



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Estudos da Proteína Similar à Esfingomielinase-D Encontrada na Biblioteca de
cDNA da Glândula da Seda de *Nephilengys cruentata*

Ana Paula Ferreira Leite

Março/2006

Brasília

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Estudos da Proteína Similar à Esfingomielinase-D Encontrada na Biblioteca de
cDNA da Glândula da Seda de *Nephilengys cruentata*

Ana Paula Ferreira Leite

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do Grau de
Mestre em Biologia Molecular

Brasília
2006

O presente Trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Introdução e Expressão de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Dr. Elíbio Rech Filho e coorientação do Dr. Alan Andrade.

Dedico este trabalho à Deus, à minha mãe Mirian, meu esposo Ney e especialmente ao meu filho Enzo, que foi privado de minha presença por tantas e tantas vezes.

Por toda LUTA, por todo ESFORÇO e por toda DEDICAÇÃO, mesmo que não tenham sido atingidos todos os objetivos iniciais, FICA A SATISFAÇÃO DO DEVER CUMPRIDO.

No final o que vale é o conhecimento edificado dentro de nós, não importa quantos ou quais obstáculos tivemos de ultrapassar, o que vale é chegarmos lá.

Ana Paula Ferreira Leite

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por tudo o que me foi concedido, pelos desafios que me proporcionaram provar a mim mesma que sou capaz de mais do que imaginava. À minha família, meus pais, Mirian e Carlos, irmãos, Rodrigo, Simone e Priscilla, tia Cris, minhas avós Miracema e Ermelinda e meu avozinho David por existirem.

Ao meu esposo Ney pelo amor e apoio incondicionais. Ao meu filho Enzo pelos melhores momentos da minha vida, e principalmente nos dias mais difíceis, por seu sorriso, que sempre me faz a pessoa mais feliz do mundo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- CENARGEN que permitiu a utilização dos equipamentos e instalações.

Ao Dr. Elibio Rech e ao Dr. Alan Andrade pela oportunidade de trabalhar neste projeto tão interessante.

Ao Dr. Francisco Aragão pelo tempo e atenção dispensados a mim.

Ao Dr. Giovanni Vianna pela ajuda e atenção.

Ao Dr. Thales Rocha, ao Prf. Fernando Torres e Dra. Simoni Campos pela generosidade para comigo.

Aos professores e funcionários do departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Brasília, pelo apoio prestado.

Aos colegas e amigos do mestrado, Rafael, Luciano, Saulo, Alexsandro e especialmente à Larissa pela amizade e companheirismo, principalmente enquanto o Enzo ainda estava dentro da barriga.

À minha amiga de todas as horas Danielle por ser tão prestativa e preocupada comigo.

À “Evita” pela amizade e companhia nos finais de semana.

À Janaina, José Humberto e Dona Dalva pela atenção e acolhida.

À Rosângela pela amizade e sua eterna torcida a meu favor.

Ao Dr. Luciano Paulino da Silva pela ajuda e atenção.

À minha amiga Cida Pietro pelos desabafos e apoio em momentos críticos.

À dona Bel por sua fé.

À Elizângela, minha companheira de jornada tripla, pelas dicas e boas palavras.

À Mariela por seu exemplo de força e luta.

Aos amigos do Laboratório de Transferência e Expressão de genes, pela companhia, risadas e palavras de incentivo, Elsa, Angélica, Emanuel, Sharon, Daniela, Thaís, Luisa, Nicolau, Lívia, Maria Laine, Kenny, Luiz, Wel, Warley, Sérgio, especialmente Aline, e Betúlia.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Kelly, Eder e Felipe pelo apoio e ajuda, também a quem mais eu estiver esquecendo agora.

SUMÁRIO

SUMÁRIO DE TABELAS	ix
SUMÁRIO DE FIGURAS	x
SUMÁRIO DE ANEXOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sedas de Aranhas	1
1.2. Importância do estudo dos genes expressos nas glândulas de seda da aranha	4
1.3. Identificação de um gene exibindo identidade com esfingomielinase-D	7
1.4. Propriedades de uma esfingomielinase-D	8
1.5. Loxoscelismo	12
1.6. Defensinas e sua relação com esfingolipídios como alvos de drogas antifúngicas	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Linhagens celulares de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	15
3.2 Vetores de clonagem (Anexos 1 e 2)	16
3.3 Vetor de expressão (Anexo 3)	16
3.4 Iniciadores	16
3.5 A predição da estrutura primária da seqüência codificante do clone H09	17
3.6 Predição de peptídeo sinal	17
3.7 BLAST e EXPASY	17
3.8 Tabela de identidades	17
3.9 ClustalW e Árvore Filogenética	17

3.10 Plot 3D	18
3.11 Soluções para eletroforese em gel de agarose (Anexo 4)	19
3.12 Northern Blot para confirmação da transcrição do gene	19
3.13 RT-PCR do RNA total das glândulas da seda e veneno de <i>Nephilengys cruentata</i>	19
3.14 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para confirmação de transcritos	20
3.15 Subclonagem da seqüência codificante do clone H09	20
3.16 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para subclonagem do gene	20
2.17 Análise de DNA em gel de agarose	21
3.18 Eluição de fragmento de DNA seqüência codificante do clone H09	21
3.19 Ligação de fragmentos de DNA no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO	21
3.20 Meios de cultura para bactérias (Anexo 5)	22
3.21 Preparo de bactérias competentes para eletroporação	22
3.22 Transformação de bactérias competentes por eletroporação	23
3.23 Seleção das colônias por X-Gal e IPTG	23
3.24 Extração de DNA plasmidial (lise alcalina)	24
3.25 Em pequena escala	24
3.26 Seqüenciamento automático de DNA	24
3.27 Digestão com as enzimas de restrição <i>NotI</i> e <i>XhoI</i>	25
3.28 Análise de DNA em gel de agarose	26
3.29 Eluição dos fragmentos de DNA	26
3.30 Ligação de fragmentos de DNA no vetor de expressão pET21a	26
3.31 Transformação Bacteriana	26
3.32 Seleção dos clones positivos	27
3.33 Reação em cadeia de polimerase (PCR) de colônia para verificação de clones	27

positivos	
3.34 Digestão com as enzimas de restrição <i>NotI</i> e <i>XhoI</i>	27
3.35 Extração de DNA plasmidial (lise alcalina)	27
3.36 Em média escala	27
3.37 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> para expressão	28
3.38 Seleção dos clones positivos	28
3.39 Indução da expressão em <i>E. coli</i>	28
3.40 Variações cinéticas da indução da expressão em <i>E. coli</i>	29
3.41 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Anexo 6)	29
3.42 Soluções para imuno-deteção (Anexo 7)	29
3.43 Western blot	29
3.44 Análise de codons preferenciais em <i>E. coli</i>	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Predição da estrutura primária da seqüência codificante do clone H09	31
4.2 Predição de peptídeo sinal	32
4.3 Análise caracterização via programas computacionais da proteína H09	33
4.4 Resultado da análise feita no programa BLASTp	35
4.5 Tabela de Identidades entre esfingomielinases de <i>Loxosceles</i> e a proteína H09	36
4.6 Resultado do alinhamento feito pelo programa CLUSTAL W	37
4.7 Análise Filogenética	39
4.8 Predição da função da proteína H09	40
4.9 Confirmação da transcrição do mRNA do clone H09	41
4.9.1 “Northern Blot”	41
4.9.2 RT-PCR	42

4.10 Subclonagem da região codificante do gene H09	42
4.11 Digestão com as enzimas de restrição <i>NotI</i> e <i>XhoI</i>	44
4.12 Análise por PCR dos clones transformantes de pET 21a e pET21/H09	44
4.13 Detecção da proteína recombinante por reconhecimento da cauda de polihistidina.	45
4.14 Análise de codons preferenciais	45
5. DISCUSSÃO	47
5.1 Dificuldades de expressão em sistema <i>E. coli</i>	48
6. PERSPECTIVAS	50
7. BIBLIOGRAFIA	51

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídios padrão para seqüenciamento	25
Tabela 2. Tabela de Identidades entre esfingomielinases de <i>Loxosceles</i> e a H09	36
Tabela 3. Codons Preferenciais de <i>Escherichia coli B</i>	46
Tabela 4. Codons Usados na seqüência codificante do clone H09	46

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Teia da aranha	2
Figura 2. <i>Nephilengys cruentata</i>	6
Figura 3. Anatomia da aranha	8
Figura 4. Representação da estrutura cristalizada de um membro da família esfingomielinase	9
Figura 5. Esquema da composição molecular e divisão bioquímica entre fosfolipídios e esfingolipídios.	10
Figura 6. <i>Loxosceles sp</i>	12
Figura 7. Lesão causada por <i>Loxosceles sp</i>	12
Figura 8. Predição da estrutura primária da seqüência codificante do clone H09	31
Figura 9. Resultado da análise feita no programa BLAST	35
Figura 10. Resultado do alinhamento feito pelo programa CLUSTAL W	37
Figura 11. Árvore filogenética	39
Figura 12. Plot 3D de H09, seqüências de esfingomielinases-D e defesinas	40
Figura 13. Análise por “Northern Blot”	41
Figura 14. Análise por RT-PCR	42
Figura 15. Esquema da clonagem da região codificante do gene H09	43
Figura 16. Digestão com as enzimas de restrição <i>NotI</i> e <i>XhoI</i>	44
Figura 17. Análise por PCR dos clones transformantes	45

SUMÁRIO DE ANEXOS

Anexo 1 Mapa do vetor pSport1	59
Anexo 2 Mapa do vetor pCR2.1-TOPO	60
Anexo 3 Mapa do vetor pET21a	61
Anexo 4 Soluções para eletroforese em gel de agarose	62
Anexo 5 Meios de cultura para bactérias	62
Anexo 6 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	63
Anexo 7 Soluções para imuno-deteção	64
Anexo 8 Resumo publicado em congresso	65

RESUMO

A possibilidade de expressão de proteínas constituintes das sedas de aranhas em larga escala com a cinética desejada usando sistemas heterólogos, pode permitir sua aplicação em vários produtos médicos como curativos e microfilamentos de suturas para neurocirurgias. Neste contexto, foi construída uma biblioteca de cDNA da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata*, onde foram encontrados, além dos genes estruturais da seda, outros ainda não descritos. Dentre estes, a predição da estrutura primária da seqüência codificante do clone H09, denominada proteína H09, apresentou identidade com uma esfingomielinase-D, principal responsável pelo loxoscelismo, condição clínica produzida por venenos provenientes de aranhas do gênero *Loxosceles sp.* O objetivo deste trabalho foi o estudo comparativo, filogenético e da expressão da seqüência codificante referente ao clone H09. A transcrição do mRNA correspondente ao clone H09 foi confirmada por meio de Northern Blot e RT-PCR havendo hibridização e amplificação somente para transcritos da glândula da seda de *Nephilengys cruentata*. De acordo com a análise filogenética, a proteína H09 apresentou um nível de similaridade de 29 a 35% com dez esfingomielinases descritas em *Loxosceles sp.* Utilizando análise tridimensional comparativa com o mesmo grupo de esfingomielinases e algumas defensinas do banco de dados Swiss-Prot, foi feita a predição da função da proteína H09, que se posicionou entre ambos os grupos indicando uma possível função de defesa. Para obtenção de grande quantidade de proteína H09, a seqüência codificante foi clonada no vetor de expressão pET21a e utilizadas três cepas de *E. coli*, Origami, PLYSs, que é própria para expressão de gene tóxicos e PRIL que possui cópias adicionais de codons raros em *E. coli*. Estas linhagens foram transformadas na tentativa de expressar a proteína recombinante. Diversos parâmetros como tempo de indução, concentração de IPTG, temperatura de incubação, rotação e meio de cultura foram também testados na otimização do protocolo de expressão. Em nenhuma das condições avaliadas foi detectada a produção de H09 por meio de Western Blot.

Palavras chaves: *Nephilengys cruentata*, esfingomielinase, biblioteca de cDNA.

ABSTRACT

The possibility to produce spider silk proteins in large scale and desirable function utilizing heterologous expression systems, will allow its application in different areas of medicine such as microfilaments for neurosurgeries. On these perspectives, a cDNA library from silk glands of *Nephylengys cruentata* was generated and have allowed the identification of silk-protein-encoding the structural sequences and novel genes still not described. The prediction of the primary structure codifying the clone H09, denominated protein H09, have presented identity with a sphingomyelinase-D, responsible for the disease called Loxocelism, a clinical condition produced by the venom derived from spider of the genus *Loxoceles* sp. The aim of this work was the comparative phylogenetic study and expression of the codifying sequence of the clone H09. To confirm the transcription of the mRNA related to the H09 clone, a northern blot and a RT-PCR were conducted comparing the silk glands transcripts from the *N. cruentata* venom. The results have shown that there was hybridization and amplification only in the first one. The phylogenetic analysis of the protein H09 have shown high similarity related with ten sphingomyelinase previously described. The function prediction of the clone H09 was conducted through a tri-dimensional comparative analysis with the same sphingomyelinase group and a few defensins. The results have shown an intermediate position of the clone H09 related to the other proteins. To obtain a large quantity of the protein H09, the codifying sequence was cloned in the vector pET21 and the three strains of *E. coli* were transformed in order to express the recombinant protein. Several parameters were evaluated such as induction, concentration of IPTG, temperature, shaker speed and culture medium in order to optimize the expression protocol. Among the utilized strains, PLISs is appropriated to express toxic proteins and PRIL carries additional copies of rare codon in *E. coli*. Among all the evaluated conditions there was no detection of the H09 protein utilizing "Western blot".

Key words: *Nephilengys cruentata*, sphingomyelinase, cDNA library.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sedas de Aranhas

As aranhas são alguns dos organismos que apresentam maior diversidade e abundância sobre o planeta terra. Existem mais de 34000 espécies de *Araneae* descritas (Coddington & Levi, 1991). Sedas produzidas por aranhas são sintetizadas em glândulas localizadas na região do abdômen, e polimerizadas através de uma série de fiandeiras (espirinetas). Estas estruturas transformam as proteínas da seda solúveis em água e com alto peso molecular, em fibras insolúveis em água (Benito, 2002). As aranhas possuem sete glândulas produtoras de seda: 1) a glândula aciniforme responsável pela produção de sedas utilizadas no encapsulamento de insetos; 2) a glândula tubiliforme que produz a seda formadora do casulo para depósito dos ovos; 3) as glândulas flagiliformes; 4) “major ampullate” (MA); 5) “minor ampullate” (MI); 6) piriforme e 7) glândula coronata que são responsáveis pela produção das sedas que constituem a teia em orbital (Figura 1). Entretanto, não são conhecidas famílias de aranhas que possuam todas as sete glândulas.

As funções das sedas das aranhas estão associadas à captura da presa, reprodução, sensores vibracionais, linhas de segurança e ferramentas de dispersão. Nem todas as aranhas constroem teias para capturar suas presas, sendo que a principal função da seda é reprodutiva, na construção do estojo ovígero sedoso, por isso a seda parte da fêmea.

Sedas de aranhas são biopolímeros que apresentam extraordinárias propriedades físicas (Cunniff *et al.*, 1994 a,b; Ko & Jovicic, 2004). Quanto à sua estrutura química, a seda da aranha é um complexo de proteínas denominada de fibroína composta, predominantemente, de resíduos de aminoácidos como glicina, alanina, serina e tirosina, tipicamente definida como um polímero de proteínas estruturado em uma fibra (Rising *et al.*, 2005). No entanto, existe somente uma limitada informação sobre a composição das diferentes sedas produzidas por uma determinada espécie de aranha. As diferentes proteínas da seda contêm aminoácidos repetitivos que variam de acordo com a função da seda, conferindo

assim diferentes propriedades mecânicas entre os biopolímeros (Gosline *et al.*, 1999).



Figura 1. Teia da aranha

<http://www.kendall-bioresearch.co.uk/SPIDER1.gif>

Os tipos e natureza das várias fibras são diversos e dependem do tipo da aranha (Denny, 1980). Dependendo das condições ambientais e necessidades, a composição dos aminoácidos da seda pode variar consideravelmente, não somente entre diferentes aranhas, mas também na mesma aranha em diferentes dias (Work & Young, 1987; Vollrath F., 1999; Craig *et al.*, 2000).

Aranhas como a *Nephila clavipes* são capazes de gerar uma família de sedas, cada qual com distintas proteínas para o desempenho de determinada função. A seda linha de segurança, isolada de *Nephila clavipes* e *Araneus diadematus*, é a mais estudada entre todas as fibras sintetizadas por aranhas, é utilizada pelas aranhas na fuga de predadores e como moldura para a construção de sedas. A seda produzida pela glândula “minor ampullate”, usada como reforço na construção da teia, possui uma força tensora semelhante à linha de segurança, mas com menor elasticidade (Colgin & Lewis, 1998; Hayashi *et al.*, 2004). É um dos produtos naturais que mais chamam atenção por sua elasticidade e resistência mecânica.

A elasticidade da teia tem um valor muito grande quando comparado a outras fibras, como o náilon que estica cerca de 20% de seu comprimento sem se romper. A elasticidade foi estimada por Stauffer *et al.*, 1994 entre 18-28% em sedas da MA de *N. clavipes* e 22-28% em sedas da MI seda *N. Clavipes*. Entretanto outros autores

reportaram 12% (Gosline *et al.*, 1999) e mais de 35% de elasticidade (Hayashi *et al.*, 1999).

A seda da aranha tem uma das maiores resistências mecânicas já descritas. A propriedade física que caracteriza a resistência mecânica de um material é a tensão de ruptura. Esta é definida como razão entre a força aplicada ao material para seu rompimento e a área de sua seção transversal. O diâmetro da seda varia grandemente em função de seu tipo e também o tamanho da aranha. Mas muitas sedas variam de 0.5 a 3 μ m (Rising *et al.*, 2005).

Sedas de aranhas, como a linha de segurança de *N. clavipes*, têm demonstrado uma resistência mecânica superior à seda do bicho da seda (*Bombyx mori*) (Cunniff *et al.*, 1994 b), tendo, por isso, se tornado na última década o principal foco das pesquisas, apesar da variedade dos tipos de seda, esta tem mais propriedades desejáveis para ser copiadas e usadas em uma variedade de aplicações comerciais (Rising *et al.*, 2005). Este tipo de seda é um material especial, sendo que a combinação de sua dureza e elasticidades ultrapassa quase que qualquer material sintético. A seda da linha de segurança é produzida pela glândula ampuleta maior e processa uma rara combinação de propriedades biológicas. Estas incluem baixa densidade, alta resistência e uma considerável alongação para se romper. Além de uma força (definida pela energia estocada antes da fratura por unidade de massa) que é superior ao melhor material de fibra sintética (Gosline *et al.*, 1999).

Como a seda da linha de segurança das aranhas existem outras sedas que ocorrem naturalmente como a seda de captura que apresenta uma força de tensão que é comparável ao aço. Essa é também extremamente elástica, com a habilidade de ser esticada quase dez vezes o tamanho do contorno relaxado sem quebrar (Gosline *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2003).

1.2. Importância do estudo dos genes expressos nas glândulas de seda da aranha

A polimerização das proteínas nas glândulas da seda da aranha ocorre durante a passagem da solução de fição pelo ducto glandular, concomitantemente com a extração de água, sódio e cloreto. Íons de hidrogênio e potássio são secretados causando uma diminuição no pH de 6.9 para 6.3 (Chen *et al.*, 2002; Dicko *et al.*, 2004). Tais alterações desencadeiam o alinhamento das proteínas na parte distal do ducto, enquanto seus segmentos hidrofóbicos de poli-A se alinham e se aproximam. Estes segmentos são expostos a um ambiente cada vez mais hidrofóbico, o que muito provavelmente instiga a conversão estrutural destas proteínas para folhas- β (Scheibel, 2004), e conseqüente polimerização da fibra.

Ainda não foi possível uma satisfatória solubilização da seda da aranha *in vitro*. A maioria dos solventes utilizada para proteínas globulares não possui ação sobre ela. A alta organização das estruturas das fibras, extensivas pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals induzem a exclusão da água das regiões entre as folhas- β . Sedas de aranhas são insolúveis em água, ácidos e bases diluídas, agentes caotrópicos como uréia e hidrocloreto de guanidina e a maioria dos solventes orgânicos (Lombardi & Kaplan, 1990). As sedas são também resistentes à maioria das enzimas proteolíticas. Uma pequena solubilização das sedas foi obtida com a utilização de soluções salinas de brometo de lítio, tiocinato de lítio, cloreto de cálcio e outros sais de cálcio. Altas concentrações da mistura de ácido propiônico/hidroclorídrico, bem como ácido fórmico, também podem ser utilizadas (Mello *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1996).

Devido a essas características marcantes, estudos testaram a possibilidade de produzir proteínas das sedas de aranhas em sistemas heterólogos em larga escala com a cinética desejada o que permitirá sua utilização em vários produtos médicos como curativos e microfiosamentos de suturas para neurocirurgias. Adicionalmente, estas fibras de alto desempenho que poderiam ser utilizadas em diferentes aplicações técnicas e industriais. Estas poderiam também ser utilizadas em cordas e redes de pesca especiais, pára-quedas, em aplicações balísticas (coletes à prova de balas), produtos esportivos, na indústria têxtil e como matéria

prima de baixo peso para a construção de aviões. Um adicional benefício é a característica biodegradável das sedas das aranhas em ambientes aquosos, oferecendo uma alternativa para as fibras sintéticas comercializadas.

A produção em larga escala das proteínas constituintes das fibras da seda de aranhas tornaria possível a produção de uma nova geração de biomateriais com alto grau de biodegradabilidade, que envolvem aplicações práticas em diferentes segmentos do setor industrial.

A inabilidade de domesticar as aranhas para produzir quantidade suficiente de proteínas para o seu estudo e utilização comercial, induziu o desenvolvimento de estudos para viabilizar a produção das proteínas da seda em sistemas de expressão heterólogos em larga escala.

O recente sucesso da clonagem de cDNAs e genes sintéticos, e a expressão de proteínas recombinantes da seda de aranhas em diferentes sistemas, foi fundamental para o desenvolvimento do entendimento da estrutura, processamento e função destas proteínas, e suas importantes propriedades mecânicas (Kaplan *et al.*, 1994,1998). Estudos estão sendo conduzidos para acumular conhecimentos sobre estes processos. Entretanto, a natureza altamente repetitiva dos genes, os específicos codons utilizados pelas aranhas e a incomum estrutura secundária adotada pelo mRNA tem resultado em uma ineficiente tradução das proteínas, limitando o tamanho da fibra produzida (Fahnestock & Bedzyk, 1997; Scheibel, 2004). Em função da natureza repetitiva das seqüências, as primeiras pesquisas feitas com mRNAs coletados da glândula “major ampullate” de *N. clavipes* não obtiveram sucesso na tradução *in vitro* (Candelas *et al.* 1983; Candelas & Cintron, 1981; Candelas & Lopez, 1983).

Diferentes sistemas heterólogos de expressão estão sendo utilizados na tentativa de produzir fibras de aranhas. A produção de proteínas das sedas de aranhas em sistemas heterólogos, e também a manipulação da estrutura primária destas proteínas, fazendo uso da engenharia da estrutura modular tem sido baseada em conhecimentos sobre as sedas de aranhas naturais (Cappello *et al.*, 1990; Scheibel, 2004; Kang *et al.*, 1997, 1999).

Objetivando produzir sedas sintéticas com propriedades mecânicas similares às das sedas das aranhas, cientistas têm procurado por meio de várias tentativas experimentais e computacionais entender a organização estrutural destas sedas (Kaplan *et al.*, 1994).

Com base nestas informações, foi realizada no laboratório de transferência de genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen a construção de uma biblioteca de cDNA da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata* (Figura 2), uma espécie da mesma família (*Tetragnatidae*) da aranha *Nephila clavipes*, a mais estudada nessa área.

A aranha *Nephilengys cruentata* está presente na região da Mata Atlântica brasileira em ambientes urbanos úmidos e tem sua origem provável no continente africano, onde são encontradas outras aranhas do mesmo gênero (Motta, 2006).

Nephilengys cruentata: Reino: Animalia; subreino: Bilateria; ramo: Protostomia; filo: Artropoda classe: Arachnida ordem: Araneae; família: Tetragnathidae; gênero: *Nephilengys* espécie: *cruentata*.



Figura 2. *Nephilengys cruentata*

<http://home.gwu.edu/~kuntner/nephs/SA34-33%20ngcru1.jpg>

Uma biblioteca de cDNA é um arranjo de cópias de DNA em uma população de mRNA que é propagada em um vetor de clonagem e usualmente mantida em *Escherichia coli*. Os transcritos de um determinado tecido são isolados e a partir deles são sintetizados cDNAs, para tanto é usada a enzima *Transcriptase reversa* em uma reação de polimerase em cadeia (PCR). O produto dessa reação é ligado a

um vetor de clonagem. Células *E. coli* são transformadas e essa população de vetores contendo cDNAs é mantida nessas células estocadas -80°C. Toda boa biblioteca de cDNA deve ter três características: 1) ser grande o suficiente para conter insertos de cDNAs representativos de todas seqüências de interesse, alguns dos quais são derivados de mRNAs pouco abundantes; 2) incluir um número mínimo de clones que contenham pequenos insertos (geralmente definidos arbitrariamente \leq 500pb); 3) ser composta de insertos de cDNA que estão próximos do tamanho total das cópias de mRNAs de cada qual eles foram derivados.

1.3. Identificação de um gene exibindo identidade com esfingomielinase-D

No estudo da biblioteca de cDNA da glândula da seda de *Nephilengys cruentata* uma parte das seqüências de nucleotídios quando comparada com o banco de dados do GenBank (www.ncbi.nih.nlm.gov) apresentou identidade com seqüências descritas como codificantes de proteínas componentes estruturais das sedas, outras não se alinharam com nenhuma seqüência. Quando isso ocorria, as seqüências se aminoácidos, provenientes da tradução dessas seqüências de nucleotídeos não alinhadas, eram comparadas com o banco de dados.

A predição da estrutura primária da seqüência codificante do clone H09, denominada proteína H09, referente à placa NP 001 da biblioteca de cDNA da glândula de *Nephilengys cruentata*, apresentou de 29 a 35% de identidade com proteínas ainda não descritas neste gênero, denominadas esfingomielinases-D. Estas proteínas são as principais responsáveis pelo loxoscelismo, a condição clínica produzida por venenos provenientes de aranhas do gênero *Loxosceles* (reino: Animália; subreino: Bilatéria; ramo: Protostomia; filo: Artropoda; classe: Arachnida; ordem: Araneae; família: Sicariidae gênero: *Loxosceles*).

Como mostrado na figura 3, é importante notar a distância anatômica das glândulas da seda e do veneno o que descarta a possibilidade de contaminação. Deve-se ressaltar que a biblioteca de cDNA foi feita da glândula da seda, que fica na parte posterior da aranha e é responsável pela produção da teia em *Nephilengys cruentata*, e apresentou similaridade com uma proteína de *Loxosceles* produzida na

glândula que fica na parte anterior da aranha, a glândula do veneno e é um componente do mesmo.

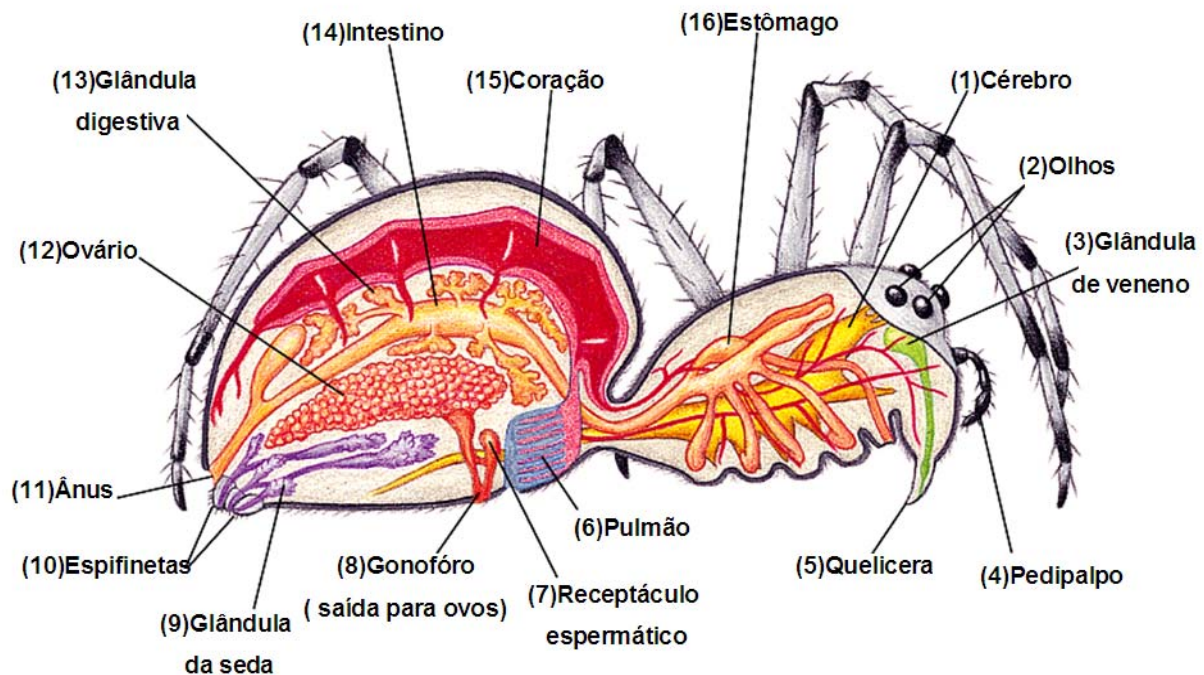


Figura 3. Anatomia da aranha: (1) cérebro, (2) olhos, (3) glândulas, (4) pedipalpo, (5) quelicera, (6) pulmão, (7) receptáculo espermático, (8) gonofóro, (9) glândula da seda, (10) espirinetas, (11) ânus, (12) ovário, (13) glândula digestiva, (14) intestino, (15) coração, (16) estômago.

<http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/16cm05/1116/33-30b-SpiderAnatomy-L.gif>

1.4. Propriedades de uma esfingomielinase-D

Esta esfingomielinase cliva esfingomielina (um esfingolípido da membrana plasmática de células eucarióticas, que por possuir um grupo fosfato como cabeça polar, é classificada como fosfolípido), originando N-acylsfiningosídeo e ceramida (Cisar *et al.*, 1989).

Murakami e colaboradores em 2005 fizeram análises cristalográficas de uma esfingomielinase-D de *Loxosceles laeta* para estudar os mecanismos catalíticos. A figura 4 mostra a estrutura terciária dessa proteína no formato Jmol.

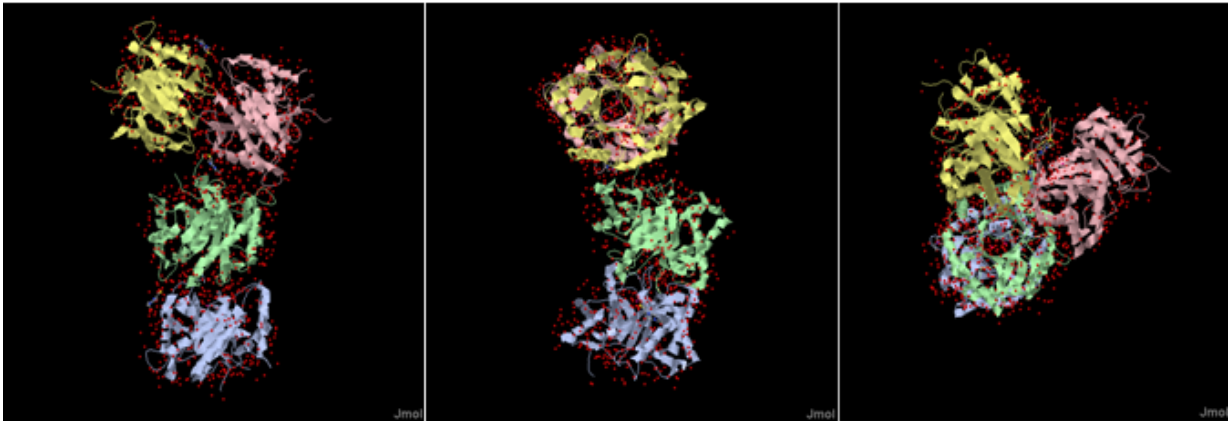


Figura 4. Representação da estrutura cristalizada de um membro da família esfingomielinase D de *Loxosceles laeta* (SMAse I) em formato Jmol. Os pontos vermelhos representam sítios de interação com água.

<http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=explorer/viewers/jmol.jsp>

Esfingolípídios são componentes de membrana importantes presentes em todas as células eucarióticas, não realizam apenas papéis em membranas biológicas, mas também estão envolvidos no crescimento celular e proliferação (Obeid & Hannun, 2003; Sims *et al.*, 2004). Também são importantes moléculas sinalizadoras na regulação celular, crescimento e resposta ao stress (Bieberich, 2004; Maceyka *et al.*, 2002) precursores de metabólitos como ceramidas (Cer), bases de cadeia longa (LCBs), bases de cadeia longa fosfato (LCBPs) e tem mostrado afetar o crescimento celular, diferenciação e morte em células de mamíferos.

Enquanto a clivagem de fosfolípídios (como a esfingomielina) é um fenômeno comum e necessário para *housekeeping*, a clivagem no sítio D dessas moléculas é rara (Bindford *et al.*, 2004). O sítio D está localizado entre a colina e o fosfato como esquematizado na figura 5. Estas fosfolipases-D, no caso esfingomielinases-D, são tóxicas para humanos e animais e não são comumente encontradas como componentes de venenos ou como produtos de microorganismos patogênicos (Bernheimer *et al.*, 1985; Truett & King, 1993; Cuevas & Songer, 1993; McNamara *et al.*, 1995).

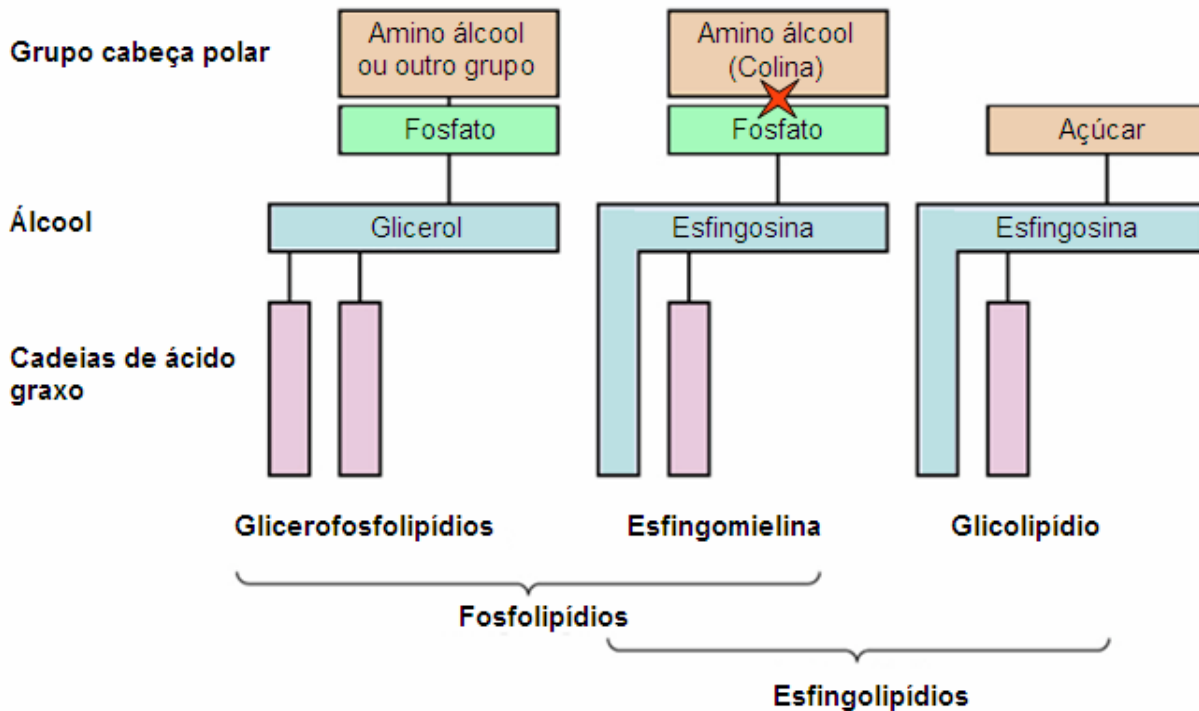


Figura 5. Esquema da composição molecular e divisão bioquímica entre fosfolípidios e esfingolípídios. Na intersecção dos dois grupos está a esfingomielina, composta por uma colina, um grupo fosfato, uma esfingosina e uma cadeia de ácido graxo. A marcação em vermelho entre a colina e o fosfato indica o sítio D, clivado por esfingomielinases-D.

http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/mcmurrygob/medialib/media_portfolio/text_images/FG24_0401.JPG

Muitas famílias de aranhas produzem venenos, mas poucas possuem presas fortes o suficiente para penetrar na pele humana e veneno tóxico o suficiente para causar necrose de pele. As aranhas *Loxosceles*, também conhecidas como aranha marrom (Figura 4), estão neste grupo reduzido de aranhas, são facilmente injuriadas e injetam veneno quando acudadas. Comumente a vítima veste uma roupa em que a aranha estava presente, nessa ocasião a mesma pode então ficar presa entre a roupa e a pessoa, sendo imprensada e reagindo com uma picada. As picadas também podem ocorrer enquanto a vítima está dormindo ou em afazeres domésticos. É inicialmente indolor, apenas uma rápida dor aguda, o que pode dificultar o diagnóstico. O veneno de *Loxosceles sp* foi desenvolvido principalmente

para paralisar a presa, insetos, não como um mecanismo de defesa, mas tem efeito de veneno em incidentes humanos (Sams *et al.*, 2001).

Enquanto um número de espécies tem sido listado como potencialmente causadores de lesões necrosantes, o agente responsável por essas lesões ainda persiste como motivo de debate. Muitos componentes do veneno de *Loxosceles sp* têm sido identificados. O mais importante é a esfingomielinase-D, uma proteína de 32 a 35 kDa que pode produzir lesões necróticas, hemólise de células vermelhas do sangue e morte de animais experimentais (Málaque *et al.*, 1999). Há uma forte evidência de que a enzima do veneno, esfingomielinase-D, é o agente causador da lesão na picada por *L. reclusa*, (Kurpiewski *et al.*, 1981).

Fora da linhagem de aranhas, a atividade de esfingomielinase-D é conhecida nas bactérias patogênicas *Corinebacterium pseudotuberculosis*, *Corinebacterium ulcerans*, *Archanobacterium haemolyticum* e *Vibrio damsela*. A infecção por *C. pseudotuberculosis* e envenenamento por *Loxosceles sp* resultam em patologias similares (Bindfort *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que esfingomielinases-D tóxicas que estão presentes no veneno da aranha marrom (*Loxosceles reclusa*) e em sobrenadantes ou filtrados de culturas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, são duas enzimas tóxicas derivadas de organismos filogeneticamente distantes, são similares em massa molecular, carga, substrato específico e em muitas outras atividades biológicas (Bernheimer, 1985).

Segundo Bindfort *et al.* (2004), três cenários evolucionários plausíveis podem explicar as similaridades entre as esfingomielinases-D de aranhas e bactérias: 1) esfingomielinases de bactérias e aranhas podem ter evoluído independentemente da mesma família geral de proteínas, 2) esfingomielinases-D podem ser originadas de um único linhagem e se movido para outra via transferência horizontal, 3) similaridades entre esfingomielinases-D de bactérias e aranhas não resultam de um ancestral comum, mas reflete uma convergência para desempenhar uma função comum.

1.5. Loxoscelismo

Casos de loxoscelismo humano têm sido relatados em diversos países de diferentes continentes em regiões temperadas e tropicais. Há numerosas espécies de *Loxosceles*, incluindo mais de 17 na África, duas na Europa e mais de 50 nas Américas, (Wasserman *et al.*, 1983).

A primeira descrição de loxoscelismo foi feita em 1872 e a reação cutânea em 1929. Em 1937 a necrose causada pelo veneno de *Loxosceles sp* foi reproduzida em coelhos. A espécie *Loxosceles reclusa* foi primeiramente descrita em 1940. Em 1957, aracnidismo necrótico foi citado como o resultado de uma provável picada de *Loxosceles sp* e foi relatada como “mancha gangrenosa do Chile”. (Atkins *et al.*, 1957).

Aranhas *Loxosceles* (Figura 6) em casos de envenenamento humano causam necrose cutânea (Figura 7) e, menos freqüentemente, cutâneo-visceral (Schenone *et al.*, 1989). Além de lesão local também há hemólise. A picada é geralmente indolor por até 2-8h, apenas após esse período a vítima nota a injúria. Pode haver eritema transiente, edema moderado a severo (Kurpiewski *et al.*, 1981).



Figura 6. *Loxosceles sp*

<http://chiletti.vilabol.uol.com.br/aranha-marrom.htm>



Figura 7. Lesão causada por *Loxosceles sp*

<http://www.monografias.com/trabajos16/aracnid-os-veneno/Image50.jpg>

Quando o veneno de *Loxosceles gaucho*, *L. laeta*, ou *L. intermedia* foi dividido em frações, com componentes de diferentes massa moleculares, a atividade letal e

dermonecrótica foi detectada exclusivamente nas frações de massa molecular maior nas três espécies, sugerindo que as toxinas responsáveis pela atividade mais importante do veneno de espécies de *Loxosceles* tem massa molecular entre 32-35 kDa e provavelmente são proteínas homólogas. (Barbaro *et al.*, 1996).

Ainda dentro da ordem *Araneae*, há evidências clínicas e experimentais de dermonecrose similar ao loxoscelismo resultante de picadas de aranhas-caranguejo de seis olhos do gênero *Sicarius* parente próxima da *Loxosceles*, o que sugere que a atividade dermonecrótica em venenos é encontrada fora de *Loxosceles* e está presente em parentes próximos fora do gênero, originados do mesmo ancestral. Todas as espécies que apresentaram atividade esfingomielinásica em seus venenos têm em seu extrato total da glândula mais de uma molécula na mesma faixa de massa molecular descrita. Ainda não é sabido se picadas de todas as espécies de *Loxosceles* são capazes de causar dermonecrose (Bindford & Wells, 2003).

1.6. Defensinas e sua relação com esfingolipídios como alvos de drogas antifúngicas

O sistema imune compreende duas grandes divisões de respostas: adaptativa (adquirida) e inata (rápida). A resposta adaptativa, que é antígeno específica, demora para ser ativada e culmina na secreção de anticorpos, é o principal caminho do sistema imune de animais mais complexos. A imunidade inata é uma resposta de natureza altamente conservada, que é vista mesmo no mais simples animal, confirmando sua importância para sobrevivência (Metchnikoff, 1887). A resposta inata é uma primeira linha de defesa pode responder imediatamente ao material estranho detectado por padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) culminado na fagocitose e destruição do material estranho. Estas PAMPs são encontradas tanto no sangue como expressas nas superfícies epiteliais. Está incluída na resposta inata a produção de peptídeos antimicrobianos, chamados defensinas, secretados pelas superfícies epiteliais.

Muitas defensinas de plantas que processam atividade antifúngica ou antimicrobiana *in vitro*, não são tóxicas para células de mamíferos ou células de plantas. Pelo fato de esfingolipídios de fungos serem estruturalmente diferentes de

esfingolipídios humanos, eles são considerados marcadores interessantes e promissores para descobrimento de novas drogas antifúngicas, permitido o desenvolvimento de moléculas seletivas e não tóxicas (Thevissen *et al.*, 2003).

Componentes antifúngicos de plantas (Thevissen *et al.*, 2003; Thevissen *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005) insetos (Thevissen *et al.*, 2004) e bactérias (Stock *et al.*, 2004) foram recentemente descritos por interagir especificamente com esfingolipídios de fungos, apresentando evidências para a hipótese de esfingolipídios ocorrerem como marcadores antifúngicos naturais.

A maioria dos peptídeos antimicrobianos catiônicos induz a permeabilização da membrana depois de uma ligação eletrostática inicial com os fosfolipídios carregados negativamente na superfície da célula. Diferentemente, as defensas de plantas induzem a permeabilização da membrana através de interação específica com sítios de ligação de alta afinidade nas células de fungos (Thevissen *et al.*, 1997; Thevissen *et al.*, 1999). Estes sítios de ligação de defensas de plantas têm sido identificados em ensaios de complementação genética e análises baseadas em *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) como um complexo de esfingolipídios (Thevissen *et al.*, 2000; Thevissen *et al.*, 2004).

Fungos mutantes afetados na biossíntese de cada esfingolipídio são resistentes a certas defensas de plantas (Thevissen *et al.*, 2005)

Micro domínios de lipídeos denominados *rafts* (Bagnat *et al.*, 2000; Martin & Konopka, 2004), desempenham importante papel estrutural, de reconhecimento e adesão, são ricos em esteróides e esfingolipídios, contribuem diretamente na morfogênese do fungo, pois sua composição de lipídeos distintos permite determinar seu envolvimento em vias de transdução de sinais, adesão celular, e outros processos de polarização celular.

Evidências obtidas recentemente sugerem que defensas de plantas induzem a morte de células de fungo não apenas por meio da desestabilização e/ou permeabilização da membrana, mas também por interação DNA, RNA, proteína, síntese protéica ou inibição de canais de íons (Lay & Anderson, 2005; Thomma *et al.*, 2003). Se defensas de plantas são internalizadas depois da interação com esfingolipídios e afetam marcadores intracelulares, contudo, ainda não está claro.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

Geral: Estudo da seqüência codificante referente ao clone H09 da biblioteca de cDNA da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata*;

Específicos: 1. Estudo da expressão desse gene na glândula da seda; 2. Análise computacional da proteína H09; 3. Filogenia da proteína H09; 4. Clonagem do gene em vetor; 5. Expressão em sistema heterólogo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares de *Escherichia coli* utilizadas

Linhagem: DH5 α (Gibco BRL); genótipo : *endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44, relA1, Φ 80 Δ lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, dcoR, phoA*.

Linhagem: Origami B[®] (Novagen[®]); genótipo : possui mutações nos genes thireodoxina redutase (*trxB*) e glutationa redutase (*gor*), o que permite uma maior formação de ligações dissulfeto; e no gene *lacZY*, pois são derivadas da BL21, o que permite uma entrada uniforme de IPTG nas células; resistências: Kanamicina (15 μ g/mL) e tetraciclina (12,5 μ g/mL).

Linhagem: BL21(DE3)pLysS[®] (Promega[®]); genótipo : permite alta eficiência na expressão de proteínas de qualquer gene sob o controle do promotor T7 e possui um sítio de ligação de ribossomo, também contém o plasmídeo pLysS detentor do gene T7 lysozyme que baixa o background da expressão basal de genes sob o controle o promotor T7, mas não interfere com o nível de expressão alcançado após a indução com IPTG, resistência: cloranfenicol (12,5 μ g/mL).

Linhagem: BL21-CodonPlus RIL[®] (Stratagene[™]); genótipo : uma variante da linhagem *Epicurian coli*[®] BL21-Gold cells * chamada BL21-CodonPlus[™]-RIL series** , que contém cópias extras dos genes de *E. coli* *argU, ileY, e leuW* tRNA. Esta modificação permite um alto nível de expressão de proteínas que são difíceis de expressar em *Escherichia coli* convencionais pelo codon usage preferencial do gene de interesse. A linhagem BL21-CodonPlus-RIL pode eliminar a necessidade de

mutar o gene de interesse de eucariotos; resistências: cloranfenicol (12,5µg/mL) e tetraciclina (12,5µg/mL).

3.2 Vetores de clonagem

Nome: pSport1; características principais: 4,1 Kb, promotor lac (lacP), repressor lac (lacI), promotor T7, origem: Invitrogen[®], anexo 1.

Nome: pCR2.1-TOPO; características principais: 3,9 Kb, fragmento alfa do gene *LacZ*, origem f1, origem pUC, Amp^R, Kan^R; origem: Invitrogen[®], anexo 2.

3.3 Vetor de expressão

Nome: pET21a(+); características principais: 5,4 Kb, promotor T7, T7-Tag, múltiplo sítio de clonagem, 6xHis-Tag, terminador T7, seqüência codificante *lacI*, origem pBR322, seqüência codificante β-lactamase (*bla*) Amp^R, Kan^R, origem de replicação do fago f1; Origem: Novagen[®], anexo 3.

3.4 Iniciadores

Foram desenhados iniciadores adicionando sítios de clivagens das enzimas de restrição *NotI* e *XhoI* nas extremidades da região codificante do gene do H09.

No primeiro apenas foi inserido o sítio de clivagem de *NotI* antes do ATG, (5' TGCGGCCGCATGTGGAATCGACAAGTC 3') respeitando a fase de leitura com relação ao vetor pET 21a, onde o gene foi clonado.

No segundo foi inserido um sítio de clivagem de *XhoI* substituindo o TGA, (5' CCTCGAGCTCGTCACAGAAGTATTC 3') também respeitando a fase de leitura do vetor, uma vez que este contém seis resíduos do aminoácido histidina (HisTag) no C-terminal, o que permite a purificação da proteína recombinante em coluna de afinidade.

Estas enzimas foram escolhidas por seus sítios de clivagem estarem presentes no múltiplo sítio de clonagem do vetor, mas não estarem presentes seqüência do gene em estudo.

Enzimas com sítios presentes na seqüência do gene em estudo: *EcoRI*, *EcoV*, *HindIII*, *PstI*, *SacI* e *BamHI*.

3.5 A predição da estrutura primária da seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata*

A seqüência foi predita usando o programa DNAMAN (Biosoft Copyright®) e foi chamada de proteína H09.

3.6 Predição de peptídeo sinal

A predição de peptídeo sinal da seqüência de aminoácidos da proteína H09 foi feita utilizando o programa PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>), a seqüência foi informada ao programa que calculou o provável sítio de clivagem do peptídeo sinal.

3.7 BLAST e EXPASY

A seqüência de nucleotídeos do clone H09 foi comparada com seqüência depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), assim como a seqüência de resíduos de aminoácidos da proteína H09. Das seqüências de resíduos de aminoácidos do banco de dados que se alinharam com a predição seqüência de resíduos de aminoácidos do clone H09, foram escolhidas dez que apresentaram identidade de 29 a 35% e possuíam a seqüência completa depositada no banco de dados.

A seqüência da proteína também foi colocada no programa EXPASY (<http://expasy.org/tools/protparam:html>).

3.8 Tabela de identidades

A análise de identidade entre as dez seqüências de esfingomielinases do banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov) que se alinharam com a predição seqüência de resíduos de aminoácidos do clone H09 foi feita alinhando uma a uma as seqüências entre si no BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.9 ClustalW e Árvore Filogenética

A relação entre as seqüências de resíduos de aminoácidos da proteína H09 e outras proteínas foi determinada pelo alinhamento com seqüências disponíveis no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), apenas seqüências

codificantes completas foram usadas para análises usando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), e para o alinhamento foi feito usando o programa MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) que gerou a árvore filogenética. Foi usado algoritmo: Maximum Parsimony, com 10000 replicações.

3.10 Plot 3D

Para uma comparação físico-química teórica da proteína H09 com seqüências de resíduos de aminoácidos depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e Swiss-prot (<http://www.psc.edu/general/software/packages/swiss/swiss.html>) , foi utilizado o programa Plot3D, este programa leva em consideração a massa molecular (MM), o pI (ponto Isoelétrico) e o momento hidrofóbico (HM), para o cálculo deste último foi utilizada a escala CCS (uma escala de hidrofobicidade consenso combinada, é derivada de duas escalas consensus consenso; um consensus consenso de duas escalas e um consensus consenso geral).

Foram utilizadas as primeiras 21 seqüências que apresentaram alinhamento de aminoácidos, no BASTp e 14 proteínas denominadas de defensinas do Swiss-prot. Seqüências das defensinas do Swiss-prot:

tr|Q621W1|Q621W1_CAEBR Hypothetical protein CBG02323 - *Caenorhabditis briggsae*.
tr|Q699S8|Q699S8_MACMU EP2L protein (Fragment) - *Macaca mulatta* (Rhesus macaque).
tr|Q699Y6|Q699Y6_MACMU EP2S protein (Fragment) - *Macaca mulatta* (Rhesus macaque).
tr|Q8SQD0|Q8SQD0_MACMU EP2L protein - *Macaca mulatta* (Rhesus macaque).
tr|Q95UP4|Q95UP4_STOCA Serine protease Ssp3 - *Stomoxys calcitrans* (Stable fly).
tr|Q17641|Q17641_CAEEEL Hypothetical protein - *Caenorhabditis elegans*.
tr|Q18238|Q18238_CAEEEL Hypothetical protein - *Caenorhabditis elegans*.
tr|Q30KN7|Q30KN7_MOUSE Beta-defensin 26 - *Mus musculus* (Mouse).
tr|Q30KP0|Q30KP0_MOUSE Beta-defensin 23 - *Mus musculus* (Mouse).
tr|Q30KS5|Q30KS5_CANFA Beta-defensin 129 - *Canis familiaris* (Dog).
tr|Q32ZG9|Q32ZG9_RAT Beta-defensin 23 - *Rattus norvegicus* (Rat).
tr|Q58QP9|Q58QP9_BRANA Oxalic acid oxidase - *Brassica napus* (Rape).
tr|Q599T9|Q599T9_BOVIN Myeloid differentiation protein (Myeloid differentiation factor 88) - *Bos taurus* (Bovine).
sp|Q30KK0|DB129_PANTR Beta-defensin 129 precursor (Defensin, beta 129) - *Pan troglodytes* (Chimpanzee).

3.11 Soluções para eletroforese em gel de agarose (Anexo 4)

3.12 Northern Blot para confirmação da transcrição do gene

Para confecção da sonda para o “Northern Blot”, foi utilizada a banda proveniente da digestão do vetor pSport1 com a enzima de restrição *PvuII* (CAG[^]CTG, Invitrogen[®]), situada nas extremidades da seqüência codificante do clone H09, e do controle negativo, um RNA ribossomal. Para a síntese de cada sonda, foram utilizados 25ng de DNA, foi utilizado o KIT Amersham-RedprimerII[®], Random Primer, Labeling System[®] de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas também amostras de RNA da glândula da seda e da glândula do veneno isoladas pelo método Trizol[®] (Invitrogen[®]), seguindo as orientações do fabricante.

Eletroforese em gel desnaturante foi realizada em duplicata em gel de agarose 1,2% (p/v) em tampão MOPS 1X. Após 5 horas de corrida a 40V o gel foi fotografado e transferido por capilaridade para a membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Bioscience[®]). A pré-hibridização e hibridização foram realizadas seguindo as instruções do fabricante da membrana.

3.13 RT-PCR do RNA total das glândulas da seda e veneno de *Nephilengys cruentata*

Para a síntese da primeira fita a partir do mRNA isolado da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata*, foram utilizadas as mesmas amostras do “Northern Blot”, que foram isoladas pelo método Trizol.

Para cada reação: 1 µL de iniciador reverso, 2 µL de first strand buffer, 1 µL de DTT, 0,5 µL de dNTPmix, 4 µL de amostra. A reação foi incubada a 95°C por 10 min, no gelo por 3 min, a 37°C por 2 min. Então foram adicionados: 0,5 µL de RNAsin, 0,5 µL de Superscript RT, do KIT Superscript II[®] RNase H⁻ Reverse Transcriptase – 200 U/µL (Invitrogen[®]).

A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de tampão de Tricina e a reação foi incubada a 72°C por 7 min e seguiu a reação de polimerização em cadeia.

3.14 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para confirmação de transcritos

Para a amplificação de DNA para a clonagem do produto, foi preparada uma solução de amplificação do DNA para um volume final de 50 μ L em um tubo tipo Eppendorf de 100 μ L. A quantidade de DNA molde foi de 10-20 ng, o sistema continha 0,2 mM de dNTPs (Gibco[®]), 2 mM de MgSO₄, 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo e 1 μ L de *Taq* DNA polimerase[®] – 5 μ L(Phoneutria[®]) em tampão de reação (10X PCR buffer) (Invitrogen[®]) para uma concentração final de 1X. Os ciclos de temperatura foram realizados no termociclador PCR Express (Hybaid), onde as amostras foram pré-aquecidas a 94°C por 2 minutos antes da amplificação, que foi executada por 30 ciclos térmicos com os seguintes parâmetros: desnaturação 30 segundos a 94°C, anelamento 65°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1,5 minutos, extensão final 72°C por 3 minutos e 4°C por 12 h. Após o término do programa de amplificação, 5 μ L da reação foi analisado em gel de agarose. O tamanho do produto da amplificação foi verificado e o restante da reação foi empregado nas etapas de clonagem subsequentes.

As amostras dos controles foram diluídas em água na proporção de 1:100. Foram utilizados como controle negativo o clone D06 da placa np01 (RNAr) e positivo o clone H09 da mesma placa.

3.15 Subclonagem da seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata*

A região codificante do gene da H09 foi clonado entre os sítios de clivagem das enzimas de restrição *Not*I (GC[^]GGCC, Invitrogen[®]) e *Xho*I (C[^]TCGAG, Invitrogen[®]), no múltiplo sítio de clonagem do vetor de expressão pET21a (Novagen[®]).

3.16 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para subclonagem do gene

Por intermédio de iniciadores desenhados para adicionar os sítios de clivagem de *Not*I e *Xho*I no início e final do gene respectivamente, o fragmento que estava clonado no vetor pSport1 (Invitrogen[®]) utilizado na construção da biblioteca de cDNA da glândula de seda da aranha *Nephilengys cruentata*, foi amplificado pela técnica

de reação de polimerização em cadeia (PCR) com o mesmo programa citado anteriormente.

Pra cada reação: 2 μL de DNA molde, 1 μL de iniciador forward, 1 μL de iniciador reverse, 1 μL de dNTPs, 3 μL de MgCl_2 , 5 μL de TP 10X, 1 μL de Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity – 5U/ μL (Invitrogen[®]).

2.17 Análise de DNA em gel de agarose

O fragmento gerado foi aplicado em gel de agarose 1% (p/v), preparado em tampão TEB (0,5X). Foi utilizado brometo de etídeo a uma concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras de DNA, misturadas em tampão de amostra, foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB (0,5X). As bandas foram visualizadas no gel utilizando um transiluminador de luz ultravioleta (UV). e seus tamanhos foram checados baseado no marcador de peso molecular.

3.18 Eluição de fragmento de DNA seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata*

Dois clones foram escolhidos e suas bandas foram eluidas do gel de agarose 1%, sendo visualizadas em um transiluminador de UV, e o fragmento desejado foi recortado do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi nova. Para o resgate do fragmento de DNA do gel, foi utilizado o Kit Wisard[®] SV Gel e PCR Clean-UP System (Promega[®]) de acordo com as instruções do fabricante.

3.19 Ligação de fragmentos de DNA no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO

As concentrações de DNA (inserto/vetor) foram utilizadas a uma razão molar de 3:1. Reação: 1 μl de água, 1 μl de dilute salt solution, 1 μl do vetor pCR2.1-TOPO, 3 μl do produto de PCR. A reação foi incubada 1 hora a temperatura ambiente, gerando dessa forma um vetor pCR2.1-TOPO com o gene em estudo. T4 DNA ligase[®] – 3 U/ μL (Promega[®]).

Foi utilizado 1 μl desta solução para transformar células *E. coli* DH5 α pela técnica de eletroporação.

3.20 Meios de cultura para bactérias (Anexo 5)

3.21 Preparo de bactérias competentes para eletroporação

A partir de uma colônia bacteriana isolada, foi preparado um pré-inoculo em 50 mL de meio LB com baixa concentração de sal, este foi incubado a 37°C sob agitação (250 rpm) por aproximadamente 16 horas. Em seguida, 1l de meio LB (baixa concentração de sal) foi inoculado com um volume de 1/100 do pré-inoculo preparado anteriormente. O inóculo foi incubado a 37°C sob agitação (200 rpm) até atingir uma $OD_{600} = 0,6-0,8$. Após este período, a cultura bacteriana foi resfriada em gelo por 30 minutos, e as células sedimentadas a 3000 rpm em rotor GSA (Sorval), por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, todo sobrenadante foi descartado, e o sedimento suspenso em 1l de água MilliQ estéril gelada em banho de gelo sob agitação (50 rpm) por aproximadamente 30 minutos. As células foram então centrifugadas desta vez a 5000 rpm em rotor GSA (Sorval), por 15 minutos a 4°C, todo sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas em 500 mL de água MilliQ estéril gelada em banho de gelo sob agitação (50 rpm) por aproximadamente 30 minutos, sedimentadas novamente a 5000 rpm em rotor GSA (Sorval), por 15 minutos a 4°C. Todo sobrenadante foi descartado, e o sedimento suspenso em 20 mL de uma solução gelada de glicerol 10% em banho de gelo sob agitação (50 rpm) por aproximadamente 30 minutos e finalmente sedimentadas a 3000 rpm em rotor GSA (Sorval), por 10 minutos a 4°C. As células foram suspensas em 2 a 3 mL de glicerol 10% gelado, alicotadas em 40 μ L, congeladas em gelo seco, e estocadas a – 80°C. A concentração bacteriana neste momento deve ser de $1-3 \times 10^{10}$ células/mL. É importante salientar que todo manuseio da cultura bacteriana foi feito cuidadosamente em capela de exaustão e em banho de gelo o máximo de tempo possível, no intuito de evitar a lise celular.

3.22 Transformação de bactérias competentes por eletroporação

Um tubo eppendorf contendo células competentes foi descongelado em banho de gelo e uma alíquota de 1 a 2 μL de DNA (1-10 ng) foi adicionada às bactérias, e o tubo incubado no gelo por 2 minutos. Após este período, a mistura células/DNA foi colocada numa cubeta de eletroporação previamente resfriada, com um espaço de 0,1 cm entre os eletrodos (BioRad[®]). A eletroporação foi realizada em um aparelho “BioRad[®] eletroporador” ajustado para as seguintes condições: resistência de 200 Ω , capacitância de 25 μF e uma voltagem de 1,8kV.

Imediatamente após a eletroporação foram adicionados 600 μL de meio LB, e as células foram suspensas cuidadosamente e transferidas para um tubo de polipropileno. Estas foram, então, incubadas em banho-maria a 37°C durante 1 hora com uma leve agitação o que pode aumentar a eficiência do processo. Após esta etapa, foram plaqueados diferentes volumes da cultura bacteriana (50 μL , 100 μL e 150 μL) em 25 mL de meio LB sólido acrescido do antibiótico adequado. As placas foram finalmente incubadas a 37°C durante uma noite para o crescimento de colônias.

Quando o vetor pCR2.1-TOPO foi usado, adicionou-se ao meio LB sólido X-gal (32 ng/mL) e IPTG (0,5 mM), para identificação de colônias.

3.23 Seleção das colônias por X-Gal e IPTG

O 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) é um substrato cromogênico da β -galactosidase. Este é usado na concentração de 20 mg/mL, dissolvido em N,N-Dimetilformamida em conjunto com isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosideo (IPTG) 100 mM, dissolvido em água MilliQ. Este último foi esterilizado por filtração em membrana microbiológica com poros de 0,22 μm (Millipore[®]). Para detecção da atividade da β -Galactosidase em clones bacterianos num ensaio colorimétrico para detectar colônias recombinantes (brancas) e não recombinantes (azuis).

A β -galactosidase é responsável pela clivagem da ponte β 1-4 entre a galactose e a parte 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl do X-Gal na hidrólise. A clivagem de X-Gal

resulta na produção de azul dichloro-dibromo-indigo, que é insolúvel em água, precipitado no sítio de clivagem da enzima.

Na estratégia de clonagem vetores que carregam o gene lacZ, codificador da β -galactosidase, como o vetor pCR2.1-TOPO, após a transformação, as células mostram atividade desta enzima em meio contendo X-Gal e IPTG que é um indutor artificial do operon Lac. Ele induz a expressão da β -galactosidase se ligando fortemente e inibindo o repressor Lac.

A inserção de um fragmento de DNA no múltiplo sítio de clonagem do vetor, localizado dentro do gene lacZ, resulta na ruptura da atividade da β -galactosidase conduzindo a uma aparência branca das colônias em meio contendo X-Gal e IPTG. Células transformantes não recombinantes produzem uma coloração azul neste mesmo meio.

3.24 Extração de DNA plasmidial (lise alcalina)

Qiagen[®] Plasmid Purification (Qiagen[®]).

3.25 Em pequena escala:

Para a execução da mini prep eram coletados 1,5 mL de uma cultura bacteriana gerada a partir de uma colônia transformada. Para o resgate plasmidial foi utilizado o FlexiPrep Kit (Pharmacia Biotech[®]), de acordo com as instruções do fabricante.

3.26 Seqüenciamento automático de DNA

O seqüenciamento de DNA foi feito pela Plataforma de Seqüenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen DF, onde foi utilizado o kit ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 e o Seqüenciador automático ABI Prism 3700. As amostras de DNA a serem seqüenciadas foram enviadas numa concentração de 100 ng/ μ L, diluídas em água. A Plataforma forneceu os oligonucleotídios padrões para seqüenciamento (Tabela 1), caso fosse necessária a utilização de oligonucleotídios diferentes, estes foram fornecidos numa concentração de 5 pmoles/reação. O resultado foi fornecido

pela Plataforma por meio de arquivos eletrônicos com eletroferograma e arquivo texto com a seqüência, e o resultado da correspondente análise de qualidade com o software Phred. Os arquivos foram analisados com o auxílio do programa de bioinformática Chromas 2.23 (www.technelysium.com.au/chromas.html).

Tabela 1. Oligonucleotídios padrão para seqüenciamento.

Oligonucleotídio	Seqüência (5'→3')
M13 Forward Primer	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 Reverse Primer	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
SP6 Primer	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
T7 Promoter Primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7 Terminator Primer	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
T3 Primer	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA

3.27 Digestão com as enzimas de restrição *NotI* e *XhoI*

O vetor pCR2.1-TOPO contendo a região codificante do gene H09 onde sítios de clivagem de *NotI* e *XhoI* foram adicionados em suas extremidades pela amplificação por PCR, foi digerido com estas enzimas a 37°C por 2 horas. Reação: 10,5 µL de água, 2,5 µL de BSA, 2,5 µL de bufer D, 10 µL do vetor TOPO com o gene em estudo, 1 µL de *NotI* e 1 µL *XhoI*.

O vetor pET21a também foi digerido com as mesmas enzimas a 37°C por 2 horas, na primeira hora somente com a enzima *NotI*, e após este período, foi adicionada a enzima *XhoI* e a digestão prosseguiu por mais uma hora. Reação: 10,5 µL de água, 2,5 µL de BSA, 2,5 µL de bufer D, 10 µL do vetor pET21a, 1 µL de *NotI* e 1 µL *XhoI*.

3.28 Análise de DNA em gel de agarose

Os fragmentos gerados foram aplicados em gel de agarose 1% (p/v), preparado em tampão TEB (0,5X). Foi utilizado brometo de etídeo a uma concentração de 0,5 µg/mL. As amostras de DNA foram misturadas em tampão de amostra, aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB (0,5X). Para a visualização dos fragmentos de DNA, o gel foi colocado sobre um transiluminador de luz ultravioleta (UV) e o tamanho desses foi checado baseado no marcador de peso molecular.

3.29 Eluição dos fragmentos de DNA

As bandas do vetor pET21a e a região codificante do gene H09 digeridos foram eluidas do gel sendo visualizadas em um transiluminador de UV, e o fragmento desejado foi recortado do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi nova. Para o resgate do fragmento de DNA do gel, foi utilizado o Kit Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-UP System (Promega[®]) de acordo com as instruções do fabricante.

3.30 Ligação de fragmentos de DNA da região codificante do gene H09 no vetor de expressão pET21a

As concentrações de DNA (inserto / vetor) foram utilizadas a uma razão molar de 3:1. Reação: 1 µL de água, 1 µL de dilute salt solution, 1 µL do vetor pET21a, 3 µL do produto da digestão. A reação foi incubada 1 hora a temperatura ambiente, gerando dessa forma um vetor pET21a /H09.

3.31 Transformação Bacteriana

Foi utilizado 1µL da ligação para transformar células *E. coli* DH5α pela técnica de eletroporação com o vetor pET21a/H09 e com pET21a(+). As bactérias transformadas foram selecionadas em 25 mL de meio LB sólido acrescido de 150 µg/mL de ampicilina.

3.32 Seleção dos clones positivos

Os clones positivos foram selecionados por intermédio da técnica de PCR ou pela digestão com as enzimas de restrição *NotI* e *XhoI*.

3.33 Reação em cadeia de polimerase (PCR) de colônia para verificação de clones positivos

Amostras das colônias transformadas com o vetor pET21a/H09 e com pET21a, foram retiradas da placa contendo meio de seleção utilizando um palito estéril, diluídas em 15µL de água e posteriormente fervidas por dez minutos. Um µL foi utilizado como DNA molde para PCR como descrito anteriormente.

3.34 Digestão com as enzimas de restrição *NotI* e *XhoI*

As colônias de clones transformados com o vetor pET21a/H09 e com pET21a, foram pegas da placa com meio de seleção utilizando um palito estéril e lançados em pré-inóculos contendo 3 mL de meio LB, 150 µg/mL de ampicilina e incubados a 37°C sob agitação (200 rpm), por 16 horas. Foi então feita a extração de DNA plasmidial (lise alcalina) em pequena escala e em seguida a digestão com as enzimas de restrição *NotI* e *XhoI*, como descrito anteriormente.

3.35 Extração de DNA plasmidial (lise alcalina)

Qiagen® Plasmid Purification (Qiagen®).

3.36 Em média escala

A partir de uma cultura bacteriana de 500 mL, proveniente de uma colônia transformada, foi feita a extração do DNA plasmidial utilizando o QIAGEN Plasmid Purification® (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

3.37 Transformação de bactérias *E. coli* para expressão

Para a expressão da H09 em *E. coli* foram utilizadas células das linhagens Origami B™, BL21(DE3) pLysS® e BL21-CodonPlus®.

As células foram transformadas por eletroporação com o vetor pET21a/H09 e com o vetor pET21a, o último servindo de controle negativo. As mesmas foram então crescidas em meio de seleção, LB ou 2XYT, acrescido dos antibióticos próprios para cada célula mais ampicilina (150 µg/mL), pois a utilização do plasmídio pET21a como vetor de expressão confere resistência a este antibiótico. As células foram incubadas por duas horas a 37°C sob agitação (200 rpm) e em seguida plaqueadas em meio de seleção LB sólido.

3.38 Seleção dos clones positivos

As etapas de seleção dos clones positivos foi realizada da mesma forma citada anteriormente.

3.39 Indução da expressão em *E. coli*

Após a seleção dos clones positivos transformados com o vetor pET21a/H09 e com o vetor pET21a (controle negativo), foram lançados pré-inóculos em 3 mL de meio LB contendo os antibióticos adequados e crescidos a 37°C sob agitação (200 rpm), por 16 horas.

Foi inoculado 1 mL de cada pré-inóculo em 50 mL de meio LB com antibióticos, sob as mesmas condições anteriores, até atingirem uma Densidade Óptica (OD)₆₀₀ = 0,6-0,8. Posteriormente, foi adicionado 1 mM de IPTG às culturas bacterianas, e os inóculos incubados a 37°C, por 3 horas.

A verificação da presença da proteína H09 intracelular dos clones recombinantes procedeu-se pela coleta de aliquotas das culturas de hora em hora e posterior armazenamento a -20 °C. O material foi centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado, e o precipitado celular suspenso em 50µl de tampão de amostra 2X para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, e análise das proteínas por “Western blot”.

3.40 Variações cinéticas da indução da expressão em *E. coli*

Para otimizar o protocolo foram feitas variações do tempo de indução: de três para até 12 horas; temperatura: de 37°C para 25 e 30 °C; rotação: de 200 para 120 rpm, concentração de IPTG: de 1mili Molar (mM) para 0,8 e 0,4mM; meio de cultura LB e 2XYT.

3.41 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Anexo6)

4.42 Soluções e materiais para imuno-deteccção (Anexo 7)

3.43 Western blot

Foi preparado um minigel de poliacrilamida 12% (p/v) de 1 mm de espessura no sistema ProteanII da Biorad[®]. Neste gel, foram aplicados 10 µL do marcador de peso molecular de proteínas, e 15 µL de cada amostra misturada em tampão 2X contendo 5% de β-mercaptoetanol, previamente fervidas por 5 minutos.

As proteínas foram separadas ao longo do gel utilizando uma corrente constante de 20mA e tampão de corrida (1X). Após o término da eletroforese o gel foi utilizado tanto para a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF, para a análise das mesmas por “Western blot”, quanto para coloração com Comassie Blue.

Antes da transferência a membrana de PVDF foi ativada em etanol 100% por 1 minuto e incubada em água por 5 minutos. Após este procedimento a membrana e o gel foram incubados, separadamente, em tampão de transferência por 15 minutos.

O sistema de transferência foi montado sobre a plataforma do pólo positivo de um aparelho de transferência eletroforética semi-seca da seguinte forma: foram empilhadas uma a uma três folhas de filtro Whatmann 3mm, em seguida a membrana de PVDF, o gel, e finalmente mais três folhas de filtro Whatmann 3mm. Os papéis filtro e a membrana foram cortados no tamanho do gel, e umedecidos em tampão de transferência antes da montagem. As bolhas presentes entre as camadas foram retiradas rolando levemente uma pipeta de 5 mL sobre o material. O aparelho

foi fechado e uma corrente constante igual a 0,8mA por cm² da área do gel foi aplicada por uma hora e meia.

Depois de terminada a transferência, a membrana foi incubada durante 18 horas com a solução de bloqueio sob leve agitação, em câmara fria. O anticorpo primário (Anti-HisTag) com uma titulação de 1:1.000 (v/v) diluído em solução de bloqueio, foi adicionado e a membrana incubada por 2 horas sob leve agitação à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi removido e a membrana lavada três vezes por 5 minutos com 20 mL de solução de bloqueio sob leve agitação. O anticorpo secundário (Anti-Rabbit IgG) conjugado com fosfatase alcalina, com uma titulação de 1:2000 (v/v) diluído em solução de bloqueio, foi adicionado e a membrana novamente incubada por 2 horas sob leve agitação, a temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi removido e a membrana lavada como citado anteriormente e colocada em tampão de ensaio duas vezes por 2 minutos sem agitação. O excesso foi retirado da membrana por capilaridade levantando-a com o auxílio de uma pinça e colocando uma das suas pontas num papel, após este procedimento, a membrana foi colocada sobre plástico esticado e foi adicionada sobre a mesma solução de trabalho, do KIT CSPD[®] Substrate for Alkaline Phosphatase (Applied Biosystems[®]), gota a gota numa razão de 3 mL para 100 cm³ de membrana e incubada por 5 minutos. O excesso foi retirado novamente e a membrana teve suas duas faces cobertas por um novo plástico formando um “sanduíche”, foram retiradas as bolhas e procedeu-se à exposição da mesma a um filme radiográfico (KodaK Biomax Xar Film[®]) por 30 minutos dentro de um K-set, após este período o filme foi revelado e fixado com as soluções próprias.

3.44 Análise de codons preferenciais em *E. coli*

Para verificação de diferenças nos códon preferenciais usados pela bactéria e pela seqüência a ser expressa foi utilizado o banco de dados de codons preferenciais (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) de onde foi retirada a tabela 3 que foi utilizada para comparação com os codons utilizados na seqüência codificante do clone H09, dispostos na forma de tabela.

4. RESULTADOS

4.1 Predição da estrutura primária da seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata*, denominada proteína H09.

A seqüência de resíduos de aminoácidos resultante da predição da tradução da seqüência nucleotídica do clone H09 no programa DNAMAN está descrita na figura 8. O códon de iniciação considerado válido para a o início da leitura está localizado na posição 362 da seqüência de nucleotídeos, a proteína resultante é constituída de 307, resíduos de aminoácidos, considerando a primeira metionina. Esta seqüência foi utilizada para comparação com o banco de dados GenBank, para análise filogenética e para predição de função.

Translation of H09(1-2152)

Universal code

Total amino acid number: 694, MW=78430

Max ORF: 284-1282, 333 AA, MW=38593

```
1      CTGATTCGCCAGCTCTAATACGACTCACTATATGGAAAGCTGGTACGCCTGCAGGTACCG
61     GTCCGGAATTCCCGGGTCGACCCACGCGTCCGCATAAGGTGATTGTTTCATCCTGATTTTA
121    GAGAGCTCTTCTTATTTTTAAAGAATGAAAGGTTATTAGTTGTTGAACATCCAAGCATAT
181    CAAGATGAAATTCAAGAAGAACTAAAATACCTTCAATGACATTTACTCATCAAGAATATT
241    AATGAATTACAACATCTTCCTTAAATCCTTATATAATTAATAACAGAATTATCCTTTGAA
301    AGCAATAAAAATTCCAATTGTAAGCAAAGTGCATCAATTCAACGCTTGTGAATTTGCAAT
361    CATGTGGAATCGACAAGTCTTACCAATATATATTTTTGGTAATTGTCTCGCTAGCGATACT
121    M W N R Q V L P I Y I L V I V S L A I L
421    TACTACGCATGTTTCCACGTCGAAACAACGTCCTTTTTTATATAATGGGACACATGGTAAA
141    T T H V S T S K Q R P F Y I M G H M V N
481    CAGTATCGAAGAAATATCGGAATTCCTAGAAAGAGGATCCAACGTTTTTGGAAATCAGATGT
161    S I E E I S E F L E R G S N V L E S D V
541    TCAATTCTTTTCAAACGGATCTGTAAAAGCAGTCCGTCATGGATTTTCTTGCATTGTGG
181    Q F F S N G S V K A V R H G F P C D C G
601    TAGATTTTTCGAGAACACAGCCAATCTGGCGGATTACTTGCAGAGTGTTTCGATACATCAC
201    R F C E N T A N L A D Y L Q S V R Y I T
```

```

661      TGATCCAGATACACCTGATAGTTATTACAACCAACTGGTACTGCAGTTCTTTGATTTGAA
221      D P D T P D S Y Y N Q L V L Q F F D L K

721      GCTGAGTACGTCCGAAAATAAAAGACAATCTGGACGAGAGATAGCTCACCATGTTCTGGA
241      L S T S E N K R Q S G R E I A H H V L D

781      TTATTTATGGGGTGAAGAAGGCGAAAGAGAGAAAGAGATCCGAGTTGTAATTTACTTTCGA
261      Y L W G E E G E R E K E I R V V I Y F E

841      AAAGCTTGAAGAGAAGGATGTAATCCTTGGATTTATGGACGTATTCAAACCTCCGAAACCA
281      K L E E K D V I L G F M D V F K L R N Q

901      AACATCGCGTCTCAGAGATGTCGGTTTTTGACGGTGGAACTGGAAACATTTTCAGATATCGC
301      T S R L R D V G F D G G T G N I S D I A

961      TAGAATGTTCTCCAAATTTAATATAAAAGATAATATTTGGCTTGGAGATGGTGCAACAAA
321      R M F S K F N I K D N I W L G D G A T N

1021     TTGTTTTGAACCTTTTAAATCATTTGTGCGTCTAAAGAATGCAATAGACAACCGAGATTC
341      C F E P F K S F V R L K N A I D N R D S

1081     CAGGAAAGGTTTTGTTTCAAAAATTTATCAATGGACTAATGATATAAAAAACAACAATGAT
361      R K G F V S K I Y Q W T N D I K T T M M

1141     GCGTTCCTAAGACTTGGAGTGGATGGGATGATCACTAACAAACCTGAGAGACTCCTGGA
381      R S L R L G V D G M I T N K P E R L L E

1201     GGTTCTGCAAGAACCCGAATTTGCGAAGGATTTTCAGATTAGCAACAATTTACGACGATCC
401      V L Q E P E F A K D F R L A T I Y D D P

1261     TTTCGAATACTTCTGTGACGAGTGAGAAATAGAGTTCGTTGGAAGTCCCAGTCATCATTGTA
421      F E Y F C D E *

1321     AAAACGCCTATGTCGATTAAGCCCATGGAATTCGAAAATAAAGAAGAGACAGAGACGTTTT

1381     ATTATTATTATTATTATTATTTAAATACAATAAAAAGAGTTGGTTACATAAGAGATAGT

1441     TTAAATAATAAGAACAAGTATTTTTTAAAAAAGGCTCAACTTGAATGATTGATTTAAAAAT

1501     AGCTCAATAAATTCCTATGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 8. Predição da estrutura primária da seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da glândula da seda da aranha *Nephilengys cruentata*, denominada proteína H09. Os aminoácidos sublinhados codificam o provável peptídeo sinal da proteína.

4.2 Predição de peptídeo sinal

Segundo o programa PSORT II, o provável sítio de clivagem do peptídeo sinal da proteína H09 está situado entre os aminoácidos 26 e 27 e está sublinhado na figura 8.

4.3 Análise caracterização via programas computacionais da proteína H09

De acordo com a análise realizada pelo programa ExPASy, a proteína possui 307 resíduos de aminoácidos, com massa molecular predita de 35,7 kDa, pI teórico de 5,34. Do total de aminoácidos, 15% são carregados negativamente e 12,4% carregados positivamente.

User-provided sequence:

```
1      11      21      31      41      51
|      |      |      |      |      |
1 MWNRQVLPIY ILVIVSLAIL TTHVSTSKQR PFYIMGHMVN SIEEISEFLE RGSNVLESDV 60
61 QFFSNGSVKA VRHGFPDCG RFCENTANLA DYLSVRYIT DPDTPDSYYN QLVLQFFDLK 120
121 LSTSENKRQS GREIAHHVLD YLWGEEGERE KEIRVVIYFE KLEEKDVILG FMDVFKLNRQ 180
181 TSRLRDVGF DGGTGNISDIA RMFSKFNKD NIWLG DGATN CFEPFKSFVR LKNAIDNRDS 240
241 RKG FVSKIYQ WTNDIKTTMM RSLRLGVDGM ITNKPERLLE VLQEPEFAKD FRLATIYDDP 300
301 FEYFCDE
```

References e documentation are available.

Number of amino acids: 307

Molecular weight: 35700.5

Theoretical pI: 5.34

Amino acid composition:

Ala (A)	10	3.3%	Gly (G)	18	5.9%	Glx (Z)	0	0.0%	Trp (W)	4	1.3%
Arg (R)	21	6.8%				Xaa (X)	0	0.0%	Tyr (Y)	11	3.6%
Asn (N)	17	5.5%	His (H)	5	1.6%	Met (M)	8	2.6%			
			Ile (I)	21	6.8%						
Asp (D)	23	7.5%				Phe (F)	22	7.2%			
			Leu (L)	26	8.5%						
Cys (C)	5	1.6%	Lys (K)	17	5.5%	Pro (P)	9	2.9%			
Gln (Q)	10	3.3%	Val (V)	21	6.8%	Ser (S)	21	6.8%			
Glu (E)	23	7.5%	Asx (B)	0	0.0%						
						Thr (T)	15	4.9%			

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 46

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 38

Atomic composition:

Carbon	C	1600
Hydrogen	H	2468
Nitrogen	N	428
Oxygen	O	474
Sulfur	S	13

Formula: C₁₆₀₀H₂₄₆₈N₄₂₈O₄₇₄S₁₃**Total number of atoms:** 4983**Extinction coefficients:**

Conditions: 6.0 M guanidium hydrochloride
 0.02 M phosphate buffer
 pH 6.5

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹ .

The first table lists values computed assuming ALL Cys residues appear as half cystines, whereas the second table assumes that NONE do.

	276	278	279	280	282	
	nm	nm	nm	nm	nm	
Ext. coefficient	37840	38054	37675	37080	35840	
Abs 0.1% (=1 g/l)	1.060	1.066	1.055	1.039	1.004	
	276	278	279	280	282	
	nm	nm	nm	nm	nm	
Ext. coefficient	37550	37800	37435	36840	35600	
Abs 0.1% (=1 g/l)	1.052	1.059	1.049	1.032	0.997	

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 41.05

This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 82.80**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.359

4.4 Resultado da análise feita no programa BLASTp

A comparação da seqüência de resíduos de aminoácidos da proteína H09 feita no programa BLASTp apresentou alinhamento semântico numa faixa de score entre 150 a 200 Bits com 23 proteínas do banco de dados (Figura 9), sendo 22 delas classificadas como esfingomielinases, das quais 10 são esfingomielinases-D. Todas essas proteínas são descritas em diversas espécies do gênero *Loxosceles sp.* As seqüências marcadas com setas foram escolhidas para as análises seguintes por estarem completas após terem sido verificadas uma a uma.

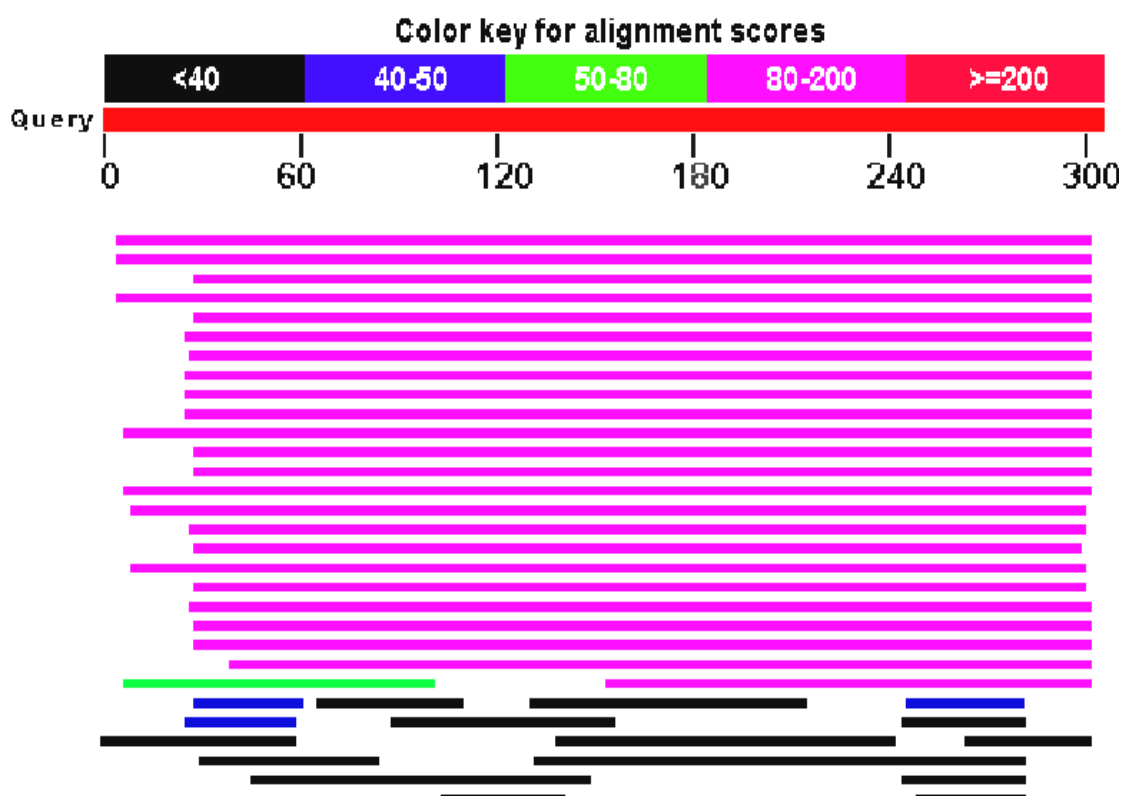


Figura 9. Resultado da análise feita no programa BLAST

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
→ gij41019463 gb AAP97091.2 sphingomyelinase P1 precursor [Lox...	<u>196</u>	1e-48
→ gij77158011 gb ABA62021.1 dermonecrotic toxin isoform 1 [Loxosc	<u>194</u>	5e-48
gij33348850 gb AAQ16123.1 dermonecrotic protein 1 [Loxosceles i	<u>192</u>	1e-47
→ gij41019465 gb AAP97092.2 sphingomyelinase P2 precursor [Lox...	<u>191</u>	2e-47
gij62275780 gb AAX78234.1 dermonecrotic protein [Loxosceles sim	<u>191</u>	3e-47
gij49458046 gb AAT66073.1 sphingomyelinase D protein 1 [Loxosce	<u>189</u>	2e-46

	gij81248673 gb ABB69098.1	dermonecrotic toxin isoform 2 [Loxosc	188	2e-46
	gij49458050 gb AAT66075.1	sphingomyelinase D protein 1 [Loxosce	187	5e-46
→	gij57792507 gb AAW56831.1	sphingomyelinase D precursor [Loxosce	187	6e-46
	gij49458052 gb AAT66076.1	sphingomyelinase D protein 2 [Loxosce	186	8e-46
	gij56694551 gb AAW22997.1	sphingomyelinase D-like protein 2 [Lo	186	1e-45
	gij65336285 gb AAY42401.1	dermonecrotic protein 1 [Loxosceles g	183	9e-45
	gij56694553 gb AAW22998.1	sphingomyelinase D-like protein 3 [Lo	178	3e-43
→	gij41017948 sp Q7Z1Y7 SMAD_LOXAR	Sphingomyelinase D precursor (S	176	8e-43
→	gij88660608 gb ABD48089.1	dermonecrotic protein-like II [Loxosc	175	2e-42
	gij49458048 gb AAT66074.1	sphingomyelinase D-like protein 3 [Lo	174	3e-42
→	gij27372520 gb AAM21156.1	sphingomyelinase-like protein [Loxosc	171	3e-41
→	gij81343346 gb ABB71184.1	dermonecrotic toxin isoform 3 [Loxosc	170	7e-41
→	gij88660606 gb ABD48088.1	dermonecrotic protein-like I [Loxosce	169	1e-40
	gij27372518 gb AAM21155.1	sphingomyelinase-like protein [Loxosc	165	2e-39
→	gij27372516 gb AAM21154.1	sphingomyelinase I [Loxosceles lae...	160	6e-38
	gij60594087 pdb 1XX1 D	Chain D, Structural Basis For Ion-Coor..	160	6e-38 S
	gij55775801 gb AAP44735.2	sphingomyelinase D dermonecrotic e...	156	1e-36
	gij31296498 gb AAP46537.1	sphingomyelinase D-like protein [Loxo	102	1e-20
	gij31296494 gb AAP46535.1	sphingomyelinase D - like protein [Lo	73.6	1e-11
	gij61216371 sp P69502_1	[Segment 1 of 5] Sphingomyelinase lo...	46.2	0.002

4.5 Tabela de Identidades entre esfingomielinas de *Loxosceles* e a proteína H09

A tabela 2, resultante da análise de identidade entre esfingomielinas de *Loxosceles* e a proteína H09, mostrou uma variação de 29 a 35%, a relação de identidade entre as esfingomielinas de *Loxosceles sp* variou de 42 a 99%.

Tabela 2. Tabela de Identidades entre esfingomielinas de *Loxosceles* e a H09

	H09	P1p	DTI1	P2p	Sphp	S.D	D.PII	S.LP	D. I3	D.LI
P1p	34									
DTI1	35	99								
P2p	34	89	88							
Sphp	32	84	82	85						
S.D	30	79	79	78	86					
D.PII	29	46	45	44	45	44				
S.LP	29	44	43	42	43	43	81			
D. I3	29	46	45	43	45	44	98	81		
D.LI	29	46	45	43	45	44	98	81	99	
Sph1	30	60	59	58	61	60	42	40	42	42

4.6 Resultado do alinhamento feito pelo programa CLUSTAL W

O ClustalW (Figura 10) da seqüência de resíduos de aminoácidos da proteína H09 com as dez esfingomielinases de *Loxosceles sp* escolhidas apresentou uma regularidade na identidade. Ao longo de toda extensão podem-se notar pontos de alinhamentos idênticos e similares, demonstrando poucas regiões com mais de treze resíduos completamente diferentes. Revelando assim um alinhamento semântico bastante consistente. Estas esfingomielinases foram escolhidas por apresentarem uma seqüência completa no banco de dados e identidade de 29 a 35% com a proteína H09.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Dprecursor      -----MLLYVTLILGCWSAFS-----ESAETDVAERAN-KRPIWI 34
SmaseDprecursor MSHS-----STALLHPYVAARATEKFAPIYFFCHPLQSAETDVAERAN-KRPIWI 49
Plprecursor     MAAAGIRF-----IMLPYIVLVLGCWSVLS-----QAAQTDDDEERAGNRRPIWI 44
toxin           -----MLPYIVLVLGCWSVLS-----QAAQTDDDEERAGNRRPIWI 35
P2precursor     MAAAGIRFGLDLSLSIIMLPYIALILVCWSVLS-----QAAQTDVEGRADKRRPIWI 51
sphingomyelinaseI
isoform3        -----MYAHLALILGCWTVVL-----QGAETDVGERADNRRPIWI 35
protein-likeI   -----MLLPAVISFIVYAVFL-----QEANGHAAERADSRKPIWD 35
protein-likeDII -----MLLCAVISFIVYAVFL-----QEANGHAAERADSRKPIWD 35
Slikeprotein    -----MLLSAVISFIGFAAFL-----QEANGHVVERADSRKPIWD 35
H09             -----MWNRQVLPYIYLIVS-----LAILLTHVSTSKQRPFYI 34
                :           .                       *           : . : : * :

Dprecursor      MGHMVNAIYQIDFVNLGANSIETDVSFDKDNPEYTYHGVPDCGRSCLKWEYFSDFLK 94
SmaseDprecursor MGHMVNANYQIDFVNLGANSIETDVSFDSSANPEYTYHGVPDCGRGWCKKWEYFNNFLK 109
Plprecursor     MGHMVNAIGQIDFVNLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIPDCGRNCKKYENFNDFLK 104
toxin           MGHMVNAIGQIDFVNLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIPDCGRNCKKYENFNDFLK 95
P2precursor     MGHMVNAIAQIDFVNLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIPDCGRSCLKWENFNDFLK 111
sphingomyelinaseI
isoform3        IAHMVNDLGLVDEYLGDGANGLELDDVAFTADGTADKMYHGVPDCDFRSCRTREGFTKYMD 95
protein-likeI   IAHMVNDLGLVDEYLGDGANGLELDDVAFTADGTADKMYHGVPDCDFRSCRTREGFTKYMD 95
protein-likeDII IAHMVNDLELVDEYLGDGANGLELDDVAFTDDGTADKMYHGVPDCDFRSCRTREGFTKYMD 95
Slikeprotein    IAHMVNDLDLVDEYLGDGANALEADLAFSTDGTADEMYHGVPDCDFRSCRTSEKFFSTYMD 95
H09             MGHMVNSIEEISEFLERGSNVLESVDVQFFSNGSVKAVRHGFPDCGRFCENTANLADYLQ 94
                : . * * * * : : : : * : * : * : * . * * * * * : : : . : : .

Dprecursor      GLRKATTPGDSK-YHAKLVLVVFDLKTGSLYDNQAYDAGKKLAKNLLKHYYWNN-GNNGGR 152
SmaseDprecursor ALRKATTPGDSK-YHEKLVLVVFDLKTGSLYDNQAYDAGKKLAKNLLQHYWNN-GNNGGR 167
Plprecursor     GLRSATTPGNSK-YQEKLVLVVFDLKTGSLYDNQANDAGKKLAKNLLQHYWNN-GNNGGR 162
toxin           GLRSATTPGNSK-YQEKLVLVVFDLKTGSLYDNQANDAGKKLAKNLLQHYWNN-GNNGGR 153
P2precursor     GLRSATTPGNAK-YQAKLILLVVFDLKTGSLYDNQANEAGKKLAKNLLKHYYWNN-GNNGGR 169
sphingomyelinaseI
isoform3        TLREYTPGNAK-YRDGFILFVLDLKTGSLSDNQVRPAGENVAKELLQNYWNN-GNNGGR 152
protein-likeI   YIRQLTTPGNSK-FKSQILLLIMDLKLNGLIEPNVAYAAGKSVAEKLLSGYWQN-GKSGAR 153
protein-likeDII YIRQLTTPGNSK-FKSQILLLIMDLKLNGLIEPNVAYAAGKSVAEKLLSGYWQN-GKSGAR 153
Slikeprotein    YIRRITTPGSSN-FRPQMLLLIIDLKLKGIIEPNVAYAAGKSTAKKLLSSYWQD-GKSGAR 153
H09             SVRYITDPDTPDSYYNQLVLQFFDLKLTSTSENK--RQSGREIAHHVLDYLDWGEGEREKE 152
                : * * * . . . : : : * . : * * * . : * . * . . : * : * :

```

```

Dprecursor      AYIVLSIPDLNHYKLITGFKETLKSEGHPELMDKVGHDHDFSG-----NDAIGDVGNAVYKKA 207
SmaseDprecursor AYIVLSIPNLAHYKLITGFKETLKTTEGHPPELMEKVGYDFSG-----NDNIDQVANAYKKA 222
Plprecursor     AYIVLSIPDLNHYPLIKGFKDQLTKDGHPPELMEKVGHDHDFSG-----NDDIGDVGKAYKKA 217
toxin           AYIVLSIPDLNHYPLIKGFKDQLTKDGHPPELMDKVGHDHDFSG-----NDDIGDVGKAYKKA 208
P2precursor     AYIVLSIPDLNHYPLIKGFKDQLTQDGHPELMDKVGHDHDFSG-----NDAIGDVGNAVYKKA 224
sphingomyelinaseI
isoform3        AYVVLSPDLIGHYEFVRGFKFVLLKKEGHEDLLEKVGYDFSGPYLPSLPTLDATHEAYKKA 212
protein-likeI   AYIVLSLETITRPNFISGFRDAIKASGHEELFEKIGWDFSG-----NEDLGEIRRVYQKY 208
protein-likeDII AYIVLSLETITRPNFISGFRDAIKASGHEELFEKIGWDFSG-----NEDLGEIRRVYQKY 208
Slikeprotein    AYIVLSLETITRQDFISGFKDAIDASGHTELYEKIGWDFSG-----NEDLGEIRRIYQKY 208
H09             IRVVIYFEKLEEKDVILGFMDVFKLRNQTSLRDLVGFDDGGT-----GNISDIARMFSKF 206
                *: : : . . : * * : : . : . . : * * . . : . . : *
Dprecursor      GVTGHVWQSDGITNCLLRG-LSRVKEAVKNRDSSN-GFINKVYYWTVDKRATTREALDAG 265
SmaseDprecursor GVTGHVWQSDGITNCLLRG-LDRVKAVANRDSSN-GYINKVYYWTVDKRQSTKNALDAG 280
Plprecursor     GITGHIWQSDGITNCLPRG-LSRVNAAVANRDSAN-GFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAG 275
toxin           GITGHIWQSDGITNCLPRG-LSRVNAAVANRDSAN-GFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAG 266
P2precursor     GISGHVWQSDGITNCLLRG-LDRVKQATANRDSAN-GFINKVYYWTVDKRATTREALDAG 282
sphingomyelinaseI
isoform3        GVDGHIWLSDLTNFSPGLDMARLKEAIKSRDSAN-GFINKIYYWSVDKVVSTTKAALDVG 271
protein-likeI   GIEDHIWQGDGITNCLPRG-DYRLTEAMKKKNDPNYKYLKVVYTWSIDKESSIRNALRLG 267
protein-likeDII GIEDHIWQGDGITNCLPRG-DYRLTEAMKKKNDPNYKYLKVVYTWSIDKESSIRNALRLG 267
Slikeprotein    GIDDHIWQGDGITNCWVRD-DDRLKEAIKKKNDPNYKYLKVVYTWSIDKNASIRNALRLG 267
H09             NIKDNIWLGDGATNCEPFKSFVRLKNAIDNRDSRK-GFVSKIYQWTNDIKTTMMRSLRLG 265
                . : . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Dprecursor      VDGVMTNYPDVI TDVLNESAYKAKFRIATYDDNPWETFKN- 305
SmaseDprecursor VDGIMPNYPDVIADVPNESAYKAKFRIASYDDNPWETFKN- 320
Plprecursor     VDGIMTNYPDVI TDVLNEAAYKKKFRVATYDDNPWVTFKK- 315
toxin           VDGIMTNYPDVI TDVLNEAAYKKKFRVATYDENPWVTFKK- 306
P2precursor     VDGVMTNYPDVI TDVLNESAYKNKFRVASYEDNPWETFKN- 322
sphingomyelinaseI
isoform3        VDGIMTNPVNLIGVLKESGYNDKYRLATYDDNPWETFKN- 311
protein-likeI   VDAVMTNYPARVKSILRESEFSGTHRMATYDDNPWQK---- 304
protein-likeDII VDAVMTNYPARVKSILRESEFSGTHRMATYDDNPWQK---- 304
Slikeprotein    VDAIMTNPEDVKDILQSEFSGYLRLMATYDDNPWVK---- 304
H09             VDGMITNKPERLLEVLQEPFAKDFRLATYDDPFYFCDE 306
                ** . : . * * : : . * : * : * : * : * : * : * : *

```

Figura 10. Resultado do alinhamento feito pelo programa CLUSTAL W

4.7 Análise Filogenética

Os resultados da árvore filogenética (Figura 11) feita pelo programa MEGA3 para análise da proximidade de seqüências resíduos de aminoácidos de esfingomielinases de *Loxosceles sp* e a proteína H09, usando o algoritmo Maximum Parsimony, com 10000 replicações, esta apresentou maior proximidade e alto índice (97) de similaridade com as proteínas P1 precursor, P2 precursor além da toxina dermonecrótica, as três descritas e *L intermédia*.

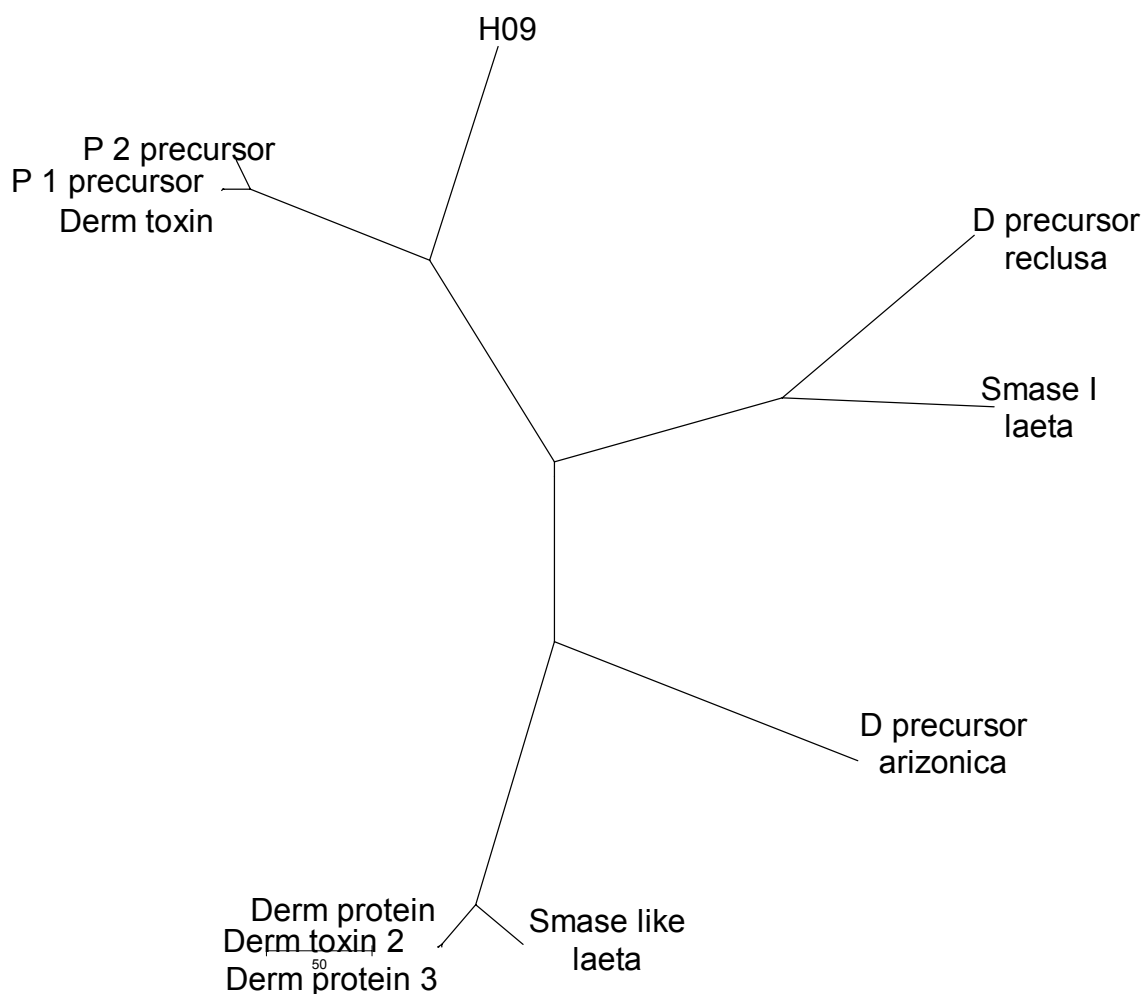


Figura 11. Árvore filogenética feita pelo programa MEGA3 na análise de seqüências de resíduos de aminoácidos de esfingomielinases-D usando o algoritmo: Maximum Parsimony, com 10000 replicações.

4.8 Predição da função da proteína H09

O Plot (Figura 12) obtido a partir do programa Plot3D usando seqüências de resíduos de aminoácidos de esfingomielinases do GenBank (pontos amarelos) e defensinas do Swiss-prot (pontos azuis) e H09 (ponto amarelo) levando em consideração a massa molecular (MM), o ponto isoelétrico (PI) e o momento hidrofóbico (HM), dessas proteínas demonstrou que a seqüência da proteína H09 situou-se no vértice dos dois grupos, sugerindo uma função de defesa.

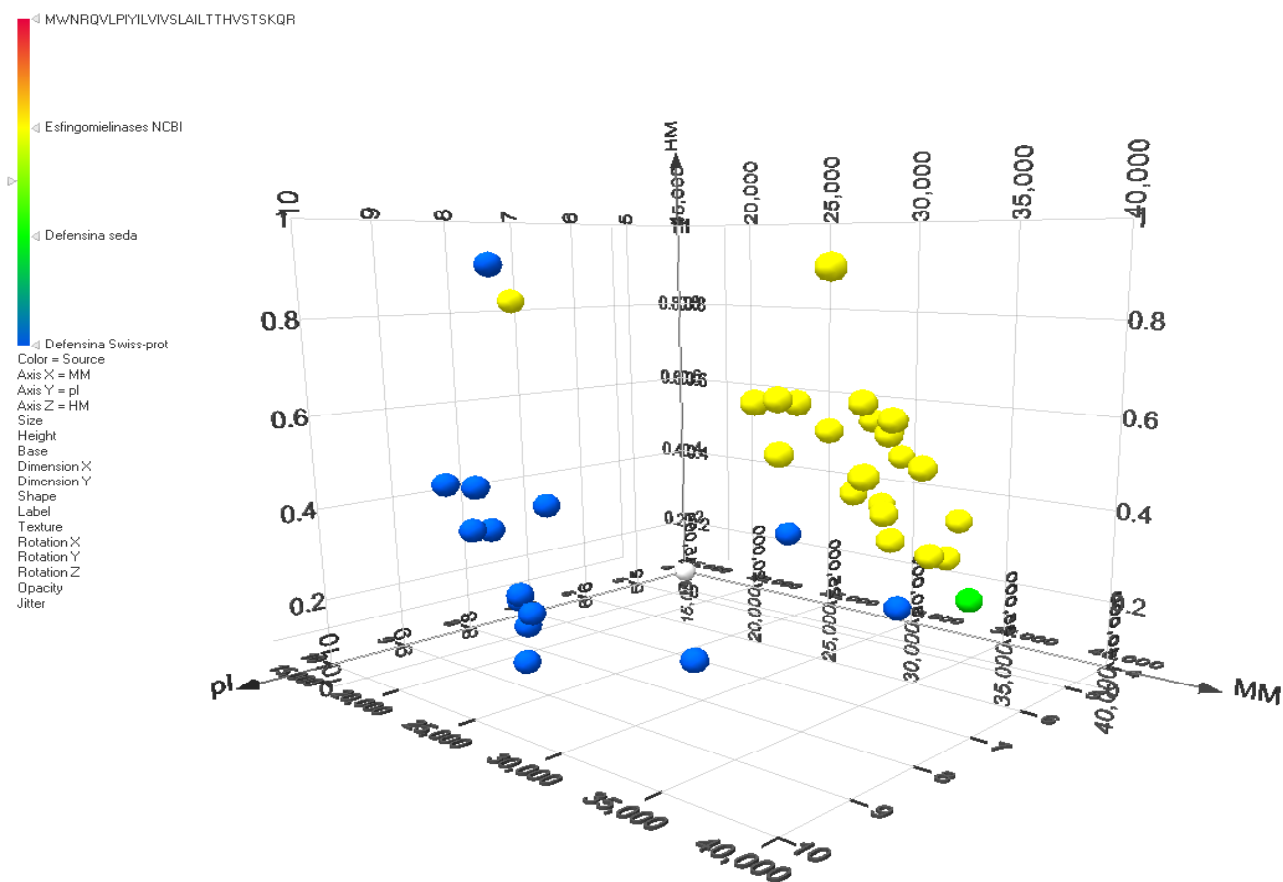


Figura 12. Plot obtido com seqüências de esfingomielinases-D e defensinas do GenBank levou em consideração a massa molecular, o PI (ponto isoelétrico) e o momento hidrofóbico, para o cálculo deste último foi utilizada a escala CCS. O ponto verde é a seqüência da proteína H09, os pontos amarelos são seqüências de esfingomielinases-D e os pontos azuis são seqüências de defensinas.

4.9 Confirmação da transcrição do mRNA do clone H09

4.9.1 “Northern Blot”

A transcrição do mRNA correspondente ao clone H09 foi confirmada por meio de “Northern Blot” nas glândulas da seda e do veneno de *Nephilengys cruentata* usando RNA total. A sonda utilizada neste experimento foi obtida a partir da seqüência codificante do gene do clone H09 da biblioteca de cDNA da glândula da seda. Na figura 13A é apresentada um gel de agarose 1% exibindo as bandas do RNA total das glândulas da seda e do veneno de *Nephilengys cruentata*. Na figura 13B é mostrado um “Northern Blot”. Nos poços 1 e 5 foram aplicadas amostras da glândula da seda e nos poços 2 e 6 amostras da glândula do veneno. De acordo com a revelação na figura 13B somente houve hibridização nos poços com RNA da glândula da seda, indicando que há expressão desse gene somente nesta glândula.

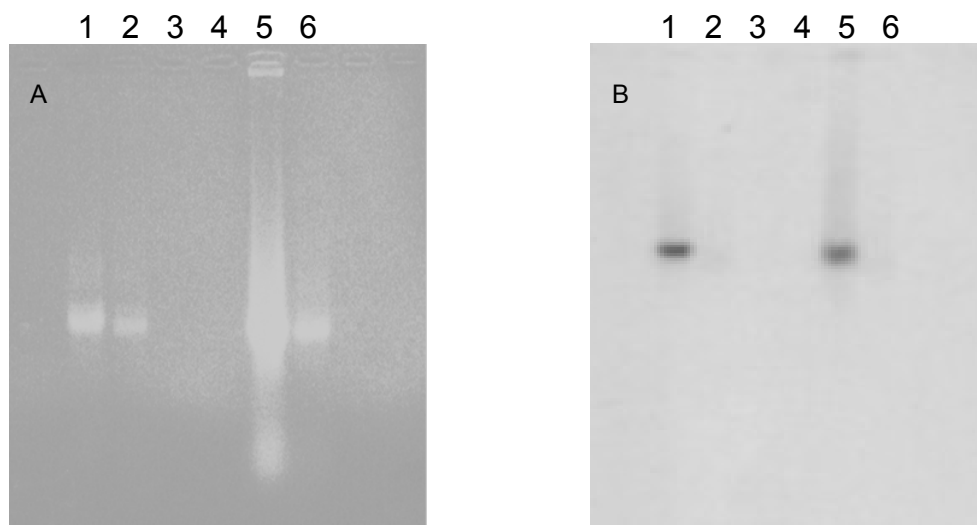


Figura 13. Análise por “Northern Blot” do RNA total das glândulas da seda e do veneno da aranha *Nephilengys cruentata* utilizando sondas provenientes da seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da seda marcadas radiativamente. Gel de agarose 1% (A) e “Northern Blot” (B); Poço 1: total da glândula da seda; poço 2: RNA total da glândula do veneno; poço 3: branco; poço 4: branco; poço 5: total da glândula da seda; poço 6: RNA total da glândula do veneno.

4.9.2 RT-PCR

O resultado da análise por RT-PCR do RNA total das glândulas da seda e do veneno da aranha *Nephilengys cruentata* (Figura 14) utilizando iniciadores desenhados a partir da seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da glândula da seda corrobora com o do “Northren Blot”. Nesta análise foi observada amplificação somente nas amostras referentes à glândula da seda (poço 3) e do próprio clone H09 (poço 2) o qual foi usado como controle positivo. Poço 1: 1Kb ladder clone H09; poço 3: RNA total da glândula da seda; poço 4: RNA total da glândula do veneno; poço 5: branco. O clone H09 foi utilizado como controle positivo da reação.

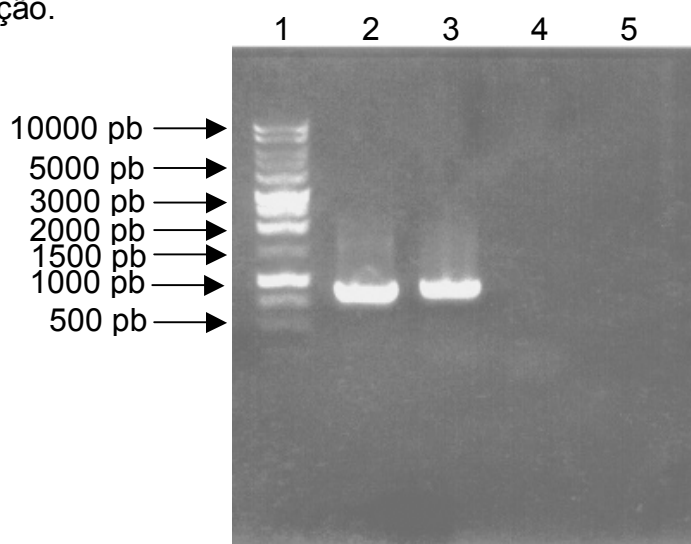


Figura 14. Análise por RT-PCR do RNA total das glândulas da seda e do veneno da aranha *Nephilengys cruentata* utilizando iniciadores desenhados a partir da seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da seda. Poço 1: 1Kb ladder (Promega®); poço 2: clone H09; poço 3: RNA total da glândula da seda; poço 4: RNA total da glândula do veneno; poço 5: branco.

4.10 Subclonagem da região codificante do gene H09 do vetor pSport1 para o vetor de expressão pET21a.

A estratégia de subclonagem da região codificante do gene H09 do vetor da biblioteca de cDNA da glândula da seda de *Nephilengys cruentata*, o vetor pSport1, para o vetor de expressão em *E. coli*, pET21a, por intermédio do desenho de iniciadores que adicionaram os sítios de clivagem de das enzimas *NotI* e *XhoI* nas extremidades do gene, está esquematizada na figura 15.

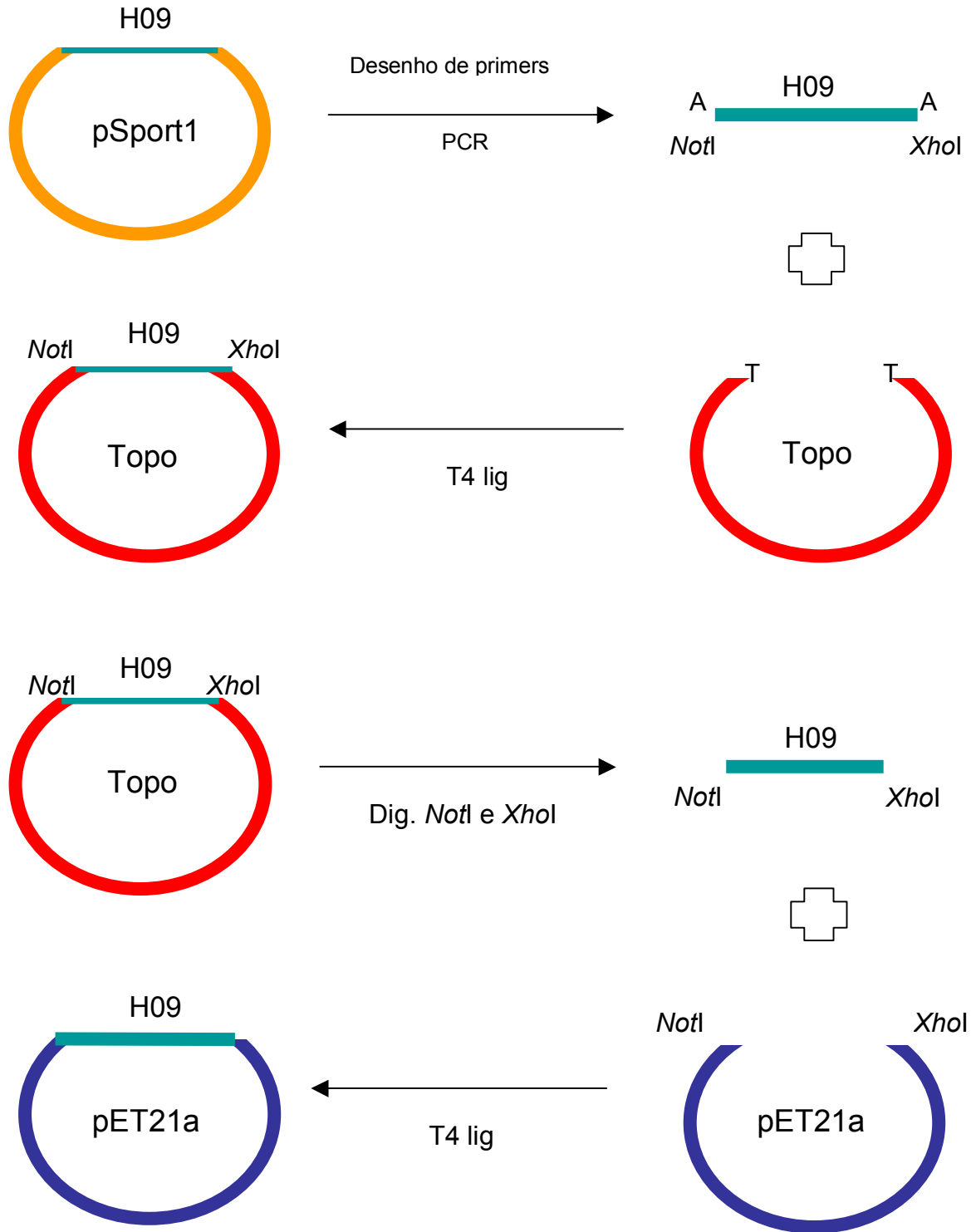


Figura 15. Esquema da clonagem da região codificante do gene H09 a partir do vetor da biblioteca de cDNA pSport1 por meio da amplificação com iniciadores que inseriram os sítios de *NotI* e *XhoI*, nas extremidades da seqüência, clonagem no vetor pCR2.1-TOPO, posterior digestão com estas enzimas tanto do vetor pCR2.1-TOPO contendo o fragmento amplificado como do vetor de expressão pET21a, e finalmente a ligação do fragmento com o vetor digerido.

4.11 Digestão com as enzimas de restrição *NotI* e *XhoI*

No resultado da digestão com as enzimas de restrição *NotI* e *XhoI*, do DNA plasmidial de culturas bacterianas transformadas com o controle negativo vetor pET21a e com pET21a/H09, os plasmídios que possuíam o inserto, quando digeridos liberavam um fragmento de 939 pb correspondente à região codificante do gene H09. No poço 1 está o marcador de massa molecular DNA Low mass (Invitrogen®) nos poços 2 e 3 os clones foram do controle negativo, os demais clones de pET21/H09. De acordo com a figura 16 os clones dos poços 5, 6 e 8 possuem o inserto.

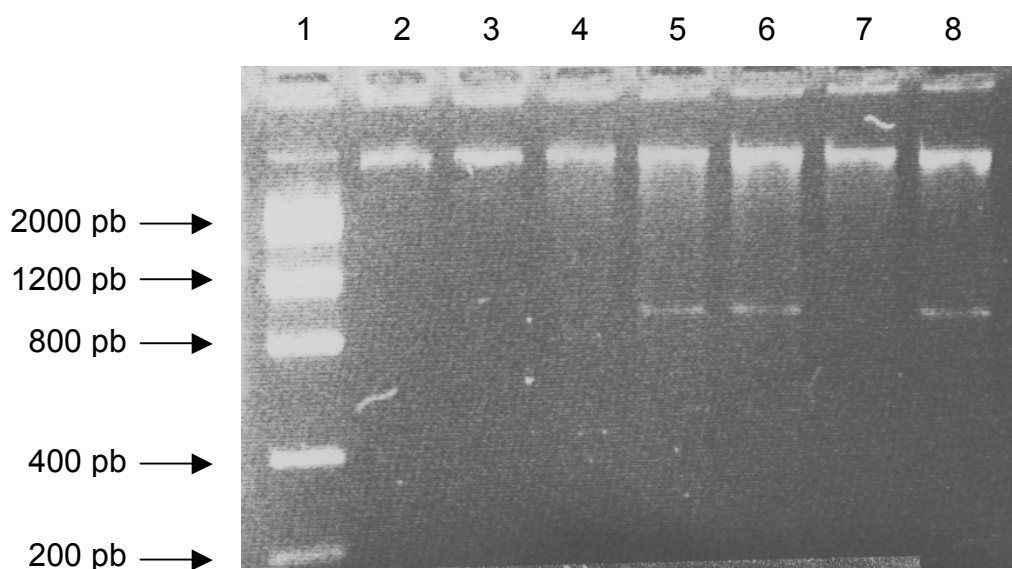


Figura 16. Gel de agarose (1%) da digestão com as enzimas de restrição *NotI* e *XhoI* do DNA plasmidial de culturas bacterianas transformadas com vetor pET21a e com pET21a/H09, a seqüência codificante do clone H09 da biblioteca de cDNA da seda da aranha *Nephilengys cruentata*. Poço 1: Low DNA mass; poço 2: pET21a; poço 3: pET 21a; poço 4: pET21a/H09; poço 5:pET21a/H09; poço 6: pET21a/H09; poço 7:pET21a/H09; poço 8: pET21a/H09.

4.12 Análise por PCR dos clones transformantes de pET 21a e pET21/H09

A confirmação da presença do inserto e checagem de contaminantes no controle negativo também foi feita pela técnica de PCR (Figura 17), utilizando os iniciadores desenhados com base na seqüência codificante do clone H09. Os quatro primeiros poços são das amostras do controle negativo, no quinto poço está o

marcador de massa molecular 1kb Plus (Promega®), no sexto, sétimo, oitavo e nono poços estão clones positivos, amplificaram um fragmento de 939 pb.

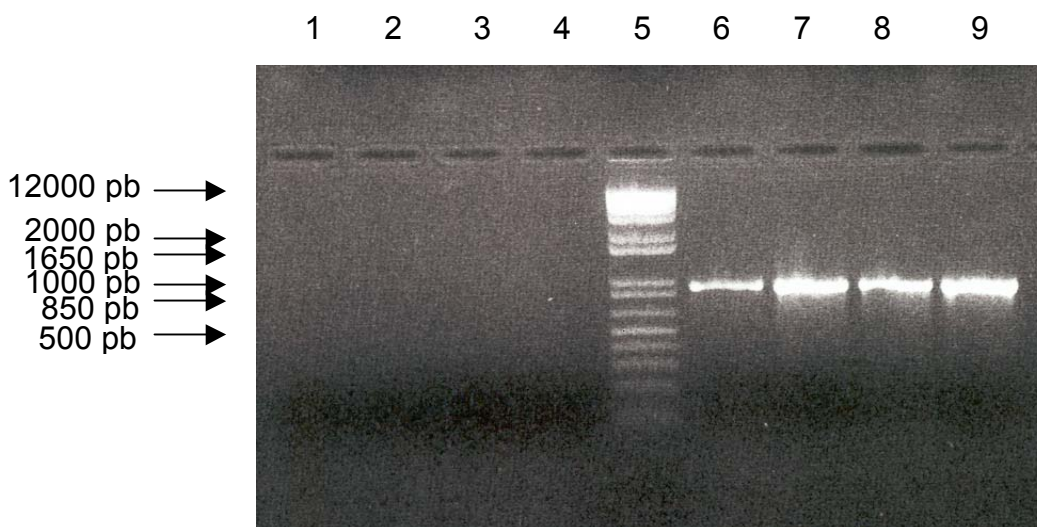


Figura 17. Gel de agarose (1%) da análise por PCR dos clones transformantes, poço 1-4:clone controle negativo; poço 5: 1kbPlus poço 6-9 clones transformantes positivos.

4.13 Detecção da proteína recombinante por reconhecimento da cauda de polihistidina.

Na análise via “Western blot” não foi possível detectar a presença da proteína recombinante na cultura bacteriana em nenhuma das variações cinéticas na indução. Pode ter havido uma atividade tóxica da proteína para o hospedeiro ou ocorrido diferença entre codons preferenciais da seqüência a ser expressa e da bactéria.

4.14 Análise de codons preferenciais

A comparação entre os codons preferenciais usados por *E. coli* e os usados na seqüência codificadora do clone H09 revelou que um dos codons mais freqüentes em H09, AGA, que aparece nove vezes dentro de uma seqüência de 307 resíduos de aminoácidos, é um codon raro em *E. coli*, CGA também é um codon raro em *E. coli* e está presente por seis vezes na seqüência, como evidenciado nas tabelas 3 e 4. Isto demonstra que há uma grande chance de ter havido problemas na tradução decorrentes da falta de tRNAs no momento da síntese da proteína recombinante.

4.14.1 Tabela 3. Codons Preferenciais de *Escherichia coli* B [gbbct]: 11 CDS's (3771 codons).

códon	%	N°	códon	%	N°	códon	%	N°	códon	%	N°
UUU	28,9	109	UCU	8,5	32	UAU	18,6	70	UGU	4,2	16
UUC	18,8	71	UCC	8,0	30	UAC	8,5	32	UGC	5,8	22
UUA	17,5	66	UCA	6,1	23	UAA	1,9	7	UGA	0,8	3
UUG	18,6	70	UCG	11,4	43	UAG	0,3	1	UGG	12,7	48
CUU	12,7	48	CCU	5,8	22	CAU	9,3	35	CGU	16,4	62
CUC	14,1	53	CCC	2,4	9	CAC	7,2	27	CGC	18,8	71
CUA	3,4	13	CCA	7,4	28	CAA	13,5	51	CGA	2,4	9
CUG	54,9	207	CCG	24,9	94	CAG	24,7	93	CGG	5,0	19
AUU	33,9	128	ACU	7,7	29	AAU	21,2	80	AGU	14,3	54
AUC	31	117	ACC	25,2	95	AAC	15,9	60	AGC	14,3	54
AUA	5,0	19	ACA	6,12	23	AAA	29,2	110	AGA	2,4	9
AUG	37,4	141	ACG	14,6	55	AAG	8,8	33	AGG	2,1	8
GUU	19,6	74	GCU	13,8	52	GAU	30	113	GGU	24,4	92
GUC	14,3	54	GCC	25,5	96	GAC	15,1	57	GGC	33,1	125
GUA	10,6	40	GCA	19,6	74	GAA	15,1	57	GGA	8,2	31
GUG	33,9	28	GCG	32,6	123	GAG	18	68	GGG	14,4	54

E:\pclab2\Codon usage ecolli.htm

4.14.2 Tabela 4. Codons Usados na seqüência codificante do clone H09

códon	%	N°	códon	%	N°	códon	%	N°	códon	%	N°
UUU	4,24	13	UCU	0,65	2	UAU	1,63	5	UGU	0,98	3
UUC	2,94	9	UCC	1,96	6	UAC	1,96	6	UGC	0,65	2
UUA	0,98	3	UCA	1,63	5	UAA	0,00	0	UGA	0,00	0
UUG	1,3	4	UCG	1,3	4	UAG	0,00	0	UGG	1,3	4
CUU	1,63	5	CCU	1,96	6	CAU	0,98	3	CGU	2,63	5
CUC	0,98	3	CCC	0,32	1	CAC	0,65	2	CGC	0,00	0
CUA	1,3	4	CCA	0,65	2	CAA	2,61	8	CGA	1,96	6
CUG	2,28	7	CCG	0,00	0	CAG	0,65	2	CGG	0,00	0
AUU	2,28	7	ACU	1,63	5	AAU	2,61	8	AGU	1,3	4
AUC	1,96	6	ACC	0,00	0	AAC	2,94	9	AGC	0,00	0
AUA	2,61	8	ACA	2,28	7	AAA	3,92	12	AGA	2,93	9
AUG	2,61	8	ACG	0,98	3	AAG	1,63	5	AGG	0,32	1
GUU	2,61	8	GCU	0,65	2	GAU	5,88	18	GGU	1,96	6
GUC	1,3	4	GCC	0,32	1	GAC	1,63	5	GGC	0,32	1
GUA	2,28	7	GCA	1,3	4	GAA	4,9	15	GGA	3,26	10
GUG	0,65	2	GCG	0,98	3	GAG	2,61	8	GGG	0,32	1

5. DISCUSSÃO

É importante notar o intrigante fato da identificação de um clone da biblioteca de cDNA da glândula da seda de *Nephilengys cruentata*, cuja proteína predita (denominada H09), ter apresentado identidade variando de 29 a 35% com uma proteína descrita na literatura em *Loxosceles sp* a esfingomielinase-D. Deve-se ainda ressaltar que esta proteína está presente na glândula do veneno de *Loxosceles sp* e é um componente do mesmo, ao contrário da proteína H09 que foi encontrada na glândula da seda. Finalmente é preciso destacar a distância anatômica dessas glândulas

Na análise de predição de peptídio sinal da proteína H09, a posição do provável sítio de clivagem, entre o resíduo de aminoácido 26 e 27, foi a mesma descrita por Pedrosa em 2005 na análise de uma esfingomielinase isolada de *Loxosceles laeta*.

De acordo com a análise realizada pelo programa Expasy, a proteína possui 307 resíduos de aminoácidos, com massa molecular predita de 35,7 kDa, pI teórico de 5,34. Do total de aminoácidos, 15% são carregados negativamente e 12,4% carregados positivamente, o que pode implicar na carga da total da proteína indicando que tipo de interação iônica é favorecida e com quais cargas ela possui maior afinidade, o que influencia diretamente na sua função.

Esfingolipídios foram descritos como alvos de drogas antimicrobianas e antifúngicas específicas que não apresentaram atividade sobre esfingolipídios de células animais e de plantas (Thevissen *et al.*, 2005). Com base nestes dados pode-se sugerir uma função de defesa como um agente antifúngico ou antimicrobiano para a proteína H09, uma vez que esta apresentou identidade com esfingomielinase, uma enzima que cliva esfingomielina, originando N-acylsfiningosídeo e ceramida (Cisar *et al.*, 1989).

Quanto a porcentagem de identidade entre a proteína H09 e as esfingomielinases do banco de dados, se forem considerados o maior valor de identidade entre a proteína H09 e as esfingomielinases de *Loxosceles* (35%) e o menor valor de identidade somente entre as mesmas (42%), estes valores não estão muito distantes, posto que a proteína H09 é proveniente de outra família de aranhas.

A comparação da seqüência de resíduos de aminoácidos da H09 mostrou não só um alinhamento semântico consistente (CLUSTAL W), mas também um enquadramento na árvore filogenética dessa classe de esfingomielinases-D. Isto demonstra que H09 esta filogeneticamente próxima dessas proteínas, mesmo sendo proveniente de gêneros distintos de aranhas.

Apresentou também uma proximidade na predição da função por meio de características físico-químicas, que levou em consideração a massa molecular, o pI e o momento hidrofóbico (Plot 3D), com essa classe de esfingomielinases-D e defensinas, situando-se no vértice dos dois grupos, reforçando a hipótese de uma função de defesa.

Os resultados do “Northern Blot” e da RT-PCR corroboram no sentido de indicar a presença da expressão do gene somente na glândula da seda e não na glândula do veneno da aranha *Nephilengys cruentata*, o que pode estar relacionado à necessidade de preservação da integridade física e estrutural da teia, defendendo-a contra agentes patogênicos. Pode ainda estar presente somente na glândula e não na seda, mas da mesma forma conferindo uma defesa natural posto que a principal função da seda é reprodutiva, na construção do estojo ovígero sedoso, o que é imprescindível para a perpetuação da espécie.

Para confirmação dessas hipóteses foi realizada a subclonagem do fragmento codificante do clone H09 no vetor de expressão em *E. coli*, confirmada por meio de PCR e digestão com enzimas de restrição. Seguiu-se da transformação de diferentes linhagens celulares e testes de variação na cinética da indução, contudo não foi possível a detecção da proteína recombinante.

5.1 Dificuldades de expressão em sistema *E. coli*

Como os resultados da cinética da indução da expressão do fragmento codificante do gene do clone H09 não foram conclusivos, pode ter havido uma atividade tóxica da proteína para o hospedeiro. No intuito de neutralizar uma possível toxicidade da proteína recombinante, foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) pLysS[®] desenvolvida especialmente para expressar proteínas recombinantes

tóxicas. Mesmo nessa linhagem não foi obtida a detecção da proteína pelo método de “Western blot”.

Outro problema que pode ter ocorrido é a diferença dos codons preferenciais da sequência a ser expressa e dos codons preferenciais da bactéria demonstrado neste estudo. Esta incompatibilidade de codons preferenciais entre o gene a ser expresso e o hospedeiro pode acarretar interrupção da transcrição, adição de aminoácidos errôneos, e uma tradução truncada. Para tentar eliminar essa hipótese foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21-CodonPlus[®], que contém genes adicionais desses codons raros em *E. coli*, mas mesmo nessa linhagem não foi detectada a proteína recombinante.

Pode ainda ter ocorrido algum problema no vetor de expressão, como a RNAPolimerase ter de passar por todo o múltiplo sítio de clonagem, que é rico em C e G, até chegar no códon inicial da sequência codificadora, o que pode estar dificultando o início da transcrição.

Pedrosa *et al.* em 2004 realizaram a clonagem e expressão de esfingomielinases P1 e P2 de *Loxosceles intermedia*, em vetor pSERT, purificaram em coluna de Ni-sefarose e testaram com sucesso a atividade das proteínas recombinantes, mostrando ser possível a expressão de esfingomielinases de *Loxosceles intermedia* em bactérias como sistema heterólogo. Devido ao fato de a proteína H09 ser proveniente de uma biblioteca de cDNA da glândula da seda de *Nephilengys cruentata*, esta proteína pode ser uma esfingomielinase que não cliva esfingomielina no sítio D, que é tóxico para células animais, mas talvez clive em outro sítio específico que seja, por exemplo, tóxica para membranas de fungos e bactérias. Posto que esfingolipídios foram descritos como alvos de drogas antimicrobianas e antifúngicas específicas, que não apresentaram atividade sobre esfingolipídios de células animais e de plantas (Thevissen *et al.*, 2005), nesse caso pode realmente haver um impedimento na expressão dessa proteína em sistema heterólogo bacteriano ou de levedura.

6. PERSPECTIVAS

1. Novas modificações nos parâmetros da cinética de indução; 1.1. diminuição do tempo de indução; 1.2. aumento da concentração de IPTG; 1.3. utilização do vetor de PLIS em célula PRIL.

2. Clonagem da seqüência codificadora do clone H09 em vetor de expressão em planta; 3. transformação para obtenção da proteína recombinante; 4. realização de testes de atividade *in vivo*; 5. purificação; 6. realização de testes de atividade *in vitro*. Viabilizando dessa forma a confirmação da hipótese dessa proteína clivar esfingomiéline e/ou ter atividade de defesa contra microorganismos.

7. BIBLIOGRAFIA

- Atkins J.A., Wingo C.W., Sodeman W.A. (1957) Probable cause of necrotic spider bite in the Midwest. *Science*; 126:73.
- Bagnat M., Keränen S., Shevchenko A., Schevchenko A., Simons K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(7),3254-3259.
- Barbaro K.C., Sousa M.V., Morthy L., Eichkstedt V.R.D., Mota I., (1996) Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles (Araneae)*. *J. Prot. Dhem.* 15, 337-344.
- Becker N., Oroudjev E., Mutz S., Cleveland J.P., Hansna P.K., Hayashi C.Y., Hansma H.G. (2003). *Nat. Mater* 2, 278.
- Benito B. (2002). Synthesizing spider silk. *Trends Biotechnol.* 20:189.
- Bernheimer A.W., Campbell B.J., Forrester L.J., (1985). Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Science* 228, 590–591.
- Bieberich E. (2004) Integration of glycosphingolipid metabolism and cell-fate decisions in cancer and stem cells: Review and Hypothesis. *Glycoconj.J.*, 21(6),315-327.
- Bindford G.J., Cordes M.H.J., Wells M.A. (2004) Sphingomyelinase-D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences e gene structure, *Toxicon* 45 547-560.
- Bindford G.J., Wells M.A., (2003) The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogygne spiders, *Comparative Biochemistry e Physiology Part B* 135 25–33.

- Candelas G.C., Candelas T., Ortiz A., Rodriguez O. (1983). Translation pauses during a spider fibroin synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116:1033-1038.
- Candelas G.C., Cintron J.J. (1981). A spider fibroin and its synthesis. *J.Exp. Zool.* 216:1-6.
- Candelas G.C., Lopez F. (1983). Synthesis of fibroin in the cultured glands of *Nephila clavipes*. *Comp. Biochem. Physiol.* 74:637-641.
- Cappello J., Crissman J., Dorman M. (1990). Genetic engineering of structural protein polymers. *Biotech.Prog.* 6:198 – 202.
- Chen X., Knight D.P., Shao Z., Vollrath F. (2002). Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved fourier transform infrared spectroscopy: Effect of potassium ions on *Nephila* spidroin films. *Biochemistry* 41:14944-14950.
- Cisar C.R., Fox J.W., Geren C.R. (1989); Screening a brown recluse library for the gene coding for the mammalian toxin using an oligonucleotide probe. *Toxicon* 27: 37-8.
- Coddington J., Levi H. (1991). Systematics and Evolution of Spiders (*Araneae*). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22:565-592.
- Colgin M.A., Lewis R.V. (1998). Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like 'spacer regions'. *Protein Sci.* 7:667-672.
- Craig C.L., Riekel C., Herberstein M.E., Webber R.S., Aplan D., Pierce N.E., (2000). Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders. *Mol. Biol. Evol.* 17:1904-1913.

- Cuevas W.A., Songer J.G., (1993). *Arcanobacterium heamoliticum* phospholipase D is genetically e functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Infect.Immun.* 61 (10), 4310–4316.
- Cunniff P.M., Fossey S.A., Auerbach M. A., (1994a). Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila clavipes*. *Poly. Adv. Technol.* 5:401-410.
- Cunniff P.M., Fossey S.A., Auerbach M.A., (1994b). Mechanical properties of major ampullate gland silk fibers extracted from *Nephila clavipes* spiders. In: Kaplan,D.L., Adams, W.W., Farmer, B., Viney, C. (Eds.). *Silk Polymers: Materials science and Biotechnology*, American Chemical Society Symposium Series, 544,pp. 234-251.
- Denny M.W. (1980) In: *Mechanical properties of biological materials*. Vincent L, Curry M (eds) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 247-272.
- Dicko C., Vollrath F., Kenney J.M. (2004). Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. *Biomacromolecules* 5:704-710.
- Fahnestock S.R., Bedzyk L.A. (1997). Production of synthetic spider dragline silk prote in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:23-32.
- Gosline J.M., Guerette P.A., Ortlepp C.S., Savage K.N. (1999). The Mechanical Desig of Spider Silks: From Fibrion Sequence to Mechanical Function. *Journal of Experimental Biology*, v. 202, p. 3295-3303.
- Hayashi C.Y., Blackledge T.A., Lewis R.V. (2004). Molecular e mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. *Mol. Biol. Evol.* 21:1950-1959.

- Hayashi C.Y., Shipley N.H., Lewis R.V. (1999) Hypotheses that correlate the sequence, structure, e mechanical properties of spider silks proteins. *Int J Biol Macromol* 24 : 271-275.
- Kang W.J., Cho S.S., Huh H., Chung D.T (1997). Identification of dynamic behavior of sheet metals for an auto-body with tension split Hopkinson bar. *Trans. KSME* 21:2209-2219.
- Kang W.J., Cho S.S., Huh H., Chung D.T. (1999). Modified Johnson-Cook model for dynamic behaviour of sheet metals for auto-body Crash-worthiness. *Int. J. Vehicle Design*, 21:424-435.
- Kaplan D.L., Adams W.W., Viney C., Farmer B.L. (1994) *Silk Polymers: Material Science e Biotechnology*. 1-370. American Chemical Society Books, Washington)
- .
- Kaplan D.L., Mello C. M., Arcidiacono S., Fossey S., Senecal K., Muller W., (1998). Silk. In: McGrath, K., Kaplan. D. L. (Eds.), *Protein Based Materials*. Birkhauser, Boston.
- Ko F.K., Jovicic J., (2004). Modelling of mechanical properties and structural design of spider web. *Biomacromolecules* 5:780-785.
- Kurpiewski G.L., Forrester J., Barrett J.T., Campbell B.J., (1981). Platelet aggregation e sphingomyelinase D activity of apurified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim.Biophys. Acta* 678, 467–476.
- Lay F.T., Anderson M.A. (2005). Defensins-components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.*,6(1), 85-101.
- Lewis R.V., Hinman M., Kothakota S., Fournier M.J. (1996). Expression and purification of a spider silk proteins: A new strategy for producing repetitive proteins. *Express. Prif* 4:400-406.

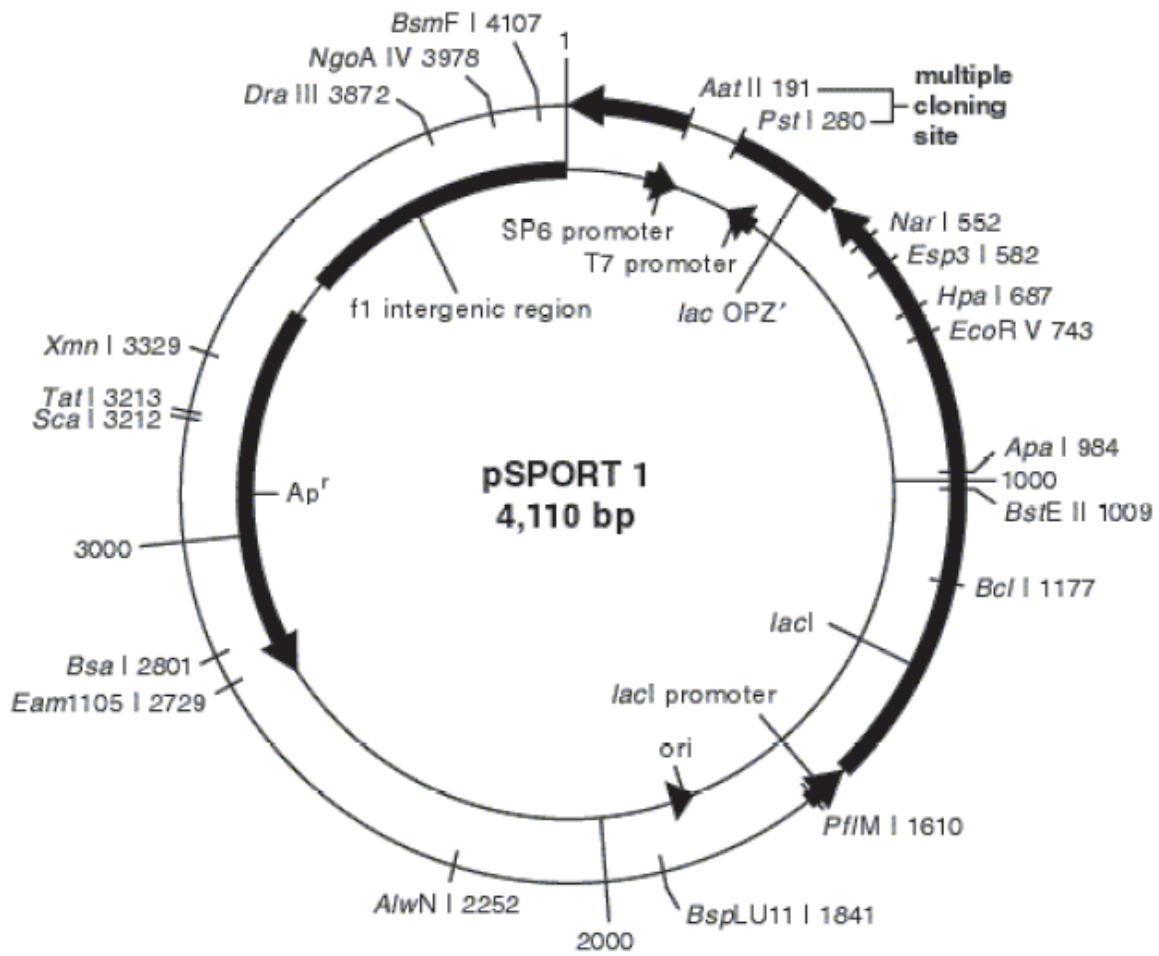
- Lombardi S.J., Kaplan D.L. (1990). The amino acid composition of major ampullate gland silk (dragline) of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae). *J. Arachnol.* 18:297-306.
- Maceyka M., Payne S.G., Milstien S., Spiegel S. (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1585(2-3), 193-201.
- Málaque C.M.S., Ori M., Santos S.A., Andrade D.R. (1999). Production of TNF- α by primary cultures of human keratinocytes challenged with *Loxosceles guacho* venom. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 41(3).
- Martin S.W., Konopka J.B. (2004) Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, 3(3),675-684.
- McNamara P.J., Cuevas W.A., Songer J.G. (1995). Toxicphospholipases-D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C.ulcerans* e *Arcanobacterium haemolyticum-cloning* and sequence homology. *Gene* 156, 113–118.
- Mello C.M., Senecal K., Yeung B., Vouros P., Kaplan D.L. (1994). Initial characterization of *Nephila clavipes* dragline protein. In: Kaplan D. L., Adams W.W., Farmer B., Viney C., (Eds.) *Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*. American Chemical Society Symposium Series, 1994.
- Metchnikoff E. (1887). Sur la lutte des cellules de l'organismes contre l'invasion des microbes. *Annales Inst Pasteur Paris* 1: 321.
- Motta P.C., Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (61) 3307-2265 ramal 23, 2006; (comunicação pessoal).

- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi, D.V., Arni, R.K. (2005) Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases d *J.Biol.Chem.* v280 pp.13658-13664 ,
- Obeid L.M., Hannun Y.A. (2003) Ceramide, stress, and a “LAG” in aging. *Sci. Aging Knowledge Environ.*,39, PE 27.
- Pedrosa M.F.F., Azevedo I.L.J., Andrade R.M.G., van den Berg C., Ramos C.R.R., Ho P.L., Tambourgi D.V. (2004), Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles Laeta* venom, *Bio. And Bio. Res. Com.* 298, 638-645.
- Pedrosa M.F.F., (2005), Clonagem e Expressão Funcional de Fatores Dermonecróticos e Hemolíticos do Veneno da Aranha *Loxosceles laeta* Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.
- Peng C., Dong C., Hou Q., Zhao J. (2005) The hydrophobic surface of PaAMP from pokeweed seeds is essential to its interaction with fungal membrane lipids and the antifungal activity *FEBS Lett.*, Apr 25;579(11):2445-50.
- Rising A., Nimmervoll H., Grip S., Arias A.F., Storckenfeldt E., Knight D.P., Vollrath F., Engström W. (2005). Spider Silk Proteins-Mechanical Property e Gene Sequence. *Zoological Science*, v. 22, p. 273-281.
- Sams H.H., Dunnick C.A., Smith M.L., King L.Jr.,. (2001). Necrotic Arachnidism. *J. Am. Acad Dermatol.* 44(4),561-73.
- Scheibel T. (2004) Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb. Cell Fact.* 3:14.

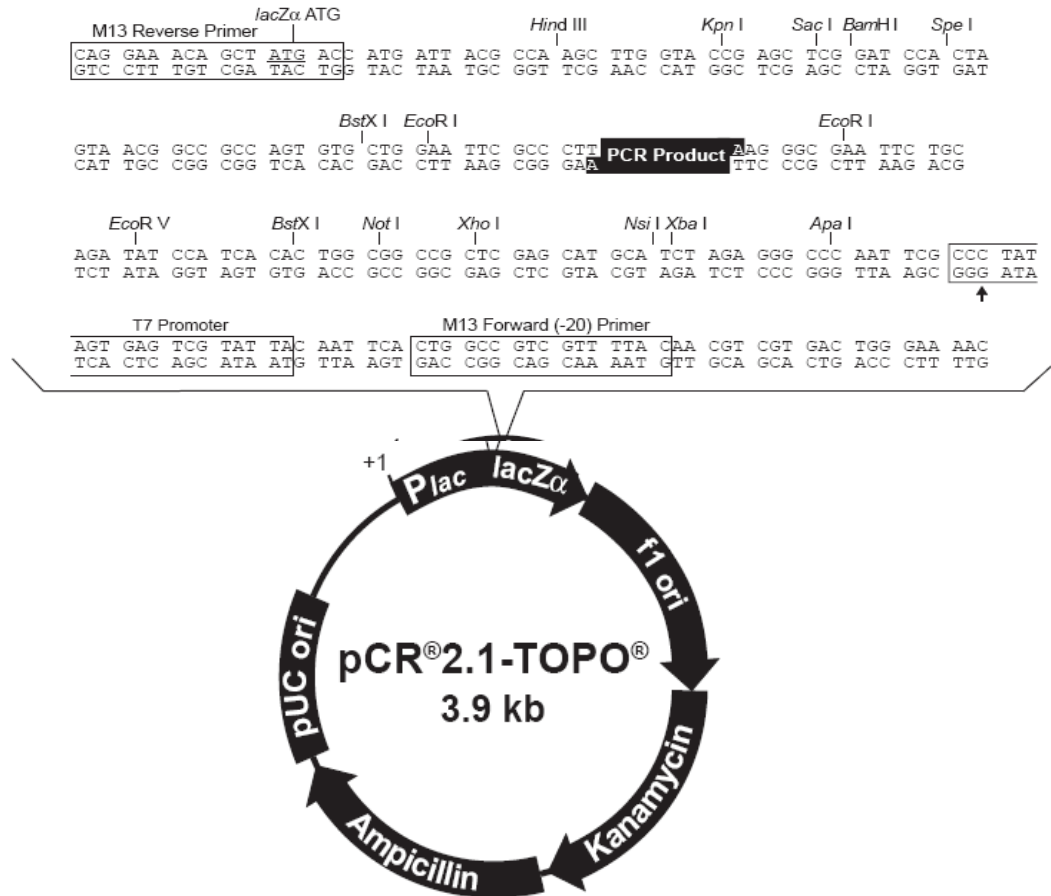
- Schenone H., Saavedra T., Rojas A., Villarroel (1989) Loxoscelimo in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies, Rev. Inst. Med. Trop, (São Paulo) 31, 403-415.
- Sims K.J., Spassieva S.D., Voit E.O., Obeid L.M. (2004). Yeast Sphingolipid metabolism: clues and connections. Biochem. Cell Biol., 82(1), 45-61.
- Stock S.D., Hama H., Radding J.A., Young D.A., Takemoto J.Y. (2004). Syringomycin E inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*: Requirement for biosynthesis of sphingolipids with very-long-chain fatty acids and mannose- and phosphoinositol-containing head groups Antimicrob. Agents Chemother., 44(5), 1174-1180.
- Thevissen K., Warnecke D.C., François I.E., Leipelt M., Heinz E., Ott C., Zahringer U., Thomma B.P., Feket K.K., Cammue B.P.J. (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. J. Biol.Chem., 279(6), 3900-3905.
- Thevissen K., Feket K.K., François I.E., Cammue B.P. (2003). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. Peptides, 24(11), 1705-1712.
- Thevissen K., Cammue B.P.A., Lemaire K., Winderickx J., Dickson R.C., Lester R.L., Feket K.K.A., Van Even F., Parret A.H.A., Broekaert W.F. (2000). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 97 (17),9531-9536.
- Thevissen K., Terras F.R.G., Broekaert W.F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. Appl. Environ. Microbiol., 65(12), 5451-5458.
- Thevissen K., I.E.J.A. François, A.M. Alberts and B.P.A. Cammue (2005) Fungal Sphingolipids as Targets for the Development of Selective Antifungal Therapeutics, Current Drug Targets, 6, 923-928.

- Thomma B.P.H.J., Cammue B.P.A., Thevissen K. (2003). Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr. Drug Target Infect. Disord.*,3(1), 1-8.
- Truett III A.P., King J.L.E. (1993). Sphingomyelinase D: a pathogenic agent produced by bacteria e arthropods. *Adv.Lipid Res.* 26, 275–291.
- Vollrath F. (1999). Biology of spider silk. *Int. J. Biol. Macromol.* 24:81-88.
- Wasserman G.S., Anderson P.C. (1983) Loxoscelism e necrotic arachnidism, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 21 451-472.
- Work R.W., Young C.T. (1987). The amino-acid compositions of major and minor ampullate silks of certain orb-web-building spiders (Araneae, Araneidae). *J. Arachnol.* 15:65-80.

Anexo 1



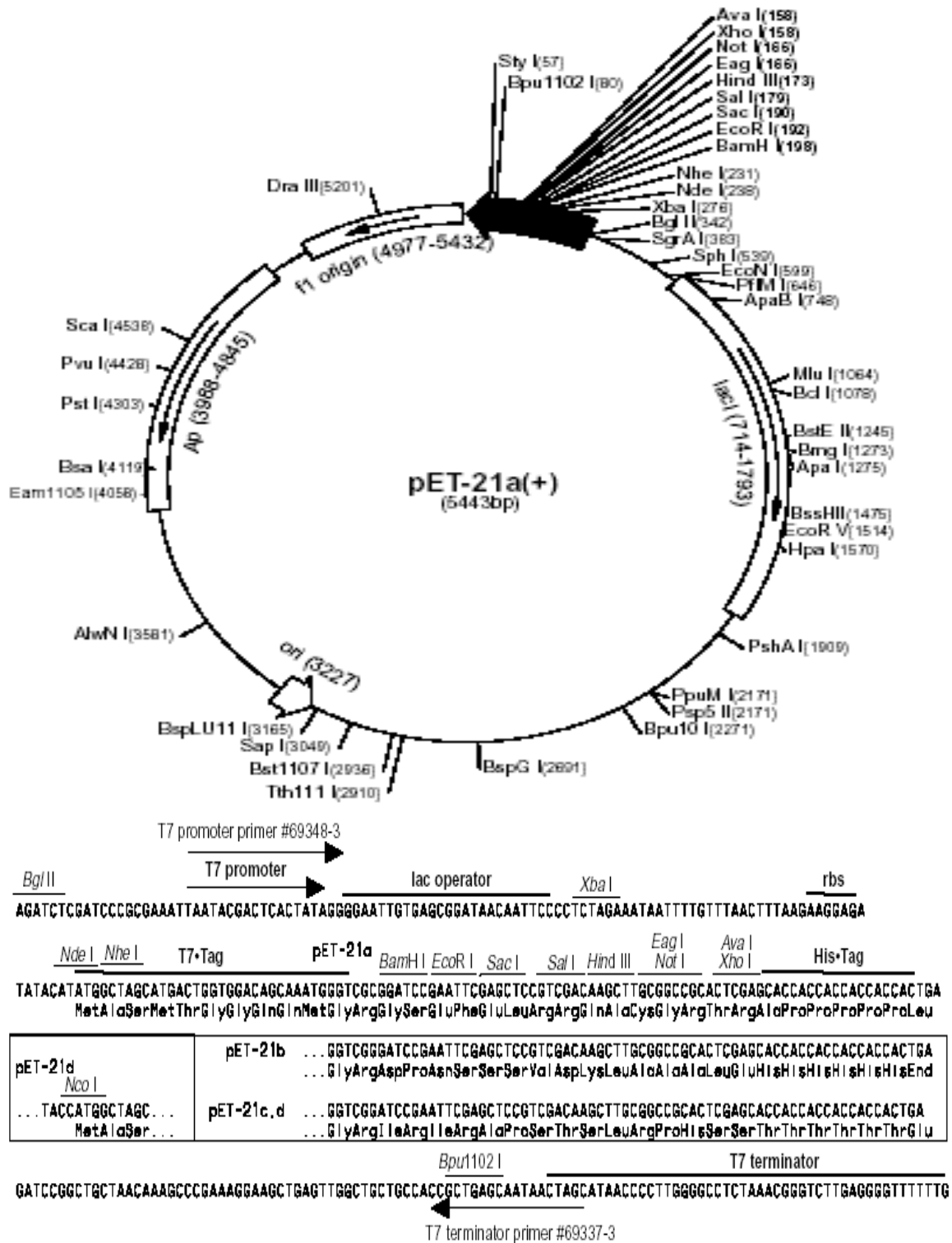
Anexo 2



Comments for pCR®2.1-TOPO® 3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-357
 T7 promoter/priming site: bases 364-383
 M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
 f1 origin: bases 548-985
 Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
 Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
 pUC origin: bases 3136-3809

Anexo 3



pET-21a-d(+) cloning/expression region

Anexo 4

3.11. Soluções para eletroforese em gel de agarose

3.11.1. Tampão de amostra 5X Glicerol : 50,0% (v/v); azul de bromofenol : 0,2% (p/v); solvente TBE : 2,5X, Estocar a 4°C.

3.11.2. Tampão de corrida para gel de agarose (TBE) 5X Ácido bórico : 27,5 g; EDTA 0,5M (pH 8,0) : 20 mL; H₂O destilada qsp : 1 l, pH 8,3.

3.11.3. Solução de brometo de etídio 20.000X Brometo de etídio: 5 mg/mL.

Anexo 5

3.20. Meios de cultura para bactérias

3.20.1. Meio LB (Luria-Bertani) – Baixa concentração de sal Peptona de caseína: 1,0% (p/v); extrato de levedura; 0,5% (p/v); NaCl: 0,5% (p/v); pH ajustado para 7,0 com NaOH.

3.20.2. Meio LB (Luria-Bertani) Peptona de caseína: 1,0% (p/v); extrato de levedura: 0,5% (p/v); NaCl : 1,0% (p/v); pH ajustado para 7,0 com NaOH.

3.20.3 Meio 2XYT Peptona de caseína: 1,6% (p/v); extrato de levedura: 1,0% (p/v); NaCl: 0,5% (p/v); pH ajustado para 7,0 com NaOH.

Para meio de cultura de bactéria sólido, foi adicionado agar bacteriológico a 1,5% (p/v).

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura utilizados foram autoclavados a 120°C por 20 minutos. Quando necessário foram adicionados os antibióticos apropriados, nas seguintes concentrações: ampicilina 100 ou 150 µg/mL, e cloranfenicol 15 µg/mL.

3.41. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

3.41.1. 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.

3.41.2. Tampão para gel separador Tris-HCl: 1,5 M. pH 8,8.

3.41.3. Tampão para gel concentrador Tris-HCl: 1,0 M. pH 6,8.

3.41.4. SDS (Sódio dodecil sulfato) SDS: 10% (p/v).

3.5 Solução de persulfato de amônio (APS) Persulfato de amônio: 10% (p/v).

3.41.6. TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina) Foi utilizado o reagente TEMED da companhia Organic Research.

3.41.7. Gel Separador 12% H₂O 3,200 mL; Ac/Bis ac 30% 4,000 mL; Tris-HCl 1,5M (pH 8,8) 2,532 mL, SDS 10% (p/v) 0,100 mL; APS 10% (p/v) 0,050 mL; TEMED 0,005 mL. Volume final 10 mL

3.41.8. Gel Concentrador 5% H₂O 1,400 mL; Ac/Bis ac 30% 0,415 mL; Tris-HCl 1M (pH 6,8) 0,630 mL; SDS 10% (p/v) 0,025 mL; APS 10% (p/v) 0,025 mL TEMED 0,0025 mL Volume final 2,5 mL

3.41.9. Tampão de amostra 2X Tris-HCl (pH 6,8) : 200 mM; SDS: 4% (p/v); β-mercaptoetanol: 4% (v/v); Glicerol: 20% (v/v); Azul de bromofenol: 0,1% (p/v). Preparar alíquotas de 1 mL e estocar a -20°C.

3.41.10. Tampão de corrida 5X Trizima base: 125 mM; Glicina: 0,96 M; SDS: 0,5% (p/v).

3.41.11. Comassie Blue: Solução corante para gel de poliacrilamida (100 mL) PBS: 80 mL; Ferricianato de potássio (50 mM): 10 mL; MgCl₂ (1 M): 0,2 mL.

4.42. Soluções e materiais para imuno-deteccção

4.42.1. Tampão de transferência pH 8,3 Triz base: 5.82g (48mM); Glicina: 2.93g (39mM); SDS: 0,375 g; Metanol: 200mL; H₂O qsp 1 l.

4.42.2. TBS (Tampão Tris salina) NaCl: 150 mM; NaHPO₄: 10 mM; NaN₂: 0,005%; pH ajustado para 7,4 com NaOH.

4.42.3. TBST (Tampão Tris salina Tween) TBS com 0,1% Tween 20.

4.42.4. Membrana de PVDF (polyvinilidene difluorine) Membrana 0,2 µm PVDF (Invitrogen®).

4.42.5. Solução de bloqueio Leite em pó desnatado (Molico®): 5% (p/v), diluído em TBST.

4.42.6. Tampão de ensaio Tris (pH 9,8) 20mM, Cl Mg 1mM.

4.42.7. Solução de trabalho Tampão de diluição 9,4 mL, substrato concentrado 1mL e enhancer 0,5 (Applied Biosystems®).

KODAK Biomax Xar Film®.

4.42.8. Anticorpos “Anti-Polyhistidine” (Sigma®), produzido em coelho. “Anti-Rabbit IgG” (Sigma®), conjugado com fosfatase alcalina, produzido em cabra.



rech@cenargen.embrapa.br

Palavras-chave: *Nephilengys*, esfingomielinases, veneno, aranha

Madeira, IM; Vinecky, F; Souto, BM; Carvalho, DM; Leite, APF; Vianna, GR; Da Silva, FR; Aragão, FJL; DafreSilva Jr, P; Andrade, AC; Rech, E.

Núcleo de Biotecnologia, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, CEP 70770-900, Brasília, DF. ¹ Universidade de São Paulo, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-900, São Paulo, SP. Laboratório de Artópodes - Instituto Butantan, Avenida Vital-Brazil, 1500 - Butantã, São Paulo - São Paulo - Brasil, CEP 05503-900

Caracterização de uma SMAseD-like isolada da glândula da seda de *Nephilengys cruentata*

As aranhas do gênero *Loxosceles* são responsáveis pela maior parte dos acidentes com aracnídeos no Brasil, diagnosticados principalmente nas regiões Sul e Sudeste. O veneno destas aranhas causa lesão dermonecrotica e induz hemólise intravascular dependente de complemento, configurando um quadro clínico de intensa gravidade, também conhecido como loxocelismo. Estudos recentes revelaram que uma esfingomielinase (SMAseI), isolada do veneno de *Loxosceles laeta*, é responsável pela maior parte dos efeitos patológicos decorrentes do envenenamento. Esfingomielinases (3.1.4.41) são esterases que catalizam a reação hidrolítica (esfingomielina + H₂O ⇌ fosfato de ceramida + colina). Inicialmente foi postulado que o fosfato de ceramida gerado pela atividade da SMAseI, seria o metabólito envolvido na indução das reações patológicas decorrentes do loxocelismo. Estudos recentes detectaram que SMAseI atua também como lipase e que o ácido lisofosfatídico pode ser o lipídeo mediador da resposta patológica. Para a nossa total surpresa, o resultado das análises de BLASTX das seqüências de ESTs produzidas no âmbito do Projeto “genoma da teia de aranha”, revelou que um dos clones de cDNA (Clone NP001-H09), apresentava alta similaridade de seqüência primária com as seqüências polipeptídicas de SMAseD de *Loxosceles* spp., presentes no banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov). A análise da sequencia total do clone NP001-H09, revelou uma molécula de cDNA de 1450 pb, codificando uma proteína de 307 a.a. A expressão do clone NP001-H09 foi analisada através de Northern Blot, contendo RNA total extraído de glândulas de teia e veneno, de aranhas *Nephilengys cruentata*. Visando-se determinar e comparar a atividade da SMAse isolada de *Nephilengys* s com a atividade de SMAse de outras aranhas, os trabalhos estão concentrados agora, na expressão heteróloga da proteína com vistas à sua purificação e caracterização funcional. ■

Apoio financeiro: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária