minha entrada na ciência. Tenho orgulho de ser seu filho.

Às minhas irmãs Virgínia e Ludmila, pelas risadas diárias, pelo apoio emotivo e psicológico que ajudou em muito meu crescimento pessoal. Obrigado pelos elogios transparentes, e aos velados também. Amo vocês.

Agradeço a minha enorme família, à todos os tios, tias, primos e primas que de alguma forma se interessaram pelo meu trabalho e me deram forças. Meu muito obrigado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilidade das instalações físicas, equipamentos e apoio financeiro. À Capes pela bolsa de estudos.

Ao departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, pela oportunidade de cursar o mestrado. À Ana, deste departamento, pela eficiência, atenção e boa vontade.

Enfim, a todos que de uma maneira ou de outra estiveram presentes e contribuíram para a realização dessa etapa, e que sem as quais, tal realização não seria possível.

1 Sumário

1	Sumário	vii
1.	Introdução	1
1.1	As aranhas.....	1
1.2	As sedas.....	6
1.3	Tipos de glândulas	10
1.3.1	Ampolada principal e a linha de segurança	10
1.3.2	Ampolada secundária	13
1.3.3	Flageliforme	13
1.3.4	Agregata.....	14
1.3.5	Tubuliforme.....	14
1.3.6	Aciniforme	14
1.3.7	Piriforme.....	14
1.4	Características moleculares das sedas.....	15
1.5	Polimerização da seda	20
1.6	Caracterização de sedas utilizando microscopia de luz, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura	27
1.7	Análise em Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)....	30
1.8	Expressão em <i>Escherichia coli</i> como sistema heterólogo	32
2.	Justificativa.....	35
3.	Objetivos.....	36
4	Objetivos específicos.....	36
5	Material e Métodos	37
5.1	Elaboração das sequências de seda utilizadas na expressão.	37
5.2	Elaboração das sequências de expressão de tRNA.....	38
5.3	Expressão das proteínas	41
5.4	Purificação das proteínas	41
5.5	Deteção por western blot.	42
5.6	Extrusão da seda	43
5.7	Análise em microscopia de força atômica	43
5.8	Microscopia eletrônica de varredura	45
5.9	Análise em Infravermelho por Transformada de Fourier	45
6	Resultados.....	46
6.1	Produção da seda em <i>Escherichia coli</i>	46
7	Discussão.....	62
8	Conclusão.....	67
9	Referências.....	68
	Anexo I.	80

Lista de Figuras

Figura 1. Imagem das feiras da glândula Piriforme de uma <i>Gasteracantha</i> sp, com as feiras em laranja, as fúsculas em verde e a seda proveniente da glândula em lilás. (Fonte http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000Vm2NIRqz3JA)	2
Figura 2. Micrografia eletrônica mostrando as quelíceras de uma aranha. (Fonte: http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A5%D0%B5%D0%BB%D1%96%D1%86%D0%B5%D1%80%D0%B8)	3
Figura 3. Figura mostrando a posição das quelíceras em Mygalomorphae.	4
Figura 4. Figura mostrando a posição das quelíceras em Araneomorphae.	4
Figura 5. Colônia de aranhas <i>Parawixia bistriata</i> mostrando o tamanho da colônia e o comportamento "quase social" destas aranhas ao construir a teia (Fonte http://compulenta.computer.ru-chelovek-biologiya-10007404-).	6
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura das sedas ampolada principal (1) e ampolada secundária (2) e flageliforme (Mauney, Cannon <i>et al.</i> ,) coletadas da aranha <i>Araneus diadematus</i> (modificado de Scheibel, 2004).	8
Figura 7. Glândulas da seda e respectivas teias da aranha <i>A. diadematus</i> (Vollrath, 2000).10	
Figura 8. Desenho esquemático da microestrutura da fibra da glândula ampolada principal. Dentro da fibra regiões cristalizadas, formadas por folhas- β , são separadas por ligações amorfas, criando um material nanoestruturado.....	12
Figura 9. Repetições consenso das seqüências das proteínas da teia. MaSp1 e MaSp2 são as proteínas produzidas pela ampolada principal. MiSp 1 e MiSp 2 são as proteínas produzidas pela ampolada secundária. Flag é a proteína que compõe a seda flageliforme. (Hinman <i>Et al.</i> , 2000).....	16
Figura 10. Módulos estruturais encontrados nas proteínas de seda de aranha. Flag é a seda flageliforme. MaSp1, MaSp2 (em destaque), ADF-3 e ADF-4 são proteínas que compõem a seda ampolada principal de <i>N. clavipes</i> e <i>A. diadematus</i> respectivamente. MiSp1, MiSp2, ADF-1 e ADF-2 compõem os tipos de seda da glândula ampolada secundária de <i>N. clavipes</i> e <i>A. diadematus</i> respectivamente. Os retângulos preenchidos representam módulos encontrados na seda, sem manter a posição real na molécula. (Hardy <i>et al.</i> , 2008).	19
Figura 11. Ilustração mostrando o caminho da proteína desde sua síntese até sua desidratação e alinhamento.....	21
Figura 12. Figura mostrando o escoamento direcional da solução de espidroínas até o início da formação de fibra (adaptado de Rey e Herrera-Valencia, 2012)	22
Figura 13. Motivos de poli-Alanina alinhados em folhas- β sendo mostrados de acordo com o sentido da fibra (adaptado de http://www.chm.bris.ac.uk/motm/spider).....	24
Figura 14. Ilustração da parte interna de um Microscópio Eletrônico de Varredura (Fonte: http://fap01.if.usp.br/~lff/mev.html)	28
Figura 15. Esquema mostrando o funcionamento de um microscópio de força atômica (Adaptado de Silva e Rech, 2013).....	30
Figura 16. Espectro esperado de uma proteína (Fonte: http://www.shimadzu.com/an/industry/pharmaceuticallifescience/proteome0205005.htm)	32
Figura 17. Vetor pET19b Masp2 16X.	39
Figura 18. Vetor pTet GlyXVY	39
Figura 19. Vetor pTet Gly2	39
Figura 20. Mapa esquemático do plasmídeo pET19b – Novagen.....	40
Figura 21. Curva de crescimento da BL21(DE3) Vazia MaSp2 16X.....	48
Figura 22. Curva de crescimento da BL21(DE3) GlyVXY MaSp2 16X	48
Figura 23. Curva de crescimento da BL21(DE3) Gly2 MaSp2 16X.....	49
Figura 24. Fotografia da proteína após extração, purificação em FPLC e liofilização.	49
Figura 25. Fotografia mostrando momento da extrusão e a seda sendo coletada por pinça.	51
Figura 26. Renderização da superfície da fibra de <i>Parawixia bistriata</i> analisada por microscópio de força atômica.	53

Figura 27. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 500X (colorida digitalmente).....	54
Figura 28. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 500X (colorida digitalmente).....	55
Figura 29. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 1.000X (colorida digitalmente).....	55
Figura 30. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 3.000X (colorida digitalmente).....	56
Figura 31. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 3.000X (colorida digitalmente).....	56
Figura 32. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 5.000X (colorida digitalmente).....	57
Figura 33. Micrografia eletrônica da ponta da seda extruída, mostrando seu cerne, em aumento de 1.000X (colorida digitalmente).	58
Figura 34. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 10.000X (colorida digitalmente).....	58
Figura 35. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 10.000X (colorida digitalmente).....	59
Figura 36. Espectro de infravermelho de MaSp2 16X.....	60
Figura 37. Aproximação do gráfico de FTIR mostrando as bandas vibracionais da tirosina (seta azul), da glutamina (seta vermelha), as bandas vibracionais das folhas-beta (quadrado vermelho) e as bandas vibracionais das alfa-hélices (circulo azul).	61

Lista de tabelas

Tabela 1. Comparação das propriedades mecânicas da seda da aranha <i>N. clavipes</i> com alguns materiais.	9
Tabela 2. Fonte adaptada de Hayashi, Shipley <i>et al.</i> , 1999.....	16
Tabela 3. Tabela contendo todas as O.D. coletadas a cada hora dos frascos de cultivo.	47
Tabela 4. Produção de proteínas por grama de pellet bacteriano.....	50
Tabela 5. Tabela mostrando os dados Ra, Rz, Rzjs, Rq, RP e Rv das amostras de fibra de <i>P. bistriata</i>	51

Lista de abreviaturas

AFM: *Atomic Force Microscope*; Microscópio de força atômica

Amp: Ampicilina

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

cDNA: DNA complementar

Comassie Blue: Reagente azul, usado para corar géis de acrilamida

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EST: *expression sequence tag*

HFIP: Hexafluoroisopropanol

His: Histidina

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

Kb: Milhar(es) de par(es) de base(s)

kDa: Kilodalton(s)

LB: Lúria-Bertani, meio rico para cultivo de microorganismos

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mRNA: RNA mensageiro

NBT: *Nitro blue tetrazolium*

μ L: Microlitro

pb: Par(es) de base(s)

poli-Ala: poli-Alanina

RNA: Ácido ribonucléico

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl SulfatePolyAcrylamide GelElectrophoresis

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside

Ponham sua confiança em Deus, garotos. E mantenham a pólvora seca.

- Oliver Cromwell

RESUMO

As sedas produzidas pelos aracnídeos são essencialmente constituídas de proteínas, as quais são secretadas por glândulas específicas, sendo também encontradas em diferentes grupos de artrópodes. Todos os indivíduos da classe dos aracnídeos produzem sedas, com diversas funções, sendo todas essas sedas sintetizadas por glândulas presentes no abdômen e polimerizadas por meio de uma série de estruturas denominadas fiandeiras ou fieiras, que são anexos finais da glândula. As aranhas podem possuir em seu corpo até sete tipos diferentes de glândulas produtoras de seda. Sendo assim, diferentes glândulas produzem diferentes fibras, permitindo então a comparação entre a fibra produzida e sua função, pois cada uma possui propriedades distintas, sendo compostas por motivos de sequência, que conferem a cada uma suas propriedades. Há anos as sedas de aranha têm sido estudadas devido a sua resistência mecânica, que é extremamente superior à do bicho-da-seda. A dificuldade de obtenção dessas sedas através da domesticação de aranhas, que são extremamente agressivas e territorialistas, aliada à possibilidade de produção de novos materiais com propriedades semelhantes, motivaram o desenvolvimento de estratégias alternativas para a produção dessa seda, utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Este projeto visou a manipulação e expressão de biopolímeros produzidos a partir de um gene isolado da glândula ampolada principal, produtora de seda da aranha brasileira *Parawixia bistriata* em microorganismos do domínio Bacteria também modificados para possível aumento da expressão desta proteína. Após produção e purificação, as proteínas de seda foram extruídas para formação de fibra e análises estruturais foram feitas para verificação da qualidade do processo de extrusão, bem como identificação de algumas características moleculares da proteína.

Palavras-chaves: seda, aranha, DNA recombinante, biopolímeros, glândula ampolada principal, *Parawixia bistriata*

ABSTRACT

Silks produced by spiders are mainly consisting of proteins, which are secreted by specific glands, also found in different arthropod groups. All individual from the Arachnida class produce silks with different functions, all these silks are synthesized by glands in the abdomen and polymerized through a series of structures called spinnerets, final appendix of the silk glands. Spiders can have on your body up to seven different types of silk-producing glands. Thus, different glands produce different fibers, thus allowing a comparison between the fiber produced and its function, because each one has different properties and is composed of repetitive amino acid modules that give each one its properties. For years the spider silks have been studied due to its mechanical strength, which is far superior to silkworm silk. The difficulty of obtaining these silks through the domestication of spiders, which are extremely aggressive and territorial, combined with the possibility of producing new materials with similar properties, motivated the development of alternatives for the production of this silk strategies using recombinant DNA technology. This project aimed at the manipulation and expression of biopolymers produced from a gene isolated from the major ampulate gland from the Brazilian spider *Parawixia bistriata*, which produce spider silk, in microorganisms of the domain Bacteria also modified to increase the expression of this protein. After production and purification, the silk proteins were spun into fibers and structural analysis were made for verification of the quality of the spin process, as well to identify some molecular characteristics of the protein.

Keywords: Silk, Spider, *Parawixia bistriata*, Recombinant DNA, Major ampulate silk gland, biopolimers.

1. Introdução

1.1 **As aranhas**

As aranhas são metazoários artrópodes pertencentes à ordem Araneae, da classe dos aracnídeos. Apresentam enorme diversidade e abundância, ocupando a maioria dos ambientes naturais. São consideradas um grupo monofilético, cujas bases desta monofilia são apoiadas pela presença de apêndices modificados, presentes no fim do abdômen, denominados fieiras, que são os anexos finais das glândulas sericigenas, responsáveis pela produção da seda e fúsculas, que são a parte final das fieiras (Figura 1), pela qual a teia é expelida. A ordem Araneae é o segundo maior grupo dentre os aracnídeos (Foelix 1996) e o sétimo dentre os artrópodes (Parker, 1982) com 40.024 espécies, incluídas em 110 famílias (Platnick, 2014) sendo menor apenas que a ordem Acari e cinco ordens de insetos (Coleóptera - Besouros, com aproximadamente 300.000 espécies catalogadas, Lepidóptera - Borboletas e mariposas, com 200.000, Himenóptera - Abelhas e vespas, com 130,000, Diptera - Moscas e mosquitos, 120.000 e Hemíptera - Percevejos, com 80.000) no que se refere ao número de espécies (Gillot, 2005).



Figura 1. Imagem das feiras da glândula Piriforme de uma *Gasteracantha* sp, com as feiras em laranja, as fúsculas em verde e a seda proveniente da glândula em lilás. (Fonte <http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000Vm2NIRqz3JA>)

Muitas vezes tomadas como insetos – subfilos hexapoda-, as aranhas são diferenciadas deste grupo por possuírem o corpo segmentado em duas partes principais, o cefalotórax e o abdômen, por terem quatro pares de patas, pedipalpos, que são apêndices semelhantes a pernas que no macho são modificados em órgãos copuladores (em escorpiões por exemplo são suas pinças), quelíceras (**Figura 2**), que são órgãos para inocular veneno, localizados na parte anterior do corpo, e finalmente, feiras, para a produção de seda, localizadas na parte posterior do corpo.

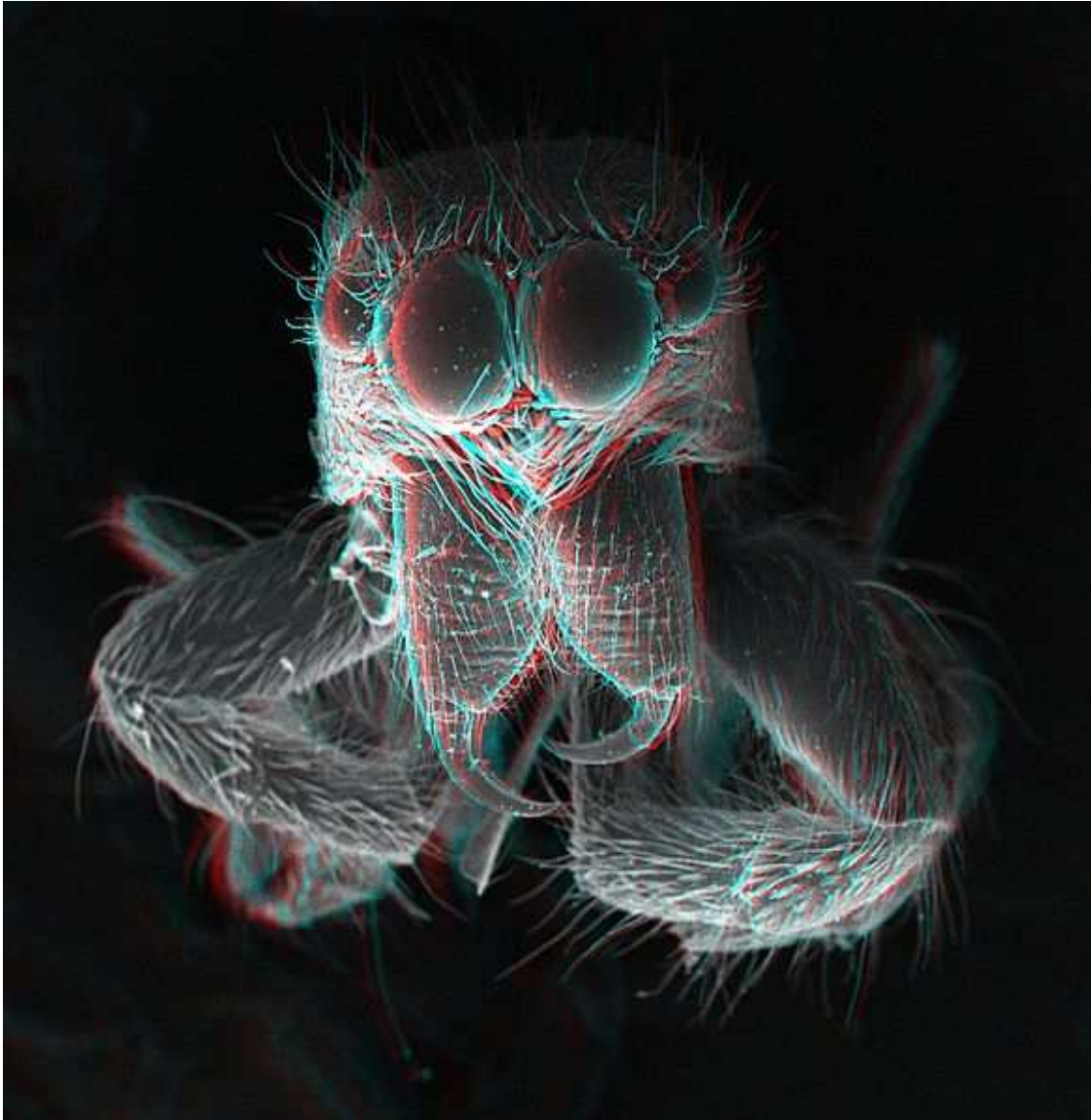


Figura 2. Micrografia eletrônica mostrando as quelíceras de uma aranha. (Fonte: <http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A5%D0%B5%D0%BB%D1%96%D1%86%D0%B5%D1%80%D0%B8>)

As aranha neotropicais dividem-se em dois grandes grupos: Mygalomorphae (Migalomorfos) e Araneomorphae (Araneomorfos). As primeiras possuem quelíceras em posição paralela ao eixo maior do corpo (**Figura 3**) e as araneomorfa em posição transversal (**Figura 4**). As Mygalomorphae são cerca de 2.500 espécies e incluem as caranguejeiras e aranhas de alcapão.

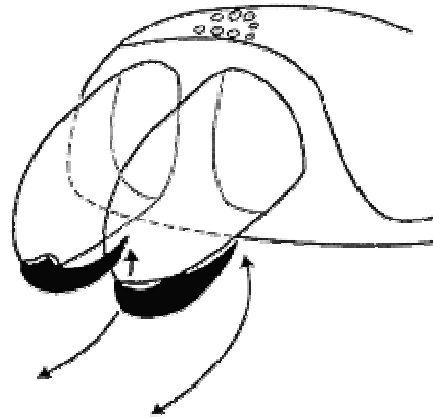


Figura 3.Figura mostrando a posição das queliceras em Mygalomorphae.

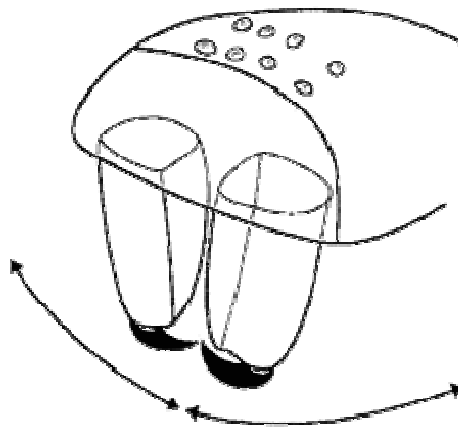


Figura 4.Figura mostrando a posição das queliceras em Araneomorphae.

As araneomorfas, também chamadas aranhas “verdadeiras” constituem a maioria das aranhas existentes (Aproximadamente 35.000 espécies), com hábitos e estratégias de predação distintos. Em se tratando de teias, os indivíduos que constroem teias orbiculares são notáveis por modificações morfológicas e comportamentais relacionadas à construção e habitação dos fios de seda com vários graus de viscosidade e altamente elásticos para captura de insetos. Outros comportamentos de caça também são notáveis, como o denominado emboscadoras de vegetação, adeptas da estratégia senta-e-espera, onde ficam paradas em folhas, flores ou galhos aguardando a presa passar. Saltatoriais, que pulam sobre a presa. Aquáticas, que ficam próximas, sobre ou sob a água, sendo que as que ficam sob a água na verdade vivem em teias especiais construídas de forma

a fixar grandes bolhas de ar sob a linha d'água, saindo a aranha para capturar pequenas larvas de insetos e peixes. As cursoriais ou errantes, que vagam pelo habitat procurando a presa e as fessoriais, que vivem em tocas construídas no chão.

Das 110 famílias existentes no mundo 67 são encontradas no Brasil (Araujo, Cella *et al.*, 2005). A diversidade de espécies reflete a grande irradiação adaptativa que a produção de seda gera.

A aranha *Parawixia bistriata* é uma espécie da biodiversidade brasileira típica do cerrado propriamente dito, mas sua presença também é relatada na Bolívia, Paraguai e Argentina. Diferente da maioria das outras aranhas, indivíduos dessa espécie vivem em grupo, sem canibalismo ou territorialismo, sendo conhecida como espécie "quase social" (não há formação de castas, como nos insetos sociais). Quando grandes presas são capturadas, as aranhas vizinhas cooperam na manipulação e todas se alimentam da mesma. A teia, na verdade o conjunto delas, é notável pelo tamanho (**Figura 5**). Cada aranha tece, a cada noite, sua própria teia orbital, transformando o conjunto de teias em uma estrutura colonial unificadora de vários metros, com capacidade de pegar até passaros, e com até 200 aranhas. Durante o dia, elas se escondem na vegetação, formando um dormitório comunal, em uma estrutura esférica (Paulo César Motta, Depto. de Zoologia, Universidade de Brasília, comunicação pessoal).



Figura 5. Colônia de aranhas *Parawixia bistriata* mostrando o tamanho da colônia e o comportamento "quase social" destas aranhas ao construir a teia (Fonte <http://compulenta.computerra.ru-chelovek-biologiya-10007404->).

1.2 As sedas

Há cerca de 4.000 anos, na China, foi domesticado o bicho-da-seda (*Bombyx mori*) para utilização de sua seda na indústria têxtil. Dois tipos básicos de filamentos contínuos de fibroína compõem os casulos do *B. mori*, um de fibroína pesada (~350kDa) e outro de fibroína leve (~25kDa), aderidos por meio de sericina, tipo de proteína adesiva (Jin e Kaplan, 2003). As aranhas também produzem seda, biopolímeros sintetizados de glândulas abdominais e polimerizados através de uma série de feiras normalmente localizadas no final do abdômen, que transformam as proteínas da seda solúveis em água e com alto massa molecular em fibras insolúveis em água (Zhang, Zhao *et al.*, 2013). Diferente do bicho-da-seda, as aranhas não são domesticáveis para aplicações têxteis, principalmente devido ao fato de as sedas de aranhas serem produzidas em pequena quantidade e não poderem ser enoveladas como uma fibra simples, de forma semelhante ao que ocorre com o casulo de *B. mori*. Entretanto, as características físicas apresentadas pelas sedas produzidas por aranhas são muito superiores às encontradas na seda de *B. mori* (Dickinson, 1999,).

Sedas são produzidas somente por artrópodes e apenas por animais das classes Insecta, Arachnida e Myriapoda. Em conjunto, os insetos produzem diferentes sedas, porém, apenas um tipo por espécie. Já uma única aranha pode produzir até seis diferentes tipos de seda (Craig, 1997).

Sedas de aranha são materiais biológicos leves, extremamente fortes, elásticos e apresentam características mecânicas comparáveis às melhores fibras sintéticas produzidas pela alta tecnologia. (Hinman, Jones *et al.*, 2000). Diferentes tipos de teia são utilizados em diferentes tipos de combinações pela aranha a fim de produzir uma seda em conformidade com a necessidade momentânea do indivíduo, como captura de presas ou construção de abrigo (Hurst e Vollrath, 1992).

Os componentes das fibras da seda são as proteínas (espidroínas) sintetizadas nas células epiteliais de glândulas especializadas e secretadas no lúmen das glândulas onde são armazenadas como uma solução líquida e cristalina altamente concentrada (Hijirida, Do *et al.*, 1996, Scheibel, 2004).

A natureza repetitiva da fibra do *B. moris* e dos aracnídeos pode ser observada quando se examina a sequência de DNA, bem como dos aminoácidos. Na literatura consta que os primeiros trabalhos para a produção de seda sintética envolviam a engenharia genética de peptídeos desenhados com base na sequência de peptídeos do *B. moris*, a fim de desenvolver fibras com diferentes propriedades mecânicas (Capello *et al.*, 1990). Estudos com cDNAs e genes mostraram que as sedas produzidas pelas aranhas são formadas por motivos de sequência de aminoácidos com diferentes sequências, dependendo do tipo de proteína, e esses módulos conferem propriedades mecânicas distintas (Xu e Lewis, 1990; Colgin e Lewis, 1998; Hayashi e Lewis, 1998; Hinman e Lewis, 1992).

Diferente dos insetos, as aranhas possuem sete diferentes tipos glândulas, que produzem diferentes tipos de sedas. Porém, algumas aranhas podem usar as sedas de forma otimizada, combinando tipos diferentes (**Error! Not a valid bookmark self-reference.**) para realizar suas tarefas como construção de armadilhas e casulos (Scheibel, 2004). Essas diferenças entre as fibras permitem a comparação entre estrutura

proteica e sua função, porque cada uma possui propriedades mecânicas distintas e é composta por um conjunto determinado de motivos de sequência que conferem essas propriedades (Hinman, Jones *et al.*, 2000).

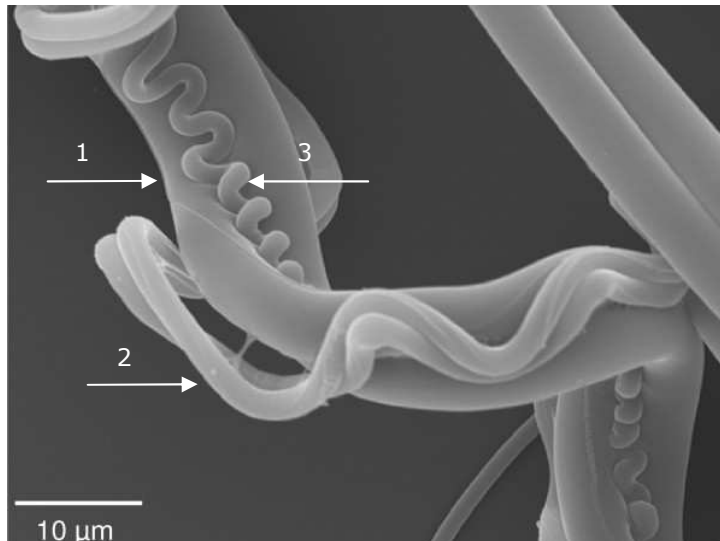


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura das sedas ampolada principal (1) e ampolada secundária (2) e flageliforme (Mauney, Cannon *et al.*,) coletadas da aranha *Araneus diadematus* (modificado de Scheibel, 2004).

As naturezas e tipos das diversas fibras existentes dependem da aranha (Denny, 1980). A **Tabela 1.** Comparação das propriedades mecânicas da seda da aranha *N. clavipes* com alguns materiais compara as propriedades mecânicas das sedas da aranha *Nephila clavipes* com alguns tipos de materiais. *N. clavipes* e *Araneus diadematus* são espécies subtropicais encontradas nos Estados Unidos e foram as primeiras aranhas a serem utilizadas em pesquisa pela facilidade de coleta e dissecção, especialmente por causa de seu tamanho relativamente grande e conseqüentemente de suas glândulas.

Tabela 1. Comparação das propriedades mecânicas da seda da aranha *N. clavipes* com alguns materiais encontrados na natureza e produzidos pelo homem.

Material	Density [g cm⁻³]	Força (Gpa)	Elasticidade (%)	Resistência [MJ m⁻³]
Seda da linha de segurança. (MaSp1 + MaSp2)	1.3	1.1	27	180
Seda Flageliforme	1.3	0,5	270	150
Seda de inseto	1.3	0,6	18	70
Nylon 6.6	1.1	0.95	18	80
Kevlar® 49	1.4	3.6	2.7	50
Fibra de carbono	1.8	4	1.3	25
Aço	7.8	1.5	0.8	6

Acredita-se que as diferentes glândulas de seda das aranhas evoluíram a partir de um único tipo e acumularam divergências em sua anatomia, no conteúdo de seu lúmen e na sua morfologia (Hurst e Vollrath, 1992).

A **Figura 7** mostra os diferentes tipos de glândulas e suas respectivas sedas em *A. diadematus*.

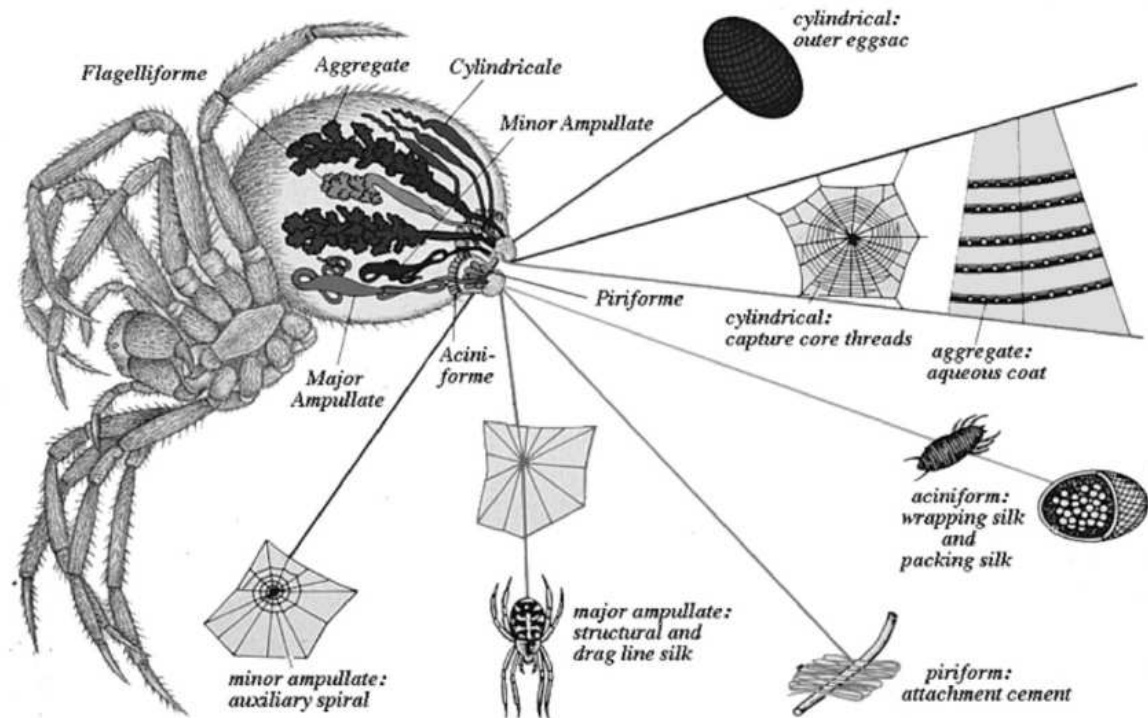


Figura 7. Glândulas da seda e respectivas teias da aranha *A. diadematus* (Vollrath, 2000).

1.3 Tipos de glândulas

1.3.1 Ampolada principal e a linha de segurança

Sua função é a produção da linha de segurança, e os fios para formar a moldura da teia. Sendo a glândula mais volumosa do abdômen, juntamente com seu formato de ampola, é uma glândula facilmente identificável e dissecável. A linha de segurança produzida por ela é de grande vislumbre por possuir propriedades mecânicas interessantes tais como ser extremamente rígida, altamente elástica e resistente à tensão

(Denny, 1980). Esta seda é utilizada na fuga de predadores e como moldura para a construção das teias. Possui força tensora comparável ao Kevlar®(4x10⁹N.m⁻²) e revela uma elasticidade de 35%, sendo portanto, uma fibra extremamente forte.

A seda da linha de segurança isolada das espécies *N. clavipes* e *A. diadematus* é a mais estudada entre todas as fibras sintetizadas por aranhas. Esta seda é formada por dois tipos de proteínas – ambas produzidas pela glândula ampulada principal – denominadas MaSp1 e MaSp2 (Major Ampullate Spidroin) em *N. clavipes* e ADF -3 e ADF -4 (*Araneus diadematus* Fibroin) na *A. diadematus* (Beckwitt, Arcidiacono *et al.*, 1998; Hinman e Lewis, 1992). A interação entre estas duas proteínas, embora identificada, ainda não está completamente elucidada, mas o fato de ambas estarem sempre acopladas na linha de segurança indica que a associação destas proteínas é conservada evolutivamente (Tian, Liu *et al.*, 2004). As proteínas dessa glândulas em espécies diferentes possuem composição aminoacídica muito semelhante. Por exemplo, em MaSp2 e ADF-3, glicina, alanina prolina, serina e tirosina são responsáveis por 99% dos aminoácidos de toda a estrutura da seda (Hayashi e Lewis, 1998). Trabalhos recentes se basearam no exame de sequências de aminoácidos da espidroína constituinte da linha de segurança em 11 espécies de aranhas. Um alto grau de conservação foi revelado entre as sequências e identificou um conjunto repetitivo de motivos. Além de corroborarem com as considerações evolutivas, esses motivos repetitivos de aminoácidos apresentam uma estrutura definida de componentes com domínios ricos em alanina e glicina (poli-alanina (poli ala) e (Glicina-alanina)_n – GA) e adotam uma estrutura de folha-β responsável pela formação dos cristais (**Figura 8**). (Gatesy, Hayashi *et al.*, 2001; Grubb e Ji, 1999; Hayashi e Lewis, 1998; Parkhe, Seeley *et al.*, 1997; Qin, Coyne *et al.*, 1997; Riekel, Madsen *et al.*, 2000). Além disso, a região Glicina-Glicina-X (GGX), onde X=leucina, tirosina, serina ou alanina, forma 3₁₀-hélices (que se diferem da alfa-hélice pois a ponte interna de hidrogênio ocorre entre os resíduos I e I+3 ao invés de I e I+4 em alfa hélices). que conectam os cristais de modo a estabilizar e orientar a estrutura da fibra (Tamburro, Guantieri *et al.*, 1991; Tatham e Shewry, 2000). Em teoria, a base para a elasticidade da fibra se deve ao

aminoácido prolina presente no motivo Glicina – Prolina – Glicina – X – X (GPGXX), sendo X= glicina, tirosina, serina, alanina ou glutamina, considerado responsável por formar uma matriz móvel e amorfa (Dong, Lewis *et al.*, 1991; Gosline, Lillie *et al.*, 2002; Hayashi e Lewis, 1998) bem como às hélices de glicina também presentes. Esses motivos estruturais e repetitivos em conjunto são considerados os responsáveis pelas características mecânicas da fibra (Hayashi, Shipley *et al.*, 1999; Rising, Nimmervoll *et al.*, 2005)

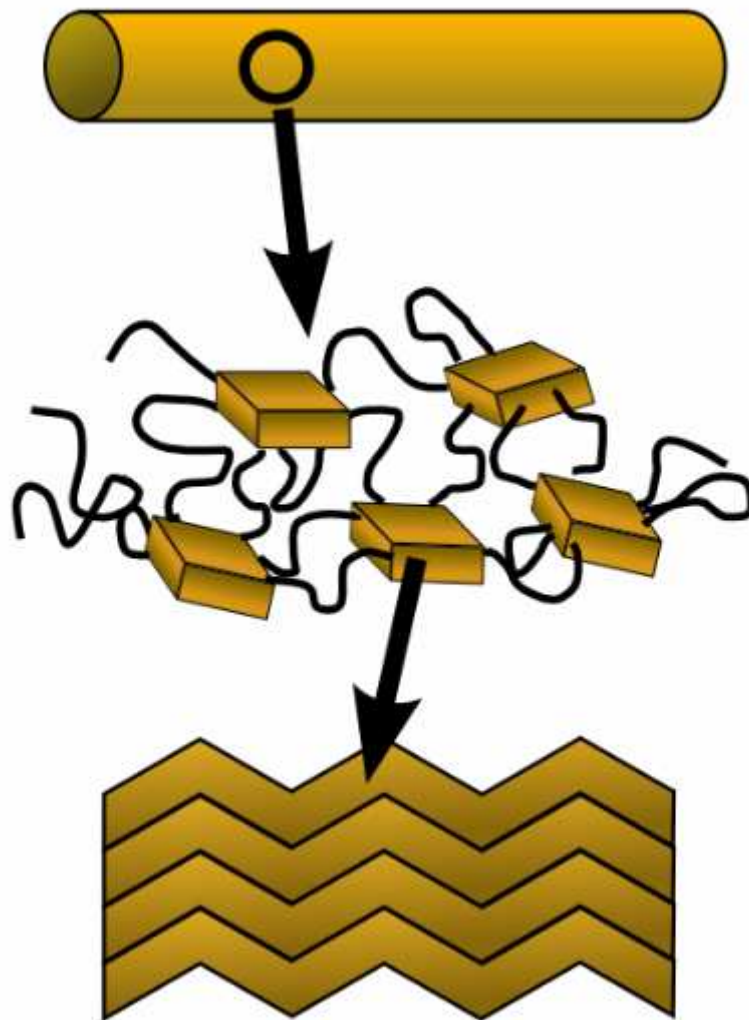


Figura 8. Desenho esquemático da microestrutura da fibra da glândula ampolada principal. Dentro da fibra regiões cristalizadas, formadas por folhas- β , são separadas por ligações amorfas, criando um material nanoestruturado.

1.3.2 Ampolada secundária

Responsável pela produção dos raios e da espiral auxiliar da teia em orbital. As curvas de tensão da seda da ampolada secundária (**Tabela 1**) indicam que ela possui cerca de $\frac{1}{4}$ da resistência da linha de segurança e a mesma elasticidade do polímero Kevlar® (Hayashi, Shipley *et al.*, 1999). Sua seda apresenta similaridades às sedas da ampolada principal, sendo utilizada como reforço mecânico na construção da teia. Segundo Hayashi *et al.* possui força tensora semelhante à da linha de segurança, mas com menor elasticidade.

A análise das sequências dessa seda revelou - assim como na ampolada principal - constituir-se da combinação de duas proteínas, MiSp1 e MiSp 2 ("minor ampollate silk protein 1 e 2") (Colgin e Lewis, 1998). Ambas mostram-se organizadas, com a presença das unidades repetitivas GA, poli-Ala e GGX. A presença de uma região espaçadora, que é uma região que separa os motivos de sequência que ainda não tem propriedades bem definidas, única e não repetitiva, que aparece conservada entre espécies produtoras de teias orbiculares, difere-a da seda produzida pela ampolada principal (Colgin e Lewis, 1998). Além disso, a ausência do motivo GPGXX, responsável pela elasticidade da seda, pode explicar o baixo desempenho nessa propriedade mecânica em relação à linha de segurança. Além de adicionar credibilidade à suposição da relação das repetições *in tandem* desse peptídeo com a elasticidade.

1.3.3 Flageliforme

Produz a seda adesiva para fixação. A seda da flageliforme é extremamente elástica, o que facilita na captura de presas sem que ocorra o rompimento do fio (Gosline, Guerette *et al.*, 1999). Testes mecânicos demonstram que sua seda tem uma elasticidade superior a 200% (**Tabela 1**), um desempenho maior do que qualquer borracha natural (Hayashi, Shipley *et al.*, 1999). Analisando sua sequência, a composição de motivos apoia os resultados de estudos mecânicos que mostram que o motivo pentapeptídeo, GliProGliXX (em muitos casos GPGQQ), é a base da elasticidade (Hayashi e Lewis, 1998). Este motivo está relacionado com a estrutura folha- β (**Figura 8**) (Hayashi, Shipley *et al.*, 1999), conclusão

baseada na comparação com a estrutura de outras proteínas (Hutchinson e Thornton, 1994,). A arquitetura da sequência mostra que esse motivo forma uma unidade repetitiva da proteína flageliforme com pelo menos 43 repetições antes da interrupção por outro motivo (Hayashi e Lewis, 2000).

1.3.4 Agregata

Produz fibras adesivas, a cola pegajosa que reveste o núcleo da espiral de captura da teia. Gotículas produzidas por essa glândula demonstraram a presença de uma mistura de glicoproteínas, com pequenos neurotransmissores (Townley, Bernstein *et al.*, 1991). Há evidências de que esta cola glicoprotéica contenha sais que agem como bactericidas (Knight e Vollrath, 2001) e compostos orgânicos que atraem a água atmosférica (Vollrath, 1992).

1.3.5 Tubuliforme

Produz a seda que forma o casulo para depósito dos ovos. Sua seda só é produzida durante o período reprodutivo do ciclo de vida de uma aranha (Tian e Lewis, 2005). Sua função biológica sugere que essa fibra tem que ser suficientemente forte para proteger os ovos, ainda frágeis, de modo a fazer com que seja possível a prole ser chocada (Blackledge e Hayashi, 2006).

1.3.6 Aciniforme

Produz as sedas utilizadas no encapsulamento e na imobilização das presas. Essa seda não é utilizada somente para envolver a presa, mas também para decoração da teia, construção de teias de espermatozoides e como camada primária na confecção do saco de ovos (Foelix, 1996).

1.3.7 Piriforme

Glândula produtora de discos de adesão (Hinman, Jones *et al.*, 2000), é utilizada para fixar a linha de segurança ao substrato (Hayashi, Blackledge *et al.*, 2004), sendo fundamental à teia orbicular aérea.

1.4 Características moleculares das sedas

As proteínas que formam fibras, como a seda e colágeno, tem sua sequência primária caracterizada por ser altamente repetitiva. Isto leva a uma homogeneidade na estrutura secundária (colágeno - tripla hélice, sedas - geralmente folhas- β). Estas propriedades são caracterizadas como pertencentes à proteínas de propriedades mecânicas, diferentemente das proteínas globulares, normalmente catalíticas e de reconhecimento (Altman, Diaz *et al.*, 2003). Essas propriedades estão ligadas intimamente com sua função, e estão ligadas à composição química e conformação molecular da proteína. Seguindo este raciocínio, Lombardi e Kaplan relacionaram às teias de aranha como materiais ideais para serem estudados em relação a entre composição química e conformacional e as propriedades mecanoelásticas das fibras biológicas.

Essas fibras são, portanto, importantes ferramentas no estudo de novos biomateriais, bem como na engenharia de tecidos. Isto, aliado à estabilidade e biocompatibilidade desta família de proteínas, pode ser aliado à técnicas de engenharia genética que podem levar a importantes aplicações biomédicas (Altman, Diaz *et al.*, 2003).

Observa-se a natureza repetitiva das fibras do *B. moris* e das aranhas quando se olha mais notadamente a sequência de aminoácidos. Alguns dos primeiros trabalhos direcionados à produção de peptídeos sintéticos tiveram por base a engenharia genética de peptídeos, desenhados com base na sequência da seda do bicho-da-seda, com o desejo do desenvolvimento de fibras com diferentes propriedades mecânicas (Cappello, Crissman *et al.*, 1990).

A maioria das proteínas de espidroínas descrita foi analisada a partir do ESTs ("*Expression sequence tag*",- Etiqueta de expressão de sequência), embora esta técnica seja limitada devido ao grande tamanho dos mRNAs. A **Tabela 2** a seguir mostra o número de pares de bases dos mRNAs da *Nephila clavipes*, demonstrando que as proteínas que formam suas sedas são de elevado massa molecular (Hayashi, Shipley *et al.*, 1999). Porém, estudos com cDNA e com sequências codificantes maiores mostraram que as sedas das aranhas são formadas de pequenos módulos repetitivos de

aminoácidos com diferentes sequências (dependendo da proteína), correspondendo às distintas propriedades mecânicas (Colgin e Lewis, 1998;

Tamanhos dos mRNAs das sedas de <i>N. clavipes</i> Seda	cDNA	Tamanho (kb)
Ampolada principal	MaSp1	12,0
Ampolada principal	MaSp2	11,5
Ampolada secundária	MiSp1	9,5
Ampolada secundária	MiSp2	7,5
Flageliforme	Flag	15,5

Hayashi e Lewis, 1998; Hinman e Lewis, 1992; Xu e Lewis, 1990).

Tabela 2. Fonte adaptada de Hayashi, Shipley *et al.*, 1999

Observam-se na **Figura 9** as sequências consenso dos peptídeos repetitivos ao longo de toda proteína das sedas produzidas pelas glândulas ampolada principal, ampolada secundária e flageliforme de *N. clavipes*.

Flag	(GPGGX) ₄₃₋₆₃ (GGX) ₁₂ – flag spacer
MaSp2	(GPGGYGPGQQ) ₂ GPSGPGSA ₈
MaSp1	GGAGQGGYGGLGGQGAGRGLGGQ(GA) ₂ A ₅
MiSp1	(GGAGGYGR(GA) ₄ A ₂ (GA) ₂ GGYGGQGGY(GA ₄)A ₄ (GA ₂)) ₁₀ – minor spacer
MiSp2	(GGYGR(GA) ₂ GA(A) ₂ (GA) ₂ GSAGGYGGQGGY(GA) ₃ A ₃ GAGSA) ₁₀ – minor spacer

Figura 9. Repetições consenso das seqüências das proteínas da teia. MaSp1 e MaSp2 são as proteínas produzidas pela ampolada principal. MiSp 1 e MiSp 2 são as proteínas produzidas pela ampolada

secundária. Flag é a proteína que compõe a seda flageliforme. (Hinman *Et al.*, 2000)

O reexame da estrutura cristalina da seda de *B. moris* por meio da difração de raio-x, mostraram que a região cristalina da seda é composta por duas estruturas em folha antipolar antiparalela empilhadas em diferentes orientações. Com isso, ficou evidente que a seda do bicho-da-seda, como as de aranha apresenta estrutura organizada (Takahashi, Gehoh *et al.*, 1999)

Todas as sedas de aranha são compostas por grandes proteínas (300 – 500kDa), contendo regiões N-terminal e C-terminal não repetitivas e conservadas evolutivamente, contendo em sua parte central uma região repetitiva rica em alanina, glicina e serina. A maioria das unidades repetitivas presentes nas sedas produzidas por aranhas, de acordo com diversos estudos, apresenta propriedades estruturais específicas (Bini, Knight *et al.*, 2004; Hayashi e Lewis, 1998; Scheibel, 2004; Pouchkina, Stanchev *et al.*, 2003; Van Beek, Hess *et al.*, 2002). Esses pequenos grupos de peptídeos repetitivos podem ser agrupados em quatro categorias distintas: (1) GPGXX/GPGQQ; (2) $(GA)_n/A_n$; Mauney, Cannon *et al.*, (3) GGX e ; (4) regiões espaçadoras (“spacers”) (Van Beek, Kummerlen *et al.*, 1999; Parkhe, Seeley *et al.*, 1997; Simmons, Michal *et al.*, 1996).

O módulo $(GA)_n/A_n$ é encontrado no formato de folha- β . A repetição GGX é provavelmente uma hélice com três aminoácidos por volta (Dong, Lewis *et al.*, 1991; Van Beek, Kummerlen *et al.*, 1999; Simmons, Michal *et al.*, 1996). A unidade de repetição GPGXX (em muitos casos GPGQQ) é relacionada com espiral- β (Hayashi, Shipley *et al.*, 1999; Lewis, Hinman *et al.*, 1996) tendo como base de comparação outras estruturas protéicas (Hutchinson e Thornton, 1994).

As regiões espaçadoras são compostas por grupos carregados que separam as regiões repetitivas em algumas proteínas (Colgin e Lewis, 1998; Hayashi, Shipley *et al.*, 1999), mas ainda não se tem conhecimento de sua função estrutural.

As regiões não repetitivas são comuns em todas as fibras produzidas pela família Araneidae. A região N-terminal das diferentes espidroínas é uma parte consideravelmente mais conservada das proteínas de seda, possuindo o DNA códons adicionais de iniciação da transcrição, com isso existem possíveis inícios alternativos da tradução. Essa parte é considerada extremamente importante no transporte das espidroínas para o lúmen glândular, devido a presença de um possível peptídeo sinal (Colgin e Lewis, 1998; Hayashi, Shipley *et al.*, 1999). As sequências C-terminais também tem alta conservação interespecífica, pois são facilmente identificáveis em várias espécies diferentes (Bini, Knight *et al.*, 2004; Hayashi, Blackledge *et al.*, 2004; Pouchkina-Stantcheva e Mcqueen-Mason, 2004; Tian, Liu *et al.*, 2004). Estudos recentes em ADF-3 e ADF-4 revelaram uma estrutura em α -hélice formada pela região C-terminal, levantando a hipótese dessa região ter importante papel na polimerização da fibra (Exler, Hummerich *et al.*, 2007)

As fibras podem ser caracterizadas por tipos de módulos, como observado na **Figura 10**.

spider species	silk protein	elastic β-turn spiral GPGXX	crystalline β-sheets Ala-rich	amorphous 3 ₁₀ -helix GGX	spacer ~ 30 aa	function termini folded
	dragline MaSp1		✓	✓		✓
	dragline MaSp2	✓	✓			✓
<i>Nephila clavipes</i>	auxiliary spiral MiSp1		✓	✓	✓	✓
	auxiliary spiral MiSp2		✓	✓	✓	✓
	capture spiral FLAG	✓		✓	✓	✓
<i>Araneus diadematus</i>	dragline ADF-3	✓	✓	✓		✓
	dragline ADF-4	✓	✓			✓

Figura 10. Módulos estruturais encontrados nas proteínas de seda de aranha. Flag é a seda flageliforme. MaSp1, MaSp2 (em destaque), ADF-3 e ADF-4 são proteínas que compõem a seda ampolada principal de *N. clavipes* e *A. diadematus* respectivamente. MiSp1, MiSp2, ADF-1 e ADF-2 compõem os tipos de seda da glândula ampolada secundária de *N. clavipes* e *A. diadematus* respectivamente. Os retângulos preenchidos representam módulos encontrados na seda, sem manter a posição real na molécula. (Hardy *et al.*, 2008).

Essa Figura tem por base a dedução da sequência protéica de *N. clavipes* (Colgin e Lewis, 1998; Hayashi e Lewis, 1998; Hinman, Dong *et al.*, 1992; Xu e Lewis, 1990) e *A. diadematus* (Guerette, Ginzinger *et al.*, 1996) mostrando ainda as possíveis estruturas secundárias formadas por esses motivos repetitivos. A proteína de seda MaSp2 aparece em destaque devido a sua relevância neste trabalho.

É possível notar também a correlação entre a estrutura desses módulos e as propriedades físicas que conferem. As sedas das glândulas ampolada principal e flageliforme contêm o bloco GPGXX e são as que possuem elasticidade maior que 5%, e até 10%. A MaSp possui 35% de

elasticidade, enquanto a Flag possui elasticidade maior que 200%, com o mesmo módulo repetindo aproximadamente 50 vezes (Hinman, Jones *et al.*, 2000).

Na literatura existem poucos estudos sobre modificações pós-traducionais das espidroínas. Essas modificações são notadamente importantes em várias enzimas, que são proteínas globulares, sendo que modificações pontuais são fundamentais para o desenvolvimento de sua atividade catalítica. Mas este tipo de alteração em se tratando de sedas de aranhas é pouco relatado em estudos. Em Hijirida, Do *et al.*, 1996, constatou-se que há poucas fosforilações na seda do tipo linha de segurança de *N. clavipes*, entretanto, estas podem ser fundamentais na estrutura e estabilidade da espidroína, assim como é importante na atividade de proteínas globulares.

1.5 Polimerização da seda

A seda da aranha passa por um complexo sistema de glândulas especializadas durante sua secreção. Cada glândula possui forma e morfologia distintas, mas funcionalmente são similares. Estas glândulas podem ser divididas em quatro áreas distintas: o lúmen, local de armazenamento do secretado, localizado em cavidade interior da glândula; a cauda, que contém células epiteliais que secretam as espidroínas de cada tipo, de acordo com a glândula; o duto, que orienta as proteínas da seda, e também reabsorve a água da solução de fiação através de suas paredes; e as fieiras (**Figura 1**), que funcionam como válvulas e possuem uma função de controle da produção final da fibra (**Figura 11**).

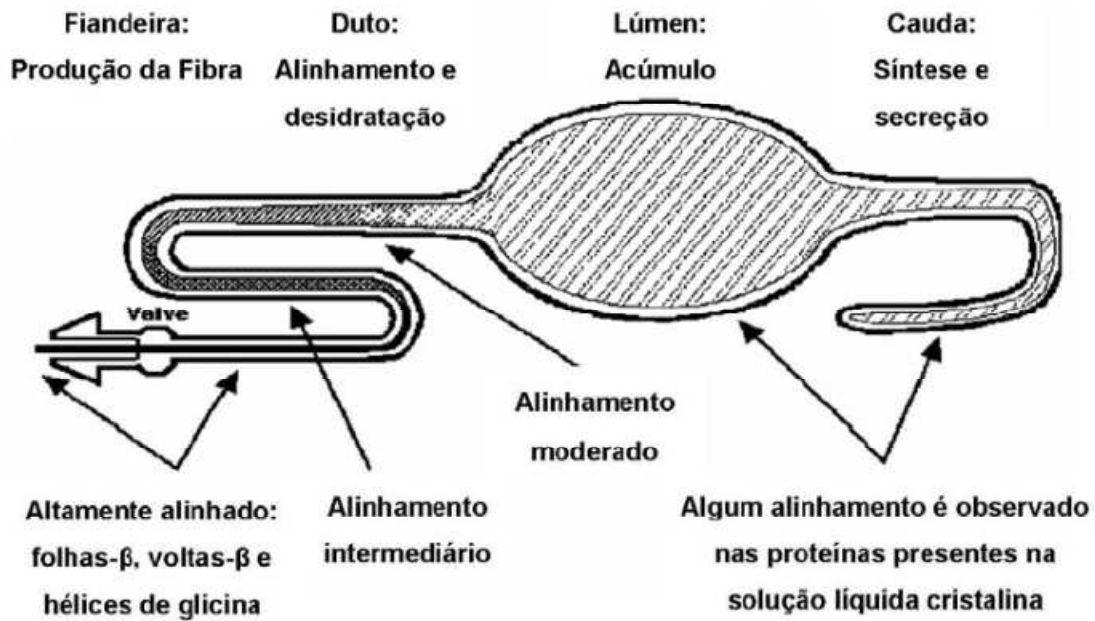


Figura 11. Ilustração mostrando o caminho da proteína desde sua síntese até sua desidratação e alinhamento.

Os processamentos bioquímicos e reológicos, que é o estudo do transporte e da quantidade de movimento de um fluido, e as propriedades da fibra estruturada de seda de aranha são áreas de intensa pesquisa. Apesar das diferenças estruturais entre a espidroína e a fibroína, essas proteínas mostram um padrão semelhante de processamento, bem como o produto final necessita que haja um padrão essencial na orientação dada às fibras em seu processo de fiação. A fiação consiste na síntese de proteínas hidrossolúveis, bem como estocagem e auto-organização em um processo reôquímico que gera um produto insolúvel em água, nanoestruturado e alinhado, contendo grande quantidade de folhas-beta. Os estágios intermediários dessa auto-organização são responsáveis pela organização final, estrutural e alinhamento. Um processo reôquímico inclui uma desidratação, uma acidificação e uma mudança nos gradientes de cátions metálicos. Esses dois últimos efeitos são acreditados de aumentarem a resposta ao cisalhamento e ao escoamento extensional da fibra que esta sendo gerada (**Figura 12**) (Rey e Herrera-Valencia, 2012).

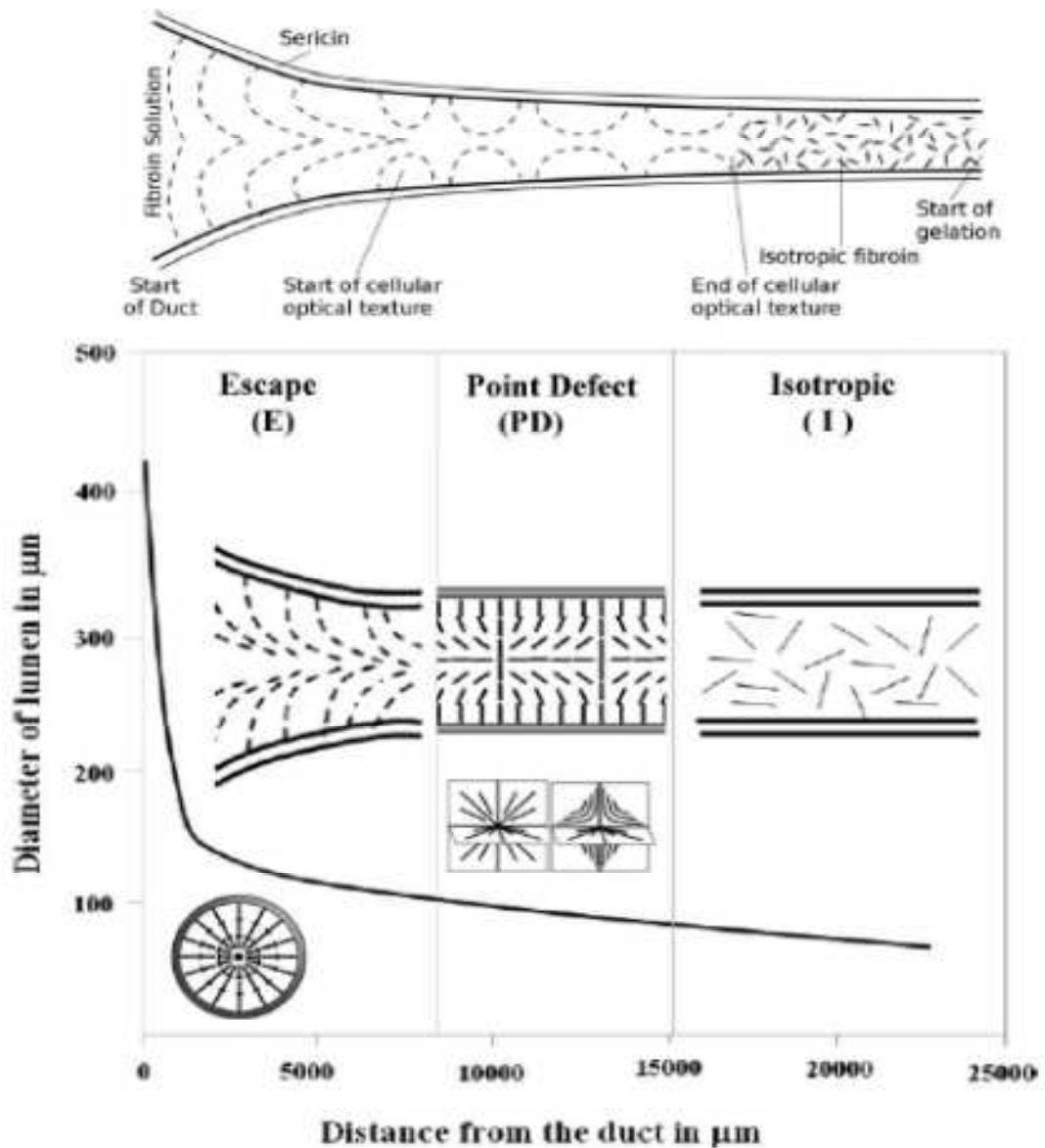


Figura 12. Figura mostrando o escoamento direcional da solução de espidroínas até o início da formação de fibra (adaptado de Rey e Herrera-Valencia, 2012)

Para a polimerização das proteínas solúveis em fibras insolúveis é necessário então um processo que se inicia com o aumento na concentração da proteína no lúmen da glândula, formando a chamada solução de fiação. Um bom exemplo é o que acontece na glândula ampolada principal, aonde as proteínas podem ser encontradas em concentração massa/volume superior a 50%. O aumento da concentração da proteína força uma

modificação estrutural nas mesmas, que passam de uma forma não estruturada para α -hélice, por causa da remoção da camada de solvatação, forçando as relações intermoleculares, com um aumento de estabilidade considerável (Dicko, Knight *et al.*, 2004). Desta forma a aranha consegue manter uma concentração relativamente elevada de proteína em solução aquosa, sem ocorrer a formação de folhas- β e, conseqüentemente, a saída de solução destas proteínas.

A polimerização das proteínas de seda ocorre durante o escoamento direcional pelo ducto glândular. Durante a passagem pelo ducto há extração de água, conjuntamente com os íons sódio e cloreto. O próprio ducto apresenta uma epiderme fina que age como uma membrana de diálise, separando água e íons para fora do lúmen e, conseqüentemente, da formação da proteína. Nesse mesmo processo há a entrada de íons de potássio, lubrificantes e agentes surfactantes (evitam o colapamento do ducto) a fim de auxiliar a formação da fibra. Íons H^+ e K^+ são secretados para dentro desse sistema (Frische, Maunsbach *et al.*, 1998) resultando em uma redução do pH de 6.9 para 6.3 (Chen, Knight *et al.*, 2002, Dicko, Vollrath *et al.*, 2004).

Essas alterações desencadeiam o processo de alinhamento das proteínas na parte mais distal do ducto, e a medida que os segmentos hidrofóbicos de poli-Alanina se alinham e ficam mais próximos um dos outros (**Figura 13**), são expostas a um microambiente cada vez mais hidrofóbico, o que segundo Huemmerich, Helsen *et al.*, 2004, potencializa a conversão estrutural destas proteínas para folhas- β , tendo como consequência a polimerização definitiva da fibra.

poly-Ala

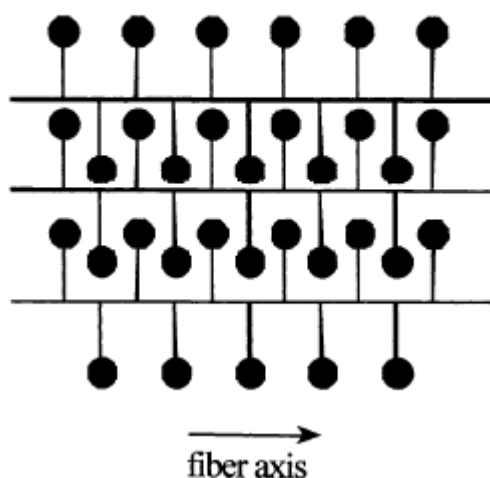


Figura 13. Motivos de poli-Alanina alinhados em folhas- β sendo mostrados de acordo com o sentido da fibra (adaptado de <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/spider>).

Interações prematuras entre as proteínas fariam com que elas precipitassem, mas com o arranjo dos domínios hidrofóbicos das espiroínas permitir-se-á que haja uma grande concentração de proteínas em uma solução cristalina e líquida pré-fiação seja processada em uma fibra.

1.6 Polimerização da fibra em laboratório

A polimerização da fibra em laboratório, em consequência da dificuldade de reprodução das condições descritas *in vivo*, ainda esbarra na dificuldade de separação entre as fases de alinhamento e desidratação das proteínas para a formação da fibra. Um método descrito conhecido como “*Wet Spinning*” consiste em uma técnica de polimerização de fibras em laboratório (Scheibel, 2004; Teulé, Furin *et al.*, 2007). Nesta técnica, as proteínas produzidas em um sistema heterólogo que permita seu acúmulo, são purificadas e liofilizadas e em seguida são solubilizadas em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), em uma concentração de 15-30% (m/v) dependendo do tipo de proteína. Para a extrusão da fibra é utilizada uma agulha de pequeno diâmetro, que induz o alinhamento, e com o auxílio de uma seringa especial são expostas a um banho de álcool isopropílico,

responsável pela remoção do HFIP e desidratação da proteína, com consequente formação da fibra.

Segundo a literatura, há a formação espontânea de fibras se, em filmes de fibras de aranha na superfície da solução contendo proteínas purificadas, forem puxados fibras individuais (Teulé, Furin *et al.*, 2007). O mesmo é dito em se tratando das propriedades mecânicas das fibras sintéticas seguindo diferentes protocolos de extrusão. As fibras tiveram um tratamento com água feito logo após a polimerização e melhoraram significativamente suas características mecânicas, indicando que este pode ser um tratamento adequado para fibras sintéticas (Scheibel, 2004)

Como as propriedades mecânicas das sedas nativas resultam possivelmente em um rearranjo de suas estruturas secundárias que mudam do estado de espiral randômica para folhas e voltas β (Dicko, Knight *et al.*, 2005) torna-se uma tarefa consequente analisar se fibras geradas sinteticamente adotam uma estrutura similar após sua polimerização, uma vez que as fibras sintéticas quando comparadas com as naturais não apresentam as características esperadas, com um comportamento mecânico inferior. Imagina-se que tal performance seja em consequência da inabilidade de fibras formadas por extrusão clássica de formar corretamente a partir do estado de espiral randômica as estruturas secundárias adequadas.

Uma das principais razões acreditadas como sendo responsável pelo desenvolvimento inferior das fibras sintéticas quando comparadas com as naturais esbarra na dificuldade de se produzir proteínas sintéticas com tamanhos comparáveis com das fibras nativas, que rodeiam 200 a 350kDa (Hayashi, Shipley *et al.*, 1999). Portanto, estima-se que o tamanho da proteína recombinante seja um fator determinante no controle das propriedades mecânicas das fibras sintéticas. Até então, os sistemas heterólogos mais comuns, incluído linhagens de *E.coli*, oferecem limitações na produção de proteínas de grande massa molecular, i.e maiores que 60kDa. Há relatos na literatura da produção de uma proteína de 140kDa em células de mamífero, mas com propriedades inferiores às apresentadas por qualquer outra fibra sintética (Lazaris, Arcidiacono *et al.*, 2002) Esse limite

justifica a limitação no número de módulos básicos construídos nos plasmídeos que irão dar origem a estas proteínas, limitação esta observada na maioria dos trabalhos até hoje descritos, e que está correlacionado intimamente com as restrições impostas por estes sistemas heterólogos. Dentre as dificuldades que se apresentam aos cientistas estão a redução da eficiência de produção no sistema heterólogo com o aumento do massa molecular da proteína, a terminação prematura da tradução, a instabilidade das sequências repetitivas de DNA que resultam em inserções e deleções, o que nos leva também a dificuldade de sequenciamento para verificação do fragmento, por perda de afinidade da polimerase.

Há, no entanto, na literatura, relatado por Xia, Qian *et al.*, 2010 e colaboradores, a expressão de proteínas de alto tamanho molecular por meio da modificação metabólica de *E. coli*. Neste trabalho conseguiu-se expressar proteínas de 284,9kDa, bem como há a descrição de propriedades mecânicas entre as melhores de sedas sintéticas. Uma das razões descritas é que proteínas maiores possuem mais repetições de motivos básicos, com conseqüente maior número de interações intra e intercadeia, enquanto para proteínas pequenas existe maior chance de erro de enovelamento.

Observa-se, portanto, o progresso das pesquisas na área de sedas visando sua aplicação em biomateriais. Os processos descritos, em sua complexidade, os detalhes que envolvem o enovelamento das proteínas e os obstáculos durante as tentativas de mimetizar sedas de aranha, entretanto.

1.7 **Caracterização de sedas utilizando microscopia de luz, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura**

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a investigação estrutural de sedas, visando um melhor entendimento de suas estruturas e comportamento mecânico. Vollrath, Madsen *et al.*, 2001 utilizaram microscopia de luz para verificar a ação de uréia na linha de segurança de *N. clavipes* e os resultados apresentaram uma estrutura com cerne microfibrilar.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) também é muito utilizada nesse tipo de caracterização. Ela usa um feixe de elétrons emitidos a partir de um filamento de tungstênio, acelerado através de um ânodo e focalizado através de lentes condensadoras em uma área de aproximadamente 0,2nm. O feixe de elétrons incide na amostra, mas como seu comprimento de onda é muito inferior ao do espectro de luz visível, é necessário um sistema computacional para a interpretação destes sinais, e há então a formação de uma imagem virtual com características de profundidade bastante eficientes para a análise da superfície (**Figura 14**) (Rudenberg e Rudenberg, 2010; McMullan, D, 1993). A microscopia eletrônica de varredura é utilizada conjuntamente com espalhamento de raio-x a amplos ângulos demonstraram uma estrutura também microfibrilar em *B. mori* (Miller, Putthanarat *et al.*, 1999).

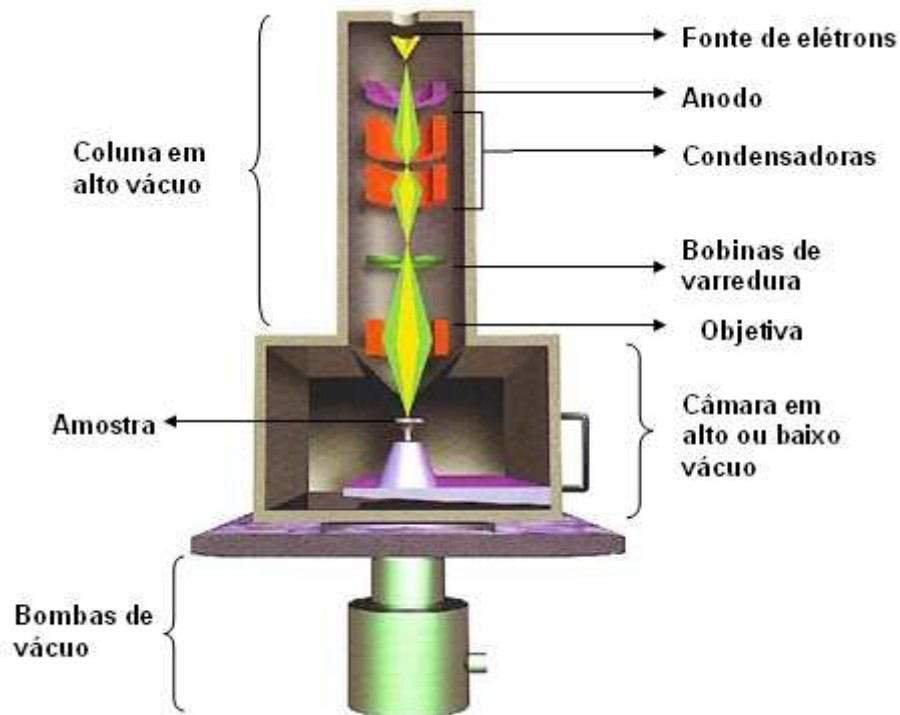


Figura 14. Ilustração da parte interna de um Microscópio Eletrônico de Varredura (Fonte: <http://fap01.if.usp.br/~lff/mev.html>)

Imagens de microscopia eletrônica de varredura das fibras em áreas de ruptura geradas após testes de tensão mostraram um cerne com estruturas também microfibrilares em fibra de segurança de aranhas e *B. mori* (Poza, Perez-Rigueiro *et al.*, 2002). Uma demonstração de segmentação em estrutura nanofibrilar da seda flageliforme da espécie de aracnídeo *Uloborus walckenaerius* foi demonstrada por Huang, Liao *et al.*, 2009. Em larva de abelha, para a estrutura de seda sintética, foi utilizada a microscopia de luz polarizada conjuntamente com MEV e espalhamento de raios-x fornecendo dados de um alto grau de alinhamento proteico (Weisman, Haritos *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos tiveram por objetivo fazer a descrição das propriedades mecânicas de fibras de aranha, utilizando-se principalmente de testes de tensão (Du, Liu *et al.*, 2006; Elices, Plaza *et al.*, 2009) e espectroscopia Raman (Sirichaisit, Brookes *et al.*, 2003). Os resultados destes trabalhos reforçam o fato de que as sedas de aranha apresentam variabilidade interespecífica, intra-específica e intra-individual bastante grandes (Madsen, Shao *et al.*, 1999).

O microscópio de força atômica (AFM) combina algumas características do microscópio de tunelamento, no qual a imagem é adquirida ao se analisar a variação da corrente de tunelamento entre a agulha e a superfície da qual se quer a imagem, ao mesmo tempo que a agulha desliza sobre a superfície, e do óptico, que usa lentes que formam uma imagem virtual através da convergência dos raios que incidem na amostra por uma ocular e então chegam diretamente aos olhos do observador. A microscopia de força atômica tem sido largamente utilizada no estudo de polímeros (Jandt *et al.*, 1998, Schneider & Herrmann, 2001 e Hodges, 2002), devido a sua capacidade de fornecer informações nas quais o uso do MEV era pouco útil. Por ter a habilidade de obter imagens de superfície de matérias sob as mais variadas condições, como ar, vácuo ou em meio líquido, se tornou um dos mais utilizados equipamentos de estudo de materiais em micro e nano escalas. Apresenta várias vantagens em relação às microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão em estudos envolvendo polímeros, tais como a dispensa de vácuo ou de recobrimento da amostra, a possibilidade de se realizar medidas diretas de altura e rugosidade de superfície, além de possibilitar o estudo de superfícies ordenadas com resolução atômica. As imagens obtidas pelos diferentes tipos de AFM são relacionadas com a natureza das forças envolvidas, como a repulsão coulômbica em modo contato, força de Van Der Waals no modo não contado e contato intermitente (Meyer, 1992), força magnética (MFM), força elétrica (MFE), força de atrito, entre outras (Jandt, 1998). A compreensão do mecanismo do AFM é imprescindível para compreender sua gama de aplicações. Seu funcionamento consiste em um cantilever, que consiste em uma haste flexível, cuja ponta tem uma ponteira. É essa ponteira que é responsável pelo escaneamento das amostras e as propriedades mecânicas do cantilever mudam de acordo com as características topográficas do objeto escaneado. Para percorrer a amostra de forma a se obter uma imagem, é acoplado um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas, capazes de realizar movimentos nas direções X, Y e Z com precisão na escala de ângstrons (Å).

Durante a varredura é utilizado um sistema de alinhamento onde um feixe de laser incide sobre o cantilever e se reflete em um sensor de quatro

quadrantes, fornecendo informações de posição para o sistema de realimentação e controle, que corrige a posição do cantilever de forma a manter contato com a amostra durante a varredura e permite a obtenção da imagem. A Figura 15 ilustra o mecanismo de um AFM.

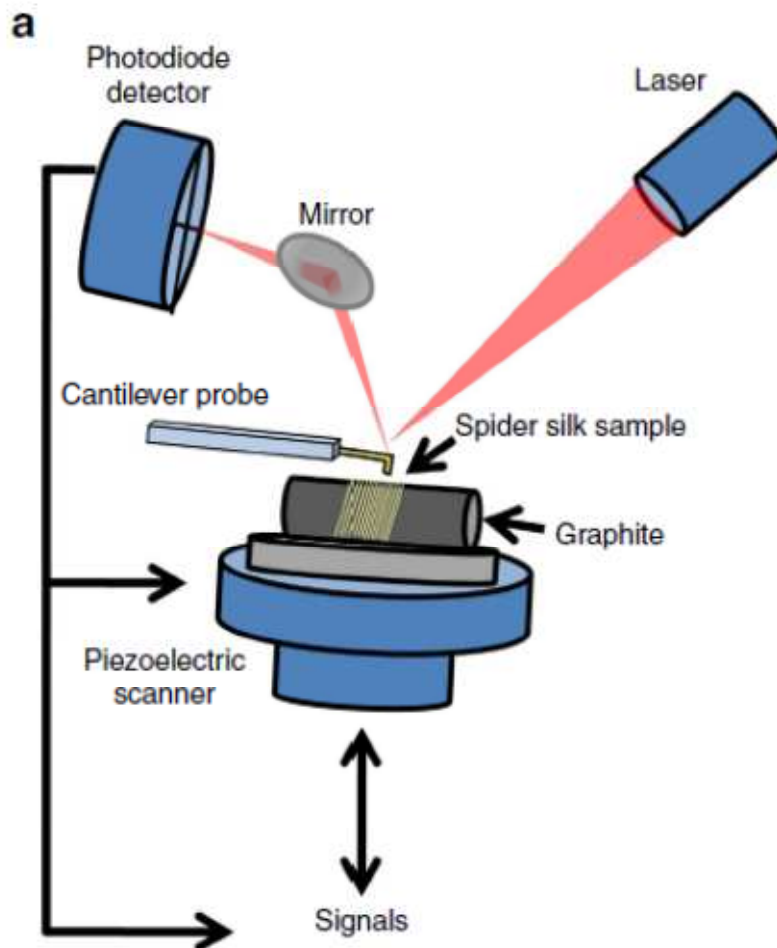


Figura 15. Esquema mostrando o funcionamento de um microscópio de força atômica (Adaptado de Silva e Rech, 2013).

1.8 Análise em Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

A análise em FTIR tem uma grande faixa de aplicações que vão desde a análise de pequenas moléculas até de sistemas inteiros como células e tecidos (Berthomieu e Hienerwadel, 2009) e é baseada na espectroscopia vibracional, sendo hoje encontrado em muitos laboratórios pelo fato de se

poder usar a amostra em estado sólido ou líquido, em soluções aquosas ou em solventes orgânicos, ou mesmo em pastilhas de sais como o KBr (Bicudo, Forato *et al.*, 2005). Como toda técnica de espectroscopia, o FTIR se baseia na interação da radiação com a matéria, que gera vibração molecular na mesma, sendo que a faixa de interesse do espectro eletromagnético de excitação ocorre entre 4000 e 400 cm^{-1} (Schimmel, 1980).

. Quando uma molécula absorve radiação na região do infravermelho, suas vibrações moleculares devem resultar numa alteração do momento dipolar, gerando deformações axiais, ou estiramentos e deformações angulares sendo os estiramentos alterações da distância internuclear dos átomos envolvidos, ou seja, aumento e diminuição dessa distância alternadamente. Já as deformações angulares podem consistir de uma mudança no ângulo de ligação com um grupo de átomos ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao restante da molécula.

Um espectro de infravermelho de uma proteína é apresentado na **Figura 16**.

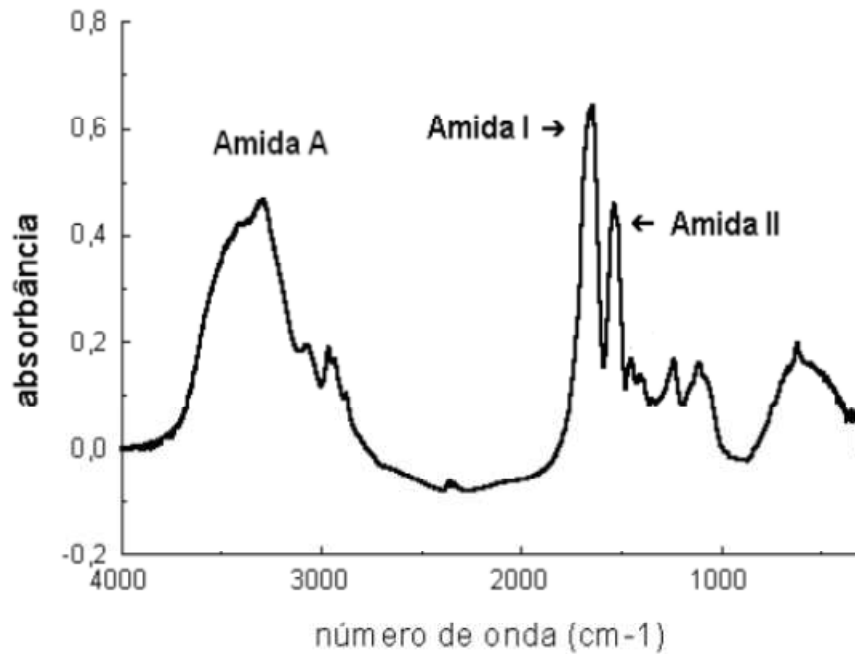


Figura 16. Espectro esperado de uma proteína (Fonte: <http://www.shimadzu.com/an/industry/pharmaceuticallifescience/proteome0205005.htm>)

As bandas assinaladas (banda de amida A, I e II) são típicas de proteínas e são fonte de informação sobre o conteúdo conformacional da proteína em alfas-hélice ou folhas-beta. As bandas típicas de uma proteína são baseadas na molécula modelo N-metil-acetamida (**Figura 4**), onde a banda de amida em 3300 cm^{-1} corresponde ao estiramento dos grupos N-H; a banda de amida I compreende 80% do estiramento do grupo carbonila, 10% de deformação angular -CNH e 10% de estiramento -CN. Ainda há a banda de amida III não indicada na **Figura 3** em 1300 cm^{-1} que corresponde a uma sobreposição de vários modos vibracionais. (Schimmel, 1980).

1.9 Expressão em *Escherichia coli* como sistema heterólogo

A biologia moderna está profundamente endividada com o procarioto *Escherichia coli*. Este procarioto de fácil cultivo por viver em um meio de cultura relativamente simples e a uma temperatura de fácil controle, conta com operons incomparáveis para o estudo e a dissecção da expressão

genética em elementos reguladores, como o operon Lac e o AraBAD (Schleif, 2000). De fato, promotores, operadores, reguladores transcricionais e traducionais foram inicialmente identificados em *E. coli* como organismo modelo.

Após o entendimento funcional dessas características, um vasto repertório de elementos regulatórios de expressão genética de *E. coli* foi inserido na biotecnologia. Depois dessa introdução, sistemas genéticos de super expressão começaram a ser concebidos e testados, o que levou à produção industrial de proteínas muito úteis à humanidade, sendo bons exemplos a insulina (Tibaldi, 2012), e interferons (Langer e Pestka, 1984; Baron e Narula, 1990). Mais recentemente, um grande número de plasmídeos de superexpressão de proteínas em *E. coli* tem sido incorporados à indústria biotecnológica (Durani, Sullivan et al., 2012) e cepas geneticamente próprias para os mesmos plasmídeos, isoladas. Estas novas ferramentas foram concebidas para melhorar a superexpressão de proteínas de acordo com diferentes estratégias, incluindo o desenvolvimento de vetores com expressão de força reguladas (Guzman, Belin et al., 1995; Mertens, Remaut et al., 1995) adequadas à produção de proteínas tóxicas cujas atividades levam o hospedeiro a morte (Miroux e Walker, 1996), o uso de plasmídeos de alta ou baixa cópia para modular a expressão de proteínas super ou infraexpressas (Smolke e Keasling, 2002) e a fusão de caudas, como a cauda de Poli-histidina usada neste trabalho, no N ou C terminal da proteína superexpressa para facilitar sua purificação e eventualmente endereçar sua localização no periplasma Terpe, 2003, e ainda a engenharia de cepas e plasmídeos para obter níveis de superexpressão do peptídeo entre as cepas individuais de *E. coli* (Khlebnikov, Datsenko et al., 2001; Morgan-Kiss, Wadler et al., 2002). Além disso, sistemas de superexpressão foram montados com a construção de cepas de *E. coli* BL21(DE3) e BL21AI, que são cepas caracterizadas pela capacidade e expressar a RNA polimerase do vírus bacteriófago T7 (Studier e Moffatt, 1986), paralelamente à construção de plasmídeos de expressão, sendo um exemplo a série pET, que contém em sua sequência um promotor que é reconhecido especificamente pela T7 RNA polimerase, sendo que altos rendimentos de proteína foram relatados em cepas BL21(DE3) que tem em

seu metabolismo inserido vetores da série pET. Além disso, isolados de *E. coli* BL21(DE3) foram utilizados com sucesso para a produção de proteínas tóxicas (Miroux e Walker, 1996; Dumon-Seignovert, Cariot et al., 2004).

Em consequência disso, a cepa BL21(DE3) conjuntamente com os vetores pET são atualmente a escolha laboratorial padrão para a produção de proteínas heterólogas. No entanto, a biologia do procaríoto em questão limita fortemente os tipos de proteínas que podem ser expressas. Particularmente modificações pós traducionais são exclusivas de seres eucariotos e a secreção de proteínas super expressas é fraca em *E. coli* se fizermos uma comparação com procaríotos gram-positivos.

Seguindo essa linha, Xia, Qian et al., 2010 transformaram *Escherichia coli* cepa BL21(DE3) com um vetor cujo inserto era o gene GlyVXY para aumentar a quantidade de tRNA do aminoácido glicina, essencial para a montagem de genes de seda. Transformaram então a mesma bactéria com um plasmídeo compatível contendo o gene MaSp1 de *Nephila clavipes* multiplicado em 32 a 96 motivos de sequência, e verificaram a produção de uma proteína de 100,7 a 284.9kDa de massa molecular.

2. Justificativa

A produção de sedas de aranha em microorganismos não é uma tecnologia nova, porém, a dificuldade reside em pontos específicos da produção, como o tamanho da proteína a ser expressa, mas principalmente na quantidade relativamente pequena produzida pelos microorganismos.

Atualmente os estudos de clonagem e expressão de fibras de aranha envolvem apenas duas espécies de aranhas dos Estados Unidos. Esses estudos possibilitaram a elucidação inicial da estrutura, processamento *in vivo* e *in vitro* e funções dessas proteínas na estruturação da teia desses artrópodes. Estes estudos também possibilitaram análises das propriedades mecânicas dessas proteínas.

Uma das razões principais acreditadas de ser responsável pela inferioridade na produção de fibras sintéticas com características semelhantes às naturais esbarra na dificuldade de se produzir proteínas que tenham tamanhos semelhantes as naturais, que flutuam entre 200 e 350kDa, nos sistemas heteólogos testados.

Este trabalho consistiu na expressão de genes isolados das glândulas sericígenas em microorganismos previamente geneticamente modificados para o aumento do pool de Glicil-tRNA para a avaliação da quantidade total de proteína produzida por esses sistemas heterólogos. As fibras posteriormente extruídas sofreram análises estruturais.

As fibras das aranhas que são reproduzidas em sistemas heterólogos deverão permitir um grande espectro de aplicações por causa de suas qualidades excepcionais. Dentre estas aplicações são esperadas aplicações na área de medicina, no caso de suturas orgânicas, na área de desenvolvimento de materiais, sendo um bom exemplo fibras para paraquedas, bem como utilização da sua resistência e elasticidade em coletes com resistências maiores que as do Kevlar®.

3. Objetivos

O Objetivo deste trabalho é analisar a produção de proteína de seda de *Parawixia bistrigata* de massa molecular aproximada 50kDa em *Escherichia coli* modificada geneticamente aumentando-se a disponibilidade de Glicil-tRNA, bem como estudo das propriedades deste biopolímero.

4 Objetivos específicos

- Expressão e produção de proteína pela bactéria *Escherichia coli* geneticamente modificada aumentando-se a *pool* de tRNA de glicina.
- Avaliação da produção de proteína pela *Escherichia coli* geneticamente modificada aumentando-se o tRNA de glicina.
- Extração e purificação das proteínas heterólogas expressas em *Escherichia coli*.
- Extrusão da proteína para formação de fibra e caracterização da mesma utilizando:
 - Microscópio Eletrônico de Varredura,
 - Microscópio de Força atômica
 - Infravermelho por transformada de Fourier.

A sequência de DNA a ser expressa pela bactéria gera uma proteína com cerca de 51,06kDa.

5.2 **Elaboração das sequências de expressão de tRNA.**

A construção dos vetores pET19b contendo 16 cópias dos módulos de MaSp2 de *Parawixia bistriata*, denominado pET19b MaSp2 16X e de expressão do Glicil-tRNA, denominados pTetGlyXVY quando contendo uma cópia do gene, e pTetGly2 quando contendo 2 cópias *in tandem* do mesmo, cujo intuito é auxiliar na expressão de uma quantidade superior de tRNA do aminoácido Glicina, foi desenvolvida anteriormente por Michalczechen-Lacerda, 2011 em nosso laboratório. Os genes do Glicil-tRNA foram amplificados a partir da bactéria W3110 (ATTC Ltd, EUA) de acordo com Xia, Qian *et al.*, 2010. A linhagem bacteriana foi gentilmente cedida pelo professor Carlos Roberto Jorge Soares do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN – USP e o vetor inicial pACYC184 foi adquirido diretamente pela New England Biolabs (NEB).

Para expressão foram utilizadas três linhagens diferentes de *Escherichia coli* para a avaliação da produção total de seda, todas da cepa BL21(DE3). A primeira continha em seu citoplasma apenas o vetor pET19b MaSp2 16X. A segunda linhagem continha o vetor pET19b MaSp2 16X e o vetor pTetGlyVXY. E a terceira linhagem continha o vetor pET19b MaSp2 16X e o vetor pTetGly2 (Michalczechen-Lacerda, 2011). As imagens dos vetores estão posicionadas abaixo, nas **Figura 17, Figura 18 e Figura 19**.

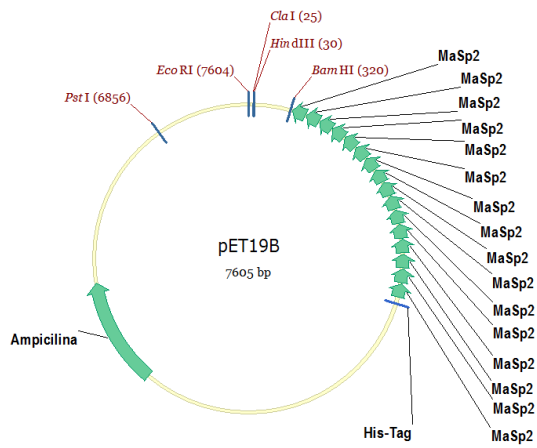


Figura 17. Vetor pET19b Masp2 16X.

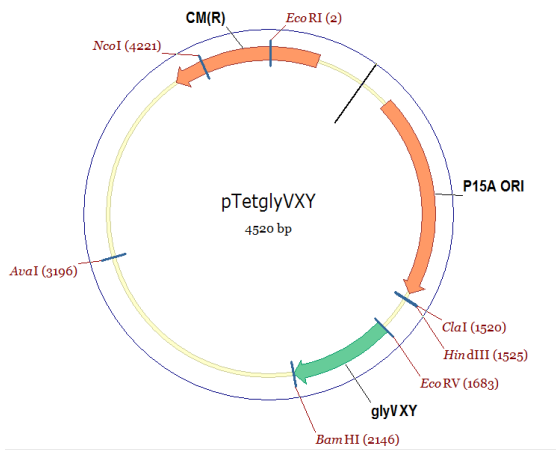


Figura 18. Vetor pTet GlyXVY

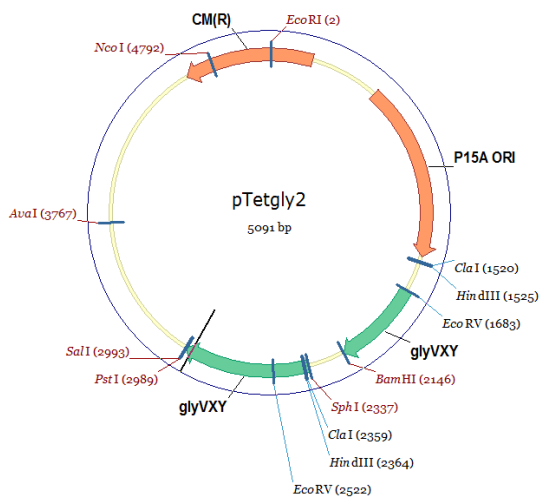


Figura 19. Vetor pTet Gly2

O vetor pET19b (plasmid for expression by T7 RNA polymerase – Novagen) que tem sua indução iniciada com a adição de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), foi escolhido para a expressão pela sua característica de ser transcrito pela enzima T7 RNA polimerase, que consegue realizar a transcrição 5 vezes mais rápido que a polimerase *wild type* de *Escherichia coli*. Além de conter em sua sequência também o RBS (sítio de ligação ao ribossomo), terminador T7, códon ATG de início de tradução, uma *his-tag* final que transcreve seis aminoácidos histidina que auxiliam na purificação, marcador seletivo ao antibiótico ampicilina (AmpR), sendo então um plasmídeo considerado de número de cópias médio. O promotor T7 também auxilia a reduzir o *background* de expressão de proteína alvo na ausência do agente indutor (**Figura 20**).

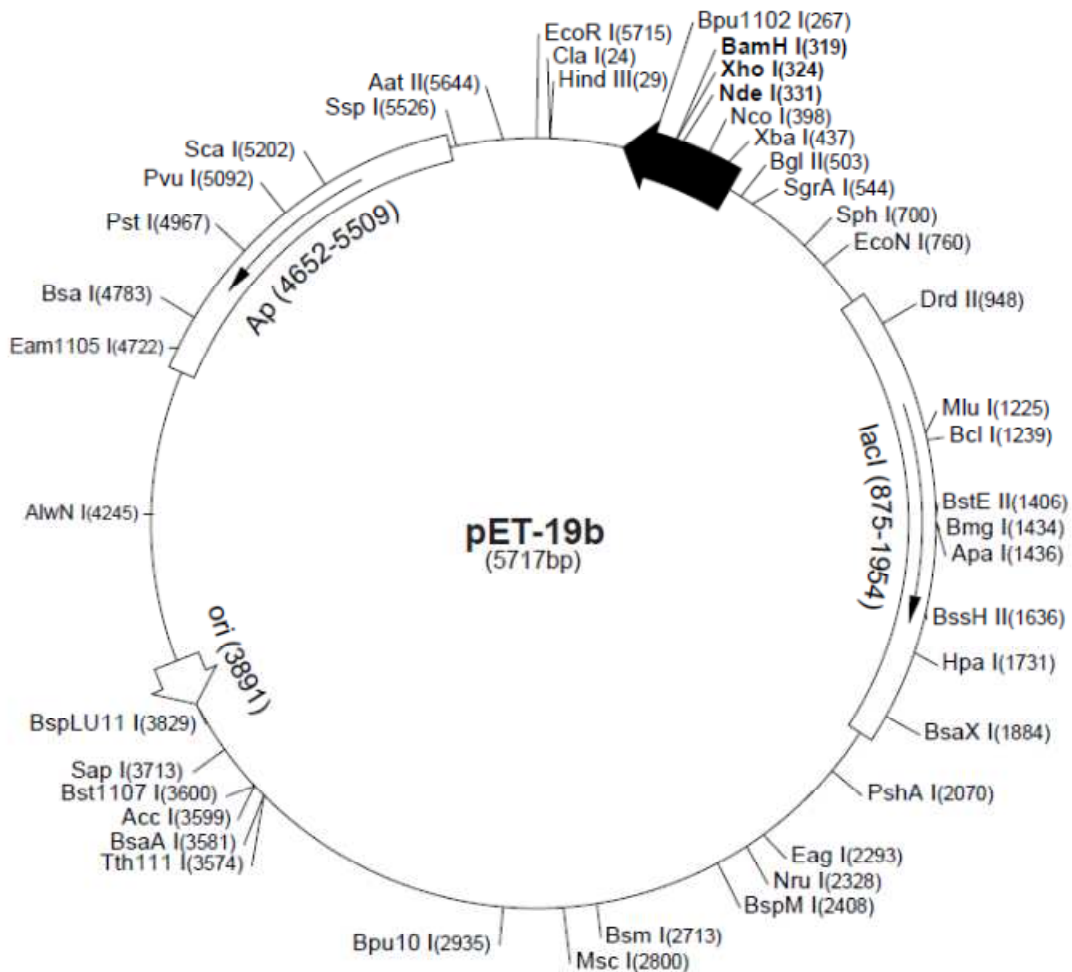


Figura 20. Mapa esquemático do plasmídeo pET19b – Novagen.

5.3 Expressão das proteínas

Para expressão foi seguido o protocolo descrito por Teule, Cooper *et al.*, 2009 e foram inoculadas 5 μ bactérias guardadas em glicerol 15% estocadas em freezer -80°C em 50 ml de meio Luria-Bertani (LB) adicionado de 200 μ g de ampicilina e deixadas para crescer 16h. Após o crescimento 5ml destas bactérias foram adicionadas a 1 litro de meio LB (Diluição 1:200) adicionado de 200 μ g de ampicilina e cultivadas a 200 rpm e 37°C até atingirem a OD600 entre 0.6 e 0.8. Então adicionou-se 1mM de IPTG para indução da expressão e deixou-se a 37°C e 200 rpm por 4 horas. Após essas 4 horas, a cultura foi retirada, centrifugada por 15 minutos a 3300rpm e as células ressuspendidas em uma proporção 1:3 (massa/ml) em tampão de lise (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl) com lisozima a 1mg/ml e congeladas a -80°C.

5.4 Purificação das proteínas

As células suspensas em tampão de lise foram descongeladas em temperatura ambiente e adicionadas de phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), um conhecido inibidor de serino proteases. Após isso foi adicionado 40mg de ácido deóxicólico por ml de bactérias ressuspendidas para dissociação das membranas e incubou-se a 37°C por 20 minutos. Essa etapa foi então seguida da adição da enzima DNase à 20 μ g de enzima para cada grama de célula gerado na indução e deixou-se a temperatura ambiente em agitação sobre plataforma por 30 minutos. Essa suspensão foi então centrifugada à 3.300g a 4°C e o sobrenadante foi repassado à outro tubo. Este sobrenadante foi tratado à 80°C por 10 minutos para desnaturação de quase todas as proteínas de *E.coli*, pois a seda é conhecida pela sua capacidade de resistência a altas temperaturas sem desnaturação.

Essa solução foi então centrifugada à 3.300g à 4°C para remoção do desnaturado e o sobrenadante foi estocado à -80°C.

A amostra foi então descongelada, e submetida à IMAC (*Immobilization Metal Affinity Chromatography*) em FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) com tampão *binding* 1X composto de 5mM imidazole, 50mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9. A amostra foi acrescida de 5mM de imidazol para evitar ligações inespecíficas à coluna. As colunas utilizadas eram de sepharose carregadas com níquel (1ml e 5ml GE HisTrap HP Ni+). A solução de *unbinding* 1X era composta de 500mM de imidazole 50 mM NaCl, 20mM Tris HCl, pH 7.9 e o FPLC foi calibrado para passar uma concentração de 10mM de imidazol por fração de 15 ml (1 tubo de ensaio) até atingir a concentração máxima de 500mM, gerando 50 frações. Essas amostras foram então submetidas à um teste de ELISA com anticorpo monoclonal anti-HisTag para se saber em quais frações a proteína de seda era liberada da coluna, chegando-se à concentração 225mM de imidazol para a qual o equipamento foi então calibrado para gerar apenas uma fração de *release* da proteína. A coluna de 5ml só foi utilizada quando se purificou uma quantidade teórica superior à quantidade que a coluna de 1ml conseguia suportar (40mg/ml) quando foi necessário acúmulo de material para extrusão. Após, a fração resultante foi dializada contra água destilada à 4°C por 48h e depois liofilizadas e pesadas para verificação de quantidade de produção por grama de pellet.

5.5 Detecção por western blot.

Após purificação em FPLC, 50µl das frações denominadas Lavagem 1, Purificado Protéico e Lavagem 2 foram guardadas e 15µl foram utilizados em imunodeteccção. Essas frações foram adicionadas de tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida e adicionadas aos poços do gel que correu por cerca de 2 horas à 200V e 15mA por gel.

O gel então foi submetido ao protocolo de transferência para membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) com tampão de

transferência em um Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e a membrana foi bloqueada em 10 ml de solução 3% de albumina sérica bovina (BSA) e agitada em plataforma durante pelo menos 1 hora. Após este tempo foi então adicionado o anticorpo monoclonal Anti-HisTag conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:5.000, em uma solução de tampão fosfato salino (PBS) com 0,05% do detergente Tween 20® e incubado por 30 minutos, quando então foi removido e lavado três vezes com PBS e submetido ao protocolo de revelação. Neste protocolo uma solução reveladora de 0,1M de Tris HCl pH 9.5, 0,1M de NaCl e 0,05 de MgCl₂ acrescidos de substratos cromogênicos para fosfatase alcalina NBT 50mg/ml e BCIP 25mg/ml.

5.6 Extrusão da seda

A proteína heteróloga foi então acumulada até obter-se material suficiente para fazer uma extrusão. A extrusão usou para dissolução da proteína o solvente 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) numa concentração de 15% (m/v) e a polimerização foi realizada através de extrusão clássica (feita à mão) em uma seringa Hamilton acoplada a tubos do tipo peek de HPLCn de 127µm de diâmetro interno, unidos por conectores também de HPLC em um banho de isopropanol 100%, que foi utilizado como agente coagulante. A fibra foi coletada por pinças e posta para secar em placas de petri em uma caixa contendo silica gel para sua completa desidratação.

5.7 Análise em microscopia de força atômica

As amostras foram analisadas em microscópio óptico e após análise foram cortadas com bisturi para seleção das secções mais uniformes para análise em AFM. Essas amostras foram coladas em um suporte próprio do aparelho com o auxílio de uma fita dupla face.

As análises de microscopia de força atômica foram realizadas em temperatura ambiente no equipamento SPM-9600 (Shimadzu, Japão). As imagens foram obtidas em modo dinâmico utilizando um cantilever de 125µm e frequência de ressonância 320kHz, Foi utilizada uma ponteira

silício de raio $<10\text{nm}$ com um *coating* de alumínio e as imagens foram obtidas no tamanho de 512/512 pixels. Após as aquisições o tratamento dado às imagens foi a remoção das linhas ruidosas e o nivelamento automático. A área varrida foi de $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$, sendo que foram analisadas 8 fibras distintas. A rugosidade média aritmética (R_a), a rugosidade quadrática média (R_q), a rugosidade média de 10 pontos (R_{zj10}) e a altura máxima (R_z) foram calculados utilizando cálculos de padrão de altura comuns. Descrições da altura média (R_p) e profundidade média (R_v) também foram calculadas.

A rugosidade média da área escaneada (R_a) é uma das mais comuns associações para a descrição da rugosidade de uma superfície e ela é calculada tendo por base os valores dos picos e vales escaneados no equipamento.

A rugosidade quadrática média (R_q), é a medida que acentua o efeito dos valores do perfil que se afastam da média, ou seja, pode ser observada para se ter noção da altura dos picos e vales das regiões analisadas se mostrou bem heterogênea.

A distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo na extensão da avaliação (R_z) nos permite ter noção das distâncias verticais entre as formações superficiais da amostra, e os dados das amostras analisadas foram bastante discrepantes entre si.

A altura máxima do pico do perfil (R_p), que gera dados da distância do pico mais alto da amostra, mostra a altura máxima medida, e, juntamente com R_v , que corresponde à profundidade máxima do vale do perfil descrevem as medidas mais distantes entre si e auxiliaram na avaliação da rugosidade da superfície.

R_p , altura máxima do pico do perfil que gera o dado da distância do pico máximo à linha média, auxilia na visualização da altura máxima medida na amostra, juntamente com R_v profundidade máxima do vale do perfil que descreve a distância do vale mais profundo à linha média.

E finalmente a rugosidade média de dez pontos Rzjis que é a soma das médias de dez picos e vales.

Esta série de parâmetros foi calculada para se ter a noção da variação superficial micrométrica das amostras extruídas.

5.8 **Microscopia eletrônica de varredura**

As fibras selecionadas para análise em microscopia de força atômica foram então levadas à microscopia eletrônica de varredura para análise visual de superfície. As amostras foram cobertas em um pulverizador de ouro Emitech K550 para adquirirem condutividade e sua visualização ocorreu em um DSM962 Zeiss a uma voltagem máxima de 10kV. As fibras foram analisadas em diversos aumentos, variando de 100X a 10.000X.

5.9 **Análise em Infravermelho por Transformada de Fourier**

As análises em FTIR ocorreram em um um Varian FT-IR Spectrometer modelo 640-ir. A leitura foi feita em pastilhas de KBr misturadas à seda, esta em sua forma pós extração liofilizada e purificada, conforme pode ser visto na **Figura 23**, e prensadas em prensa mecânica manual. A medição foi realizada na resolução de 4cm^{-1} .

6 Resultados

6.1 Produção da seda em *Escherichia coli*.

A expressão em *Escherichia coli* teve o intuito de comprovar a eficácia do aumento do tRNA de glicina na construção *in vivo* da proteína MaSp2 16X. Essa expressão consistiu em triplicatas do protocolo de indução de três bactérias previamente transformadas em nosso laboratório com os vetores de aumento de tRNA de glicina (duas linhagens) e MaSp2 16X (todas as três linhagens) (Michalczechen-Lacerda, 2011). Esses vetores estão denominados abaixo, com sua descrição:

Linhagem 1 – **Vazia MaSp2 16X**. Linhagem contendo apenas o plasmídeo pET19b MaSp2 16X e nenhuma cópia do plasmídeo pACYC184.

Linhagem 2 – **GlyVXY MaSp2 16X**. Linhagem contendo plasmídeo pACYC184 com uma cópia do gene de tRNA de glicina e vetor pET19b MaSp2 16X.

Linhagem 3 – **Gly2 MaSp2 16X**. Linhagem contendo plasmídeo pACYC184 com duas cópias do gene de tRNA de glicina e vetor pET19b MaSp2 16X.

Essas linhagens foram então crescidas 16 horas em 50 ml de meio LB e 5 ml desses foram transferidos para 1 litro de meio também LB e aguardou-se o crescimento ideal para a inserção do agente indutor IPTG no meio. Essas bactérias foram então cultivadas por 4 horas, e mediu-se a O.D. a cada hora de indução e um gráfico de crescimento foi montado. Estes dados estão dispostos abaixo na **Tabela 3**, e nas **Figura 21**, **Figura 22** e **Figura 23**.

Tabela 3. Tabela contendo todas as O.D. coletadas a cada hora dos frascos de cultivo.

BI21(De3) Masp 2 16xv O.D.	1° Frasco	2° Frasco	3° Frasco
1º Hora	0,08	0,12	0,11
2º Hora	0,26	0,34	0,33
2,5 Horas (IPTG)	0,63	0,62	0,64
3º Hora	1,18	1,2	1,22
4º Hora	1,26	1,29	1,3
5º Hora	1,47	1,5	1,54
6º Hora	1,64	1,64	1,67
7º Hora	1,71	1,72	1,73
BI21 (De3) Masp 2 16X GlyVXY-O.D.	1° Frasco	2° Frasco	3° Frasco
1º Hora	0,12	0,14	0,13
2º Hora	0,33	0,41	0,33
2,5 Horas (IPTG)	0,64	0,74	0,64
3º Hora	0,94	1,04	0,94
4º Hora	1,29	1,36	1,29
5º Hora	1,5	1,64	1,52
6º Hora	1,64	1,68	1,64
7º Hora	1,72	1,73	1,74
BI21 (De3) Masp 2 16X GLY2-O.D.	1° Frasco	2° Frasco	3° Frasco
1º Hora	0,09	0,08	0,14
2º Hora	0,29	0,27	0,33
3º Hora (IPTG)	0,59	0,6	0,65
4º Hora	0,97	0,96	1,21
5º Hora	1,13	1,11	1,44
6º Hora	1,29	1,27	1,56
7º Hora	1,36	1,35	1,61

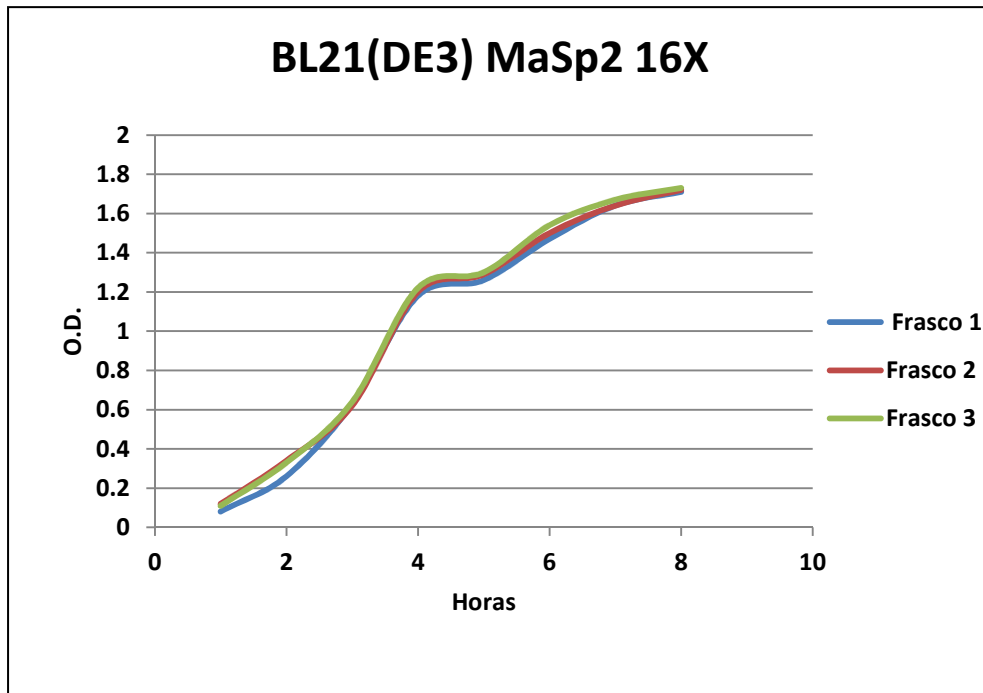


Figura 21. Curva de crescimento da BL21(DE3) Vazia MaSp2 16X

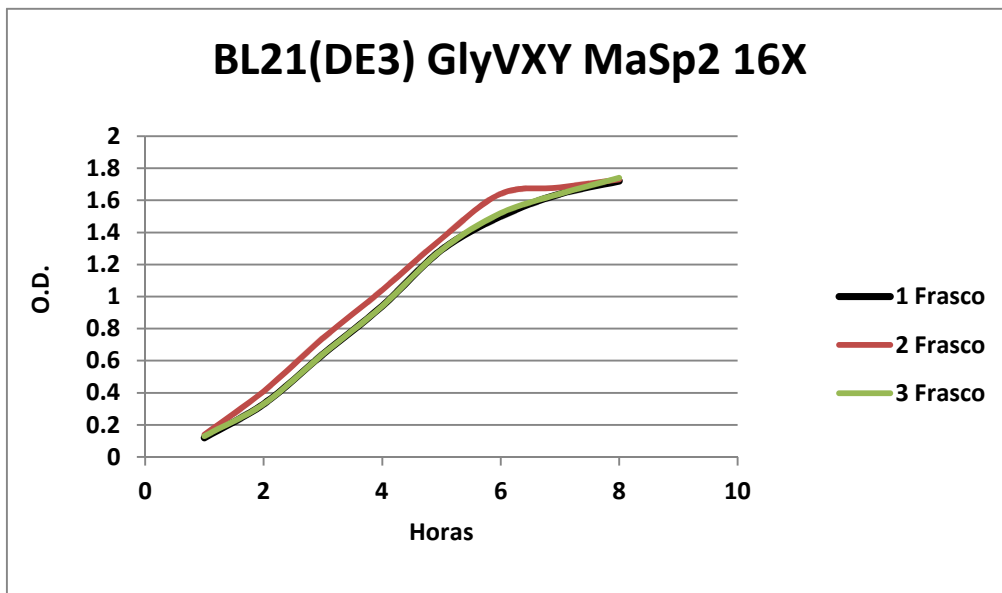


Figura 22. Curva de crescimento da BL21(DE3) GlyVXY MaSp2 16X

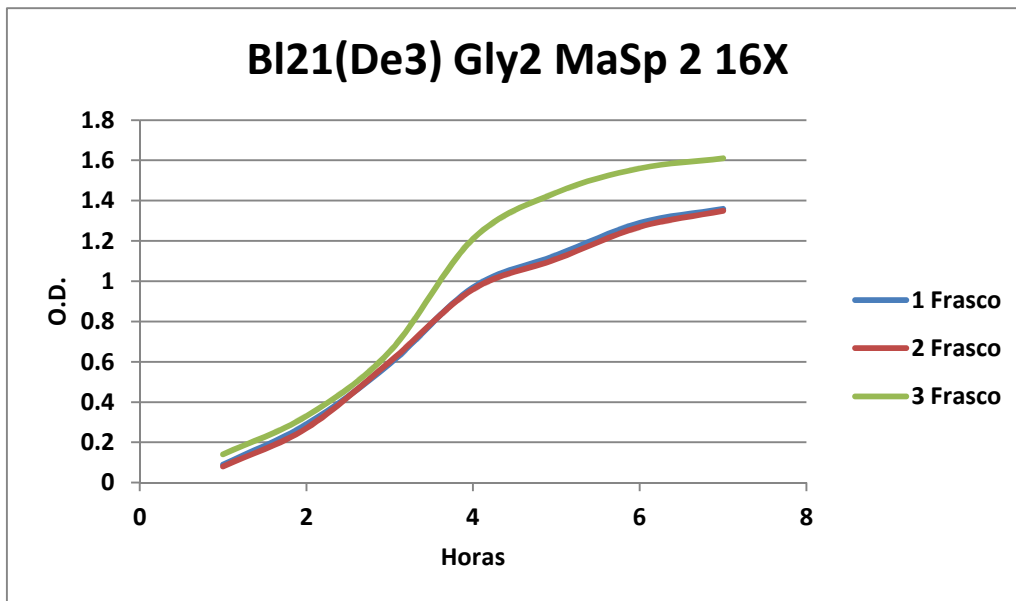


Figura 23. Curva de crescimento da BL21(DE3) Gly2 MaSp2 16X

Após o crescimento as bactérias foram centrifugadas e o peso total de bactérias foi avaliado quantitativamente com relação à produção de proteína heteróloga por grama de bactéria.



Figura 24. Fotografia da proteína após extração, purificação em FPLC e liofilização.

O resultado das pesagens, juntamente com a relação peso bacteriano/produção total estão na **Tabela 4** abaixo.

Tabela 4. Produção de proteína purificada por grama de pellet bacteriano.

BL21 (DE3) Vazia MaSp2 16X	Quantidade de pellet em gramas	Produção de proteína em miligramas	Total mg/g de pellet
1 frasco	8,02g	6,70mg	≅0,83mg/g
2 frasco	7,79g	6,08mg	≅0,79 mg/g
3 frasco	7,77g	6,28mg	≅0,80 mg/g
Total	23,58g	19,06mg	≅0,80mg/g
BL21 (DE3) GlyVXY MaSp2 16X			
1 frasco	6,89g	9,81mg	≅1,42 mg/g
2 frasco	8,59g	11,62mg	≅1,35 mg/g
3 frasco	7,92g	10,11mg	≅1,27 mg/g
Total	23,14g	31,54mg	≅1,36mg/g
BL21 (DE3) Gly2 MaSp2 16X			
1 frasco	6,62g	4,3 mg	≅0,64 mg/g
2 frasco	7,72g	4,9mg	≅0,63 mg/g
3 frasco	7,81g	5,6mg	≅0,71 mg/g
Total	22,15g	14,8mg	≅0,68mg/g

As proteínas sofreram então extrusão clássica e após extrusão, essas fibras sintéticas constituídas por proteínas recombinantes foram secas em placas de petri em caixas plásticas preenchidas parcialmente por sílica gel e em seguida foram analisadas em um microscópio de força atômica para avaliar as características topográficas e determinar sua rugosidade de superfície, que é a medida com parâmetros pré-estabelecidos em nanoescala. A momento da extrusão pode ser verificado na **Error! Reference source not found..**



Figura 25. Fotografia mostrando momento da extrusão e a seda sendo coletada por pinça.

Para enriquecimento do conhecimento sobre as amostras, foram comparadas a rugosidade entre algumas fibras selecionadas da mesma extrusão e que tiveram o mesmo tipo de tratamento de secagem. Esse parâmetro de rugosidade resultante foi bastante variável entre fibras, sugerindo que a superfície é bastante irregular. A

Tabela 5 contendo os dados está disposta abaixo.

Tabela 5. Resultados dos parâmetros de nanorugosidade Ra, Rz, Rzjis, Rq, Rp e Rv das amostras de fibra sintética de proteína recombinante de *P. bistriata*.

Amostras	Ra (nm)	Rz (nm)	Rzjis (nm)	Rq (nm)	Rp (nm)	Rv (nm)
<i>P. bistriata 1</i>	20,4	336,9	165,4	29,2	118,5	218,3
<i>P. bistriata 2</i>	23,7	204,5	100,7	29,7	94,0	110,5
<i>P. bistriata 3</i>	25,8	247,0	121,4	34,4	113,9	133,1
<i>P. bistriata 4</i>	13,1	347,8	156,4	16,6	284,6	63,1
<i>P. bistriata 5</i>	16,5	125,4	61,7	20,1	56,0	69,4
<i>P. bistriata 6</i>	809,6	3.760	1.879	925,0	1.731	2.029
<i>P. bistriata 7</i>	462,5	1.976	987,6	533,3	807,8	1.168
<i>P. bistriata 8</i>	337,6	2.153	1.072	411,0	1.203	950,3
Média	213,6	1.143,8	568,0	249,9	551,1	592,7
Desvio Padrão da Média	297,6	1339,6	671,2	340,7	630,9	723,0
Erro Padrão da Média	105,2	473,6	237,3	120,4	223,0	255,6

Pode-se observar que houveram variações bastante expressivas entre fibras submetidas ao mesmo tipo de extrusão, que está representado pela grande variação das médias e dos erros-padrão. As imagens renderizadas da superfície podem ser visualizadas na **Figura 26**.

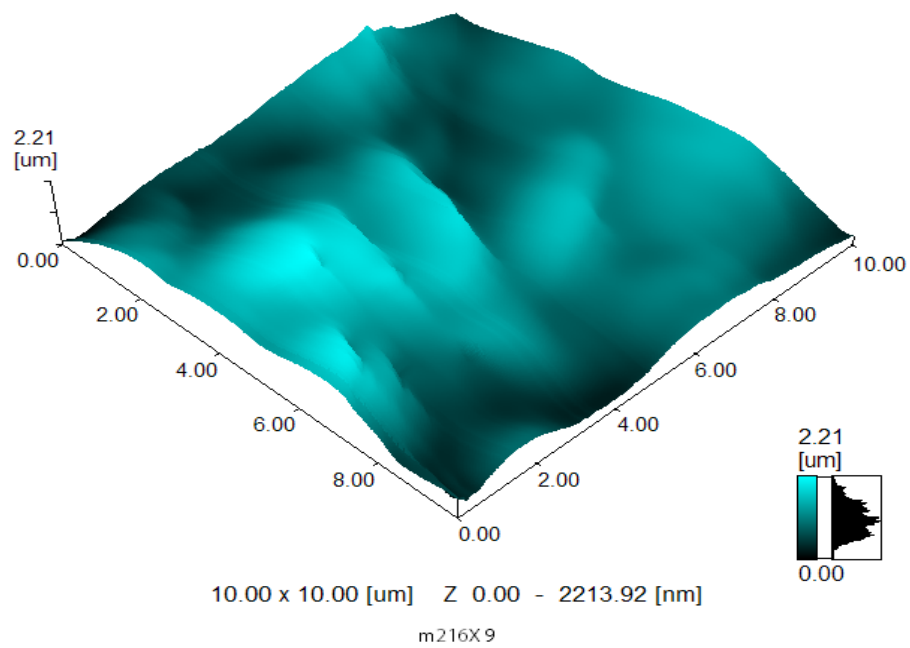
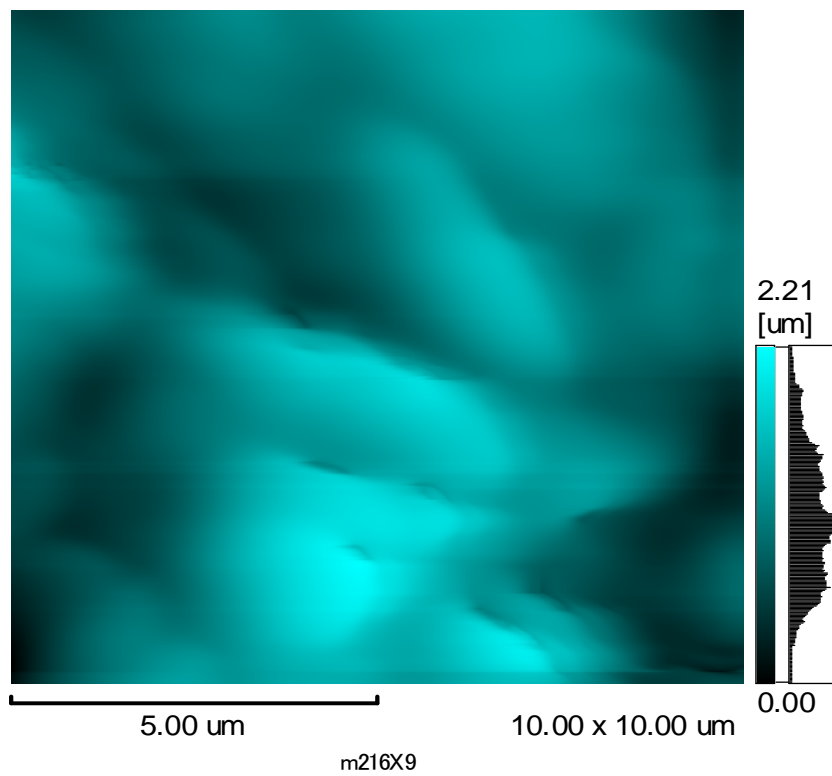


Figura 26. Renderização da superfície da fibra de *Parawixia bistrata* analisada por microscópio de força atômica.

Após análise em força atômica, as amostras foram visualizadas em microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de 500X, 1.000X, 3.000X, 5.000X e 10.000X e corroboraram com os dados do AFM pela visualização de uma superfície bastante superficialmente heterogênea (Figura 27), tais como grânulos redondos (Figura 29, Figura 30) e alongados (Figura 32, Figura 34) e vãos (Figura 28, Figura 29, Figura 30, Figura 35) Foi possível visualizar o cerne através de uma micrografia da ponta da seda, cerne este que se mostra bem polimerizado, mas com rachaduras internas provavelmente derivadas do tipo de polimerização proporcionada pelo métodos de extrusão com controle manual (Figura 31).

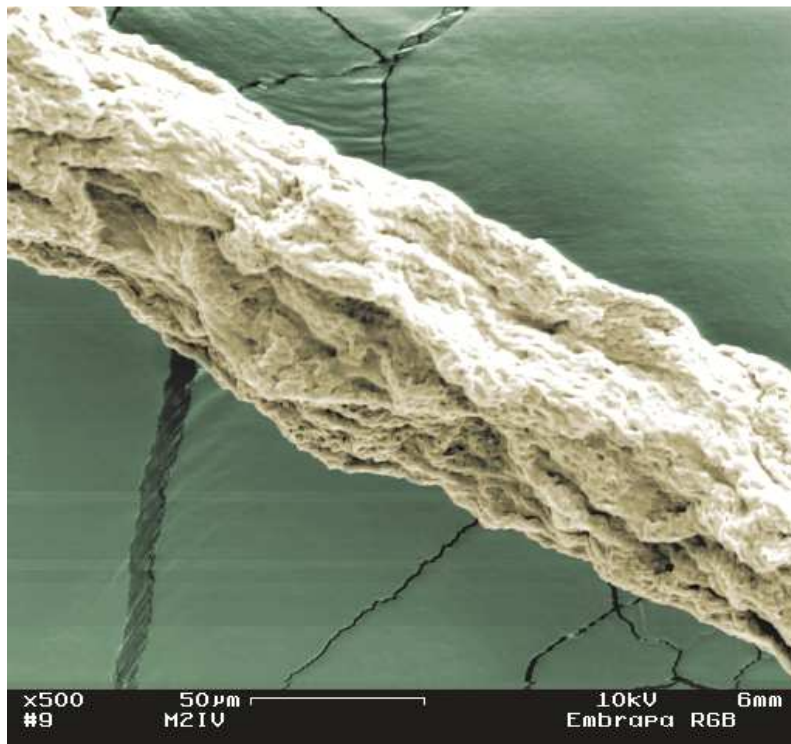


Figura 27. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 500X (colorida digitalmente).

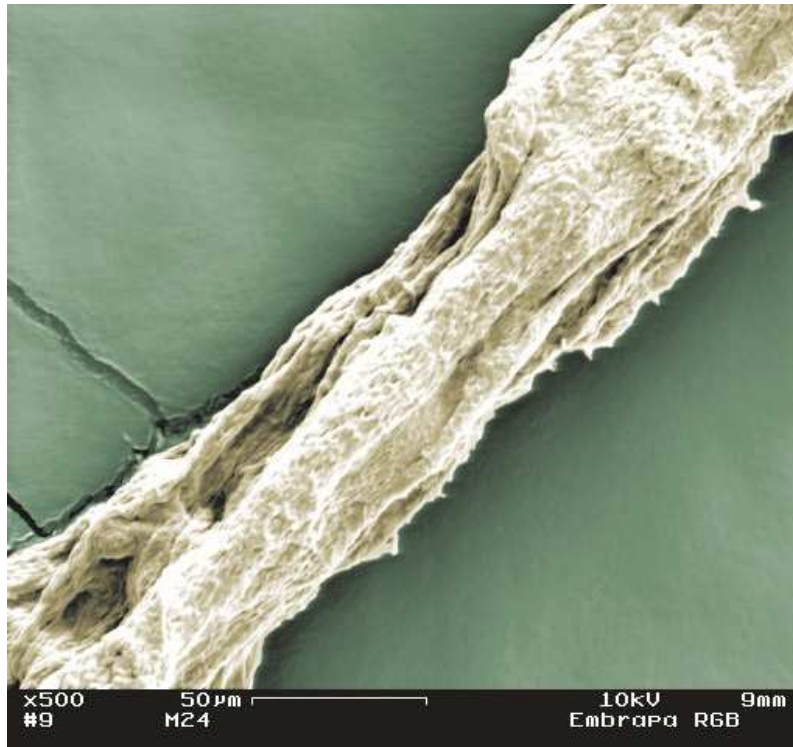


Figura 28. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 500X (colorida digitalmente).

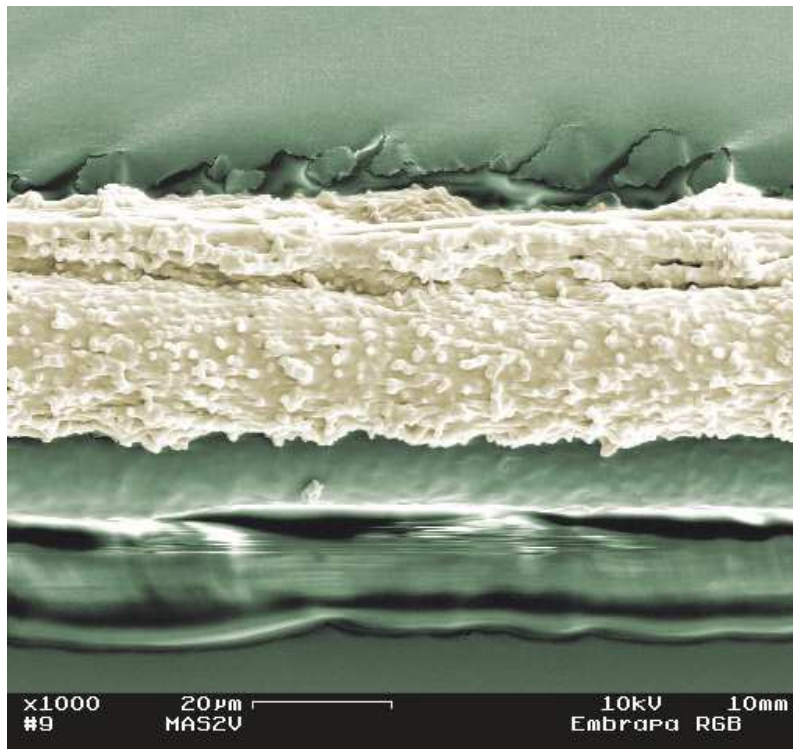


Figura 29. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 1.000X (colorida digitalmente).

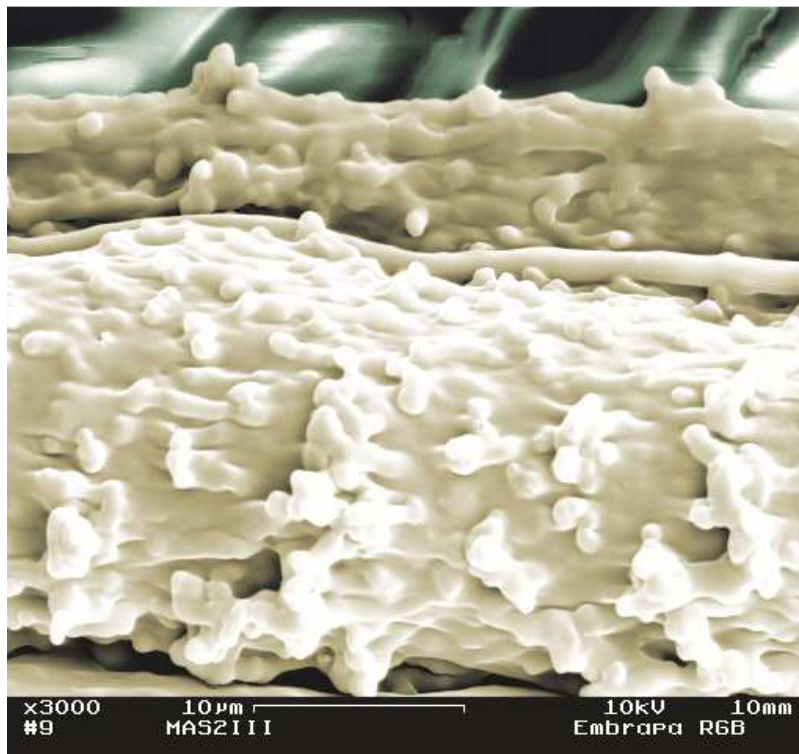


Figura 30. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 3.000X (colorida digitalmente).

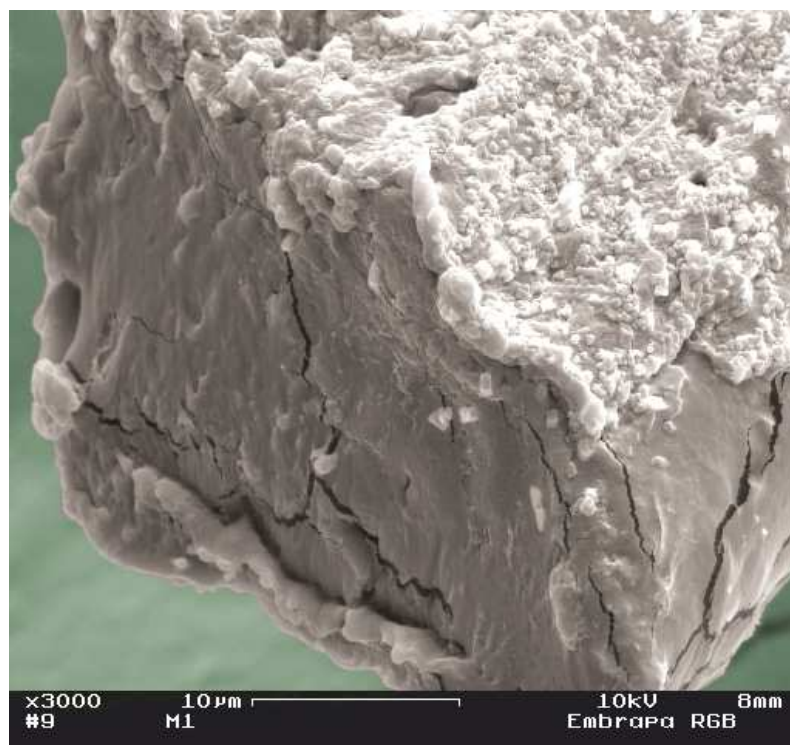


Figura 31. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 3.000X (colorida digitalmente)

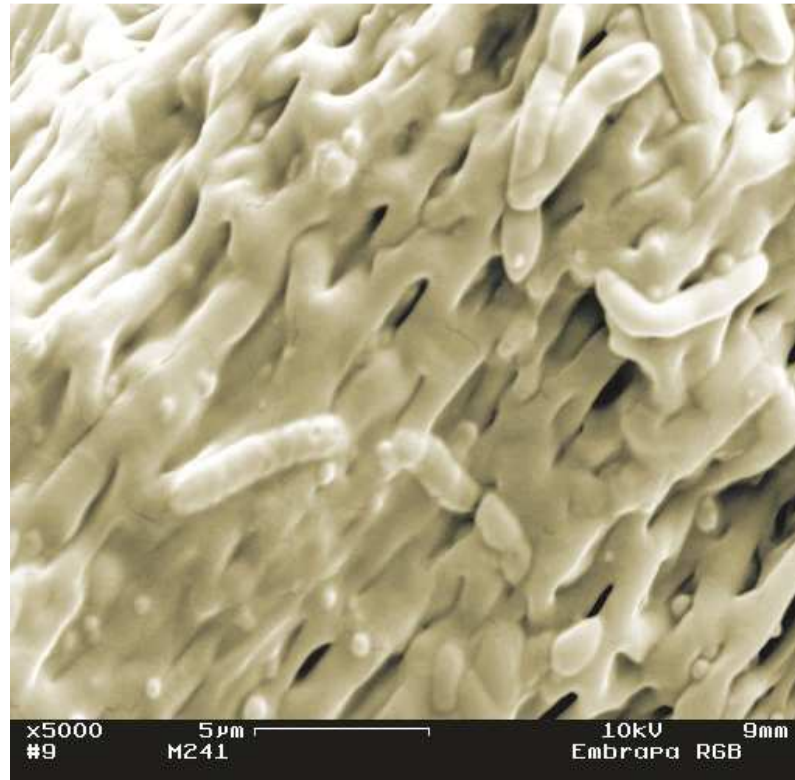


Figura 32. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 5.000X (colorida digitalmente).

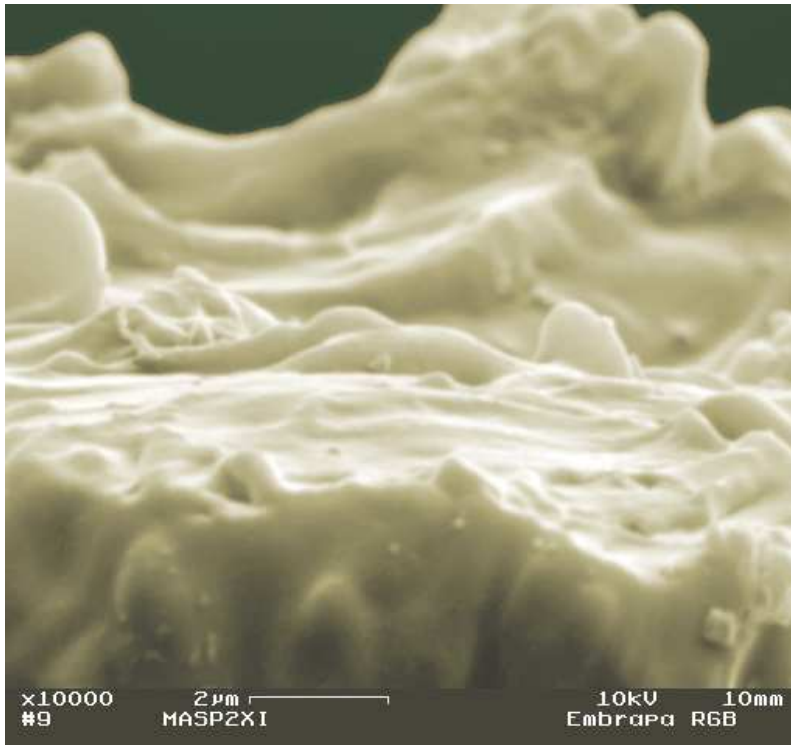


Figura 33. Micrografia eletrônica da ponta da seda extruída, mostrando seu cerne, em aumento de 1.000X (colorida digitalmente).

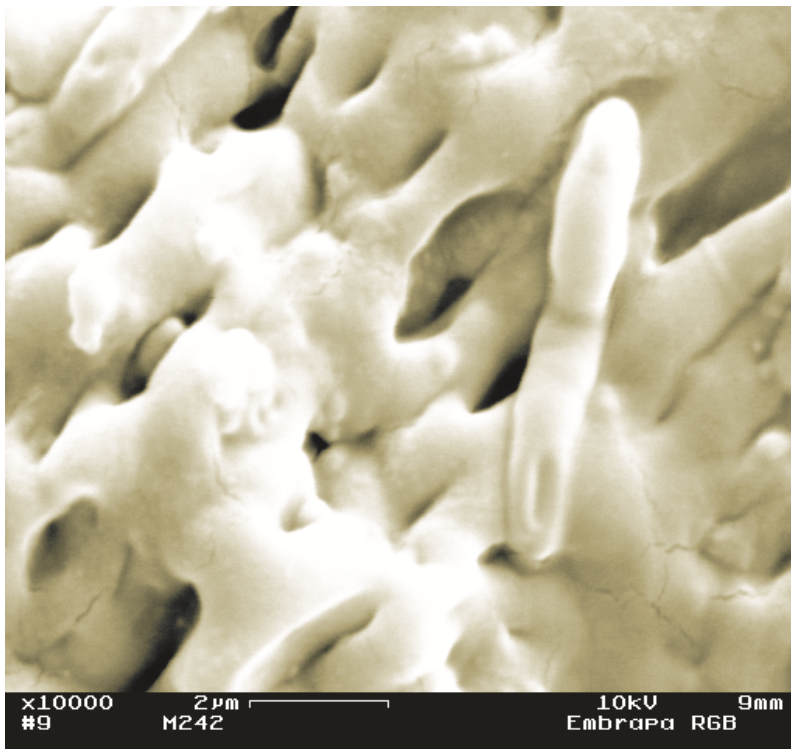


Figura 34. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 10.000X (colorida digitalmente).

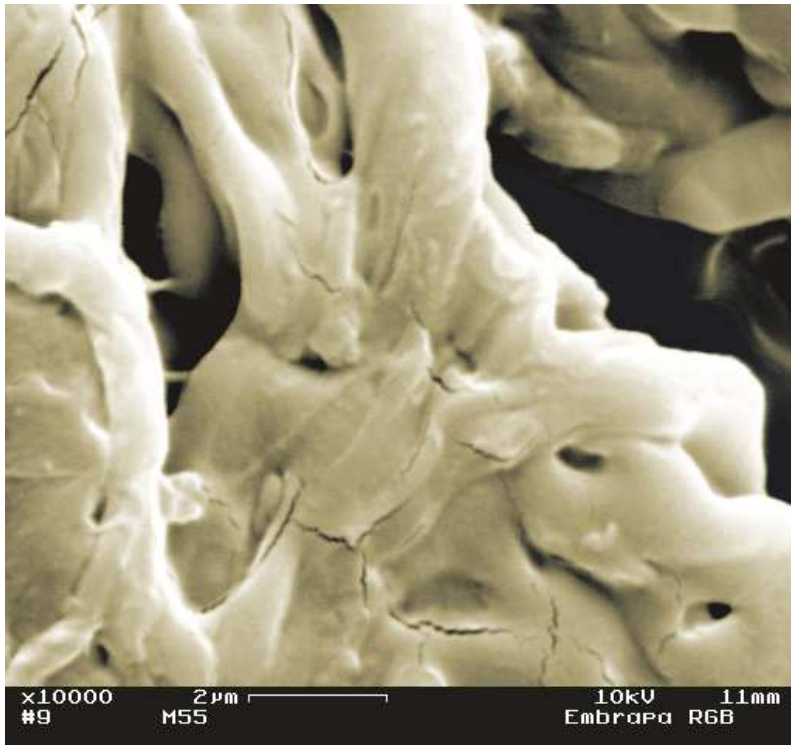


Figura 35. Micrografia eletrônica da seda extruída em aumento de 10.000X (colorida digitalmente).

As análises de FITR foram feitas em seda na sua forma pós-liofilização, pré extrusão (pó), com pastilhas de KBr na proporção de 1:10 (Peso proteína em mg/Peso KBr em mg) e geraram o gráfico absorvância/número de onda (**Figura 36**) onde é possível realizar as análises. A resolução das análises foi feita em 4cm^{-1} .

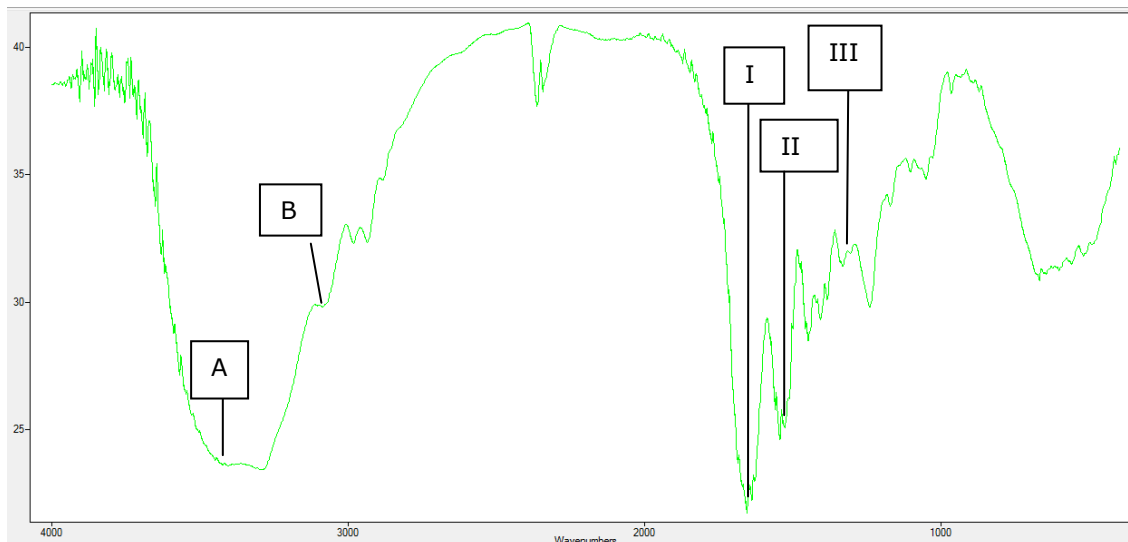


Figura 36. Espectro de infravermelho de MaSp2 16X

Fica evidente no gráfico a banda vibracional gerada pela amida A a 3.500cm^{-1} (marcado no gráfico), a 3.100 cm^{-1} a amida B, entre 1.600 e 1.700 cm^{-1} Amida I associada com alongamento vibracional de $\text{C}=\text{O}$ (75-85%) embora não esteja ligado diretamente à cadeia principal, entre 1.500 e 1.590 cm^{-1} esta a Amida II resultante do dobramento vibracional N-H (40 a 60%) e do alongamento vibracional C-N (18-40%) Esta banda é sensível à conformação. E por fim a amida III, que é uma banda complexa formada de diversas bandas, e fica entre 1.300 e 1.400 cm^{-1} tendo a ver com a natureza das cadeias laterais e ligação de hidrogênio, o que as torna pouco úteis.

Devido a natureza da proteína, que contém os aminoácidos, glutamina (1.560 cm^{-1}) e tirosina (1.518 cm^{-1}), é possível detectar seus espectros no gráfico, visto que são de fácil distinção. Outros aminoácidos não tem espectro visível em infravermelho ou não estão presentes na proteína.

Um grande número de polipeptídeos sintéticos com estruturas secundárias bem definidas já foi caracterizado em espectroscopia de infravermelho, gerando dados suficientes para que se possa ter noção da conformação de uma proteína pelo seu espectro em FTIR, sendo que as frequências de folhas-beta e alfa-hélices tem um claro discernimento dentre estas estruturas. Na amostra de seda elas podem ser verificadas no espectro pelos comprimentos de onda, sendo que as folhas-beta são encontradas entre 1.615 e 1.637 cm^{-1} . A folha-beta paralela não é comum em peptídeos sintéticos, e sua absorção é 1.640 cm^{-1} .

Os comprimentos de onda das alfa-hélices são dados pelas frequências 1.652 cm^{-1} na amida I. Todas as bandas vibracionais podem ser vistos na **Figura 38**.



Figura 37. Aproximação do gráfico de FTIR mostrando as bandas vibracionais da tirosina (seta azul), da glutamina (seta vermelha), as bandas vibracionais das folhas-beta (quadrado vermelho) e as bandas vibracionais das alfa-hélices (circulo azul).

7 Discussão

Sedas são produzidas apenas por artrópodes, e apenas nas classes Insecta, Arachnida e Myriapoda. Coletivamente estes insetos produzem muitos tipos de seda diferentes, muito embora algumas espécies produzam um único tipo. Dentre estes, as aranhas produzem uma grande variedade de sedas, mas em contraste com os insetos, uma aranha pode produzir até oito tipos diferentes de seda, mesmo que os propósitos de produção de seda sejam os mesmos entre insetos e estes indivíduos. As sedas de myriapodas permanecem descaracterizadas.

As sedas pertencem à classe de proteínas estruturais. Os dados comparativos de análises filogenéticas sugerem que o sistema de secreção das aranhas e dos insetos são homólogos e ligados à glândula crural (do latim, *cruralis* – Sob as pernas) e secreções cuticulares de um ancestral *onychophoran-like*. No início da evolução, as glândulas de seda de aranha permaneciam indiferenciadas sugerindo que o número de glândulas por indivíduo estava ligado à necessidade energética desse aracnídeo. Entretanto, o complexo sistema de produção de seda das aranhas orbiculares atuais refletem os variados tipos de uso que as aranhas fazem delas.

Essas sedas são de alto interesse à ciência dos biomateriais devido a suas características únicas de flexibilidade, extensibilidade, resistência a tensão e dissipação de energia. por isso muitos laboratórios tem investido na produção destas em diversos sistemas heterólogos, como *Bombix mori*, células de mamífero e tabaco.

Por mais de três décadas os microorganismos foram utilizados como hospedeiros na produção de proteínas recombinantes. Devido ao fato de boa parte do cultivo e desenvolvimento molecular ter sido em *Escherichia coli*, esse procaríoto foi escolhido como organismo padrão na expressão das proteínas heterólogas deste trabalho.

As proteínas de seda de aranha são muito ricas em glicina e alanina, onde a parte do peptídeo interna às partes N-terminal e C-terminal é

composta basicamente por motivos repetitivos destes aminoácidos apresentando uma estrutura definida de componentes com domínios ricos em alanina e glicina (poli-alanina e (Glicina-alanina)_n – GA) (Rising, Widhe *et al.*, 2011).

Com isto, levando as restrições da maquinaria celular da *E. coli*, que segundo Xia e colaboradores (2010) é uma relação que decresce em expressão com o aumento do tamanho da proteína a ser produzida, e visando um melhor entendimento dos processos biológicos, neste trabalho foi testada uma metodologia baseada no aumento do *pool* de tRNA, mostrando que a manipulação da maquinaria celular resulta em diferenças na produção.

As três linhagens de *E. coli* testadas na produção do gene MaSp2, gene referente à seda da glândula ampulada maior, e que havia sofrido engenharia *head to tail* até se encontrar 16 vezes *in tandem*, carregavam em seu citoplasma os vetores de aumento de tRNA de glicina, gene GlyVXY (duas linhagens) e MaSp2 16X (todas as três linhagens).

Segundo os dados da Tabela 4, a produção em triplicata, gerou uma diferença positiva entre a produção total de proteína por grama de pellet entre as linhagens Vazia MaSp2 16X e GlyVXY MaSp2 16X. Essa diferença média de 0,56mg foi considerada alta, visto que a produção por grama de pellet subiu em 70,18% em GlyVXY MaSp2 16X. Entre as linhagens Vazia MaSp2 16X e Gly2 MaSp2 16X, a diferença média foi de 0,12mg (15%), que foi considerada média, porém bastante significativa, pois a bactéria contendo o plasmídeo pTetGly2, parece estar passando por problemas metabólicos ocasionados pelo inserto duplo, uma vez que seu tempo de crescimento é maior até atingir a O.D. e seu rendimento é menor que a bactéria sem nenhum inserto.

As sedas analisadas por meio de microscopia de força atômica, de acordo com a Tabela 5 que mostra parâmetros de rugosidade de superfície, apresentaram o quão superficialmente heterogêneas são as superfícies das fibras em escala nanométrica, de acordo com os padrões estabelecidos. As variações topográficas distintas entre as fibras estão muito provavelmente

relacionadas ao processo clássico de extrusão em tubos peek de HPLC acoplados a uma seringa, que sem qualquer equipamento de controle de pressão sobre o êmbolo da seringa, resultou em uma fibra com uma superfície coagulada com diversas falhas estruturais.

Essas falhas podem ser ocasionadas também pelo tamanho reduzido de 50kDa da proteína recombinante em relação à proteína nativa, tendo menor número de resíduos de aminoácidos entre os C-terminais e N-terminais, pois se acredita que quanto maior a proteína, mais interações intra- e intercadeias são possibilitadas, gerando uma estrutura mais robusta de forma geral, em comparação a proteínas pequenas que tem mais chance de sofrerem erros de enovelamento, causando fibras com características estruturais heterogêneas e possivelmente com deficiências biofísicas em relação às nativas.

Durante a análise das fibras por meio de microscopia de força atômica, foram comuns ruídos e vibrações que tornaram difíceis, ou mesmo impediram a continuidade de escaneamento de algumas áreas, e isto levou à necessidade da utilização da microscopia eletrônica de varredura para fornecer informações adicionais sobre a superfície analisada e entender em microescala os motivos dessas falhas tão frequentes. Essa análise corroborou com a hipótese de fibras altamente heterogêneas, podendo ser observadas em sua superfície grânulos e fissuras. Destes grânulos é possível observar que há áreas com grânulos redondos e áreas com grânulos alongados. As fissuras também foram verificadas frequentemente, sendo a orientação longitudinal a mais frequente delas, sendo que estas podem se alongar por grandes extensões das fibras analisadas, como pode ser verificado na **Figura 28**.

Como sugerido anteriormente, a heterogeneidade das fibras deve ter sido causada pelo processo de extrusão clássica sem controle de pressão acoplado à seringa utilizada para pressionar a proteína dissolvida em HFIP pelo tubo *peek* de HPLC, para solucionar este problema um processo com um controle de velocidade/pressão na seringa provavelmente resultaria em uma fibra muito mais homogênea superficialmente, e provavelmente com suas propriedades físicas melhor conservadas.

As análises de FTIR mostraram os picos esperados de uma proteína, com as amidas A, B, , I e II. A visualização dos picos de glutamina e tirosina evidenciaram o correto *coding* da proteína (abaixo), já que estão previstos na sequência teórica da mesma, outros aminoácidos não foram distinguidos por não serem excitados na frequência do infravermelho.

Sequência da proteína

```
GGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPG  
SQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGY  
GPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQG  
SYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPG  
GAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSY  
PGAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAG  
QQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAA  
AAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQG  
PAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAA  
AAAASGGGYGPGGAGQQGPAAGQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAASGGGYGPGGAGQQGPA  
GQQGPGSQGSYGPAAAAAAAAA
```

A presença de algumas bandas de absorção específicas são correlacionadas com a presença de alfa-hélices, folhas-beta e estruturas aleatórias (Yang, Griffiths *et al.*, 1985; Byler e Susi, 1986). Atualmente é aceito na comunidade científica que a banda vibrônica entre 1.650 e 1.658 cm^{-1} , como a profunda banda na **Figura 36** é geralmente associado à presença de alfa-hélice em ambiente aquoso. Uma interpretação mais precisa é difícil pois há uma sobreposição de espectros de alfa-hélice e estruturas aleatórias, mas, com uma banda de alfa-hélice mais profundo na Amida I, é possível inferir que existem mais destas estruturas na proteína analisada. Um modo de tirar essa incerteza seria a substituição do hidrogênio por deutério na tradução da proteína, pois isso acarretaria uma mudança severa nas estruturas aleatórias, absorvendo agora em 1646 cm^{-1} , mas a banda da alfa-hélice permaneceria intacta. As vibrações de folhas-beta ocorrem entre 1.615 e 1637 cm^{-1} , porém a ciência do processo ainda não tem certeza se são paralelas ou antiparalelas.

Elementos estruturais secundários de proteína tem bandas de absorção largas na região da Amida I, e sua sobreposição é significativa a outros elementos. A banda entre dois picos adjacentes de igual intensidade deve

ser 20% menor que a largura dos topos dos picos para ser considerado na resolução. As larguras das bandas de proteína são inerentemente largas, entre 16 e 20 cm^{-1} e se encontram próximas umas das outras na região da amida I. Assim, assim, a obtenção de espectros de uma muito alta resolução não pode ser utilizado para resolver os espectro da Amida I em componentes individuais limitando o resolução que podemos alcançar. Desconvolução ou técnicas de derivativa secundária dos espectros podem ser usadas para melhorar matematicamente a resolução do espectro, isto é, o processo separa bandas que são intrinsecamente amplas, aumentando matematicamente a resolução do instrumento (Kauppinen, Moffatt *et al.*, 1981). Tais técnicas serão executadas pelo software PROTA FT-IR protein Analyser, da Biotools, pela própria empresa. Infelizmente, até o ato da defesa, a empresa ainda não havia conseguido terminar as análises.

8 Conclusão

Na primeira etapa do trabalho, foi possível concluir que o aumento da disponibilidade de Glicil-tRNA elevou os níveis de produção de proteína de seda na bactéria que possuía apenas uma cópia deste gene, enquanto a que possuía duas cópias apresentou problemas metabólicos ainda não elucidados.

Após extrusão, formação de fibra e posterior análise em AFM e MEV foi possível concluir que a proteína necessita de um processo de extrusão mais elaborado, com precisão na pressão de extrusão, para uma fibra mais estruturada e possivelmente com características de resistência física mais próximas as naturais.

As análises de FTIR geraram dados que mostram espectros de alguns dos aminoácidos que são encontrados na proteína, corroborando com a sequência teórica. Essa técnica também permitiu inferir que na seda pós purificação liofilizada há maior presença de alfa-hélices.

9 Referências

- 1 ALTMAN, G. H. et al. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401-16, Feb 2003.
- 2 ARAUJO, D.; CELLA, M. D.; BRESCOVIT, D. A. Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): standard staining norms, C-bands and base-specific fluorochromes. **Braz J Biol**, v. 65, n. 2, p. 193-202, May 2005.
- 3 BARON, E.; NARULA, S. From cloning to a commercial realization: human alpha interferon. **Crit Rev Biotechnol**, v. 10, n. 3, p. 179-90, 1990.
- 4 BECKWITT, R.; ARCIDIACONO, S.; STOTE, R. Evolution of repetitive proteins: spider silks from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 28, n. 3, p. 121-30, Mar 1998.
- 5 BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynth Res**, v. 101, n. 2-3, p. 157-70, Aug-Sep 2009.
- 6 BICUDO, T. C. et al. Study of the conformation of gamma-zeins in purified maize protein bodies by FTIR and NMR spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 383, n. 2, p. 291-6, Sep 2005.
- 7 BINI, E.; KNIGHT, D. P.; KAPLAN, D. L. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. **J Mol Biol**, v. 335, n. 1, p. 27-40, Jan 2 2004.
- 8 BLACKLEDGE, T. A.; HAYASHI, C. Y. Unraveling the mechanical properties of composite silk threads spun by cribellate orb-weaving spiders. **J Exp Biol**, v. 209, n. Pt 16, p. 3131-40, Aug 2006.

- ⁹ BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. **Biopolymers**, v. 25, n. 3, p. 469-487, 1986.
- ¹⁰ CAPPELLO, J. et al. Genetic engineering of structural protein polymers. **Biotechnol Prog**, v. 6, n. 3, p. 198-202, May-Jun 1990.
- ¹¹ CHEN, X.; KNIGHT, D. P.; VOLLRATH, F. Rheological characterization of nephila spidroin solution. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 4, p. 644-8, Jul-Aug 2002.
- ¹² COLGIN, M. A.; LEWIS, R. V. Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like "spacer regions". **Protein Sci**, v. 7, n. 3, p. 667-72, Mar 1998.
- ¹³ CRAIG, C. L. Evolution of arthropod silks. **Annu Rev Entomol**, v. 42, p. 231-67, 1997.
- ¹⁴ D, M. **Scanning Electron Microscopy - 1928/1965**. 51st Annual Meeting of the Microscopy Society of America. Cincinnati, OH. Retrieved 2010-01-31, 1993. p.
- ¹⁵ DENNY, M. W. Silks--their properties and functions. **Symp Soc Exp Biol**, v. 34, p. 247-72, 1980.
- ¹⁶ DICKINSON, M. H. Bionics: biological insight into mechanical design. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 25, p. 14208-9, Dec 7 1999.
- ¹⁷ DICKO, C. et al. Conformational polymorphism, stability and aggregation in spider dragline silks proteins. **Int J Biol Macromol**, v. 36, n. 4, p. 215-24, Sep 15 2005.
- ¹⁸ _____. Secondary structures and conformational changes in flagelliform, cylindrical, major, and minor ampullate silk proteins. Temperature and concentration effects. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2105-15, Nov-Dec 2004.

- ¹⁹ DICKO, C.; VOLLRATH, F.; KENNEY, J. M. Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 704-10, May-Jun 2004.
- ²⁰ DONG, Z.; LEWIS, R. V.; MIDDAUGH, C. R. Molecular mechanism of spider silk elasticity. **Arch Biochem Biophys**, v. 284, n. 1, p. 53-7, Jan 1991.
- ²¹ DU, N. et al. Design of Superior Spider Silk: From Nanostructure to Mechanical Properties. **Biophysical Journal**, v. 91, n. 12, p. 4528-4535, 12/15/ 2006.
- ²² DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). **Protein Expr Purif**, v. 37, n. 1, p. 203-6, Sep 2004.
- ²³ DURANI, V.; SULLIVAN, B. J.; MAGLIERY, T. J. Simplifying protein expression with ligation-free, traceless and tag-switching plasmids. **Protein Expr Purif**, v. 85, n. 1, p. 9-17, Sep 2012.
- ²⁴ ELICES, M. et al. Mechanical behavior of silk during the evolution of orb-web spinning spiders. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 7, p. 1904-10, Jul 13 2009.
- ²⁵ EXLER, J. H.; HUMMERICH, D.; SCHEIBEL, T. The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 46, n. 19, p. 3559-62, 2007.
- ²⁶ FOELIX, R. **Biology of spiders**. New York Editor, 1996.
- ²⁷ FRISCHE; MAUNSBACH; VOLLRATH. Elongate cavities and skin-core structure in Nephila spider silk observed by electron microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 189, n. 1, p. 64-70, 1998.

- 28 GATESY, J. et al. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. **Science**, v. 291, n. 5513, p. 2603-5, Mar 30 2001.
- 29 GILLOT. Entomology. 2005.
- 30 GOSLINE, J. et al. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 357, n. 1418, p. 121-32, Feb 28 2002.
- 31 GOSLINE, J. M. et al. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. **J Exp Biol**, v. 202, n. Pt 23, p. 3295-303, Dec 1999.
- 32 GRUBB, D. T.; JI, G. Molecular chain orientation in supercontracted and re-extended spider silk. **Int J Biol Macromol**, v. 24, n. 2-3, p. 203-10, Mar-Apr 1999.
- 33 GUERETTE, P. A. et al. Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 112-5, Apr 5 1996.
- 34 GUZMAN, L. M. et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. **J Bacteriol**, v. 177, n. 14, p. 4121-30, Jul 1995.
- 35 HAYASHI, C. Y.; BLACKLEDGE, T. A.; LEWIS, R. V. Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. **Mol Biol Evol**, v. 21, n. 10, p. 1950-9, Oct 2004.
- 36 HAYASHI, C. Y.; LEWIS, R. V. Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. **J Mol Biol**, v. 275, n. 5, p. 773-84, Feb 6 1998.

- 37 _____ . Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1477-9, Feb 25 2000.
- 38 HAYASHI, C. Y.; SHIPLEY, N. H.; LEWIS, R. V. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. **Int J Biol Macromol**, v. 24, n. 2-3, p. 271-5, Mar-Apr 1999.
- 39 HIJIRIDA, D. H. et al. ¹³C NMR of Nephila clavipes major ampullate silk gland. **Biophys J**, v. 71, n. 6, p. 3442-7, Dec 1996.
- 40 HINMAN, M. et al. Spider silk: a mystery starting to unravel. **Results Probl Cell Differ**, v. 19, p. 227-54, 1992.
- 41 HINMAN, M. B.; JONES, J. A.; LEWIS, R. V. Synthetic spider silk: a modular fiber. **Trends Biotechnol**, v. 18, n. 9, p. 374-9, Sep 2000.
- 42 HINMAN, M. B.; LEWIS, R. V. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. Nephila clavipes dragline silk is a two-protein fiber. **J Biol Chem**, v. 267, n. 27, p. 19320-4, Sep 25 1992.
- 43 HUANG, Z. et al. Segmented nanofibrils of spiral silk in Uloborus walckenaerius spider. **J Phys Chem B**, v. 113, n. 15, p. 5092-7, Apr 16 2009.
- 44 HUEMMERICH, D. et al. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. **Biochemistry**, v. 43, n. 42, p. 13604-12, Oct 26 2004.
- 45 HURST, L. D.; VOLLRATH, F. Sex-ratio adjustment in solitary and social spiders. **Trends Ecol Evol**, v. 7, n. 10, p. 326-7, Oct 1992.
- 46 HUTCHINSON, E. G.; THORNTON, J. M. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. **Protein Sci**, v. 3, n. 12, p. 2207-16, Dec 1994.

- 47 JANDT, K. D. Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials systems. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 21, n. 5-6, p. 221-295, 2// 1998.
- 48 JIN, H. J.; KAPLAN, D. L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. **Nature**, v. 424, n. 6952, p. 1057-61, Aug 28 2003.
- 49 KAUPPINEN, J. K. et al. Fourier Self-Deconvolution: A Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands. **Applied Spectroscopy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 1981/05/01 1981.
- 50 KHLEBNIKOV, A. et al. Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in Escherichia coli by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 12, p. 3241-7, Dec 2001.
- 51 KNIGHT, D. P.; VOLLRATH, F. Changes in element composition along the spinning duct in a Nephila spider. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 4, p. 179-82, Apr 2001.
- 52 LANGER, J. A.; PESTKA, S. Purification, bacterial expression, and biological activities of the human interferons. **J Invest Dermatol**, v. 83, n. 1 Suppl, p. 128s-136s, Jul 1984.
- 53 LAZARIS, A. et al. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. **Science**, v. 295, n. 5554, p. 472-6, Jan 18 2002.
- 54 LEWIS, R. V. et al. Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins. **Protein Expr Purif**, v. 7, n. 4, p. 400-6, Jun 1996.
- 55 MADSEN, B.; SHAO, Z. Z.; VOLLRATH, F. Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. **Int J Biol Macromol**, v. 24, n. 2-3, p. 301-6, Mar-Apr 1999.

- 56 MAUNEY, J. R. et al. Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation. **Biomaterials**, v. 32, n. 3, p. 808-18, Jan 2011.
- 57 MERTENS, N.; REMAUT, E.; FIERS, W. Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. **Biotechnology (N Y)**, v. 13, n. 2, p. 175-9, Feb 1995.
- 58 MEYER, E. Atomic force microscopy. **Progress in surface science**, v. 41, p. 3-49, 1992.
- 59 MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A. **CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE Escherichia coli PARA PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS DE ALTO MASSA MOLECULAR DE SEDAS DA ARANHA Parawixia bistriata**. XVI Talento Estudantil. Brasília: Embrapa 2011.
- 60 MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A. **Brazilian Spider Silk Protein Masp2 Production in E.coli System with Synthetic Biology**. Society For Biomaterials. UNIVERSITY OF BRASÍLIA, B., BRAZIL, EMBRAPA GENETICS RESOURCES AND BIOTECHNOLOGY, BRASILIA, BRAZIL, TUFTS UNIVERSITY, MEDFORD, MA. Boston, 2013.
- 61 MILLER, L. D. et al. Investigation of the nanofibrillar morphology in silk fibers by small angle X-ray scattering and atomic force microscopy. **Int J Biol Macromol**, v. 24, n. 2-3, p. 159-65, Mar-Apr 1999.
- 62 MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J Mol Biol**, v. 260, n. 3, p. 289-98, Jul 19 1996.
- 63 MORGAN-KISS, R. M.; WADLER, C.; CRONAN, J. E., JR. Long-term and homogeneous regulation of the Escherichia coli araBAD promoter by use of a lactose transporter of relaxed specificity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 11, p. 7373-7, May 28 2002.

- 64 OLIVEIRA, P. E. F. **Expressão e purificação MaSp2 isolada da glândula produtora de teia da aranha Parawixia bistriata**. 2008. 70 (Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia)). Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília-UCB
- 65 PARKER. **Synopsis and Classification of Living Organisms**. New York: McGraw-Hill, 1982.
- 66 PARKHE, A. D. et al. Structural studies of spider silk proteins in the fiber. **J Mol Recognit**, v. 10, n. 1, p. 1-6, Jan-Feb 1997.
- 67 PLATNICK, N. I. **WORLD SPIDER CATALOG**. University of Michigan, 2014.
- 68 POUCHKINA-STANTCHEVA, N. N.; MCQUEEN-MASON, S. J. Molecular studies of a novel dragline silk from a nursery web spider, *Euprosthennops* sp. (Pisauridae). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 138, n. 4, p. 371-6, Aug 2004.
- 69 POUCHKINA, N. N.; STANCHEV, B. S.; MCQUEEN-MASON, S. J. From EST sequence to spider silk spinning: identification and molecular characterisation of *Nephila senegalensis* major ampullate gland peroxidase NsPox. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 33, n. 2, p. 229-38, Feb 2003.
- 70 POZA, P. et al. Fractographic analysis of silkworm and spider silk. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 69, n. 9, p. 1035-1048, // 2002.
- 71 QIN, X. X.; COYNE, K. J.; WAITE, J. H. Tough tendons. Mussel byssus has collagen with silk-like domains. **J Biol Chem**, v. 272, n. 51, p. 32623-7, Dec 19 1997.

- 72 REY, A. D.; HERRERA-VALENCIA, E. E. Invited review liquid crystal models of biological materials and silk spinning. **Biopolymers**, v. 97, n. 6, p. 374-96, Jun 2012.
- 73 RIEKEL, C. et al. X-ray diffraction on spider silk during controlled extrusion under a synchrotron radiation X-ray beam. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 622-6, Winter 2000.
- 74 RISING, A. et al. Spider silk proteins--mechanical property and gene sequence. **Zoolog Sci**, v. 22, n. 3, p. 273-81, Mar 2005.
- 75 RISING, A. et al. Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 2, p. 169-84, Jan 2011.
- 76 RUDENBERG, H. G.; RUDENBERG, P. G. Chapter 6 - Origin and Background of the Invention of the Electron Microscope: Commentary and Expanded Notes on Memoir of Reinhold Rüdénberg. In: PETER, W. H. (Ed.). **Advances in Imaging and Electron Physics**: Elsevier, v. Volume 160, 2010.
- 77 SCHEIBEL, T. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. **Microb Cell Fact**, v. 3, n. 1, p. 14, Nov 16 2004.
- 78 SCHIMMEL, C. R. C. A. P. R. **Biophysical Chemistry**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1980.
- 79 SCHLEIF, R. Regulation of the L-arabinose operon of Escherichia coli. **Trends Genet**, v. 16, n. 12, p. 559-65, Dec 2000.
- 80 SILVA, L. P.; RECH, E. L. Unravelling the biodiversity of nanoscale signatures of spider silk fibres. **Nat Commun**, v. 4, p. 3014, Dec 18 2013.

- 81 SIMMONS, A. H.; MICHAL, C. A.; JELINSKI, L. W. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. **Science**, v. 271, n. 5245, p. 84-7, Jan 5 1996.
- 82 SIRICHAISIT, J. et al. Analysis of structure/property relationships in silkworm (*Bombyx mori*) and spider dragline (*Nephila edulis*) silks using Raman spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, p. 387-94, Mar-Apr 2003.
- 83 SMOLKE, C. D.; KEASLING, J. D. Effect of copy number and mRNA processing and stabilization on transcript and protein levels from an engineered dual-gene operon. **Biotechnol Bioeng**, v. 78, n. 4, p. 412-24, May 20 2002.
- 84 STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J Mol Biol**, v. 189, n. 1, p. 113-30, May 5 1986.
- 85 TAKAHASHI, Y.; GEHOH, M.; YUZURIHA, K. Structure refinement and diffuse streak scattering of silk (*Bombyx mori*). **Int J Biol Macromol**, v. 24, n. 2-3, p. 127-38, Mar-Apr 1999.
- 86 TAMBURRO, A. M. et al. Polypeptide models of elastin: CD and NMR studies on synthetic poly(X-Gly-Gly). **Chirality**, v. 3, n. 4, p. 318-23, 1991.
- 87 TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. Elastomeric proteins: biological roles, structures and mechanisms. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 11, p. 567-71, Nov 2000.
- 88 TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, p. 523-33, Jan 2003.
- 89 TEULE, F. et al. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. **Nat Protoc**, v. 4, n. 3, p. 341-55, 2009.

- 90 TEULÉ, F. et al. Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 21, p. 8974-8985, 2007/11/01 2007.
- 91 TIAN, M.; LEWIS, R. V. Molecular characterization and evolutionary study of spider tubuliform (eggcase) silk protein. **Biochemistry**, v. 44, n. 22, p. 8006-12, Jun 7 2005.
- 92 TIAN, M.; LIU, C.; LEWIS, R. Analysis of major ampullate silk cDNAs from two non-orb-weaving spiders. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 657-60, May-Jun 2004.
- 93 TIBALDI, J. M. Evolution of insulin development: focus on key parameters. **Adv Ther**, v. 29, n. 7, p. 590-619, Jul 2012.
- 94 TOWNLEY, M. A. et al. Comparative study of orb web hygroscopicity and adhesive spiral composition in three araneid spiders. **Journal of Experimental Zoology**, v. 259, n. 2, p. 154-165, 1991.
- 95 VAN BEEK, J. D. et al. The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 16, p. 10266-71, Aug 6 2002.
- 96 VAN BEEK, J. D. et al. Supercontracted spider dragline silk: a solid-state NMR study of the local structure. **Int J Biol Macromol**, v. 24, n. 2-3, p. 173-8, Mar-Apr 1999.
- 97 VOLLRATH, D. T. E. A. F. The contribution of atmospheric water vapour to the formation and efficiency of a spider's web. **The Royal Society**, v. 248, p. 145-148, 1992.
- 98 VOLLRATH, F. Strength and structure of spiders' silks. **J Biotechnol**, v. 74, n. 2, p. 67-83, Aug 2000.

- 99 VOLLRATH, F.; KNIGHT, D. P. Liquid crystalline spinning of spider silk. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 541-8, Mar 29 2001.
- 100 VOLLRATH, F.; MADSEN, B.; SHAO, Z. The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. **Proc Biol Sci**, v. 268, n. 1483, p. 2339-46, Nov 22 2001.
- 101 WEISMAN, S. et al. Honeybee silk: recombinant protein production, assembly and fiber spinning. **Biomaterials**, v. 31, n. 9, p. 2695-700, Mar 2010.
- 102 XIA, X. X. et al. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered Escherichia coli results in a strong fiber. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 32, p. 14059-63, Aug 10 2010.
- 103 XU, M.; LEWIS, R. V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 18, p. 7120-4, Sep 1990.
- 104 YANG, W.-J. et al. Protein Conformation by Infrared Spectroscopy: Resolution Enhancement by Fourier Self-Deconvolution. **Applied Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 282-287, 1985/03/01 1985.
- 105 ZHANG, Y. et al. The molecular structures of major ampullate silk proteins of the wasp spider, *Argiope bruennichi*: a second blueprint for synthesizing de novo silk. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 164, n. 3, p. 151-8, Mar 2013.

Anexo I.

1- Meios de cultura para bactérias:

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura utilizados foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Quando necessário foi adicionado o(s) antibiótico(s) apropriado, nas seguintes concentrações: ampicilina 200 µg/ml, e clorafenicol 25 µg/ml.

Meio LB (Luria-Bertani) Peptona de caseína

Extrato de levedura	1,0% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
pH ajustado para 7,0 com NaOH	1,0% (p/v)

Meio LB (Luria-Bertani) – Baixa concentração de sal

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaC	0,5% (p/v)
pH ajustado para 7,0 com NaOH	

2 - Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante:

Gel Separador 12%

Acrilamida 30%	2000 µl
Tampão Tris 1,5M pH 8,8 / SDS 0,4%	1250 µl
Água destilada	1700 µl
APS 10%	50 µl
Temed	3 µl

Gel Concentrador 5% Acrilamida 30%

Acrilamida 30%	420 µl
Tampão Tris 1 M pH 6,8 / SDS 0,4%	340 µl
Água destilada	1750 µl
APS 10%	15 µl
Temed	3 µl

Soluções:

Tampão Tris 1,5M pH 8,8 com SDS 0,4%:

Tris Base	72,66 g
SDS	1,6 g

Dissolver em 300 ml de água, ajustar o pH (com HCl) para 8,8 e completar o volume para 400 ml.

Tampão Tris 1,5M pH 6,8 com SDS 0,4%:

Tris Base	48,44 g
SDS	1,6 g

Dissolver em 300 ml de água, ajustar o pH (com HCl) para 6,8 e completar o volume para 400 ml.

Tampão de corrida 10X:

Tris Base	30,28 g
Glicina	187,675 g
SDS	10 g

Dissolver em 800 ml de água destilada, ajustar o pH para 8,3 com HCl e diluir para 1000 ml.

Tampão de Amostra 3X: adicionar 4 ml de H₂O

Tris Base	181,8 mg
Glicerol	3 ml
SDS	0,6 g
Azul de bromofenol	30 mg
β- Mercaptoetanol	1 ml

Ajustar o pH para 6,8 com HCl e diluir para 10 ml.

Solução estoque acrilamida/bis-acrilamida 30%

Acrilamida 30% (p/v)

Bis-acrilamida 0,8% (p/v)
Dissolver em água bidestilada e filtrar em papel Whatman.

Solução de persulfato de amônio

Persulfato de amônio 10% (p/v)

TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina)

Foi utilizado o reagente TEMED da companhia Organic Research.

Marcadores de massa molecular (MM) para proteínas:

- Broad Range Protein da Promega;
- Bench Mark Protein Ladder/ Invitrogen;
- Pre strained SDS-PAGE standards broad range da Bio Rad.

5. Soluções e materiais para imuno-detecção:

Tampão de transferência BSN (Bjerrum and Schafer-Nielsen) com SDS

Tris base	5,8 g
Glicina	2,9 g
SDS	0,037 g
Metanol	200 mL
H ₂ O qsp	1 L

pH ajustado para 8,3

PBS 10X

NaCl	137 mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	10mM
Tris base	20 mM

pH ajustado para 7,4 com HCl.

PBST

PBS com 0,1% Tween 20.

Solução de bloqueio

Solução BSA 3% (p/v)

Diluído em PBST.

Membrana de nitrocelulose

Hybond C⁺ (Amersham Biosciences)

Anticorpo:

- Anticorpo monoclonal anti-His conjugado à fosfatase alcalina da SIGMA, utilizado na concentração de 1:4000;

Soluções para revelação (seguindo as instruções do fabricante: CSPD ® substrato para fosfatase alcalina da "Applied Biosystems")

Assay Buffer:

Tris-HCl pH 9,5	20 mM
MgCl ₂	1 mM

Preparar 40 mL de solução

Working solution:

Substrate Dilution Buffer	9,4 mL
Nitro Block	0,5 mL
CSPD (substrato)	0,1mL

Substrate Dilution Buffer:

Dietanolamina	0,1 M
MgCl ₂	1 mM

Usar água deionizada