



Universidade de Brasília – UnB
Departamento de Biologia Celular

**Expressão e Purificação de Proteínas de
Glândulas Produtoras de Seda das Aranhas
Nephilengys cruentata e
*Avicularia juruensis***

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

Betúlia de Moraes Souto

Orientador: Elíbio Leopoldo Rech Filho

Coorientadora: Natalia Verza



Recursos Genéticos e
Biotecnologia



Brasília, Março de 2008

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à Ciência,
pela busca por um mundo cada vez melhor para todos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Elíbio, por ter me acolhido em seu laboratório e aceitado me orientar.

À Daniela, por ter iniciado este grande projeto e por estar sempre disposta a ajudar.

À Natalia, pela co-orientação e incentivos no início do trabalho. Além das importantes sugestões na escrita da dissertação.

Aos membros da banca, Dr. Francisco José Lima Aragão, Dr. Luciano Paulino da Silva e Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres por terem aceitado o meu convite. Obrigada pela participação e contribuições de vocês.

À querida Paula, pelo companheirismo e amizade. Obrigada por estar sempre do meu lado e ter passado por todas as dificuldades junto comigo.

Aos meus amigos Luisa, Larissa, Nadinni e Nicolau, sempre dispostos a amparar nos momentos difíceis e comemorar os felizes.

Aos Dr. Giovanni Vianna e Dr. Cristiano Lacorte, pesquisadores do Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela ajuda e sugestões.

Aos meus amigos do laboratório, Andréa, Bárbara, Maria Laine, Érica, Kenny, Gustavo, Aline, Fernanda, Júlia, Angélica, Renata, Thaís, Aisy, Sharon, Emanuel, Welcimar, Sérgio, Gabriela, Daniela, em especial a Elsa, que sempre ajudaram, mesmo que indiretamente.

Aos meus queridos amigos de todos os momentos, Augusta, Giovanna, Leandro, Marina, Johanna, Alexandre, Guilherme, Marcelo, Saulo e Júlio, por entenderem minha falta de tempo e pelo amor e carinho.

À minha amada mãe, por sempre estar ao meu lado, pelo amor e principalmente pelo exemplo de vida.

Ao meu pai e minhas irmãs, Bruna e Bárbara pelo companheirismo e pela presença em todos os momentos difíceis. Ao meu novo irmão Joaquim Pedro, que um dia poderá ler esse agradecimento.

À toda minha família, avós, avôs, tios, tias e primos que de certa forma estão ligados com minha caminhada pela vida.

Ao meu amor Hugo, por estar sempre me dando forças para continuar e finalizar mais uma etapa na minha vida. Muito obrigada! Te amo! E também à sua família, Nilson, Mara e Igor, por terem me acolhido.

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

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

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

A todos o meu muito obrigada!

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aranhas	1
1.1.1. <i>Nephilengys cruentata</i>	1
1.1.2. <i>Avicularia juruensis</i>	3
1.2. Sedas	4
1.2.1. Tipos de sedas	8
1.2.2. Características Moleculares das Sedas	15
1.2.3. Seda NCFlag-like da aranha <i>Nephilengys cruentata</i>	20
1.2.4. Proteína AJ Silk gland protein - 1 da aranha <i>Avicularia juruensis</i> ..	21
1.2.5. Polimerização da seda	21
1.3. Aplicações	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Materiais	28
3.1.1. Linhagens de células utilizadas	28
3.1.2. Vetores	28
3.1.3. Outros materiais	32
3.2. Métodos	33
3.2.1. Análise das seqüências	33
3.2.2. Elaboração das seqüências utilizadas para expressão	33
3.2.3. Construção dos Vetores de Expressão	36
3.2.4. Expressão	41
3.2.5. Detecção e análise das proteínas por “Western blot”	41
3.2.6. Purificação das Proteínas	42
3.2.7. Outros métodos	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Análise da seqüência AJSilk Gland Protein -1 da aranha <i>Avicularia juruensis</i>	44
4.2. Construção dos vetores para expressão de ECNCFlag-like	48
4.3. Construção dos vetores para expressão de ECAJ Silk Gland Protein-1 ..	51
4.4. Expressão das construções em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	52
4.5. Purificação das proteínas expressas	56
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	69
7. PERSPECTIVAS	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO I	80
ANEXO II	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Nephilengys cruentata</i> , fotografias de aranhas vivas.	2
Figura 2. Distribuição global da <i>Nephilengys cruentata</i> .	3
Figura 3. Foto de uma fêmea da aranha <i>Avicularia juruensis</i> .	4
Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura das sedas ampolada principal e secundária e flageliforme coletadas da aranha <i>Araneus diadematus</i> .	9
Figura 5. Esquema das glândulas produtoras de seda e suas respectivas utilidades.	10
Figura 6. Desenho esquemático da microestrutura da fibra da glândula ampolada principal.	12
Figura 7. Repetições consenso das seqüências das proteínas da teia.	16
Figura 8. Módulos estruturais encontrados nas proteínas de seda de aranha.	19
Figura 9. Esquema das seqüências consensos da seda Flageliforme de diferentes aranhas que produzem teias orbiculares.	20
Figura 10. Imagem lateral das fiandeiras da aranha <i>Nephilengys cruentata</i> .	22
Figura 11. Diagrama da glândula ampolada principal. As funções estão designadas à áreas específicas da glândula.	22
Figura 12. Fiandeira da seda linha de segurança.	23
Figura 13. Vetor pGEM-T Easy, utilizado na clonagem de fragmentos de PCR.	29
Figura 14. Vetor pJ204:10328 contendo a seqüência sintetizada pela “DNA 2.0” do espaçador (M3).	30
Figura 15. Vetor pJ244:10329 contendo a seqüência sintetizada pela “DNA 2.0” do módulo repetitivo M4.	30
Figura 16. Vetor de clonagem pBluescript SK- (pBSK-).	31
Figura 17. Vetor para expressão para <i>E. coli</i> pET-19b.	32
Figura 18. Seqüências dos módulos utilizados para engenharia modular.	35
Figura 19. Seqüência dos “primers” utilizados para amplificação da ECAJ Silk gland protein – 1.	35

Figura 20. Estratégia utilizada na construção dos vetores de expressão ECNCFlag, em <i>E. coli</i> .	38
Figura 21. Esquema mostrando os módulos M1, M2, M3 e M4 repetidos até quatro vezes colocados <i>in tandem</i> , formando sete diferentes vetores de expressão: pBSK- ECNCFlag1111, ECNCFlag2212, ECNCFlag2222, ECNCFlag3313, ECNCFlag3323, ECNCFlag4414 e ECNCFlag4424.	39
Figura 22. Desenho esquemático mostrando os sítios de restrições <i>Bam</i> HI e <i>Nde</i> I da seqüência ECAJ Silk Gland Protein – 1.	40
Figura 23. Alinhamento da seqüência AJ Silk Gland Protein – 1 com a Fibroína 2 de <i>Aptostichus</i> sp (ABW80564) realizado em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi .	44
Figura 24. Composição de aminoácidos de AJ Silk Gland Protein – 1.	45
Figura 25. Alinhamento da região C-terminal da proteína AJ Silk Gland Protein 1 com espidroínas descritas de espécies de aranhas Mygalomorphae.	46
Figura 26. Alinhamento da região N-terminal da proteína AJ Silk Gland Protein-1 com espidroínas descritas de espécies de aranhas Araneamorfes.	47
Figura 27. Comparação dos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (“molecular mass”) e Carga (“Charge”) das proteínas de glândulas produtoras de seda das aranhas <i>Nephilengys cruentata</i> (verde), <i>Parawixia bistrriata</i> (amarelo) e <i>Avicularia juruensis</i> (azul).	48
Figura 28. Gel de agarose 1,5%, mostrando os vetores pBSK- com os módulos 1, 2, 3 e 4 repetidos.	49
Figura 29. Gel de agarose 1%, mostrando os vetores pET19b ECNCFlag2212, ECNCFlag2222, ECNCFlag4414 e ECNCFlag4424.	50
Figura 30. Gel de agarose 1%, mostrando amplificação da seqüência ECAJ Silk Protein - 1 e vetor pGEM ECAJ Silk Protein – 1 digerido com <i>Nde</i> I e <i>Bam</i> HI.	51
Figura 31. Gel de agarose 1%, mostrando digestão parcial do vetor pGEM ECAJ Silk Gland Protein -1.	52
Figura 32. Resultado do “Western blot” das frações solúveis (Sol.) e do pellet insolúvel (Insol.) resultantes da expressão dos vetores pET19b-ECNCFlag2212, pET19b-ECNCFlag2222, pET19b-ECNCFlag4424 em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.	53
Figura 33. Resultado do “Western blot” das frações solúveis resultantes da expressão dos vetores pET19b-ECNCFlag1111, pET19b-ECNCFlag2212, pET19b-ECNCFlag2222, pET19b-ECNCFlag4414 e	54

pET19b-ECNCFlag4424 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Figura 34. Resultado do “Western blot” das frações solúveis e do pellet insolúvel resultantes das expressões do vetor pET19b-ECNCFlag2222 em 3 diferentes condições. 56

Figura 35. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das frações coletadas durante o teste I de purificação de pET19b-ECNCFlag 2222. 57

Figura 36. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das frações coletadas durante o teste II de purificação de pET19b-ECNCFlag 2222. 58

Figura 37. Resultado do “Western blot” das frações coletadas durante o teste II de purificação de pET19b-ECNCFlag 2222. 59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Comparação do uso que aranhas e insetos fazem das sedas.	5
Tabela 2. Comparação entre as propriedades mecânicas da seda de aranha e alguns materiais.	6
Tabela 3. Sedas da aranha <i>N. clavipes</i> e sua utilidade.	9
Tabela 4. Tamanhos dos mRNAs das sedas de <i>N. clavipes</i> .	16
Tabela 5. Tamanho em pares de bases dos fragmentos liberados na digestão dos vetores, com os módulos multiplicados, utilizando as enzimas de restrição <i>XhoI</i> e <i>BamHI</i>	49
Tabela 6. Comparação entre os pesos moleculares esperados (cálculo teórico) e os estimados em “Western blot” para as construções de ECNCFlag.	54
Tabela 7. Enzimas de restrição utilizadas.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcSp1	Espridoína aciniforme 1 (aciniform spridoin 1)
ADF-1	Fibroína 1 de <i>Araneus diadematus</i>
ADF-2	Fibroína 2 de <i>Araneus diadematus</i>
ADF-3	Fibroína 3 de <i>Araneus diadematus</i>
ADF-4	Fibroína 4 de <i>Araneus diadematus</i>
Amp	ampicilina
cDNA	DNA complementar produzido a partir de um RNA mensageiro.
DNA	ácido desoxirribonucléico
Flag	Seda da glândula flageliforme das aranhas
g	gramas
GGX	Motivo repetitivo de aminoácidos: Glicina-Glicina-X (X=Leucina, Tirosina, Serina ou Alanina)
GPGXX	Motivo repetitivo de aminoácidos: Glicina-Prolina-Glicina – X-X (X= Glicina, Tirosina, Serina, Alanina ou Glutamina)
HFIP	hexafluoroisopropanol
His	histidina
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kb	milhar(es) de par(es) de base(s)
kDa	kilodalton(s)
<i>Lac-Z</i>	gene que codifica a enzima β -galactosidase
LB	Lúria-Bertani, meio rico para cultivo de microorganismos
MaSp1	Seda da glândula ampolada principal da aranha (“Major ampollate spridoin 1”)
MaSp2	Seda da glândula ampolada principal da aranha (“Major ampollate spridoin 2”)
mg	miligrama
MiSp1	Seda da glândula ampolada principal da aranha (“Minor ampollate spridoin 1”)
MiSp2	Seda da glândula ampolada principal da aranha (“Minor ampollate spridoin 1”)

mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
μL	microlitro
pb	par(es) de base(s)
pBSK-	vetor de clonagem pBluescript SK- (pBSK-) produzido pela Stratagene
PCR	reação em cadeia da polimerase
pET19b	plasmídeo para expressão por meio da T7 RNA polimerase
pJ	série de vetores produzidos pela empresa “DNA 2.0”
poli-Ala	poli-Alanina
RNA	ácido ribonucléico
RO	Rondônia
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	“Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis” (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS)
TBST	Tris-Buffered Saline + Tween 20
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4cloro-3indolil-β-D-galactosídeo

RESUMO

Sedas são compostos protéicos secretadas por glândulas especializadas encontradas em diferentes grupos de artrópodes. Aranhas produzem uma diversidade de fibras, que são predominantemente compostas por proteínas repetitivas (espidroínas), codificadas por uma família multigênica. A caracterização dessa família está focada em espidroínas sintetizadas por espécies de Araneomorphae (aranhas verdadeiras), enquanto poucas seqüências de Mygalomorphae (tarântulas) são conhecidas. Sedas formam uma família diversa de materiais naturais com extraordinárias propriedades mecânicas, como resistência e extensibilidade, além da biocompatibilidade demonstrada. A possibilidade de produzir novos biomateriais com propriedades similares às das espidroínas levou à inúmeros estudos dessas proteínas. Apesar das potenciais características mecânicas, a inabilidade de domesticar as aranhas para produzir quantidades suficientes de proteínas conduziu ao desenvolvimento de estratégias alternativas para a produção das sedas utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Proteínas com resistência e elasticidade definidas podem ser produzidas utilizando engenharia genética de maneira a misturar os módulos repetitivos em proporções específicas, produzindo biomateriais com grande potencial para uso na medicina e engenharia. Este trabalho envolve a expressão recombinante de seda de aranhas em *Escherichia coli*, por meio da manipulação genética de genes isolados das glândulas produtoras de seda das espécies *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae) e *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae). A proteína AJSilk Gland Protein – 1 de *A. juruensis* identificada neste trabalho pode ajudar no melhor entendimento da diversidade e evolução da família de genes das espidroínas. Além disso, genes sintéticos foram construídos para codificar um análogo à Flag-like de *N. cruentata*. Esses genes artificiais foram obtidos por meio de uma estratégia controlada, usada para proteínas repetitivas compostas por diferentes unidades repetitivas *in tandem*. Resultados de análises por SDS-PAGE e “Western blot” e a purificação (em coluna de afinidade) demonstraram que as proteínas Flag recombinantes foram expressas com sucesso em microorganismos.

Palavras-chaves: aranhas, espidroínas, DNA recombinante, biopolímeros, seda Flageliforme, *Nephilengys cruentata* e *Avicularia juruensis*.

ABSTRACT

Silks are protein compounds secreted by specialized glands, and are found in different groups of arthropods. Spiders can produce a number of silk fibers (spidroins) that are predominately composed of repetitive amino acid modules encoded by a multigenic family. The characterization of this multigenic family has focused on spidroins synthesized by Araneomorphae species (true spiders), whereas only a few sequences are known from the Mygalomorphae species (tarantulas). Silks represent a diverse family of natural materials with extraordinary mechanical properties such as high tensile strength and extensibility, as well as a great biocompatibility. The possibility of producing new biomaterials properties similar to spidroins motivated this research. Despite their superior mechanical characteristics, the inability of domesticating spiders to produce enough protein for industrial applications had lead to alternative strategies for silk production, mainly through the recombinant DNA technology. By using genetic engineering approaches to mix the conserved and repetitive modules in specific proportions, proteins with defined strength and elasticity can be designed, and they may have many potential medical and engineering uses. This work involves the recombinant expression of spider silk proteins in *Escherichia coli* through the manipulation of silk genes isolated from glands of the Brazilian species *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae) and *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae). The protein AJSilk Gland Protein – 1 from *A. juruensis* was identified in this work and could enlighten some diversity and evolution issues of the spidroin multigenic family. In addition, synthetic genes were designed to encode analogs of the *N. cruentata* Flag-like gene. These artificial genes were constructed by using a controlled strategy to generate repetitive proteins composed of tandem different repeat units. The results of SDS-PAGE, Western blot analysis and the purification (using a affinity column) of the spider flagelliform recombinant proteins demonstrated that the strategy was successfully conducted to produce these spider proteins in microorganisms.

Keywords: spider, spidroins, recombinant DNA, biopolymers, Flagelliform silk, *Nephilengys cruentata* and *Avicularia juruensis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aranhas

As aranhas formam um grupo monofilético, cuja monofilia é apoiada pela presença de apêndices abdominais modificados, como fiandeiras, glândulas sericígenas (responsável pela produção da seda) e fúsculas. São animais artrópodes pertencentes à ordem Araneae da classe dos aracnídeos. A ordem Araneae é o segundo maior grupo dentre os aracnídeos (Foelix, 1996) e o sétimo dentre os artrópodes (Parker, 1982), com 40.024 espécies incluídas em 108 famílias (Platnick, 2008), sendo menor apenas do que a ordem Acari e cinco ordens de insetos, no que se refere ao número de espécies (Parker, 1982). A diversidade de espécies se deve, em grande parte, à capacidade das aranhas de produzir sedas durante sua vida como também à utilização especializada dos diferentes tipos produzidos. Das 108 famílias de aranhas encontradas no mundo, 67 são encontradas no Brasil (Brescovit *et al.*, 2002; Brescovit *et al.*, 2004).

Esta ordem é dividida em duas infraordens: Mesothelae e Opisthothelae. A primeira é constituída de aranhas com características mais parecidas com seus ancestrais, a exemplo do abdômen segmentado. O grupo Opisthothelae é constituído pelas aranhas Mygalomorphae (caranguejeiras e similares), que não constroem teias orbiculares e as Araneomorphae (aranhas verdadeiras), que constituem o grupo das aranhas tecedoras de teias orbiculares.

Os vetores de expressão construídos nesta dissertação foram baseados nas seqüências de cDNA de duas espécies de aranhas coletadas no Brasil. Uma pertencente à família Nephilidae (*Nephilengys cruentata*) e a outra à família Theraphosidae (*Avicularia juruensis*), que são pertencentes às subordens Araneomorphae e Mygalomorphae respectivamente.

1.1.1. *Nephilengys cruentata*

As espécies do gênero *Nephilengys* (Koch, 1872) são familiares para a maioria dos biólogos tropicais (Kuntner, 2007). Possuem um grande

dimorfismo sexual de tamanho, com fêmeas gigantes em relação aos machos, além de uma vívida coloração, tornando-as por isso importante objeto de estudo (Kuntner, 2007).

A espécie *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae) (Figura 1), utilizada neste estudo, é uma aranha arborícola, geralmente encontrada em residências construídas em São Paulo, Brasil (Chuck-Paim e Alonso, 2001). Os indivíduos utilizados na construção da biblioteca de cDNA foram coletadas na Mata Atlântica em São Paulo – Brasil (S 23o 33' 54" e W 46o 46' 09").

Sua distribuição pode ser observada na Figura 2, mostrando que esta já foi observada na África tropical e subtropical em uma limitada área da América do Sul: Brasil e Paraguai (Kuntner, 2007).



Figura 1. *Nephilengys cruentata*, fotografias de aranhas vivas. A – Macho copulando com uma fêmea de Adiepo Doume, Ivory Coast (foto por R.Jocque) (Kuntner, 2007); B – Fêmea coletada na Mata Atlântica em São Paulo – Brasil (S 23° 33' 54" e W 46° 46' 09") (foto por Felipe Rodrigues da Silva).

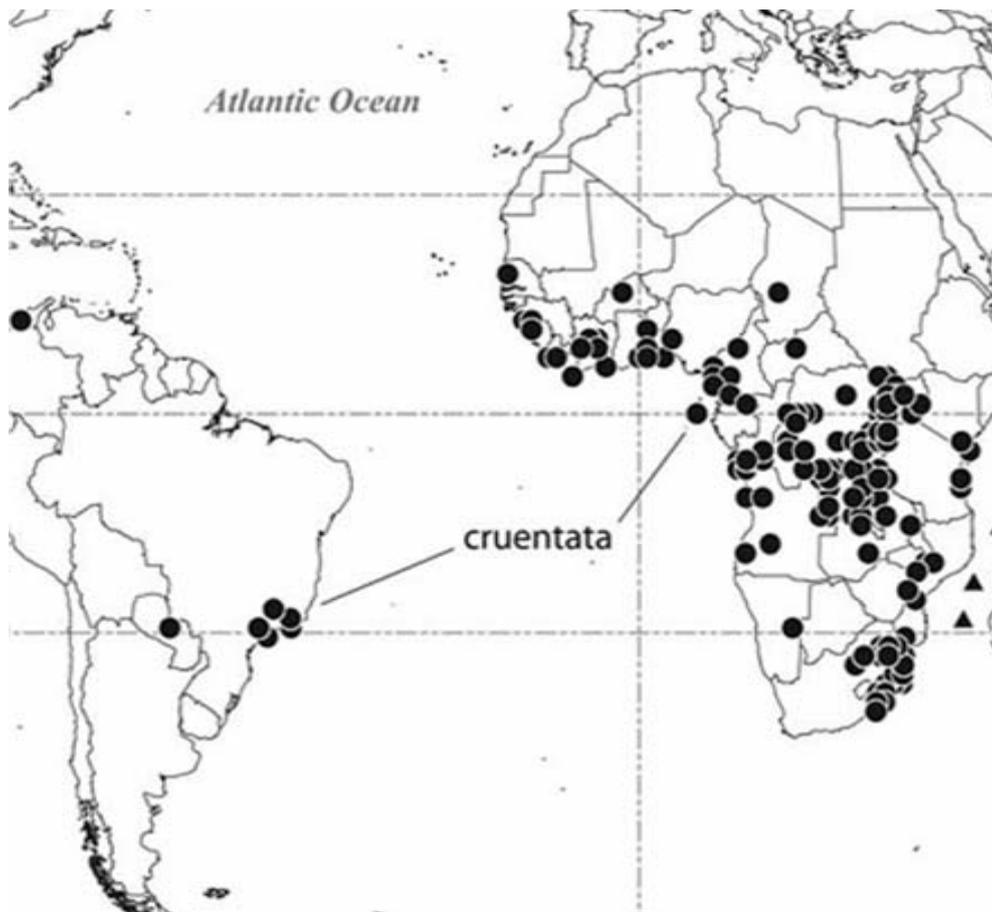


Figura 2. Distribuição global da *Nephilengys cruentata* de acordo com Kuntner (2007).

1.1.2. *Avicularia juruensis*

Avicularia juruensis (Mello-Leitão, 1923) (Figura 3) é uma aranha migalomorfa encontrada na região da Amazônia, Brasil e pertence à família Theraphosidae (Thorell, 1870). Os indivíduos utilizados neste trabalho foram coletados próximos à cidade de Monte Negro – Rondônia (RO) (S 10° 17' 40" e W 60° 19' 21"). Diferente das araneomorfas, as migalomorfas não produzem teias orbiculares, utilizando suas sedas apenas para construção de casulos e tocas.



Figura 3. Foto de uma fêmea da aranha *Avicularia juruensis*. (fonte: Guy Tansley – www.giantspiders.com).

1.2. Sedas

Sedas são produzidas somente por artrópodes e apenas por animais das classes Insecta, Arachnida e Myriapoda (Craig, 1997). Os insetos em conjunto, produzem diferentes tipos de sedas, sendo que cada espécie produz apenas um tipo – enquanto uma única aranha pode produzir até seis diferentes tipos de seda (Vollrath, 1992). Esses animais utilizam as sedas de diversas formas: construção de abrigos, reprodução, alimentação e dispersão (Craig, 2003).

A Tabela 1 a seguir contém a comparação do uso que aranhas e insetos fazem das sedas e evidencia a forma similar desse uso. A seda produzida por miriapodas (lacrãia, piolho-de-cobra) - ainda não caracterizada - é utilizada por machos, durante a reprodução (Craig, 2003).

Tabela 1. Comparação do uso que aranhas e insetos fazem das sedas.

Função	Exemplos para insetos	Exemplos para aranhas
Abrigos para proteção	Casulo de seda produzido por Lepidoptera	Sedas de abrigo produzido por aranhas
Suporte estrutural	Saco de seda com ovos produzidos por Neuroptera	Sacos de ovos produzidos por Araneidae
Reprodução	Restrição de movimento durante o acasalamento por Thysanoptera	Bolsa de esperma produzido por machos de aranhas
Busca por comida	Seda para captura de presas produzidas por Trichoptera	Teias para captura de presas produzidas por Araneidae
Dispersão	Dispersão da ninhada de Lepdoptera	Dispersão de juvenis de aranhas

Fonte: adaptada de Craig (2003).

Os chineses domesticaram o bicho da seda (*Bombyx mori*) há cerca de quatro mil anos, tendo em vista o uso de sua seda na indústria têxtil. Os casulos desses animais são compostos por dois filamentos contínuos de seda, fibroínas pesada (~ 350 kDa) e leve (~25 kDa), aderidos por meio de proteínas adesivas denominadas sericinas (Jin e Kaplan, 2003).

Diferente do bicho da seda, as aranhas não foram domesticadas para produzirem fibras em escala industrial. Essa diferença deve-se à dificuldade de se obter grandes populações de aranhas, devido a sua natureza solitária e predadora. Além disso, as sedas de aranhas são produzidas em pequena quantidade e não podem ser enoveladas como uma fibra simples, de forma semelhante ao que ocorre com o casulo do bicho da seda (Altman *et al.*, 2003). Entretanto, as características físicas das sedas de aranhas são muito superiores às encontradas nas sedas de *Bombyx mori*.

Constata-se que sedas de aranhas vêm despertando o interesse dos cientistas nos últimos 40 anos, conforme Xu e Lewis (1990), em especial via estudos sobre as várias propriedades mecânicas e físicas dessas sedas.

As sedas de aranhas são biomateriais leves, extremamente fortes e elásticas e apresentam características mecânicas comparáveis às melhores fibras sintéticas produzidas pela alta tecnologia (Hinman *et al.*, 2000). Os componentes das fibras são proteínas e no caso das aranhas são chamadas

de espidroínas. São secretadas por glândulas abdominais especializadas e utilizadas em diferentes combinações, que resultam em estruturas para captura de presas, reprodução, locomoção, entre outras funções. (Gosline *et al.*, 1986; Guerette *et al.*, 1996; Vollrath, 1992).

A Tabela 2 contém comparações das propriedades mecânicas de alguns tipos de sedas da espécie de aranha *Nephila clavipes* em relação a alguns materiais naturais ou sintéticos. Essa foi uma das primeiras espécies utilizadas como modelo para estudo, devido à facilidade de coleta e de extração da glândula produtora de seda (Hinman *et al.*, 2000).

Tabela 2. Comparação entre as propriedades mecânicas da seda de aranha e alguns materiais.

Seda	Resistência (N m ⁻²)	Elasticidade (%)	Energia para romper (J Kg ⁻¹)
Seda linha de segurança	4 x 10 ⁹	35	1 x 10 ⁵
Seda flageliforme	1 x 10 ⁹	>200	1 x 10 ⁵
Seda ampolada secundária	1 x 10 ⁹	5	3 x 10 ⁴
Kevlar®	4 x 10 ⁹	5	3 x 10 ⁴
Borracha	1 x 10 ⁹	600	8 x 10 ⁴
Tendão	1 x 10 ⁹	5	5 x 10 ³
Nylon, tipo 6	7 x 10 ⁹	200	6 x 10 ⁴

Fonte: adaptada de Hinman, *et al.* (2000).

Diversos trabalhos publicados comparam a seda de aranha com os materiais sintéticos mais resistentes, em especial com o Kevlar® (Gosline *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2004; Hinman *et al.*, 2000; Lewis, 2006; Li *et al.*, 1994). Esse constitui uma fibra de poliamida aromática produzida pela empresa “DuPont” e é considerada como uma inovação tecnológica. O Kevlar® – assim como a fibra mais resistente da aranha (seda linha de segurança) – é extremamente resistente e possui baixo peso molecular, por isso é de grande interesse para a indústria. Essa fibra sintética pode ser produzida de diferentes formas dependendo de sua aplicação, muitas vezes relacionada com a segurança – a exemplo de coletes a prova de balas, produtos resistentes à incêndio e abrigos contra furacões, tempestades e tornados. Nessa perspectiva

é possível que alguns materiais à base de biopolímeros de seda de aranha sejam desenvolvidos e encontrem grande aceitação e aplicabilidade

A produção em larga escala das fibras de aranhas tornaria possível a elaboração de uma nova geração de biomateriais com alto grau de biodegradabilidade, envolvendo aplicações práticas em diferentes segmentos do setor industrial. Mas a inabilidade de domesticar as aranhas, de forma a produzirem quantidades necessárias e suficientes de proteínas para propiciar estudos e utilização comercial, induziu ao desenvolvimento de estudos para se viabilizar a produção das proteínas dessa seda, em especial por meio de sistemas de expressões heterólogos.

A ciência tem investido na biomimetização do processo de produção de seda por aranhas em laboratório (Miao *et al.*, 2006). Mas a produção das proteínas da seda recombinantes tem sido complicada devido à natureza repetitiva dos genes, por serem seqüências ricas em G-C (guanidina-citosina), pelo grande tamanho desses genes e pelos códons preferenciais das aranhas (Huemmerich *et al.*, 2004). Essas dificuldades levaram à construção de genes sintéticos, com base nas seqüências de cDNA do bicho da seda (Capello *et al.*, 1990) e de aranha, (Arcidiacono *et al.*, 1998; Fahnstock e Irwin, 1997; Lewis *et al.*, 1996; Prince *et al.*, 1995) - clonados e expressos em sistemas procarióticos, como *Escherichia coli*. Mas os níveis de expressão dessas seqüências sintéticas ainda foram baixos. Na tentativa de melhorá-los, Fahnstock e Bedzyk (1997) utilizaram *Pichia pastoris*, levedura comumente utilizada para expressão de proteínas heterólogas, como organismo para expressão. Esses autores mostraram que *P. pastoris* - comparada a *E. coli* - é capaz de produzir uma maior quantidade de proteínas, além de ser mais eficiente na expressão de proteínas com maiores pesos moleculares. Apesar dos bons resultados, esses dois sistemas de expressão mostraram formações de proteínas truncadas.

Essas limitações levaram Scheller *et al.* (2001) a utilizarem plantas como biorreatores, que têm se mostrado um eficiente sistema de expressão para proteínas heterólogas. A seda de aranha foi expressa em folhas de tabaco e em tubérculos de batata, de forma mais satisfatória do que em *E. coli* e *P. pastoris* (Scheller *et al.*, 2001). Posteriormente, foram utilizadas *Arabidopsis* e soja (Barr *et al.*, 2004). Com a mesma finalidade, Lazaris *et al.*

(2002) analisaram a produção de proteínas de seda das aranhas *Nephila clavipes* e *Araneus diatematus*, em cultura de células MAC-T (bovino) e BHK (hamster).

Proteínas da seda também foram expressas em linhagens celulares do inseto *Spodoptera frugiperda* usando-se o sistema de expressão de baculovírus (Huemmerich *et al.*, 2004). Miao *et al.* (2006) utilizaram um sistema “Bac-to-Bac”, para expressar uma proteína de seda de aranha em linhagem de célula de *B. mori*. Esse mesmo grupo, utilizando a mesma estratégia produziu uma seda da aranha *Nephila clavata* em linhagens de células e na larva do inseto *B. mori* (Zhang *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços nos diversos sistemas de expressão, constata-se muitos trabalhos voltados para produção inicial da seda em *E. coli*, por ser o sistema mais antigo e desta forma mais conhecido e explorado (Balbás, 2001). Além disso, os protocolos de expressão são de simples execução e a produção em geral ocorre de forma rápida, o que facilita os estudos iniciais das características da proteína recombinante de interesse. Outro ponto positivo é que vários trabalhos estão voltados para otimização da expressão em *E. coli* (Hannig e Makrides, 1998). Devido a essas facilidades, o trabalho aqui descrito envolve a produção de proteínas em *E. coli*.

1.2.1. Tipos de sedas

Aranhas podem possuir até sete diferentes tipos de glândulas, cada uma produzindo um tipo de proteína - no caso, seis glândulas produzem sedas específicas enquanto uma produz um tipo de cola (Vollrath, 1992). Porém, não são conhecidas famílias de aranhas que possuam todos os sete tipos de glândula em um só indivíduo. Algumas aranhas podem usar as sedas de forma econômica, combinando tipos diferentes (Figura 4) para realizar suas tarefas como armadilhas e casulos (Huemmerich *et al.*, 2004). A Tabela 3 mostra os diferentes tipos de seda da *N. clavipes*.

O conhecimento das informações contidas em cada uma das seqüências de proteínas, associados à produção de determinado tipo de seda é de fundamental importância para o entendimento das relações estrutura-função (Kaplan *et al.*, 1994; Kaplan *et al.*, 1998).

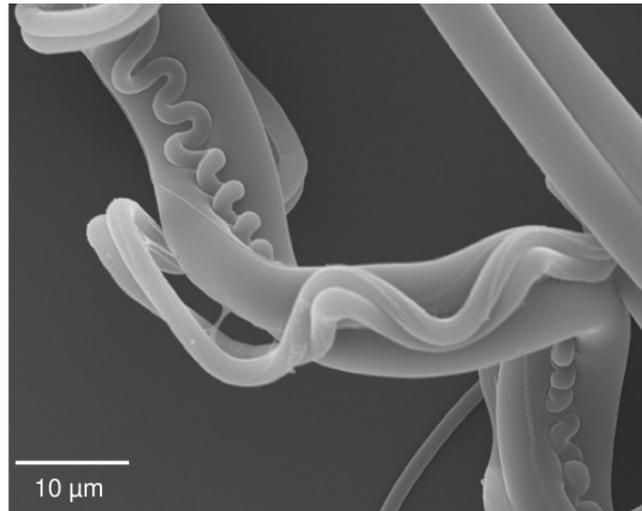


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura das sedas ampolada principal e secundária e flageliforme coletadas da aranha *Araneus diadematus* (Huemmerich *et al.*, 2004).

Tabela 3. Sedas da aranha *N. clavipes* e sua utilidade.

Seda	Utilidade	Fiandeira
Seda linha de segurança	Moldura estrutural e linha de segurança	Anterior
Seda ampolada menor	Reforço da teia	Medial
Seda flageliforme	Fios espirais da teia	Posterior
Agregata	Seda adesiva dos fios espirais	Anterior e Posterior
Tubuliforme ou Cilidrinca	Casulo	Posterior
Seda aciniforme	Encapsulamento das presas, construção do saco espermático e camada primária do saco de ovos	Anterior
Seda piriforme	Discos de adesão	Anterior

Fonte: adaptada de Hinman, *et al.* (2000).

Acredita-se que essas diferentes glândulas evoluíram a partir de um único tipo e se divergiram na anatomia, no conteúdo do lúmen e na morfologia (Vollrath, 1992). A Figura 5 mostra os diferentes tipos de glândulas e respectivas sedas da *Araneus diadematus*, uma das espécies de aranhas mais estudadas, face à facilidade de coleta e tamanho do abdômen.

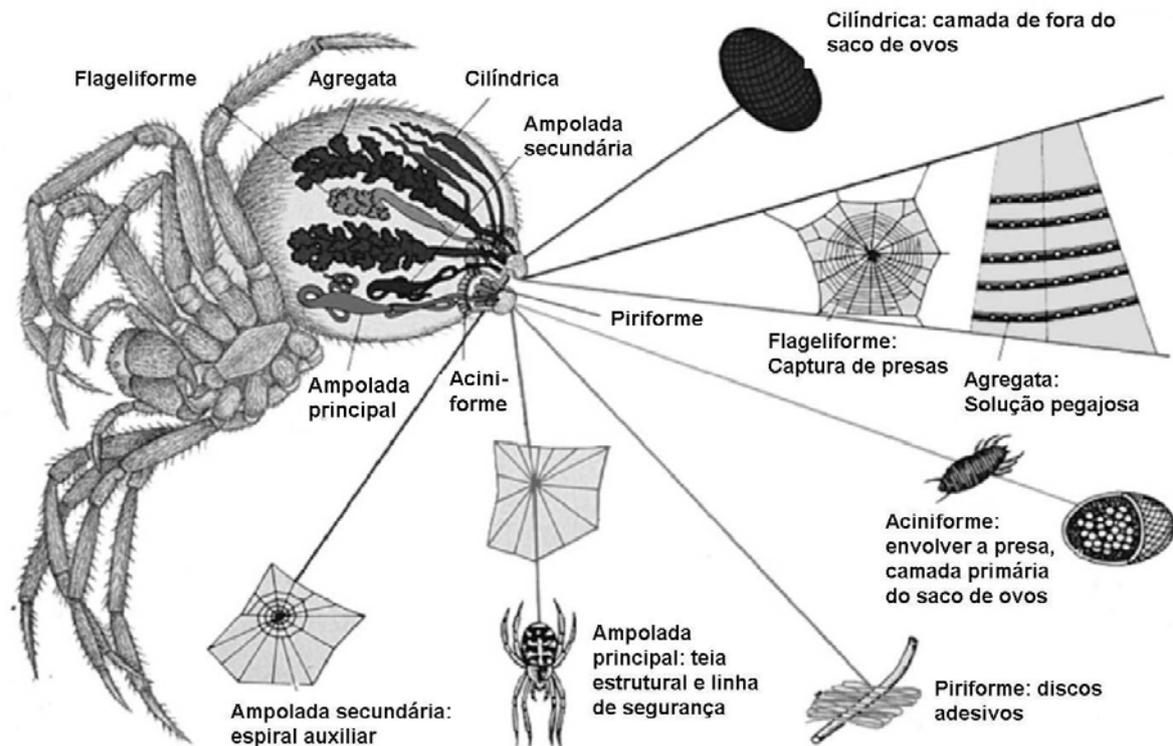


Figura 5. Esquema das glândulas produtoras de seda e suas respectivas utilidades (adaptada Vollrath, 2000).

Glândula Ampolada Principal

A fibra da ampolada principal (chamada linha de segurança ou “dragline”) é a mais estudada já que essa glândula é a mais volumosa no abdômen da aranha e sua forma de ampola faz com que seja fácil identificá-la e dissecá-la. Além disso, as propriedades físicas dessa seda são de grande interesse, como mostrado na Tabela 2.

Dentre as diferentes sedas produzidas pelas aranhas, a linha de segurança é extremamente rígida e possui propriedades mecânicas interessantes, tais como alta elasticidade e resistência à tensão (Denny, 1980; Stauffer *et al.*, 1994; Work, 1976). Ela é utilizada na fuga de predadores e como moldura para a construção das teias. Possui uma força tensora comparável ao Kevlar ($4 \times 10^9 \text{ N m}^{-2}$) e revela uma elasticidade de 35%, sendo, portanto, uma fibra extremamente forte (Work e Young, 1987).

A seda linha de segurança isolada das espécies *N. clavipes* e *A. diadematus* é a mais estudada entre todas as fibras sintetizadas por aranhas.

Essa seda é formada por dois tipos de proteínas - produzidas pela glândula ampolada principal - denominadas de MaSp1 e MaSp 2 (Major Ampullate Spidroin) na espécie *N. clavipes*, e ADF-3 e ADF-4 (*Araneus diadematus* Fibroin) na *A. diadematus* (Beckwitt *et al.*, 1998; Guerette *et al.*, 1996; Hinman e Lewis, 1992). Embora a natureza da interação entre esses dois tipos de proteínas não esteja identificada, o fato de ambas estarem sempre acopladas na linha de segurança, independente da espécie de aranha, indica que a associação entre as duas proteínas é conservada (Tian *et al.*, 2004).

As proteínas dessa glândula – ampolada principal – produzidas por espécies diferentes possuem composição muito semelhante. Em MaSp2 e ADF-3, por exemplo, glicina, alanina, prolina, serina e tirosina são responsáveis por 99% dos aminoácidos presentes em sua estrutura (Hayashi e Lewis, 1998). Gatesy *et al.* (2001) examinaram as seqüências de aminoácidos da espidroína, que constitui a teia linha de segurança, em 11 espécies de aranhas. O trabalho revelou alto grau de conservação entre as seqüências, e identificou um conjunto repetitivo de motivos. Além das considerações evolutivas, esses motivos repetitivos de aminoácidos contêm uma estrutura definida de componentes, com domínios ricos em alanina e glicina (poli-Alanina – poli-Ala e (Glicina-Alanina)_n – GA) e adotam uma estrutura em folhas- β responsável pela formação de cristais (Grubb e Ji, 1999; Hayashi e Lewis, 1998; Lucas, 1964; Parkhe *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1997; Riekel *et al.*, 2000) (Figura 6). Além disso, a região Glicina-Glicina-X (GGX) (X=leucina, tirosina, serina, alanina) forma 3_{10} -hélices que conectam os cristais de modo a estabilizar e orientar a estrutura da fibra (Tamburro *et al.*, 1991; Tatham e Shewry, 2000). Hipoteticamente, a base para a elasticidade da fibra deve ser a prolina presente no motivo Glicina-Prolina-Glicina-X-X (GPGXX) (X= glicina, tirosina, serina, alanina ou glutamina), considerado responsável por formar uma matriz móvel e amorfa (Dong *et al.*, 1991; Gosline *et al.*, 2002; Hayashi e Lewis, 1998). Esses motivos estruturais e repetitivos, em conjunto, são considerados os responsáveis pelas características mecânicas da fibra (Hayashi *et al.*, 1999, Rising *et al.*, 2005).

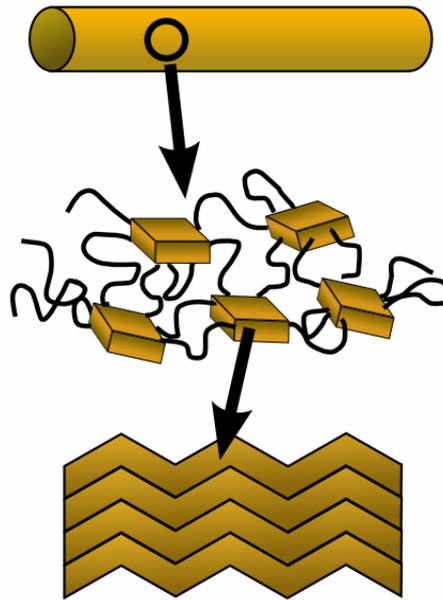


Figura 6. Desenho esquemático da microestrutura da fibra da glândula ampolada principal. Observa-se que dentro da fibra há regiões cristalizadas, formadas por folhas- β , separadas por ligações amorfas, criando um material nanoestruturado. (fonte: <http://www.answers.com/topic/spider-silk-microscopic-structure-png-1>). Glândula Ampolada Secundária

A Glândula Ampolada Secundária é produtora dos raios e da espiral auxiliar da teia em orbital. As curvas de tensão da seda da ampolada secundária (Tabela 2) indicam que ela possui cerca de um quarto da resistência da linha de segurança e a mesma elasticidade da fibra Kevlar® (Gosline *et al.*, 1999).

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

Glândula Flageliforme

A seda produzida pela flageliforme (Flag), focada neste trabalho, é extremamente elástica, o que facilita a captura de presas, sem que ocorra o rompimento do fio (Gosline *et al.*, 1999). Essa compõe a teia espiral de captura, que é a combinação do produto de duas glândulas: a fibra da glândula flageliforme e a cola da glândula agregata, caracterizando-se como a parte mais extensível da teia orbicular.

Testes mecânicos demonstraram que a seda resultante tem uma elasticidade superior a 200% (Tabela 2), um desempenho maior do que qualquer borracha natural (Hayashi *et al.*, 1999). A proteína Flag é composta por seqüências altamente repetitivas formadas pelos peptídeos (GPGXX)_n e GGX - separados por uma seqüência não repetitiva, conhecida como espaçador (composta por muitos aminoácidos carregados e hidrofílicos). Analisando-se sua seqüência, observa-se que a composição de motivos apóia os estudos mecânicos de que o pentapeptídeo GPGXX (em muitos casos, X sendo Q, que representa o aminoácido glutamina) é a base da elasticidade (Hayashi e Lewis, 1998).

Comparando com outras proteínas já descritas, GPGXX está relacionado com a estrutura secundária voltas-β (Hayashi *et al.*, 1999; Hutchinson, 1994; Lewis *et al.*, 1996; Urry *et al.*, 1995; Van Dijk *et al.*, 1997a; Van Dijk *et al.*, 1997b). A arquitetura da seqüência mostra que esse motivo forma uma unidade repetitiva da proteína flageliforme com até 63 repetições antes da interrupção por outro motivo (Hayashi e Lewis, 2000).

Glândula Agregata

A glândula agregata produz a cola pegajosa que reveste o núcleo da espiral de captura da teia. Gotículas produzidas por essa glândula são formadas por uma mistura de glicoproteínas com pequenos neurotransmissores (Tillinghast *et al.*, 1991; Vollrath *et al.*, 1990). Há evidências de que essa cola glicoproteica contenha sais que agem como

bactericidas (Vollrath e Knight, 2001), além de compostos orgânicos que atraem a água atmosférica (Edmonds e Vollrath, 1992).

Glândula Tubuliforme

A glândula tubuliforme produz a seda que forma o casulo para depósito dos ovos. Essa seda só é produzida durante o período reprodutivo do ciclo de vida de uma aranha (Tian e Lewis, 2005). Sua função biológica sugere que essa fibra tem que ser suficientemente forte para proteger os ovos, porém um tanto quanto frágil, de modo que seja possível a prole ser chocada (Blackledge e Hayashi, 2006). Suas seqüências de aminoácidos se encontram conservadas entre as diferentes espécies, apesar das origens antigas dessa seda (Garb e Hayashi, 2005; Tian e Lewis, 2005). A análise da composição da proteína mostrou a presença de alto teor de serina e baixo de glicina, com alguns motivos repetitivos não encontrados em outras sedas descritas: Alanina_{n≤3}, Serina_n, (Serina-Alanina)_n, (Serina-Glutamina)_n, Glicina-X (Garb e Hayashi, 2005; Hu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Tian e Lewis, 2005).

Glândula Aciniforme

Produz a seda utilizada, em especial, no envolvimento e na imobilização das presas. Além disso, essa pode ser utilizada na decoração da teia (observado na espécie *Argiope*), construção de sacos espermáticos e na camada primária da confecção do saco de ovos (Foelix, 1996). A análise da composição de aminoácidos mostrou baixos percentuais de glicina e alanina, o que não é observado nas demais sedas (Hayashi *et al.*, 2004).

Apenas a proteína da espécie *Argiope trifasciata* (Araneidae) é conhecida (AcSp1) e seu estudo mostrou a presença de dois módulos: poli-serina e treonina-glicina-prolina-serina-glicina. Porém, a seda aciniforme possui uma baixa quantidade de sub-repetições, que caracterizam muito bem as sedas ampolada principal, ampolada secundária e flageliforme (Hayashi *et al.*, 2004).

Glândula Piriforme

A glândula piriforme é produtora de discos de adesão (Hinman *et al.*, 2000) utilizados para fixar a linha de segurança ao substrato (Hayashi *et al.*, 2004), o que a torna fundamental na construção da teia orbicular aérea. Existem poucos estudos que abordam sua seqüência e propriedades mecânicas, mas sabe-se que se compõe de resíduos polares e carregados (ácido glutâmico, serina, lisina). Além disso, sua composição é mais parecida com o produto protéico da glândula agregata do que com as fibras mais estudadas (Andersen, 1970).

1.2.2. Características Moleculares das Sedas

As proteínas que formam fibras, como seda e colágeno, são caracterizadas pela seqüência primária altamente repetitiva. Isto leva a uma homogeneidade na estrutura secundária (tripla hélice no caso do colágeno e folhas- β em várias sedas). Esses tipos de proteínas apresentam quase sempre importantes propriedades mecânicas, em contraste com as funções catalíticas e de reconhecimento das proteínas globulares (Altman *et al.*, 2003). Essas propriedades estão intimamente relacionadas com sua função e são determinadas pela composição química e conformação molecular. Isto torna a teia de aranha um material ideal para estudar a relação entre composição química, conformação estrutural e propriedades mecanoelásticas das fibras biológicas (Lombardi e Kaplan, 1990).

Essas fibras são, por isso, importantes ferramentas no estudo de novos biomateriais e para engenharia de tecidos. Além disso, a estabilidade e biocompatibilidade dessa família de proteínas, aliadas às técnicas de engenharia genética das seqüências, podem levar a importantes aplicações biomédicas (Altman *et al.*, 2003).

Observa-se a natureza repetitiva das fibras do bicho da seda e das aranhas quando se examina a seqüência de aminoácidos. Alguns dos primeiros trabalhos direcionados para produção de seda sintética envolveram a engenharia genética de peptídeos, desenhados com base na seqüência da

seda do bicho da seda, tendo em vista o desenvolvimento de fibras com diferentes propriedades mecânicas (Capello *et al.*, 1990).

A maioria das espidroínas descrita foi analisada a partir de ESTs (“expression sequence tag”, etiqueta de seqüência expressa), embora hajam limitações devido ao grande tamanho dos mRNA. A Tabela 4 a seguir mostra o número de pares de bases dos mRNAs da *Nephila clavipes*, demonstrando que as proteínas que formam suas sedas são de elevado peso molecular (Hayashi *et al.*, 1999). Porém, os estudos com cDNA e com seqüências codificantes maiores mostraram que as sedas produzidas pelas aranhas são formadas por pequenos módulos repetitivos de aminoácidos com diferentes seqüências (dependendo da proteína), correspondendo às distintas propriedades mecânicas (Colgin e Lewis, 1998; Guerette *et al.*, 1996; Hayashi e Lewis, 1998; Hinman e Lewis, 1992; Xu e Lewis, 1990).

Tabela 4. Tamanhos dos mRNAs das sedas de *N. clavipes*

Seda	cDNA	Tamanho (kb)
Ampolada principal	MaSp1	12,0
Ampolada principal	MaSp2	11,5
Ampolada secundária	MiSp1	9,5
Ampolada secundária	MiSp2	7,5
Flageliforme	Flag	15,5

Fonte: adaptada de Hayashi *et al.* (1999).

Observam-se na Figura 7 as seqüências consenso dos peptídeos repetitivos ao longo de toda proteína das sedas produzidas pelas glândulas ampolada principal, ampolada secundária e flageliforme de *N. clavipes*.

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

Figura 7. Repetições consenso das seqüências das proteínas da teia. MaSp1 e MaSp2 são as proteínas produzidas pela ampolada principal. MiSp 1 e MiSp 2 são as proteínas produzidas pela ampolada secundária. Flag é a proteína que compõe a seda flageliforme. (Hinman *et al.*, 2000).

Takahashi *et al.* (1999) reexaminaram a estrutura cristalina da seda de *Bombyx mori* por meio de difração de raio-X, mostrando que a região cristalina da seda é composta por duas estruturas em folha antipolar-antiparalela empilhadas com diferentes orientações. Com isso, ficou evidente que a seda do bicho da seda, assim como as sedas de aranhas apresenta estrutura organizada.

Todas as sedas de aranha são compostas por grandes proteínas (300-500 kD), constituídas por regiões N-terminal e C-terminal não repetitivas e conservadas e uma região central repetitiva rica em alanina, glicina e serina. A maioria das unidades repetitivas presentes nas sedas de aranhas, de acordo com diferentes estudos, apresenta propriedades estruturais específicas (Bini *et al.*, 2004; Hayashi e Lewis, 1998; Scheibel, 2004; Stantcheva e Mason, 2004; van Beek *et al.*, 2002; Xu e Lewis, 1990). E os pequenos peptídeos repetitivos podem ser agrupados em quatro categorias: (1) GPGXX/GPGQQ; (2) (GA)*n*/An; (3) GGX e; (4) regiões espaçadoras (“spacers”) (Bram *et al.*, 1997, Kümmerlen *et al.*, 1996; Parkhe *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1996; Simmons *et al.*, 1994).

O módulo (GA)*n*/An é encontrado como folha- β . A repetição GGX é provavelmente uma hélice com três aminoácidos por volta (Bram *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1991; Kümmerlen *et al.*, 1996; Simmons *et al.*, 1996; Simmons *et al.*, 1994). A unidade repetitiva GPGXX (em muitos casos GPGQQ) tem sido relacionada com β -espiral (Hayashi *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 1996), tendo-se por base a comparação com estruturas de outras proteínas (Hutchinson e Thornton, 1994; Urry *et al.*, 1995; Van Dijk *et al.*, 1997a; Van Dijk *et al.*, 1997b). As regiões espaçadoras são constituídas por grupos carregados que separam as regiões repetitivas em algumas proteínas (Colgin e Lewis, 1998; Hayashi *et al.*, 1999), mas não se tem conhecimento de sua função estrutural.

As terminações não repetitivas são comuns em todas as fibras produzidas por aranhas da família Araneidae. A região N-terminal das diferentes espidroínas é a parte mais conservada das proteínas da seda e possui códons adicionais de iniciação da transcrição, com isso, existem possíveis inícios alternativos da tradução (Smith *et al.*, 2005). Sabe-se que essa região é muito importante no transporte das espidroínas para o lúmen

glandular, devido à presença de um possível peptídeo sinal (Hayashi e Lewis, 1998; Smith *et al.*, 2005). As seqüências C-terminais também são altamente conservadas entre as espécies (Bini *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2004; Stantcheva e Mason, 2004; Tian *et al.*, 2004). Estudos recentes sobre ADF-3 e 4 revelaram uma estrutura em α -hélice formada pela região C-terminal, levantando a hipótese dessa região ter importante papel na polimerização da fibra (Huemmerich *et al.*, 2004).

A caracterização das fibras por tipos de módulos pode ser observada na Figura 8, tendo-se por base a dedução da seqüência protéica de *N. clavipes* (Colgin e Lewis, 1998; Hayashi e Lewis, 1998; Hinman *et al.*, 2000; Xu e Lewis, 1990) e *A. diadematus* (Guerette *et al.*, 1996). Essa figura mostra ainda as possíveis estruturas secundárias formadas por esses motivos repetitivos. A seda flageliforme aparece em destaque, devido a sua relevância neste trabalho.

É possível notar também a correlação entre a estrutura desses módulos e as propriedades físicas que conferem. As sedas das glândulas ampolada principal e flageliforme contêm o bloco GPGXX e são as que possuem elasticidade maior que 5 – 10%. A MaSp possui 35% de elasticidade, enquanto a Flag possui elasticidade maior que 200%, com o mesmo módulo repetindo aproximadamente 50 vezes (Hinman *et al.*, 2000).

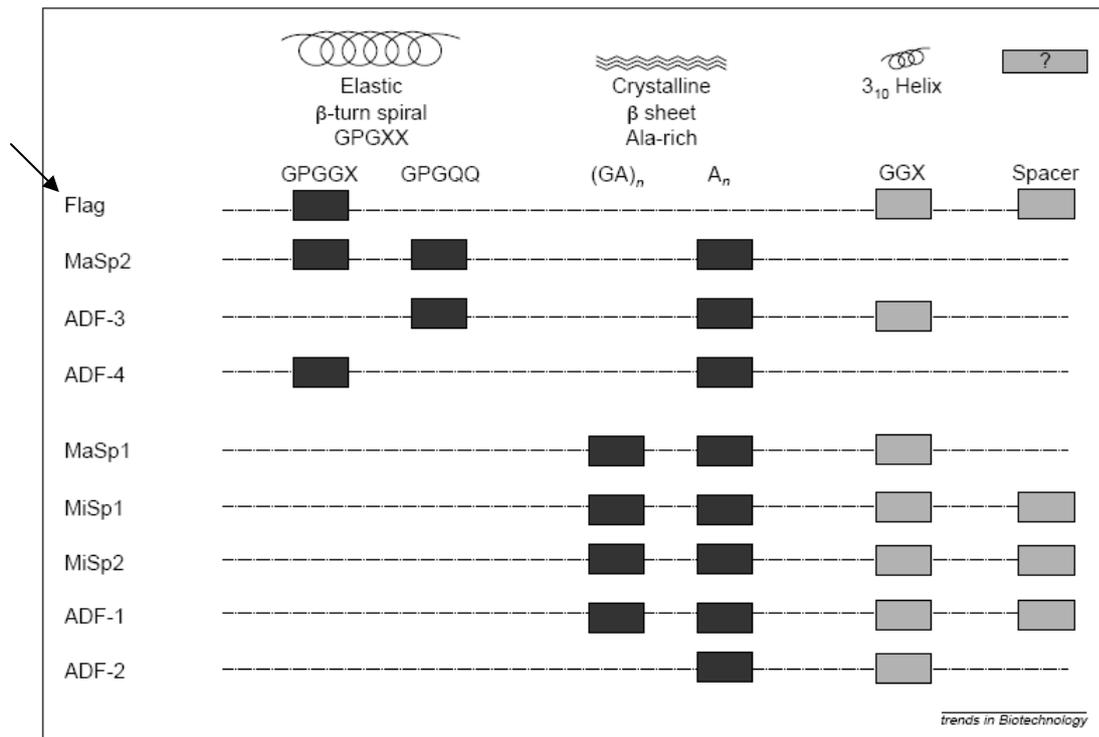


Figura 8. Módulos estruturais encontrados nas proteínas de seda de aranha. Flag é a seda flageliforme (em destaque). MaSp1, MaSp2, ADF-3 e ADF-4 são proteínas que compõem a seda ampolada principal de *N. clavipes* e *A. diadematus* respectivamente. MiSp1, MiSp2, ADF-1 e ADF-2 compõem a ampolada secundária de *N. clavipes* e *A. diadematus* respectivamente. Os retângulos preenchidos representam módulos encontrados na seda, sem manter a posição real na molécula. (Hayashi *et al.*, 1999).

Essa natureza modular encontrada na seda de aranha e a relação entre os módulos repetitivos e as propriedades físicas são elementos que levam à produção de trabalhos relacionados com a engenharia de módulos para expressão de proteínas análogas (Hinman *et al.*, 2000). Diferentes sistemas heterólogos de expressão estão sendo utilizados na tentativa de produzir grandes quantidades de sedas de aranhas, com a finalidade de obter material suficiente para os testes mecânicos comparativos.

Existem poucos estudos a respeito de modificações pós-traducionais das espidroínas. Esses tipos de modificações em aminoácidos específicos de proteínas globulares, como enzimas, são fundamentais para o desenvolvimento de suas atividades. Mas sabe-se pouco a respeito dessas alterações em proteínas de seda. Em trabalho publicado no ano de 1996, por Michal *et al.*, constata-se que há poucas fosforilações na seda linha de segurança de *N.*

clavipes, entretanto, pode ser fundamental na estrutura e estabilidade da espidroína, assim como é importante na atividade de proteínas globulares.

1.2.3. Seda NCFlag-like da aranha *Nephilengys cruentata*

Bittencourt *et al.* (2007), utilizando seqüências expressas nas glândulas da seda da espécie de aranha *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae) - coletada no Brasil - identificaram quatro proteínas produzidas pelas glândulas ampoladas (principal e secundária), flageliforme e tubiliforme. Essas novas proteínas mostraram grande similaridade com outras sedas previamente descritas. Dentre essas sedas, a produzida pela glândula flageliforme (NCFlag-like), – focada neste trabalho – é extremamente elástica, o que facilita a captura de presas sem que ocorra o rompimento do fio.

NCFlag-like (*N. cruentata* flagelliform spidroin-like) é composta por seqüências altamente repetitivas formadas pelos peptídeos (GPGGX)_n (X representa Alanina, Valina, Serina ou Tirosina) e por três repetições de GGX (X representa Alanina, Serina ou Treonina) separados por uma seqüência não repetitiva conhecida como espaçador (composta por muitos aminoácidos carregados e hidrofílicos), como pode ser observado na Figura 9 (Bittencourt *et al.*, 2007). A seqüência encontrada nessa espécie mostra-se similar às flageliformes descritas anteriormente (Hayashi e Lewis, 2000). A seqüência GPGGX parece formar estruturas secundárias β-espiral que, como citado anteriormente, contribuem para o mecanismo de elasticidade da fibra.

Flag			
<i>N. cruentata</i>	[GPGGX] ₁₉ [GGX] ₃	TVIEDLDITVNGPGGPITISEELTVGGPGAGGS	[GPGGX] _n] ₂₄
<i>N. clavipes</i>	[GPGGX] ₄₁	TIIEDLDITIDGADGPPITISEELTIS-GAGGS	[GPGGX] _n] ₂₆
<i>N. madagascariensis</i>	[GPGGX] ₃₆ [GGX] ₇	TVIEDLDITIDGADGPPITISEELTIGGAGAGGS	[GPGGX] _n] ₁₉
<i>A. trifasciata</i>	[GPGGX] _n] ₆	GPVTVDVDSVGGAPGG	[GPGGX] _n] ₅ [GGX] ₆ [GPGGX] _n] ₇

Figura 9. Esquema das seqüências consensos da seda Flageliforme de diferentes aranhas que produzem teias orbiculares. Hífens indicam pulos para obter melhor alinhamento das seqüências. As cores indicam os diferentes módulos repetitivos.

De acordo com Hayashi *et al* (1999), a estrutura formada pelos espaçadores nas sedas formadas pelas glândulas ampolada secundária e

flageliforme ainda é desconhecida. Os dois tipos de regiões espaçadoras são relativamente longos, carregados negativamente e complexos e diferem pela seqüência, de aminoácidos. São apontados como possíveis funções dessa região: promover a formação de uma estrutura alternativa para seda, enquanto essa é armazenada em solução; alinhar a estrutura cristalina ao longo da molécula e; servir como região de interação com outros componentes da seda, a exemplo, da associação entre a seda flageliforme e a secreção produzida pela glândula agregata, importante na captura de presas (Stauffer *et al.*, 1994).

1.2.4. Proteína AJ Silk gland protein - 1 da aranha *Avicularia juruensis*

A proteína AJ Silk Gland Protein – 1 de *A. juruensis*, tornou-se foco de interesse neste projeto por ter as regiões N-terminal e C-terminal conservadas em relação as demais espidroínas. Observa-se que a região central da proteína não é composta de módulos repetitivos aparentes, como na maioria das sedas de aranha; além disso, constata-se que o 'pI' (ponto isoelétrico) é relativamente baixo e o padrão de aminoácidos é diferente das demais.

Há possibilidade que essa nova proteína esteja relacionada com proteção ou com a construção de estruturas que envolvem seda. Quando comparado com o grupo Araneomorphae (aranhas que produzem teias orbiculares), pouco se sabe a respeito das espidroínas de Mygalomorphae (caranguejeiras e similares). O estudo dessa proteína pode levar a melhor compreensão das sedas desse grupo, tão pouco estudado.

1.2.5. Polimerização da seda

As aranhas possuem um sistema complexo de glândulas especializadas em secretar seda. Cada glândula de seda possui tamanho e forma distintos, mas são funcionalmente organizadas de maneira similar. Ela pode ser dividida em quatro áreas distintas: o lúmen, que serve como armazenamento para a solução de fiação; a cauda, que abriga as células epiteliais especializadas que secretam as espidroínas; o duto, que orienta as proteínas da seda e também reabsorve a água da solução de fiação; e a

fiandeira (Figura 10), que funciona como válvula e possui funções de controle da produção da fibra final (Figura 11).

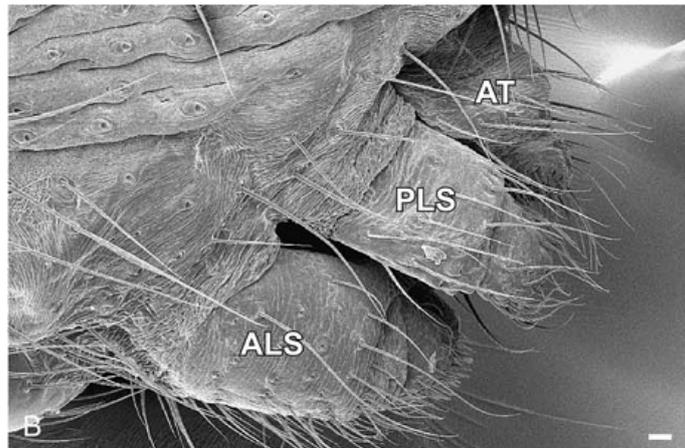


Figura 10. Imagem lateral das fiandeiras da aranha *Nephilengys cruentata* (Kuntner, 2007).

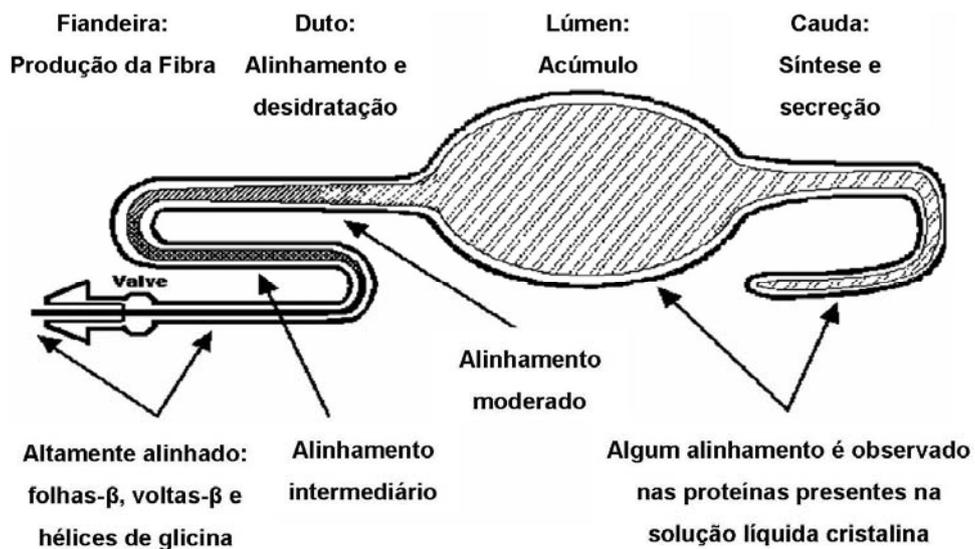


Figura 11. Diagrama da glândula ampolada principal. As funções estão designadas à áreas específicas da glândula. Adaptado de Lewis (2006).

A Figura 12 mostra a histologia da glândula ampolada principal, responsável por tecer o fio da seda linha de segurança (Vollrath e Knight, 2001). Essa glândula foi utilizada como modelo para decifrar as tênues características morfológicas e funcionais desse mecanismo de fiação, por ser a maior e a mais acessível de todas as glândulas produtoras de seda.

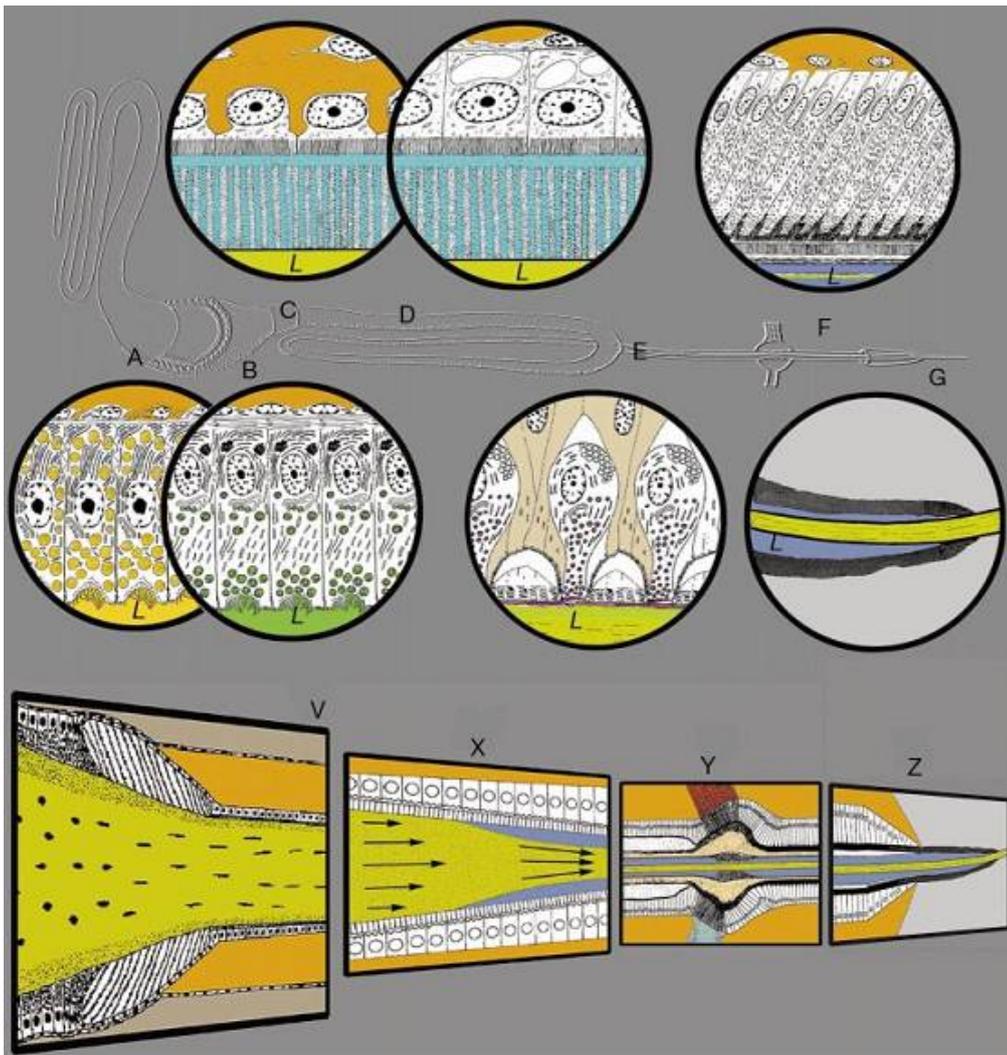


Figura 12. Fiandeira da seda linha de segurança. A parte de cima mostra o desenho da histologia da fiandeira (L, lúmen); a parte de baixo destaca a sua função, que envolve a extrusão da solução cristalina produzida na glândula através de um ducto em formato de "S", convertendo a solução em uma fibra elástica. A produção da solução ocorre em duas zonas: a zona "A" da glândula (letra A no painel) secreta espidroína, a proteína que forma a parte central da fibra, enquanto a zona "B" da glândula (letra B no painel) secreta o revestimento fino da fibra. As vesículas secretórias da zona A contêm pequenos

filamentos de comprimento limitado; a maioria das vesículas da zona B contém cristais líquidos cilíndricos e hexagonais. A cutícula extremamente fina do funil (claramente visível no painel V) ancora o ducto ao saco extensível com mobilidade limitada, talvez para impedir danificação da solução cristalina enquanto aranha se movimenta. O próprio ducto tem uma cutícula fina, que age como uma membrana de diálise, permitindo que água e íons de sódio saiam do lúmen, e que íons de potássio, agentes surfactantes e lubrificantes entrem no lúmen para facilitar a formação da fibra (painel X). O epitélio do ducto em formato de "S" aumenta progressivamente sua altura do funil para a válvula, sugerindo um aumento no bombeamento de água e íons para fora para que a solução seja seca ao longo do caminho (painéis C e D mostram a histologia do epitélio no primeiro e segundo braços, respectivamente). O processo de dessecação é principalmente interno e começa no terceiro braço do ducto (painel X), a aproximadamente 4 milímetros da fúcula ("spigot") de saída. A válvula mostrada no painel Y (parte de baixo da figura) não tem função de retenção, mas de controle da formação de fibra. Ela pode funcionar também como uma bomba para manutenção da extrusão após uma eventual ruptura interna do filamento. A seção do ducto (painel F) subsequente à válvula parece ser altamente especializada para bombeamento de água, contendo células altas, com numerosas mitocôndrias, microvilosidades apicais e uma ampla superfície formada pelas vilosidades internas da membrana plasmática. Finalmente, a fibra é expelida pelos braços flexíveis e elásticos da fúcula (painel G), através do qual a fibra alcança o meio externo (painel Z). Os diâmetros dos painéis circulares são: A - 93 mm, B - 93 mm, C - 12 mm, D - 12 mm, E - 70 mm, F - 288 mm, G - 60 mm (desenhos baseados em microscopia ótica, microscopia de transmissão e de varredura da glândula ampolada maior de três espécies de *Nephila*); as alturas em pontos médios nos painéis são: V (funil) 350 mm, X (ducto de dessecação) 40 mm, Y (válvula) 300 mm, Z (fúcula) 190 mm. Fonte: Vollrath e Knight (2001).

O mecanismo de fiação - ou seja, a polimerização das proteínas solúveis em água para fibras insolúveis – constitui um processo que se inicia com um aumento na concentração da proteína no lúmen glandular, formando a solução de fiação. Na glândula ampolada principal, por exemplo, as proteínas da seda linha de segurança estão presentes em concentração superior a 50% (m/v) (Artkins, 2003, Scheibel, 2004). O aumento da concentração da MaSp faz com que ocorra uma modificação estrutural nessas proteínas, passando de uma forma não estruturada para α -hélice, com conseqüente aumento da estabilidade (Dicko *et al.*, 2004a). Desta maneira, a aranha mantém uma concentração relativamente alta de proteína em solução aquosa, sem resultar na formação de folhas- β insolúveis.

A polimerização das proteínas ocorre durante a passagem da solução de fiação pelo ducto glandular, concomitantemente com a extração de água, sódio e cloreto. O próprio ducto tem uma cutícula fina, que age como uma membrana de diálise, permitindo que água e íons de sódio saiam do lúmen, e que íons de potássio, agentes surfactantes e lubrificantes entrem no lúmen para facilitar a formação da fibra. 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.*, 2004b).

Tais alterações desencadeiam o alinhamento das proteínas na parte distal do ducto, e enquanto seus segmentos hidrofóbicos de poli-Alanina se alinham e se aproximam, essas são expostas a um ambiente cada vez mais hidrofóbico, o que muito provavelmente instiga a conversão estrutural destas proteínas para folhas- β (Huemmerich *et al.*, 2004), e conseqüente polimerização da fibra.

O arranjo dos domínios hidrofóbicos e hidrofílicos das espidroínas permite que a solução líquida e cristalina de fiação seja processada em uma fibra sólida, impedindo interações prematuras que fariam com que as proteínas da seda se precipitassem. Os aminoácidos hidrofóbicos são agrupados para excluir a água à medida que a solução flui através da glândula afunilada, permitindo a formação dos cristais de folhas- β para confecção de fios fortes e insolúveis (Knight e Vollrath, 2002).

Para polimerização sintética ou de laboratório as proteínas purificadas e liofilizadas são solubilizadas em HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol), em uma concentração de 25-30% (m/v). A extrusão da fibra é feita utilizando o equipamento DACA Instruments SpinLine system (DACA Instruments, Santa Barbara CA) em um banho de álcool isopropílico 90% (Teulé, 2007). Portanto, na polimerização artificial ocorre uma separação dos processos de desidratação (utilizando a liofilização) e de organização (realizada durante a extrusão através de uma agulha de diâmetro pequeno).

1.3. Aplicações

É importante, em primeiro plano, definir os termos biomaterial e biocompatibilidade. Um biomaterial constitui material não vivo, com diversas aplicações médicas, que interage com sistemas biológicos (Teddei, 2001). As principais funções de um biomaterial devem ser reparar, repor ou acrescentar um tecido (Silver e Christiansen, 1999). A habilidade de um biomaterial ter resposta apropriada do hospedeiro, em uma situação específica, é conhecida como biocompatibilidade (Black, 1992).

A fibroína de *Bombyx mori* é um polímero natural que tem se mostrado como importante biomaterial, ao apresentar boas propriedades mecânicas, quando molhada e resistência contra clivagem enzimática. Além da alta permeabilidade ao oxigênio e às drogas (Minoura *et al.*, 1995).

O design de materiais biomiméticos, como imitação de componentes nanoestruturais da matriz extracelular é uma área que pode ter grande impacto na engenharia e regeneração de tecidos na medicina (Bondar *et al.*, 2008). Minoura *et al.* (1995) apresentaram pela primeira vez resultados sobre adesão e crescimento celular em seda, do bicho da seda domesticado *Bombyx mori* e do bicho da seda selvagem *Antheraea pernyi*. Esse estudo mostrou que as performances dessas proteínas são comparáveis ou até melhores que a do colágeno. Além disso, Scheller *et al.* (2004) produziram uma proteína de aranha utilizando as seqüências que promovem elasticidade, purificaram e a utilizaram para produção de placas, como meio para proliferação de condrócitos humanos. Eles mostraram crescimento similar ao observado quando cultivados em meio com colágeno.

Gobin *et al.* (2006) demonstraram que lipossomos, contendo drogas, destinados à locais específicos (como um câncer), encapados com fibroína, aumentaram o tempo de residência no organismo, com menor ataque de células do sistema imune.

Bondar *et al.* (2008) vêm estudando a resposta de células endoteliais, crescendo em matriz de fibroína, produzida pelo bicho da seda, mostrando que estas são capazes de proliferarem bem. Allmeling *et al.* (2006) descreveram pela primeira vez a utilização de seda de aranha de *Nephila clavipes* como um novo material para engenharia de tecidos do sistema nervoso. Células de Schwann foram cultivadas em fibras de seda de aranha, observando-se rápida adesão, além de sobrevivência e proliferação normais.

A produção em laboratório das sedas de aranhas pode dar início a uma nova geração de biomateriais. A seda do bicho-da-seda não é alergênica, e é provável que a seda de aranha também apresente tal característica (Altman *et al.*, 2003). A possibilidade de produzir proteínas das sedas de aranhas em sistemas heterólogos em larga escala e com a cinética desejada deverá permitir sua aplicação em vários produtos médicos como curativos e microfilamentos de suturas para neurocirurgias. Fibras de alta performance poderão ser utilizadas em diferentes aplicações técnicas e industriais. As sedas poderão ser usadas 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 (Scheibel, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é expressar e purificar proteínas (ECNCFlag-Like e ECAJ Silk gland protein – 1) relacionadas com glândulas produtoras de sedas de duas espécies de aranhas coletadas no Brasil: (*Nephilengys cruentata* e *Avicularia juruensis*) em *Escherichia coli*.

2.2. Objetivos Específicos

- Construir vetores de expressão de ECNCFlag-Like para transformação genética de *E. coli*, por meio de engenharia modular de seqüências elaboradas com base em cDNAs associados à glândula produtora de seda da espécie *Nephilengys cruentata*;

- Construir o vetor de expressão de ECAJ Silk gland protein – 1 com base em cDNAs associados à glândula produtora de seda da espécie *Avicularia juruensis*;

- Avaliar a expressão heteróloga em *E. coli*;

- Realizar processos de purificação das proteínas recombinante expressas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Linhagens de células utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de *Escherichia coli*. Uma para construção dos vetores e outra para expressão das proteínas desejadas.

- **XL1-Blue:**

XL1-Blue permite a seleção por cor azul-branco das células que contêm plasmídeos recombinantes. Seu genótipo é: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F' proAB lacI ZM15 Tn10 (Tet)*], no qual os genes listados são mutantes. Além disso, possui resistência à tetraciclina.

- **BL21(DE3)pLysS:**

Segundo a empresa “Invitrogen”, BL21(DE3)pLysS é ideal para expressões utilizando o promotor T7 (como exemplo os vetores pRSET, pCR®T7 e pET). Essa *E. coli* possui “DE3 lysogen” (produz T7 RNA polimerase) e o plasmídeo pLysS (4886 pb), que expressa constitutivamente baixos níveis de lisozima T7, reduzindo a expressão basal de genes recombinantes, inibindo os níveis basais de T7 RNA polimerase, como um inibidor natural. Seu genótipo é *F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)* e possui resistência ao cloranfenicol.

3.1.2. Vetores

- **Vetor pGEM T Easy**

O vetor pGEM®-T Easy (Figura 13) é de alta cópia e faz parte de um sistema produzido pela empresa “Promega”: “pGEM -T Easy Vector System”. Esse sistema é conveniente para clonagens de produtos de PCR. Os vetores são preparados com base no pGEM®-5Zf(+), cortando-se com a enzima *EcoRV* e adicionando timina 3' terminal nas extremidades. Essas timinas terminais promovem eficiência na ligação de produtos de PCR produzidos por certas polimerases termoestáveis (que deixam uma adenina na extremidade 3').

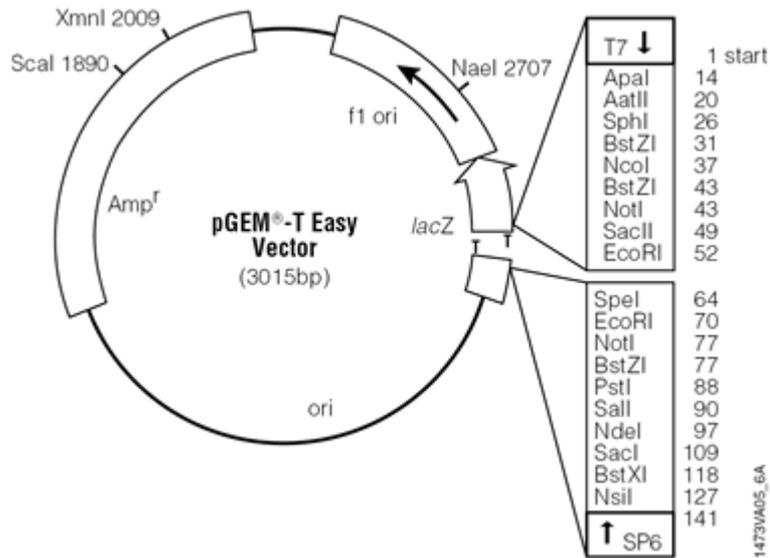


Figura 13. Vetor pGEM-T Easy, utilizado na clonagem de fragmentos de PCR.

- **Vetor pJ**

Os genes sintetizados pela empresa “DNA 2.0” são clonados na série de vetores pJ, produzidos pela própria empresa. Esses vetores foram elaborados para possuírem sítios de restrição enzimática pouco utilizados, sendo assim ideais para construção dos genes em foco neste trabalho.

As seqüências sintetizadas foram clonadas nos vetores pJ204:10328 e pJ244:10329 (Figura 14 e 15).

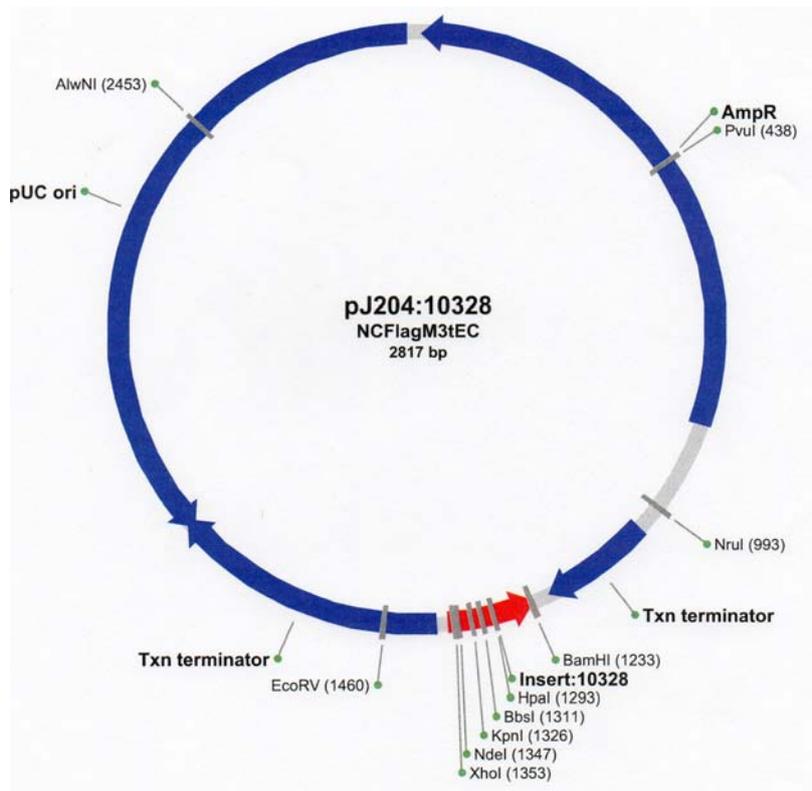


Figura 14. Vetor pJ204:10328 contendo a seqüência sintetizada pela “DNA 2.0” do espaçador (M3), evidenciada em vermelho.

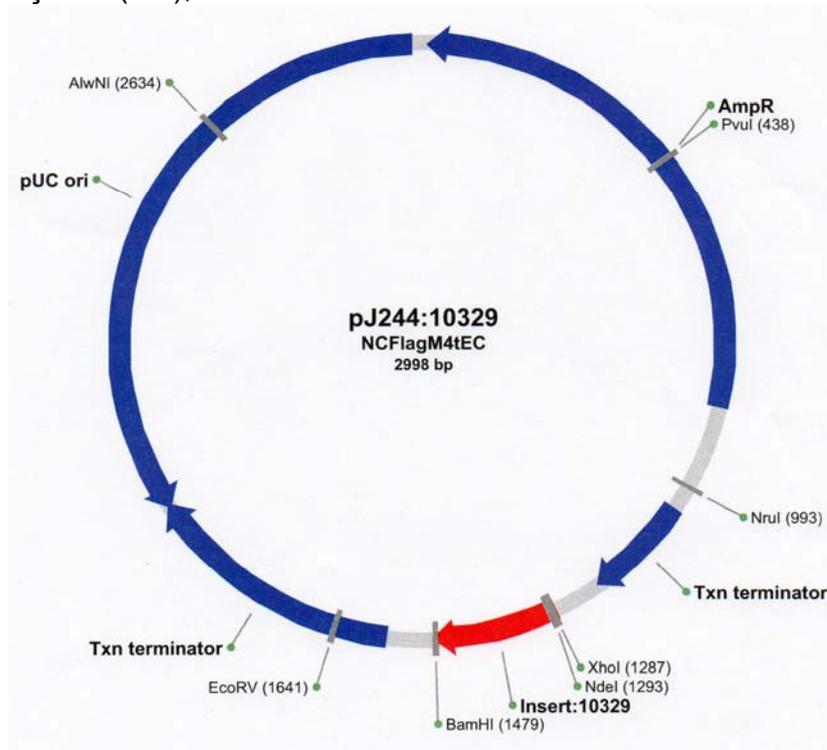


Figura 15. Vetor pJ244:10329 contendo a seqüência sintetizada pela “DNA 2.0” do módulo repetitivo M4, evidenciada em vermelho.

- **Vetor de clonagem (pBluescript SK-)**

O vetor de clonagem pBluescript SK- (pBSK-) (Figura 16), produzido pela Stratagene possui um polylinker e gene de resistência à antibiótico. O gene de controle *lacZ* está localizado no polylinker. Este facilita o reconhecimento dos vetores que foram transformados com sucesso. As células competentes transformadas e crescidas no meio com X-gal são distinguidas em transformadas e não-transformadas por meio da coloração branca e azul, respectivamente.

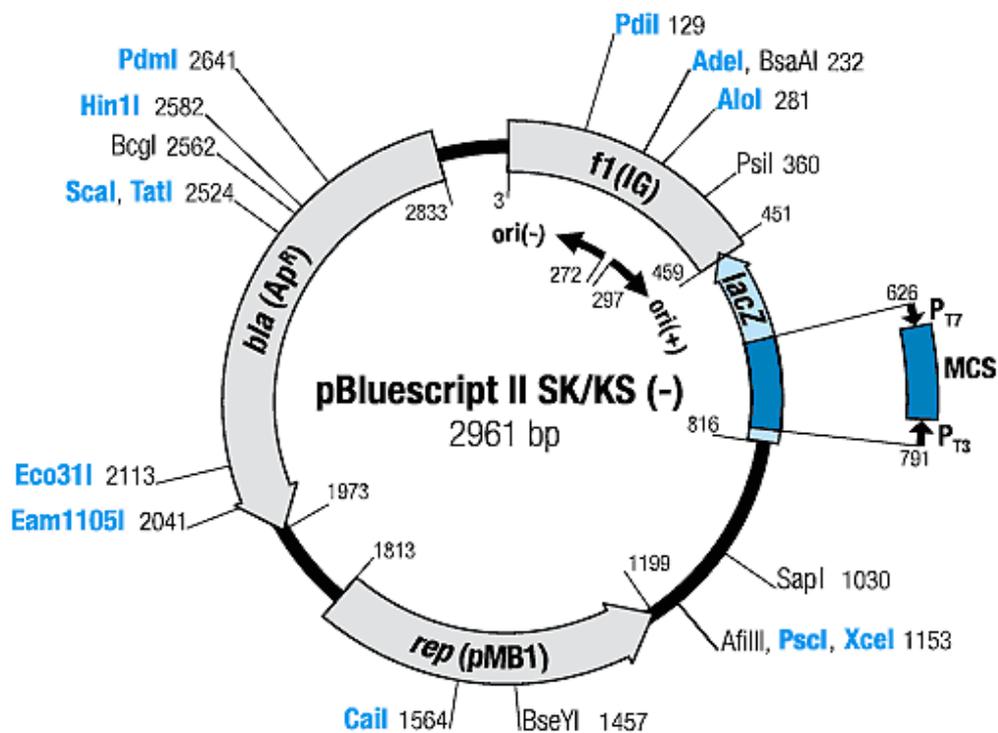


Figura 16. Vetor de clonagem pBluescript SK- (pBSK-), produzido pela Stratagene.

- **Vetor de Expressão em *E. coli* (pET 19b)**

Vários vetores encontram-se disponíveis no mercado para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Dentre eles, há os vetores da série pET (plasmid for expression by T7 RNA polimerase), cujas expressões estão sob o controle do promotor de transcrição $\Phi 10$ e dos sinais de iniciação de tradução s10 da proteína do gene 10 (a principal proteína do capsídeo) do bacteriófago T7. A grande vantagem desse vetor é ser transcrito pela T7 RNA polimerase, a

qual é muito seletiva e ativa, sendo capaz de alongar cadeias de RNA aproximadamente 5 vezes mais rápido que a RNA polimerase de *E. coli*. Alguns vetores da série pET apresentam o promotor T7-lac, colocando a expressão da proteína sob o controle do repressor lac e assim, reduzindo o “background” de expressão da proteína alvo na ausência do agente indutor (um exemplo é o vetor pET-19b).

O plasmídeo pET-19b é um vetor de expressão em *Escherichia coli* produzido pela Novagen que pode ser induzido por IPTG. Contém o promotor T7, sítio de ligação ao ribossomo, terminador T7, códon ATG de início de tradução, seqüência que codifica uma cauda N-terminal contendo 10 histidinas, repressor lacI, resistência à ampicilina (AmpR) e origem de replicação do plasmídeo pBR322, sendo um plasmídeo de número de cópia médio (Figura 17).

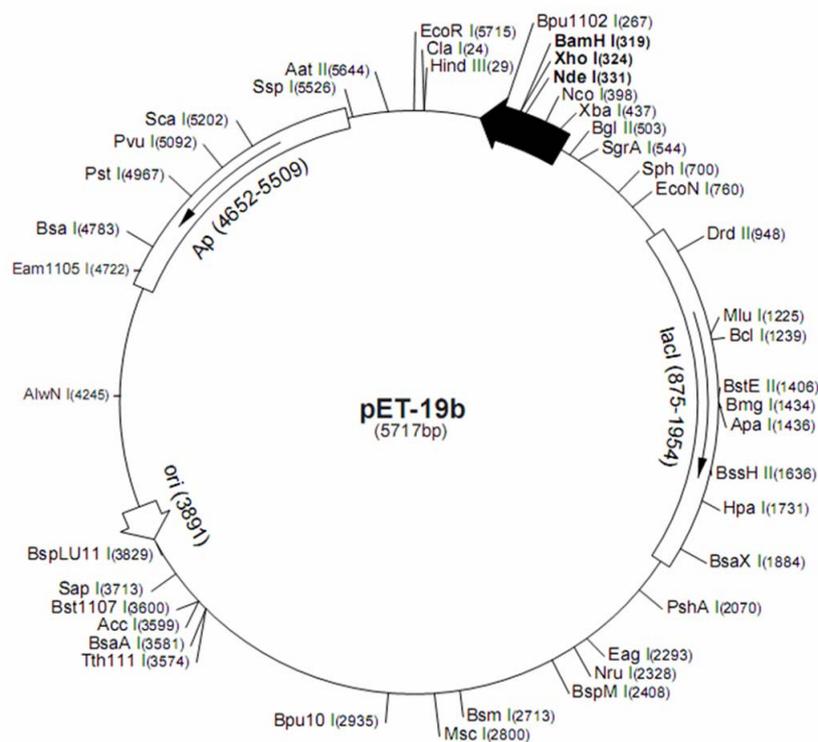


Figura 17. Vetor para expressão para *E. coli* pET-19b produzido pela Novagen e induzido por IPTG.

3.1.3. Outros materiais

Os demais materiais, incluindo meios e tampões podem ser encontrados no anexo I.

3.2. Métodos

3.2.1 Análise das seqüências

As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank usando o algoritmo blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). As seqüências de aminoácidos também foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank (“all non-redundant GenBank CDS”), usando o blastp 2.2.18 (Altschul, 1997).

Os alinhamentos múltiplos de proteínas foram realizados utilizando o programa “CLC Sequence Viewer 4.6.1”, desenvolvido por CLC bio A/S (<http://www.clcbio.com>). As massas moleculares e pontos isoelétricos teóricos foram calculados em <http://ca.expasy.org/cgi-bin/protparam>.

3.2.2 Elaboração das seqüências utilizadas para expressão

As seqüências utilizadas para expressão foram construídas com base nas seqüências originais das proteínas “NCFlag-like” e “ECAJ Silk gland protein – 1”. Essas foram identificadas em bibliotecas de cDNA das glândulas produtoras de seda das aranhas *Nephilengys cruentata* e *Avicularia juruensis* respectivamente, previamente construídas.

A biblioteca de cDNA foi construída a partir do RNA mensageiro isolado da glândula da seda. O RNA total extraído da glândula foi enviado pelo Instituto Butantan, localizado em São Paulo. Para purificação do RNA mensageiro poli-A+ foi utilizado o kit “Oligotex mRNA Mini” da QIAGEN.

A partir dessa purificação, foi utilizado o kit “SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning” da Invitrogen Life Technologies (Cat nos. 18248-039) para construção da biblioteca de cDNA (procedimentos realizados de acordo com instruções do fabricante).

Os clones das bibliotecas foram seqüenciados e depois comparados com o GenBank do NCBI utilizando-se o algoritmo tblastn (Altschul, 1997), desta forma, foram identificados os cDNAs relacionados com os genes da seda de aranha.

NCFlag-like:

Baseando-se na sequência de cDNA da “NCFlag-like”, foi possível elaborar uma engenharia modular com a finalidade de comparar a expressão, purificação e polimerização de diferentes arranjos. Nesta seda, foram identificados três módulos repetitivos diferentes (chamados de M1, M2 e M4) e um espaçador (denominado M3). Esses podem ser observados na sequência de cDNA, apresentando-se um seguido do outro: M1+M2+M3+M4. Os módulos passaram por uma otimização de códon para *Escherichia coli* e na Figura 9 é possível observar as seqüências com os sítios de restrições adicionados necessários à engenharia modular. As seqüências menores do que 100 pb foram enviadas para síntese de oligonucleotídeos (M1 e M2) via “invitrogen”. Já as maiores (M3 e M4) foram sintetizadas pela empresa “DNA 2.0” (Califórnia, USA) e enviadas no vetor pJ244. As seqüências, com as enzimas de restrições adicionadas podem ser observadas na Figura 18.

Módulo 1 (oligonucleotídeo):

GP GGAY GP GGPG GP GGPG

XhoI **NdeI** **XmaI**
CTC GAG CAT ATG CCC GGG CCG GGT GGT GCT TAC GGT CCG GGT GGT CCG
GGT GGT CCG GGT GGT CCG GGT TCC GGA TAA GGA TCC
 BSpeI **Stop BamHI**

Módulo 2 (oligonucleotídeo):

GP GGA GP GGY GP GGS

XhoI **NdeI** **XmaI**
CTC GAG CAT ATG CCC GGG CCG GGT GGT GCT GGT CCG GGT GGT TAC GGT
CCG GGT GGT TCC GGA TAA GGA TCC
 BSpeI **Stop BamHI**

Módulo 3 - Espaçador(síntese de DNA):

GGSGGTTVIEDLDITVNGPGGPITISEELTVG

XhoI **NdeI** **XmaI**
CTC GAG CAT ATG CCC GGG GGT TCC GGT GGT ACC ACC GTT ATC GAA GAC
CTG GAC ATC ACC GTT AAC GGT CCG GGT GGT CCG ATC ACC ATC TCC GAA
GAA CTG ACC GTT GGT TCC GGA TAA GGA TCC
 BSpeI **Stop BamHI**

3.2.3. Construção dos Vetores de Expressão

ECNCFlag-like:

Os oligonucleotídeos M1 e M2 foram amplificados utilizando os seguintes “primers”: ECNCFlagfwd (CTCGAGCATATGCCCGG) e ECNCFlagrev (GGATCCTTATCCGGAAC) e a enzima Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity, seguindo as orientações do fabricante (Invitrogen). As reações de PCR foram analisadas em gel de agarose 2% e os fragmentos purificados, utilizando o kit “Wizard[®] SV Gel and PCR Clean up system” da Promega. Esses fragmentos foram clonados no vetor “pGEM[®]-T Easy”, utilizando o sistema “pGEM[®]-T Easy Vector System”, fabricado pela promega (seguindo as orientações do fabricante). *E. coli* XL 1 Blue competente foi transformada com os vetores pGEM M1 e pGEM M2 e algumas colônias brancas foram selecionadas para mini-preparação de DNA plasmidial.

Os vetores pJ204:10328 e pJ244:10329 com os insertos M3 e M4, respectivamente, e pGEM M1 e pGEM M2 foram digeridos com as enzimas de restrição *Xho*I e *Bam*HI, liberando os fragmentos de 84 (M1), 72 (M2), 126 (M3) e 198 pb (M4). Esses fragmentos foram purificados de um gel de agarose 2%, utilizando o kit “Wizard[®] SV Gel and PCR Clean up system” da Promega. O vetor pBSK- também foi digerido com as mesmas enzimas, esse linearizado foi purificado e os fragmentos M1, M2, M3 e M4 reclonados entre *Xho*I e *Bam*HI por meio da reação da enzima T4-ligase da Invitrogen. *E. coli* XL 1 Blue competente foi transformada com os vetores pBSK- M1.1 (pBSK- + M1 apenas 1 vez), pBSK- M2.1 (pBSK- + M2 apenas 1 vez), pBSK- M3.1 (pBSK- + M3 apenas 1 vez) e pBSK- M4.1 (pBSK- + M4 apenas 1 vez) e algumas colônias brancas foram selecionadas para mini-preparação de DNA plasmidial. Esses plasmídeos contêm apenas um módulo repetitivo.

Como esses módulos se apresentam várias vezes em um único gene na aranha, deve-se repetí-los várias vezes e depois posicioná-los *in tandem*. Desta forma, eles foram repetidos até quatro vezes e colocados um seguido do outro (Figura 20 e 21). Para isso foi utilizada uma estratégia baseada em Lewis *et al.* (1996).

Os vetores pBSK- M1.1, pBSK- M2.1, pBSK- M3.1 e pBSK- M4.1 com apenas um módulo foram separados em duas alíquotas. A primeira foi digerida com as enzimas de restrição *Scal* e *Bspel*, e a outra com *Xmal* e *Scal*. Os fragmentos contendo M3 e M4 foram purificados a partir do gel de agarose 1%. É importante dizer que *Xmal* e *Bspel* são enzimas compatíveis, sem regeneração de nenhum dos sítios de restrição. Esse mecanismo é essencial para essa estratégia. Os fragmentos purificados foram ligados, formando os novos vetores pBSK- M1.2, pBSK- M2.2, pBSK- M3.2 e pBSK- M4.2, agora com o módulo repetido duas vezes. Como *Xmal* e *Bspel* se ligam sem regeneração dos sítios foi possível continuar com essa estratégia, construindo vetores, pBSK- M1.3, pBSK- M1.4, pBSK- M1.5, pBSK- M2.3, pBSK- M2.4, pBSK- M4.3 e pBSK- M4.4 (Figura 20).

Após construídos, esses vetores foram digeridos e os fragmentos foram colocados *in tandem*, formando os seguintes vetores: pBSK- ECNCFlag1111 (que significa M1.1+M2.1+M3.1+M4.1), ECNCFlag2212 (M1.2+M2.2+M3.1+M4.2), ECNCFlag2222 (M1.2+M2.2+M3.2+M4.2), ECNCFlag3313 (M1.3+M2.3+M3.1+M4.3), ECNCFlag3323 (M1.3+M2.3+M3.2+M4.3), ECNCFlag4414 (M1.4+M2.4+M3.1+M4.4) e ECNCFlag4424 (M1.4+M2.4+M3.2+M4.4) (Figura 21). Esses foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, os fragmentos com os diversos arranjos foram purificados a partir do gel de agarose 1%. O vetor de expressão pET19b foi digerido com as mesmas enzimas e após linearizado, foi purificado e as construções reclonadas entre *NdeI* e *BamHI* por meio da reação da enzima T4-ligase da Invitrogen.

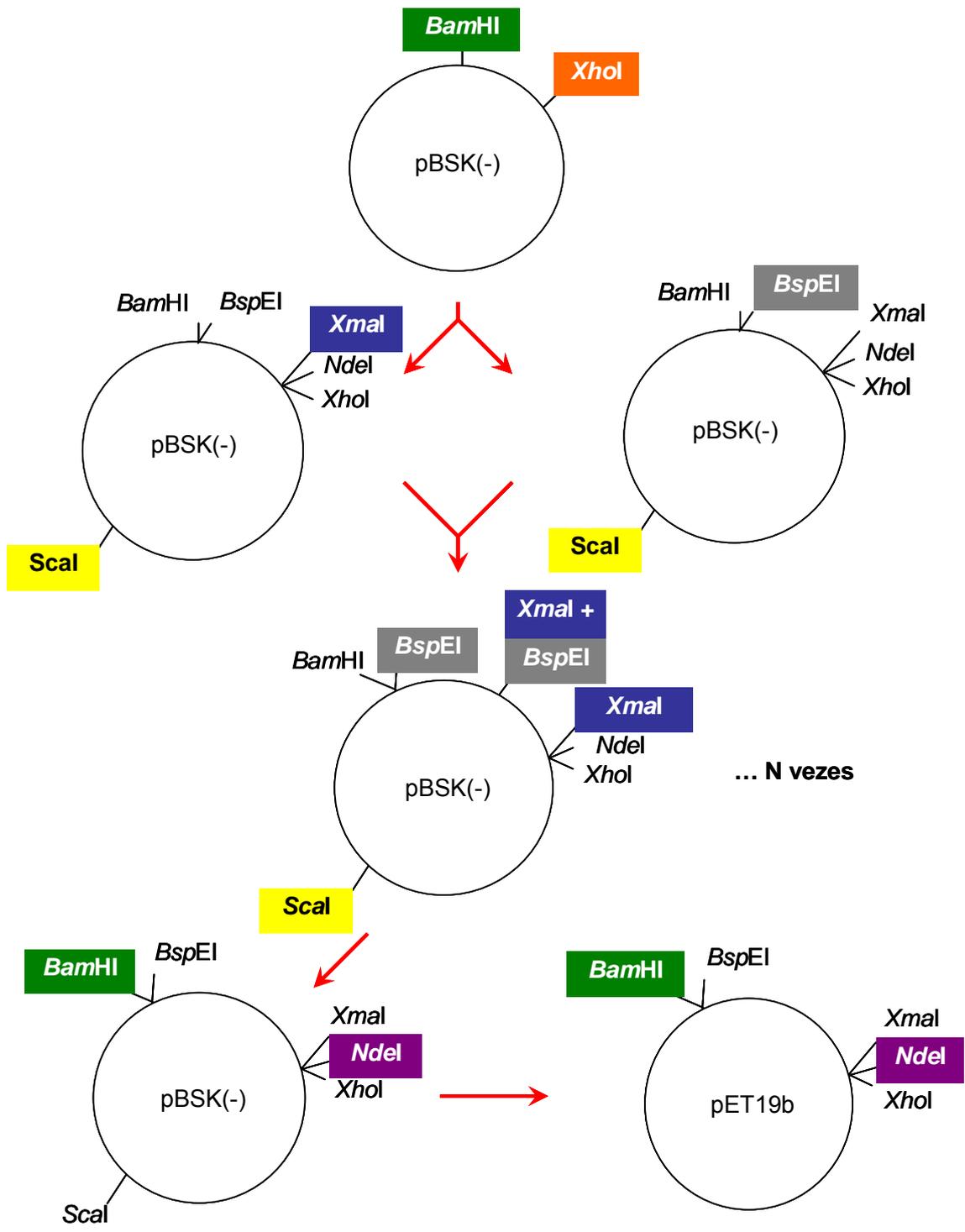


Figura 20. Estratégia utilizada na construção dos vetores de expressão ECNCFlag, em *E. coli*.

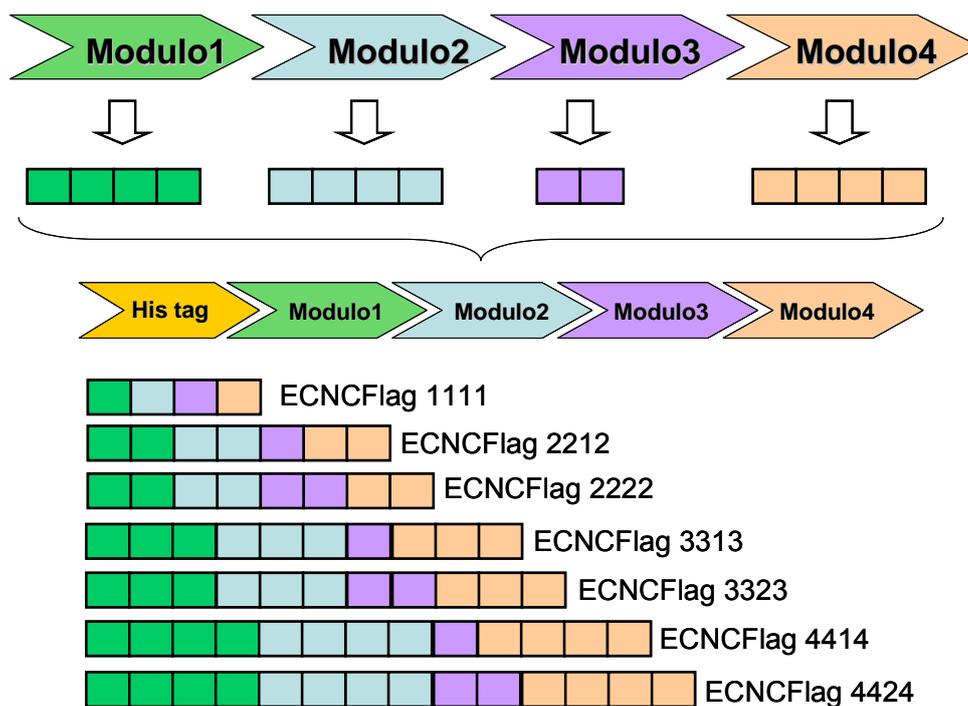


Figura 21. Esquema mostrando os módulos M1, M2, M3 e M4 repetidos até quatro vezes colocados *in tandem*, formando sete diferentes vetores de expressão: pBSK- ECNCFlag1111, ECNCFlag2212, ECNCFlag2222, ECNCFlag3313, ECNCFlag3323, ECNCFlag4414 e ECNCFlag4424.

ECAJ Silk gland protein – 1:

A sequência de “ECAJ Silk gland protein – 1”, foi amplificada por PCR a partir do cDNA das glândulas produtoras de seda da aranha *Avicularia juruensis*, utilizando os “primers”: AJNegECf (TGCCATATGACT TCGTTTACCCAAATC) e AJNegECr (AAGGATCCTCATGCAATTATTGAACT GG) e a enzima Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity, seguindo as orientações do fabricante (Invitrogen). A reação de PCR foi analisada em gel de agarose 1% e o fragmento de 1718 pb purificado do mesmo utilizando o kit “Wizard[®] SV Gel and PCR Clean up system” da Promega. O fragmento foi clonado no vetor “pGEM[®]-T Easy”, utilizando o sistema “pGEM[®]-T Easy Vector System”, fabricado pela promega (seguindo as orientações do fabricante). *E. coli* XL 1 Blue competente foi transformada com o vetor pGEM ECAJ Silk gland protein-1 e algumas colônias brancas foram selecionadas para mini-preparação de DNA plasmidial.

O vetor pGEM ECAJ Silk gland protein-1 foi digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, para retirar o fragmento e cloná-lo no pET19b. Mas, dentro da seqüência de DNA da proteína ECAJ Silk gland protein-1, há sítios de *BamHI* (Figura 22). Desta forma foi necessário fazer uma digestão parcial para retirar o fragmento de tamanho desejado (1718 pb).

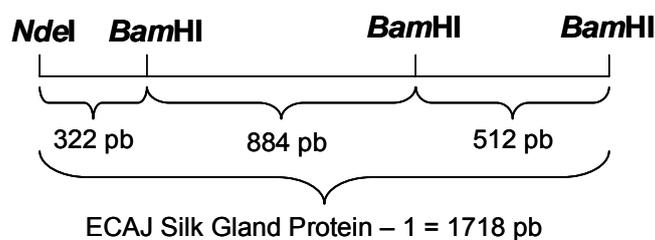


Figura 22. Desenho esquemático mostrando os sítios de restrições *BamHI* e *NdeI* da seqüência ECAJ Silk Gland Protein – 1 amplificada por “primers” específicos.

Foi feita uma digestão com o vetor pGEM ECAJ Silk Gland Protein – 1 com a enzima *NdeI* durante aproximadamente 2 horas. Depois foi realizada a digestão parcial com *BamHI*. Para inibir a atividade enzimática foi adicionado EDTA na solução em uma concentração final de 20mM. Uma alíquota foi coletada nos tempos 1min, 5min, 7min e 10min. Segundo o esquema acima, é possível calcular os diferentes tamanhos esperados na digestão parcial: 320, 500, 890, 1200, 1400 e 1720 pb aproximados.

O fragmento de aproximadamente 1720 pb foi purificado a partir de um gel de agarose 1%, utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean up system” da Promega. O vetor de expressão pET19b foi digerido com as mesmas enzimas; após linearizado foi purificado e a ECAJ Silk gland protein-1 reclonada entre *NdeI* e *BamHI* por meio da reação da enzima T4-ligase da Invitrogen.

Os vetores resultantes das construções foram utilizados para transformar células de *E. coli* (linhagem BL21 (DE3) pLysS). Os clones recombinantes foram selecionados para experimentos de indução e expressão. As proteínas expressas foram purificadas em colunas de cromatografia de afinidade (“His Tag”) e testadas pela técnica de imunodeteção “Western Blot”.

3.2.4. Expressão

Uma colônia recombinante de cada vetor foi inoculada em 10mL de meio LB/ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL) e cultivada à 37° C com agitação de 180 rpm durante 16 horas. Para a cultura de expressão foram adicionados os 10mL do pré-inóculo em 500mL (1:50) de meio LB ampicilina (100 µg/ml) e cultivada à 37° C com agitação de 220 rpm até atingir a OD₆₀₀ entre 0.7 e 0.8. Após, foi adicionado IPTG em concentração final de 1 mM, resultando na indução da expressão. A cultura permaneceu a 37° C e agitação de 180 rpm por 4 horas. Após esse período, a cultura foi retirada, centrifugada por 20 minutos a 2500 rpm e o pellet resultante foi ressuscitado em 8 mL de tampão de lise (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl) e congelado à -80° C.

Outras duas condições também foram testadas. A primeira trata-se de uma expressão controle, sem adição de IPTG e após atingida uma OD₆₀₀ entre 0,7-0,8 foi deixado sob agitação durante 4 horas, utilizando meio LB. Na segunda, foi utilizado meio LB acrescido de 2% de glicose e indução com IPTG concentração final de 1 mM quando chegou na OD₆₀₀ entre 0,7-0,8, durante 4 horas. Essa última condição foi sugerida pelo livro guia da amersham pharmacia biotech (“The Recombinant Protein Handbook: Protein Amplification and Simple Purification”).

3.2.5. Detecção e análise das proteínas por “Western blot”

Os 100µl separados foram precipitados com ácido tricloroacético (TCA) 75% no gelo, centrifugados à 14000 rpm por 20 minutos à 4° C. Logo após foram lavados com acetona 100% e novamente centrifugados à 4° C por 20 minutos. Os precipitados foram ressuscitados em 20µl de tampão de amostra 1X e submetidos à SDS-PAGE 12%.

Após a eletroforese em SDS-PAGE 12%, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose “Hybond C Extra” (Amersham Biosciences), utilizando o transferidor “Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell” (Bio-Rad Laboratories, Inc.). A membrana foi então bloqueada por 16 horas à 4° C em TBS contendo

0,1% de Tween 20 e 5% de leite em pó molico desnatado (TBST). Após a transferência, o gel foi corado em Coomassie blue. Depois do bloqueio, a membrana foi incubada os anticorpos, que poderiam ser anticorpo primário policlonal anti-His (His probe, H-15 sc 803 rabbit polyclonal IgG) da Santa Cruz Biotechnology, utilizado na diluição de 1:1000; anticorpo monoclonal anti-His conjugado à fosfatase alcalina da SIGMA, utilizado na concentração de 1:4000; ou anticorpo secundário anti-rabbit da Santa Cruz Biotechnology, em uma concentração de 1:5000). As incubações foram realizadas em TBST, durante aproximadamente 2 horas. No caso da utilização do primeiro anticorpo citado acima, fez-se necessário incubação adicional com o anticorpo secundário por mais 2 horas. Após esse período, as membranas passaram por três lavagens de 10 minutos com TBST. Os blots foram revelados utilizando-se 10 mL do tampão de revelação (200µl de NaCl 5M; 1ml Tris 3M pH 9.5; 50µl MgCl₂ 1M) acrescido dos substratos cromogênicos para fosfatase alcalina NBT 50 mg/mL (Nitro blue tetrazolium em dimetil formamida 70%) e BCIP 25 mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato em dimetil formamida) e também o substrato quimioluminescente CSPD™ (Applied Biosystems) e filmes fotográficos standard Kodak.

3.2.6. Purificação das Proteínas

Todas as construções gênicas foram conduzidas de modo a adicionar uma cauda de histidinas (“His-tag”), à seqüência protéica, tendo em vista proceder a purificação. A suspensão de células em tampão de lise, previamente guardada à -80°C, foi descongelada no gelo e após foi adicionado 400 µl de ácido deoxicólico (40 mg/mL), e, foi incubada por 40 minutos à 37° C. Foi adicionado 20 µl de DNase (1 mg/mL) à suspensão, e a incubação continuou em temperatura ambiente, sob agitação, por mais 40 minutos. A amostra foi centrifugada a 14000 rpm durante 20 minutos à 4° C; o sobrenadante foi removido e o pellet guardado. Do total de sobrenadante, 100µl foram retirados para análise de eletroforese em SDS-PAGE 12% e “Western blot”.

O restante do sobrenadante foi diluído 1:1 com tampão binding 1X (5mM imidazole, 50mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9). Essa solução foi passada por uma coluna de cromatografia de afinidade (HisTrap HP Ni+ 1ml da “GE Healthcare”). Foram realizadas duas purificações testes, chamadas aqui de teste I e teste II, com a finalidade de descobrir a concentração de imidazole ideal para eluição da proteína de interesse.

- Teste I: A coluna HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare) foi primeiro equilibrada com 10 mL de “Binding Buffer”, em seguida a amostra foi passada e essa fração, chamada de “passado”, coletada. Logo depois a coluna foi lavada com 10 mL de “Binding Buffer” e coletada a fração, denominada “lavado”. A eluição foi realizada utilizando 5 mL “Elution Buffer” com as seguintes concentrações de imidazole: 10, 20, 30, 40, 50 e 100 mM. Essas eluições foram realizadas em seqüência e foram coletadas frações de 1 mL, em tubos de centrífuga. Todas as amostras foram quantificadas para posterior análise em SDS-PAGE e “Western blot”.

- Teste II: Neste teste, os procedimentos foram os mesmos que no anterior, com diferença apenas nas eluições. Estas foram feitas com “Elution Buffer” nas concentrações de 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mM. Além disso, a coluna foi estripada (o Níquel foi retirado) com “Strip Buffer”.

A quantificação das proteínas foi realizada por meio do método de Bradford (1976), utilizando dye apropriado da “Bio Rad”.

3.2.7. Outros métodos

Os demais métodos podem ser encontrados no anexo I.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da seqüência AJ Silk Gland Protein – 1 da aranha *Avicularia juruensis*

A análise da seqüência de NCFlag – like foi realizada e publicada em Bittencourt *et al.* (2007), mas não há estudo a respeito de AJ Silk Gland Protein – 1. Portanto, é de grande importância mostrar algumas características dessa seqüência.

A seqüência de nucleotídeos de AJ Silk Gland Protein – 1 foi comparada com seqüências depositadas no GenBank usando o algoritmo blastn. Apesar da cobertura de apenas 9% e uma identidade de 70%, a similaridade encontrada com a Fibroína 2 da espécie de aranha *Aptostichus* sp. (mygalomorphae) (ABW80564) pode ser um indício de que há uma ligação dessa seqüência com as glândulas produtoras de seda (Figura 23).

```
>gb|EU117161.1| Aptostichus sp. AS220 fibroin 2 mRNA, partial cds
Length=2411

Score = 68.0 bits (74), Expect = 1e-07
Identities = 112/160 (70%), Gaps = 5/160 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 1487 CTCTCTTCT--CAGTTGTTTTGTCTTCGTTAGTTTCTCAGATTTCTCA---AAGCTCTAG 1541
      |||| |||| || ||| ||| || | | ||||| ||||| ||| | || || |
Sbjct 1968 CTCTTTTCTGTCAAATGTCTTGGCTACCTCAGTTTCTCAGATCTCTGAGGGCAGTTCAGG 2027

Query 1542 TTTTACGTCATCTCAGGTTCTCATTGAAGCAATTTTGGAGATAATATCCGGTATGTTGAA 1601
      || | || | || | || | ||||| |||| | || ||||| ||| || || |
Sbjct 2028 ATTATCCGCAACCCAAATTATTATTGAAGCTCTTTTCGAGTTAATATCTGGTTTGATGCA 2087

Query 1602 CATCCTAACTTCAGCACAACTTGGTTTGGTGAGTACAGCT 1641
      |||| | ||||| || ||| | ||||| ||||
Sbjct 2088 CATCTTGACTTCAGCCCACTTTGATGCTGTGAGTAGAGCT 2127
```

Figura 23. Alinhamento da seqüência AJ Silk Gland Protein – 1 com a Fibroína 2 de *Aptostichus* sp (ABW80564) realizado em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

A seqüência dessa proteína (567 aminoácidos) apresentou maiores quantidades dos aminoácidos serina e alanina (Figura 24). Além disso, foram calculadas sua massa molecular e pI teóricos que são de 58380,5 Da e 4,0 respectivamente. O total de resíduos carregados negativamente (Aspartato (D)

+ Glutamato (E)) foi 49 e de resíduos carregados positivamente (Arginina (R) + Lisina (K)) foi 16.

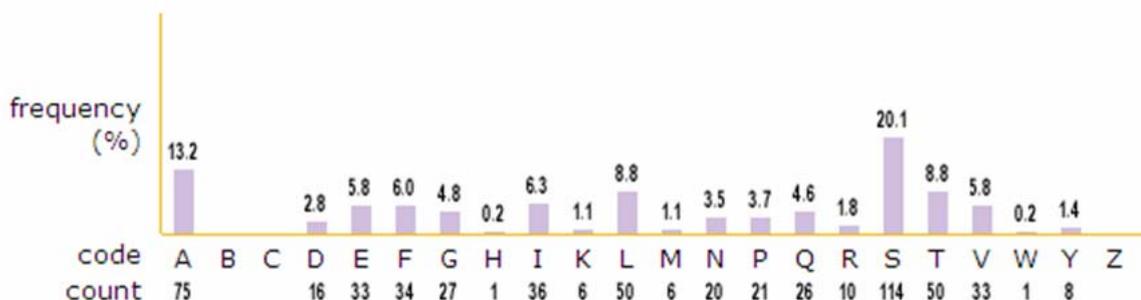


Figura 24. Composição de aminoácidos de AJ Silk Gland Protein – 1, mostrando maiores quantidades de Serina (S) e Alanina (A). Tabela feita em http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/comp_mw.shtml.

A seqüência de aminoácidos foi comparada com seqüências depositadas no GenBank (“all non-redundant GenBank CDS”), usando o blastp 2.2.18 (Altschul, 1997). Foram obtidos quatro alinhamentos significativos com as proteínas Fibroin 2 *Bothriocyrtum californicum* (ABW80566.1), Fibroin 3 *Bothriocyrtum californicum* (ABW80567.1), Fibroin 2 *Aptostichus* sp. (ABW80564.1) e Tubuliform spidroin *Argiope aurantia* (AAX45292.1). Esses alinhamentos ocorreram principalmente na região C-terminal e em regiões ricas em serina e alanina.

A análise da região C-terminal dessa proteína mostrou que essa é conservada quando comparada com outras espidroínas de migalomorfos já descritas (Garb *et al.*, 2007, Gatesy *et al.*, 2001). Os alinhamentos desta região foram realizados utilizando o programa “CLC Sequence Viewer 4.6.1” e podem ser observados na Figura 25.

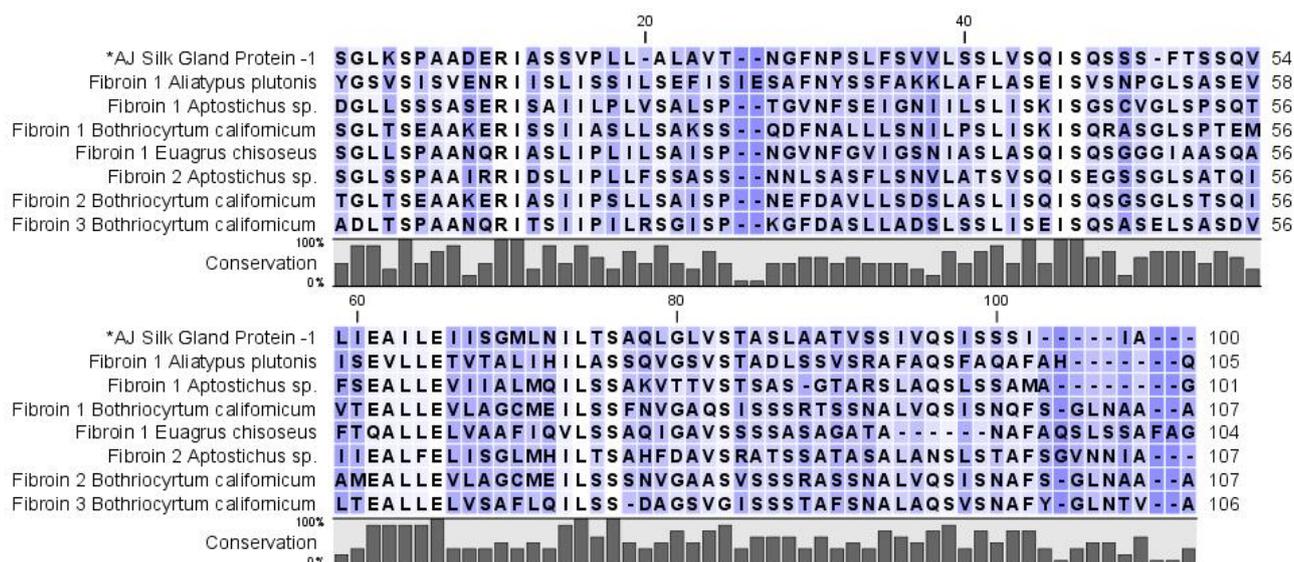


Figura 25. Alinhamento da região C-terminal da proteína AJ Silk Gland Protein 1 com espidroínas descritas de espécies de aranhas Mygalomorphae. Aminoácidos estão abreviados com uma letra (tabela pode ser observada no ANEXO II) e numerados no sentido N- para o C-terminal. Hífens indicam “gaps”, para um melhor alinhamento. A coloração azul indica: quanto mais azul, menos conservado é o aminoácido. Números de acessos no GenBank: Fibroin 1 *Aliatypus plutonis* (ABW80562); Fibroin 1 *Aptostichus* sp. (ABW80563); Fibroin 1 *Bothriocyrtum californicum* (ABW80565); Fibroin 1 *Euagrus chisoseus* (AAK30600); Fibroin 2 *Aptostichus* sp. (ABW80564); Fibroin 2 *Bothriocyrtum californicum* (ABW80566); Fibroin 3 *Bothriocyrtum californicum* (ABW80567);

O alinhamento da região N-terminal também foi realizado, porém, só foram descritas regiões N-terminais de espécies Araneomorfas. Desta forma, a comparação foi feita com esse grupo irmão e não com as migalomorfas (alinhamentos realizados com “CLC Sequence Viewer 4.6.1”, Figura 26). Essa análise mostrou que o cDNA de AJSilk Gland Protein – 1 parece estar completo, ou seja, contém as regiões N-terminal e C-terminal da proteína. Além disso, foi possível observar que existem alguns locais conservados dentro desta região, mesmo quando comparado com araneomorfas.

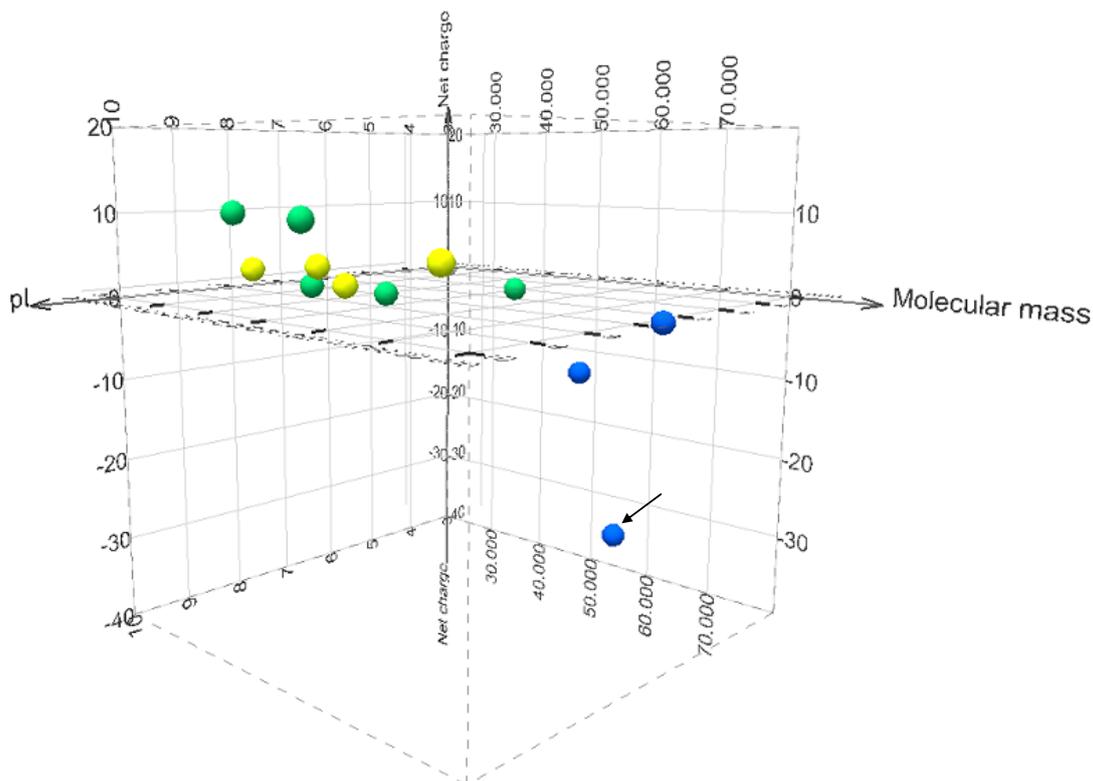


Figura 27. Comparação dos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (“molecular mass”) e Carga (“Charge”) das proteínas de glândulas produtoras de seda das aranhas *Nephilengys cruentata* (verde), *Parawixia bistriata* (amarelo) e *Avicularia juruensis* (azul). A seta indica a proteína AJSilk Gland Protein – 1.

4.2. Construção dos vetores para expressão de ECNCFlag-like

Para confirmar a eficiência da estratégia de multiplicação dos módulos, todos os vetores pBSK- M1.1, M1.2, M1.3, M1.4 e M1.5, pBSK- M2.1, M2.2, M2.3 e M2.4, pBSK- M3.1 e M3.2 e pBSK- M4.1, M4.2, M4.3 e M4.4 foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* (Figura 28). Desta forma, foi possível seguir com os passos da construção dos vetores com mais certeza. A Tabela 5 mostra os tamanhos em pares de bases dos fragmentos liberados para cada vetor.

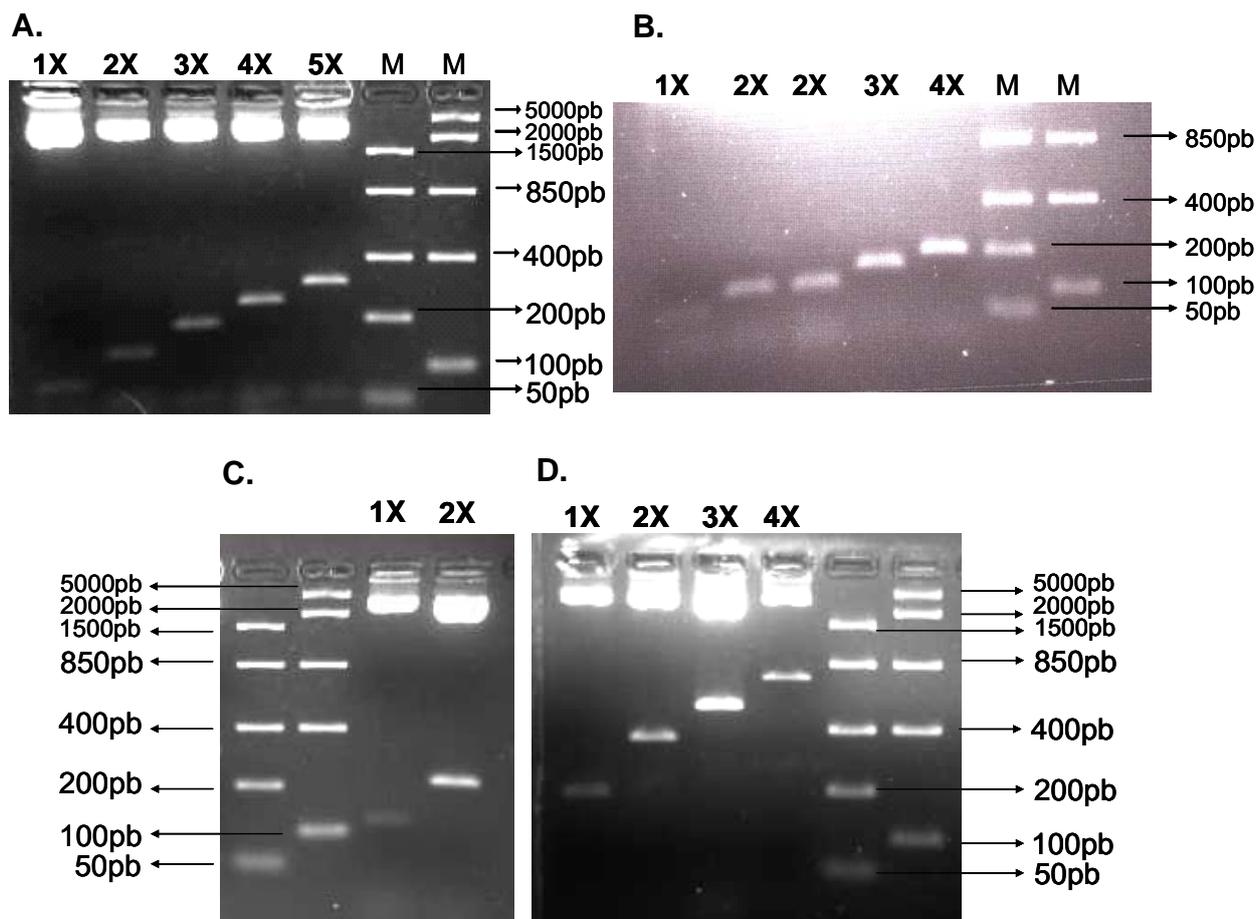


Figura 28. Gel de agarose 1,5%, mostrando **A.** os vetores pBSK- M1.1, M1.2, M1.3, M1.4 e M1.5 digeridos com *XhoI* e *BamHI*; **B.** os vetores pBSK- M2.1, M2.2, M2.3 e M2.4 digeridos com as mesmas enzimas; **C.** os vetores pBSK- M3.1 e M3.2; e **D.** os vetores pBSK- M4.1, M4.2, M4.3 e M4.4; Marcadores da Fermentas FastRuler Low e Middle Range DNA Ladder, respectivamente.

Tabela 5. Tamanho em pares de bases dos fragmentos liberados na digestão dos vetores, com os módulos multiplicados, utilizando as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI*

Módulo	Tamanho em pares de bases				
	1X	2X	3X	4X	5X
M1	84	141	198	255	312
M2	72	117	162	207	-
M3	126	225	-	-	-
M4	198	369	540	711	-

Esses vetores foram utilizados para a construção dos vetores finais de expressão: pET19b ECNCFlag1111, ECNCFlag2212, ECNCFlag2222, ECNCFlag3313, ECNCFlag3323, ECNCFlag4414 e ECNCFlag4424. Tendo em vista verificar a correta construção, esses foram enviados para

sequenciamento. Porém, os vetores pBSK- ECNCFlag3313 e ECNCFlag3323 apresentaram problemas em sua construção quando se analisou o resultado do sequenciamento e por isso, devem ser reconstruídos. Os demais vetores seguiram para os testes de expressão.

Células competentes de BL21 (DE3) pLysS foram transformadas com os vetores corretos. Os clones recombinantes foram selecionados para experimentos de indução e expressão, por meio de mini preparação de DNA plasmidial. A Figura 27 mostra os fragmentos ECNCFlag2212, ECNCFlag2222, ECNCFlag4414 e ECNCFlag4424, oriundos da digestão dos plasmídios da mini preparação com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*.

BL21 (DE3) pLysS possui o vetor pLysS, como descrito em materiais e métodos. Este está presente também na mini preparação de DNA plasmidial realizada para confirmar a presença dos vetores de expressão construídos. Desta forma é possível observar, na Figura 29, um fragmento de 642 pb, resultante da digestão o vetor pLysS com *BamHI*.

Após as confirmações da correta construção dos vetores de expressão e sua eficiente transformação em BL21 (DE3) pLysS, foi possível passar para as etapas de expressão.

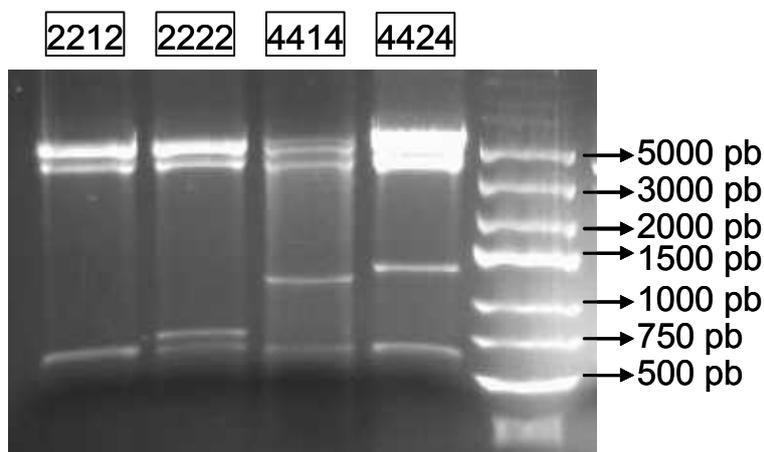


Figura 29. Gel de agarose 1%, mostrando os vetores pET19b ECNCFlag2212 (666 pb), ECNCFlag2222 (765 pb), ECNCFlag4414 (1212 pb) e ECNCFlag4424 (1311 pb) oriundos de uma miniprep de DNA da bactéria BL21 (DE3) pLysS, digeridos com *NdeI* e *BamHI*. O fragmento de 642 pb é resultante da digestão do vetor pLysS com *BamHI*. Marcador da Fermentas GeneRuler™ Express DNA Ladder.

4.3. Construção dos vetores para expressão de ECAJ Silk Gland Protein-1

A construção do vetor de expressão pET19b ECAJ Silk Gland Protein – 1 teve início com a amplificação por PCR do fragmento a partir do cDNA das glândulas produtoras da *Avicularia juruensis* e do clone 01F03 da biblioteca de cDNA, como mostrado na Figura 30. Além disso, a eficiente clonagem deste fragmento no pGEM T Easy foi demonstrada na digestão de clones oriundos de minipreparação de DNA plasmidial com *NdeI* e *BamHI*. Como a seqüência ECAJ Silk Gland Protein – 1 possui 3 sítios de *BamHI* e um de *NdeI*, foram liberados três fragmentos (322, 512 e 884 pb) (Figura 30).

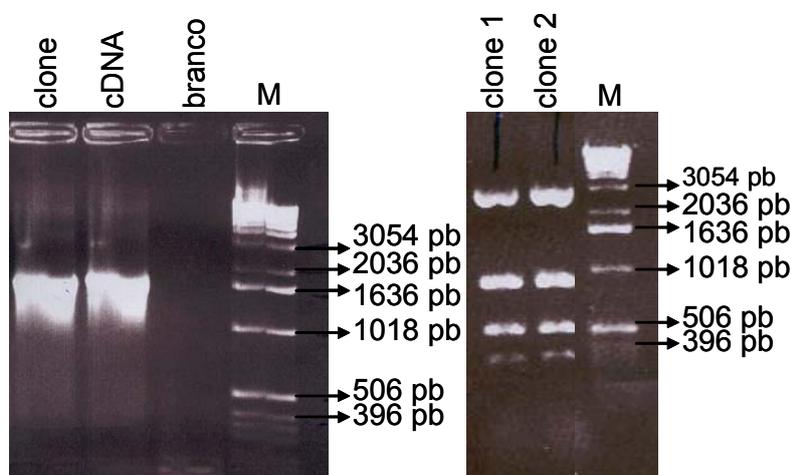


Figura 30. Gel de agarose 1%, mostrando **A.** amplificação da seqüência ECAJ Silk Protein - 1 a partir do cDNA das glândulas produtoras de seda da aranha *Avicularia juruensis* e do clone da biblioteca de cDNA produzida, utilizando os “primers”: AJNegECf (TGCCATATGACT TCGTTTACCCAAATC) e AJNegECr (AAGGATCCTCATGCAATTATTGAACT GG) e a enzima Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity; **B.** vetor pGEM ECAJ Silk Protein – 1 digerido com *NdeI* e *BamHI*, liberando três fragmentos (322, 512 e 884 pb). Marcador “1 kb Ladder” da Invitrogen.

A clonagem do fragmento ECAJ Silk Gland Protein – 1 no vetor de expressão pET19b deve ser realizada com os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI*. Mas, como observado na Figura 30 B, sítios de restrição de *BamHI* são encontrados dentro da seqüência AJ Silk Gland Protein – 1 (Figura 22). Foi necessário, então, realizar uma digestão parcial, de forma que fosse purificado apenas o fragmento de 1720 pb, que corresponde à seqüência completa. Para isso o vetor pGEM ECAJ Silk Gland Protein – 1 foi digerido com *NdeI*, para que depois fosse feita a digestão parcial com *BamHI*. Alíquotas foram retiradas nos tempos 1, 5, 7 e 10 minutos e a atividade enzimática foi inibida com EDTA. A

Figura 31 mostra a digestão parcial e a eficiente purificação da banda de 1720 pb de interesse.

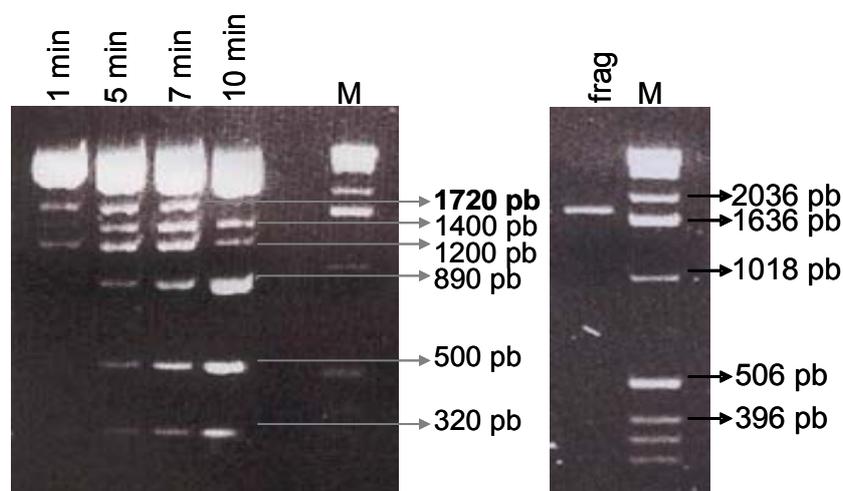


Figura 31. Gel de agarose 1%, mostrando A. Digestão parcial do vetor pGEM ECAJ Silk Gland Protein -1 digerido inicialmente com *NdeI* e logo em seguida com *Bam*HI, parando a reação com EDTA nos tempos 1, 2, 7 e 10 minutos, liberando 6 fragmentos (320, 500, 890, 1200, 1400 e 1720 pb); B. Eficiente purificação do fragmento de 1720, de tamanho desejado na digestão parcial em A (utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean up system” da Promega). Marcador “1 kb Ladder” da Invitrogen.

Esse fragmento foi clonado no pET19b previamente digerido com *NdeI* e *Bam*HI e purificado de um gel de agarose 1%. A minipreparação de DNA plasmidial de um dos clones positivos foi utilizada para transformar *E. coli* BL21(DE3)pLysS competente e foram realizados testes de expressão.

4.4. Expressão das construções em *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Os clones positivos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS competente, transformadas com os plasmídeos pET19b-ECNCFlag1111, pET19b-ECNCFlag2212, pET19b-ECNCFlag2222, pET19b-ECNCFlag4414 e pET19b-ECNCFlag4424, foram submetidos ao protocolo de expressão, com indução com IPTG concentração final de 1mM após atingida a OD₆₀₀ entre 0,7-0,8, durante 4 horas.

Os pellets foram ressuspensos em tampão de lise e tratados com ácido deoxicólico e DNase. Após esse tratamento, a amostra foi centrifugada e a fração solúvel e o pellet com proteínas insolúveis foram analisados por SDS-PAGE. No entanto, nos primeiros testes feitos com os vetores pET19b-

ECNCFlag2212, pET19b-ECNCFlag2222, pET19b-ECNCFlag4424 não foi possível verificar por SDS-PAGE, bandas diferenciadas em relação ao controle negativo (BL21(DE3)pLysS).

Uma outra forma de se tentar verificar a expressão da proteína foi submeter essas amostras à técnica de imunodeteção “Western blot” (Figura 32). Esse método se mostrou eficiente para detecção das proteínas de interesse, que pareciam estar com baixos níveis de expressão, já que não foi possível visualizá-las em SDS-PAGE. Além disso, as proteínas estavam presentes tanto na fração solúvel, como no pellet com proteínas insolúveis.



Figura 32. Resultado do “Western blot” das frações solúveis (Sol.) e do pellet insolúvel (Insol.) resultantes da expressão dos vetores pET19b-ECNCFlag2212, pET19b-ECNCFlag2222, pET19b-ECNCFlag4424 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Foi utilizado como anticorpo primário: anti-His policlonal (H-15), produzido pela Santa Cruz Biotechnology em coelho; anticorpo secundário: Anti-coelho (Anti-rabbit) conjugado com fosfatase alcalina, produzido pela Santa Cruz Biotechnology.

Para confirmação dos resultados, foi realizada uma nova expressão utilizando as mesmas condições anteriores, desta vez com os seguintes vetores de expressão: pET19b-ECNCFlag1111, pET19b-ECNCFlag2212, pET19b-ECNCFlag2222, pET19b-ECNCFlag4414 e pET19b-ECNCFlag4424. Da mesma forma, não foi possível sua detecção por SDS-PAGE, porém, os resultados do “Western Blot” mostraram a presença das proteínas, com excessão da ECNCFlag1111 (Figura 33). Um fato que chamou a atenção foi que as proteínas detectadas não possuíam o peso molecular esperado quando comparadas ao padrão de massa molecular. A Tabela 6 mostra a comparação entre os pesos moleculares esperados e os estimados no “Western blot”.



Figura 33. Resultado do “Western blot” das frações solúveis resultantes da expressão dos vetores pET19b-ECNCFlag1111, pET19b-ECNCFlag2212, pET19b-ECNCFlag2222, pET19b-ECNCFlag4414 e pET19b-ECNCFlag4424 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. M - Padrão de Massa Molar (kDa), Broad Range Protein da Promega; C+ - Fração solúvel resultante da expressão do vetor pET19b-MaSp2; C- - Fração solúvel resultante da expressão da bactéria BL21(DE3)pLysS não transformada. Foram aplicados no gel de poliácridamida utilizado para transferir para membrana de nylon: 1111 (150 µg de proteínas totais), 2212 (200 µg), 2222 (50 µg), 4414 (200 µg) e 4424 (100 µg). Foi utilizado anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA)

Tabela 6. Comparação entre os pesos moleculares esperados (cálculo teórico) e os estimados em “Western blot” para as construções de ECNCFlag.

Construções	Esperado (kDa)	Estimado (kDa)
ECNCFlag2212	19,8	≈ 29,0
ECNCFlag2222	23,0	≈ 40,0
ECNCFlag4414	33,4	≈ 45,0
ECNCFlag4424	36,6	≈ 50,0

A ausência de uma banda positiva para a construção ECNCFlag1111 foi explicada mais tarde por uma contaminação por outra espécie de bactéria. Esta, provavelmente ocorreu durante o processo de transformação da bactéria BL21(DE3)pLysS competente, já que colônias de bactérias desconhecidas cresceram na placa com meio LB sólido/ampicilina, utilizada para plaquear a transformação.

Quando o “Western blot” foi feito, conforme mostrado na Figura 32 - utilizando 100 µg de proteínas totais da fração solúvel de cada amostra, foi possível observar que as proteínas ECNCFlag2222 e ECNCFlag4424 apresentaram bandas de maior intensidade quando comparadas com as demais. Como se trata de muitas construções e pouco tempo para finalização

do projeto, uma das proteínas foi escolhida para realização de alguns testes visando a otimização da expressão. Essa otimização está relacionada com o aumento dos níveis de expressão, modificando alguns parâmetros - como meio, temperatura e tempo de indução. Além disso, é importante diminuir a quantidade de proteínas insolúveis e aumentar as solúveis.

A proteína ECNCFlag2222 foi escolhida para realização destes testes, porque apresentou uma grande quantidade de proteína expressa em relação às outras. Foram testadas três condições diferentes:

1. Indução com IPTG concentração final de 1mM após atingida a OD₆₀₀ de 0,7-0,8, durante 4 horas em meio LB.

2. Expressão sem adição de IPTG e depois de atingida a OD₆₀₀ entre 0,7-0,8 foi deixado durante 4 horas, utilizando meio LB. Esta condição foi importante para saber se estava ocorrendo alguma taxa de expressão basal (expressão sem indução por IPTG).

3. Indução com IPTG concentração final de 1mM após atingida a OD₆₀₀ de 0,7-0,8, durante 4 horas em meio LB com 2% de Glicose. Esta condição foi sugerida por um livro guia da amersham pharmacia biotech ("The Recombinant Protein Handbook: Protein Amplification and Simple Purification").

A Figura 34 mostra o resultado dessas três diferentes condições, obtido por "Western blot", utilizando anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (produzido pela SIGMA). Quando se analisa a fração solúvel, é possível observar que sem dúvidas, a primeira condição foi mais eficiente. Porém, quando se observa a fração insolúvel, o nível de expressão alcançado pela terceira condição foi bem maior que as demais. É possível observar também que existe expressão basal tanto na fração solúvel, quanto na insolúvel, em baixo nível.

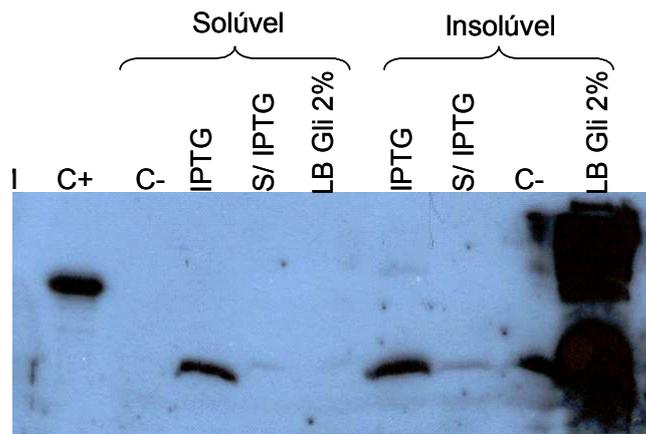


Figura 34. Resultado do “Western blot” das frações solúveis e do pellet insolúvel resultantes das expressões do vetor pET19b-ECNCFlag2222 em 3 diferentes condições: expressão com IPTG (indicada na figura por IPTG), expressão sem IPTG (indicada na figura por S/ IPTG) e expressão com IPTG em meio LB com 2% de glicose (indicada na figura por LB Gli 2%). M - Padrão de Massa Molar (kDa), Broad Range Protein da Promega; C+ - Fração solúvel resultante da expressão do vetor pET19b-MaSp2; C- - Fração solúvel e pellet insolúvel resultante da expressão da bactéria BL21(DE3)pLysS não transformada. Foram aplicados no gel de poliacrilamida utilizado para transferir para membrana de nylon 50 µg de proteínas totais da fração solúvel. Foi utilizado anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA)

Quanto a proteína ECAJ Silk Gland Protein – 1, várias tentativas foram realizadas para detectar sua expressão, mas nem o SDS-PAGE, nem a técnica de “Western blot” mostraram um resultado positivo.

4.5. Purificação das proteínas expressas

Para realizar os testes das melhores condições para purificação das proteínas, também foi escolhido o vetor pET19b ECNCFlag2222. A purificação foi realizada a partir da fração solúvel resultante da expressão e do tratamento com ácido deoxicólico e DNase e filtrada em membrana de 44µm. Este material foi equilibrado com “Binding Buffer” (1:1) e a amostra foi passada na coluna de cromatografia de afinidade em coluna de Ni+.

Foram realizadas duas purificações testes, chamadas aqui de teste I e teste II, com a finalidade de descobrir a concentração de imadazole ideal para eluição da proteína de interesse.

Teste I: A coluna HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare) foi primeiro equilibrada com “Binding Buffer” e em seguida a amostra foi passada. Logo depois a coluna foi lavada com “Binding Buffer” e eluída com “Elution Buffer” com as seguintes concentrações de imidazole: 10, 20, 30, 40, 50 e 100 mM.

Teste II: Neste teste as eluições foram feitas com 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mM. Além disso, o níquel foi retirado da coluna utilizando “Strip Buffer”.

A Figura 35 mostra as frações coletadas do teste I de purificação analisadas em SDS-PAGE. É possível perceber que não houve uma purificação eficiente. Porém, foi realizado um “Western blot” (resultado não mostrado), com o intuito de saber em quais frações se encontraria a proteína de interesse. Esse mostrou que a proteína não se encontrava em nenhuma das frações, portanto, ela ainda estava ligada na coluna.

Desta forma, o teste II foi realizado com concentrações diferentes de imidazole, para definirmos a melhor concentração necessária para lavar a coluna dos contaminantes. Além disso, o “Strip Buffer” foi utilizado para verificar se a proteína continuava ligada à coluna mesmo depois de uma lavagem com 100 mM de imidazole.

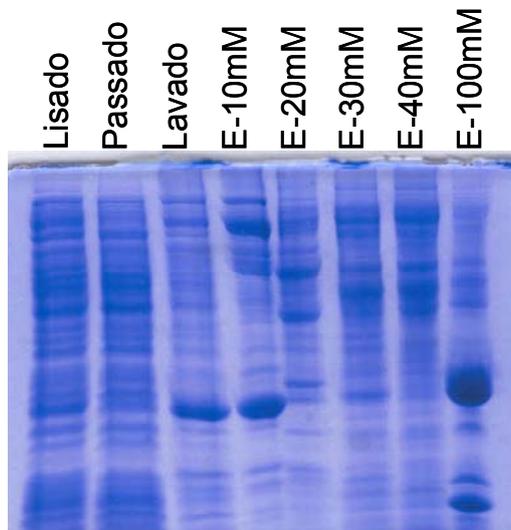


Figura 35. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das frações coletadas durante o teste I de purificação de pET19b-ECNCFlag 2222. Lisado (extrato total da cultura de bactéria BL21(DE3)pLysS, após lisada e tratada com ácido deoxicólico e DNase), Passado (Fração coletada durante a passagem da amostra na coluna de afinidade usada na purificação), Lavado (Material coletado da primeira lavagem com “binding buffer” acrescido de 5mM de imidazole) e Eluídos, com concentrações de imidazole de 10-50 mM e 100mM (E-10mM, E-20mM, E-30mM, E-40mM, E-50mM e E-100mM). Foram aplicados 50 µg de proteína em cada poço.

A Figura 36 mostra um SDS-PAGE com as frações coletadas no teste II. Podemos observar que a fração da eluição com 80 mM de imidazole apresenta poucos contaminantes. A concentração de proteínas, calculada por Bradford, da fração com 100 mM mostrou uma ausência de proteínas, portanto esta não foi aplicada no gel. Por Bradford, foram detectadas proteínas em duas frações de 1 mL coletadas do “Strip” (Strip 2 e Strip 3). Como podemos observar no gel de SDS-PAGE da Figura 34, a solução de Strip continha a proteína de interesse esperada. Poucos contaminantes foram observados nesta amostra purificada.

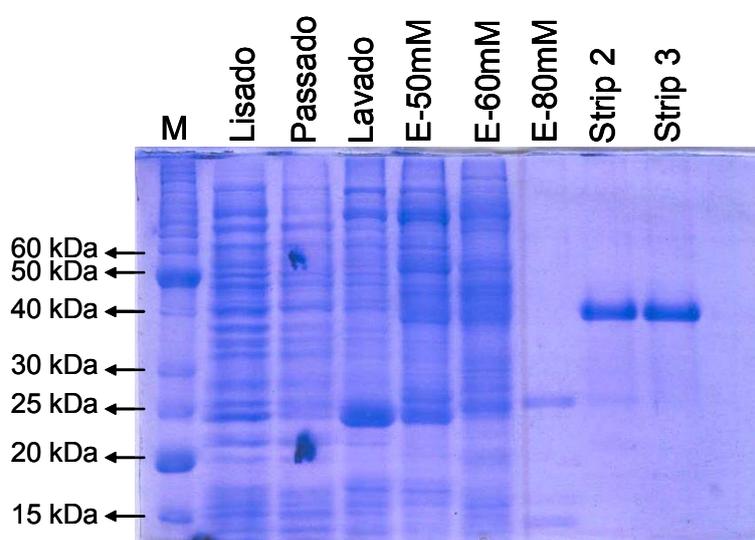


Figura 36. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das frações coletadas durante o teste II de purificação de pET19b-ECNCFlag 2222. M (Padrão de Massa Molar (kDa), Bench Mark Protein Ladder/ Invitrogen); Lisado -30 μ g (extrato total da cultura de bactéria BL21(DE3)pLysS, após lisada e tratada com ácido deoxicólico e DNase); Passado -30 μ g (Fração coletada durante a passagem da amostra na coluna de afinidade usada na purificação); Lavado -30 μ g (Material coletado da primeira lavagem com “binding buffer” acrescido de 5mM de imidazole); e Eluídos, com concentrações de imidazole de 50-100 mM e com “strip buffer” (E-50mM -30 μ g, E-60mM - 25 μ g, E-80mM - 25 μ g, Strip 2 - 5 μ g e Strip 3 - 5 μ g).

Para comprovar a eficiência da purificação, foi realizado um “Western blot”, utilizando anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (produzido pela SIGMA) (Figura 37). Este mostrou que a proteína está realmente presente, já que o tamanho da banda confere com a banda

purificada, observada na Figura 35. Outra banda maior (de aproximadamente o dobro do tamanho) também foi observada na fração do Strip. Além disso, foi detectada uma banda no eluído com 80 mM de imidazole.

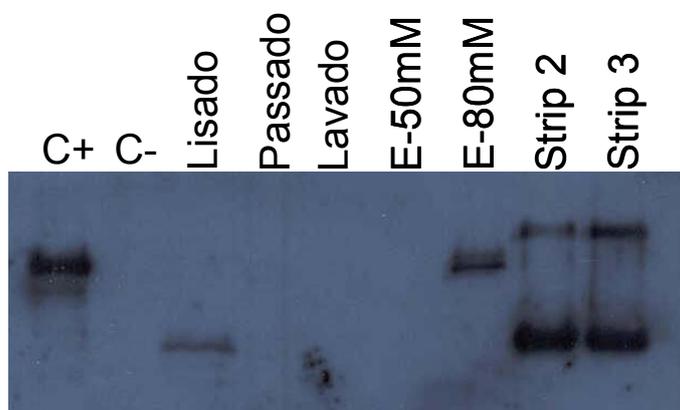


Figura 37. Resultado do “Western blot” das frações coletadas durante o teste II de purificação de pET19b-ECNCFlag 2222, utilizando anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA). M - Padrão de Massa Molar (kDa), Pre strained SDS-PAGE standards broad range da Bio Rad; C+ - Lisado da proteína pET19b-MaSp2; C- - Lisado da bactéria BL21(DE3)pLysS não transformada; Lisado -50 μ g (extrato total da cultura de bactéria BL21(DE3)pLysS, após lisada e tratada com ácido deoxicólico e DNase); Passado -100 μ g (Fração coletada durante a passagem da amostra na coluna de afinidade usada na purificação); Lavado -100 μ g (Material coletado da primeira lavagem com “binding buffer” acrescido de 5mM de imidazole); e Eluídos, com concentrações de imidazole de 50-100 mM e com “strip buffer” (E-50mM -100 μ g, E-80mM - 25 μ g, Strip 2 - 5 μ g e Strip 3 - 5 μ g).

5. DISCUSSÃO

Mygalomorphae compartilha similaridades morfológicas e ecológicas com o grupo Mesothelae, linhagem irmã das aranhas Opisthothelae (Mygalomorphae + Araneomorphae) (Coddington *et al.*, 2004; Platnick e Gertsch, 1976). Mesoteles e migalomorfos apresentam em comum características primitivas, incluindo aquelas associadas à produção de seda (Haupt, 1993). Em contraste com araneomorfos, migalomorfos possuem um aparato de fiar indiferenciado, consistindo de fúsculas uniformes que permitem a saída de fibras oriundas de 1 a 3 tipos de glândulas produtoras de seda. Além disso, araneomorfos possuem várias sedas para funções distintas, enquanto migaloformas utilizam poucas sedas para uma variedade de propósitos. Regiões C-terminais de espidroínas desses grupos são similares (Garb *et al.*, 2007; Gatesy *et al.*, 2001), mostrando uma relação evolutiva antiga e podendo ajudar na predição da sua divergência, que data de 240 milhões de anos (Selden e Gall, 1992). Portanto, a elucidação de novas proteínas é de grande importância para o entendimento de diversos processos biológicos. No caso, as de proteínas da seda, podem também contribuir na diversidade e história evolutiva desse grupo de proteínas.

Não consta na literatura nenhuma publicação sobre a caracterização da seqüência da proteína AJ Silk Gland Protein – 1 de *Avicularia juruensis*; por isso é que foram realizadas algumas análises. Nenhuma caracterização à respeito da seqüência da proteína AJ Silk Gland Protein – 1 de *A. juruensis* foi publicada na literatura, portanto algumas análises foram realizadas. Esta proteína se tornou de interesse neste projeto por ter as regiões N-terminal e C-terminal conservadas em relação as demais espidroínas, como foi mostrado na análise das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos. No entanto, a região central da proteína não é composta de módulos repetitivos aparentes, como na maioria das sedas de aranha. Além disso, AJSilk Gland Protein – 1 foi comparada com proteínas de glândulas produtoras de seda das aranhas *Nephilengys cruentata*, *Parawixia bistrriata* e as outras proteínas de *A. juruensis*. Os pontos isoelétricos, cargas e massas moleculares foram compilados em um único gráfico (Figura 27), mostrando que as proteínas de *A. juruensis* formam um grupo separado das outras espécies. A proteína de

interesse chamou a atenção por se encontrar isolada das demais, devido sua carga negativa (-33) e pI (4,0).

Observa-se, ainda, que o padrão de aminoácidos é diferente das demais, com maior quantidade dos aminoácidos serina e alanina, o que está em consenso com o que já foi descrito a respeito de fibroínas de Mygalomorphae (Garb *et al.*, 2007, Gatesy *et al.*, 2001).

Muitas seqüências da região C-terminal de espidroínas estão disponíveis nos bancos de dados, já que a maioria dos estudos foram realizados a partir de bibliotecas de cDNA. Observa-se também, que a maior parte das sedas analisada na literatura pertence ao grupo das aranhas araneomorfas. A aranha *A. juruensis* pertence ao grupo migalomorfos, ainda pouco estudado quanto às espidroínas produzidas. Porém, algumas seqüências C-terminais já foram descritas e estas foram utilizadas para realizar o alinhamento, que mostrou ser conservada em relação às espidroínas de Mygalomorphae, assim como observado por Garb *et al.* (2007).

Já seqüências N-terminais de migalomorfos não constam na literatura e em bancos de dados. Portanto, esta região da AJSilk Gland Protein – 1 foi comparada com de outras espécies de araneomorfas. Mesmo assim, essa possui alguns pontos conservados. Devido à diferença de grupos utilizados nos alinhamentos, não é possível afirmar que região C-terminal é mais conservada que a N-terminal, apesar dos multialinhamentos mostrarem isso.

A estratégia utilizada para construção dos genes repetitivos apresenta várias vantagens em relação aos outros mecanismos descritos anteriormente (Lewis *et al.*, 1996). O método mostrou que a utilização de sítios de restrição compatíveis e que não se regeneram permite o controle preciso da manipulação do número de repetições do DNA, além de possibilitar a construção de genes maiores, com maior número de repetições, que produzirá uma proteína mais próxima do tamanho natural. Essa estratégia permite o design de fibras com propriedades diversas, por meio da mistura desses peptídeos, devido à correlação que existe entre os módulos repetitivos que compõem a estrutura da proteína e a função de cada seda.

Essa estratégia utilizada na construção dos vetores de expressão de ECNCFlag, adaptada de Lewis *et al.* (1996), se mostrou eficiente. Os módulos

1, 2, 3 e 4 foram multiplicados e os resultados foram positivos como mostrado na Figura 28. Porém, os sequenciamentos das construções finais, mostraram erros nos vetores pET19bECNCFlag3313 e 3323. Estes devem passar por uma reconstrução, para possibilitar comparações no futuro, entre os diferentes arranjos, de forma mais completa. Além disso, sua reconstrução será fácil, já que os vetores intermediários, como pBSK- M1.3, M2.3, M3.1, M3.2 e M4.3, estão prontos e confirmados.

A construção do vetor pET19b ECAJSilk Gland Protein – 1 também foi realizada com sucesso. As técnicas de PCR e digestão parcial funcionaram de forma efetiva como pode ser observado nas Figuras 30 e 31. Porém, várias tentativas foram realizadas para detectar sua expressão, mas nem o SDS-PAGE, nem a técnica de “Western blot” mostraram um resultado positivo. Alguns fatores podem estar relacionados com este fato, como por exemplo, a sua toxicidade. Proteínas tóxicas à célula utilizada como sistema de expressão, podem não ser expressas, e se forem, ocorrem em baixos níveis, já que as células podem morrer, ou simplesmente expulsar o vetor de expressão (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004). Vários parâmetros, que serão discutidos mais adiante, devem ser testados para se obter sucesso na produção heteróloga desta proteína.

Quanto a expressão das construções de ECNCFlag, não foi possível sua visualização no extrato lisado da bactéria em SDS-PAGE corado com Coomassie blue. Estas foram detectadas apenas pela técnica “Western Blot” e após a purificação por afinidade em coluna de Níquel, assim como em Arcadiacono *et al.* (1998).

Quando as proteínas de interesse foram detectadas, por “Western blot”, percebeu-se que seus pesos moleculares não correspondiam aos calculados teoricamente, quando se comparado com os padrões de massa molecular utilizados. Foi descartada a formação de um dímero como explicação para este fato, já que a massa estimada não foi o dobro, como deveria ser, caso esta fosse a melhor hipótese.

No caso da proteína ECNCFlag2222, o tamanho foi quase o dobro, aproximadamente 1,74 vezes maior que o esperado. Porém, no caso de ECNCFlag4424 o resultado foi de aproximadamente 1,36 vezes maior, descartando a possibilidade de formação de dímero. Outra explicação poderia

ser a interação de uma proteína oriunda da bactéria com as proteínas heterólogas. Neste caso, todas deveriam ter seu tamanho aumentado de forma igual.

Constam na literatura, migrações aberrantes em SDS-PAGE. Essas são bem conhecidas com proteínas que apresentam modificações pós-traducionais como fosforilação, glicosilação e pontes dissulfeto (Iakoucheva *et al.*, 2001). Mas como a proteína deste trabalho foi expressa em *E. coli* BL21(DE3)PlysS, que não realiza transformações pós-traducionais, o problema da migração deve estar relacionado com a seqüência de aminoácidos. Trabalhos já mostraram que o excesso de cargas positivas e negativas na proteína também pode interferir na migração em SDS-PAGE (Armstrong e Roman, 1993; Hu e Ghabrial, 1995).

Armstrong e Roman (1993), demonstraram, por meio de análise de mutantes, que o comportamento eletroforético anormal na proteína E7 de papilomavirus humano tipo 16 é devido à presença de aminoácidos negativos. McGrath *et al.* (1992) sugeriram que os problemas na migração das proteínas expressas por eles, também estavam relacionados com os resíduos carregados negativamente. Portanto, o peso molecular aparente estimado por SDS-PAGE maior do que o esperado para as proteínas em estudo, pode ser explicado pelas cargas negativas encontradas no espaçador (módulo 3 – M3). Assim como neste trabalho, Shimizu *et al.* (2004a) expressaram Flag de *N. clavata* em *E. coli* e observaram uma banda principal do no SDS-PAGE com baixa mobilidade eletroforética. Adicionando-se, assim, um ponto positivo para hipótese de que os espaçadores podem está interferindo na migração.

E. coli é o procarioto mais utilizado como sistema de expressão para produção de altos níveis de proteínas heterólogas (Hannig e Makrides, 1998). Trata-se do método mais antigo e com mais resultados positivos (Balbás, 2001). Além disso, possui a habilidade de crescer rápido, em alta densidade e em meio de fácil preparo (Baneyx, 1999). Outra vantagem é o extenso estudo sobre otimização da produção, além dos protocolos rápidos e bem estabelecidos (Balbás, 2001; Baneyx, 1999; Das, 1990; Hannig e Makrides, 1998; Makrides, 1996; San *et al.*, 1994; Weickert *et al.*, 1996). Desta forma, os baixos níveis de expressão encontrados inicialmente na produção podem ser contornados por meio da modificação de vários parâmetros.

A proteína ECNCFlag2222 foi escolhida para realização de testes em diferentes condições de expressão. Foram testadas três condições como descrito anteriormente. Foi realizada uma expressão controle, ou seja, sem a indução com IPTG, que mostrou a existência de uma expressão basal, que ocorre em baixos níveis, mas que pode estar relacionada com a produção ineficiente das proteínas de interesse. Segundo Hannig e Makrides (1998), os promotores utilizados na construção dos vetores de expressão devem possuir níveis mínimos de transcrição basal, pois a proteína produzida pode ser tóxica para a bactéria, diminuindo a eficiência na produção.

Para inibir a transcrição basal, um livro guia da Amersham Pharmacia Biotech ("The Recombinant Protein Handbook: Protein Amplification and Simple Purification"), sugere a utilização de um meio LB com adição de 2% de glicose para vetores que utilizam o promotor *lac*, como é o caso. Níveis basais de expressão podem ser minimizados por repressão catabólica, como, por exemplo, a adição de glicose, que não afeta a expressão após a indução. Quando comparado com a expressão que utilizou apenas meio LB e IPTG, foi possível observar um grande aumento na expressão em meio LB 2% Glicose. Porém, isto ocorreu apenas quando comparado ao pellet, contendo proteínas insolúveis.

A expressão de ECNCFlag2222 em meio LB e com 4 horas de indução com IPTG mostrou que existem proteínas tanto na fração solúvel, como nos corpos de inclusão insolúveis. Na condição de expressão em que foi adicionado Glicose no meio LB, os níveis de expressão nos corpos de inclusão foram extremamente aumentados. Mas quando analisada a fração solúvel, foi possível perceber que os níveis foram menores em relação ao meio sem glicose. Isto pode ter ocorrido porque, a formação de agregados insolúveis é uma freqüente consequência de altos níveis de produção de proteínas no citoplasma (Hannig e Makrides, 1998). Em meio que contém glicose, os níveis foram extremamente altos, o que levou a formação dos corpos de inclusão.

Algumas alterações nas condições de expressão - segundo a literatura - podem ser feitas com o intuito de minimizar a produção de corpos de inclusão e aumentar o nível de proteínas na fração solúvel. De acordo com o livro guia da Amersham Pharmacia Biotech podem ser realizadas as seguintes alterações:

- diminuir a temperatura de indução (entre 20 e 30°C), para aumentar a solubilidade;
- diminuir a concentração de IPTG para alterar os níveis de indução;
- induzir por períodos curtos de tempo;
- induzir com maiores densidades celulares por menos tempo e;
- aumentar a aeração, pois alta taxa de transporte de oxigênio pode ajudar a prevenir a formação de corpos de inclusão.

De acordo com Hannig e Makrides (1998), algumas vantagens são encontradas na formação de corpos de inclusão, a exemplo da facilidade de isolamento, proteção contra proteases, inatividade da proteína (não prejudicial à célula de expressão) e altas concentrações de proteínas. Mas a recuperação da atividade biológica pode ser muito custosa para produções em larga escala. Além disso, para solubilizar os corpos de inclusão é necessário utilizar desnaturantes como guanidina-HCl e uréia. O que pode atrapalhar o processo de purificação, além da necessidade de realizar uma diálise complicada, devido às altas concentrações destes desnaturantes utilizadas.

Neste trabalho, portanto, a proteína na fração solúvel é de maior interesse, devido a facilidade na purificação. É necessária uma grande quantidade de proteína purificada para realizar a polimerização em laboratório. Nas aranhas, a polimerização da seda ocorre em alta concentração das proteínas no lúmen glandular. A polimerização artificial também requer uma grande quantidade de proteína em solução, além da ausência de proteínas contaminantes que possam interferir no alinhamento dos polímeros. Segundo Teulé *et al.* (2007), a solução utilizada para polimerização em laboratório possui de 25-30% (m/v) de proteína purificada, liofilizada e solubilizada em solvente orgânico.

A cromatografia de afinidade foi escolhida para a purificação das proteínas de interesse devido as mesmas possuírem uma cauda de histidina advinda do vetor de expressão pET19b utilizado. Esse método de purificação possui algumas vantagens, como a ligação específica e reversível da proteína alvo na coluna, além de alta seletividade e rendimento. Em Teulé *et al.* (2007) a presença da cauda de histidina na proteína Masp2 de *N. clavipes* purificada, aparentemente não afetou o processo de polimerização para produção de

fibras feito posteriormente. Além disso, uma vantagem na adição dessa cauda é a fácil identificação da proteína por anticorpos anti-His em técnicas de imunoenensaio, como realizados neste trabalho.

Os testes realizados para determinar as melhores condições de purificação foram realizados com a fração solúvel resultante da expressão da proteína ECNCFlag2222. O primeiro teste (Figura 34) mostrou que a lavagem com 50mM de imidazole foi insuficiente para retirar todos os contaminantes. Além disso, 100 mM de imidazole não é suficiente para retirar as proteínas de interesse, que ficam fortemente ligadas ao níquel presente na coluna de cromatografia.

Com o intuito de solucionar esses problemas, um segundo teste mostrou que a lavagem com 80 mM foi suficiente para retirar a maior parte dos contaminantes e portanto, para garantir uma maior pureza. A melhor concentração de imidazole que deve ser utilizada no tampão de lavagem da coluna é de 100 mM. No teste II, a coluna foi estripada com “Strip Buffer”, o que comprovou que grandes concentrações de imidazole devem ser utilizadas para reitirar a proteína da coluna, ou utilizar o próprio “Strip Buffer” como solução de eluição. Como pode ser observada na Figura 36, a purificação foi relativamente eficiente, apesar da presença de pouquíssimos contaminantes. Concentrações maiores que 100 mM de imidazole devem ser testadas tanto para melhorar a pureza, como para determinar o melhor tampão de eluição.

Foi realizado um “Western blot” para confirmar que a banda presente no “Strip Buffer” era realmente a ECNCFlag. Este mostrou uma banda do tamanho esperado, quando comparado com o padrão de massa molecular. Porém, mostrou uma banda com o dobro de tamanho em kDa, podendo essa ser considerada um dímero. Além dessas bandas, foi evidenciada outra na fração eluída com 80 mM de imidazole. Essa, assim como a que pode ser considerada um dímero, podem constituir proteínas contaminantes, ricas em histidina, advindas da bactéria utilizada na expressão. Para saber sua origem, deve ser realizada uma purificação, com o mesmo protocolo, mas utilizando a fração solúvel resultante da expressão de um clone BL21(DE-3)PLysS não transformado com vetor de expressão.

Por meio da purificação, foi possível estimar a quantidade de proteína produzida por litro de cultura na condição de expressão com IPTG 1

mM durante 4 horas. Juntando as frações “Strip 2” e “Strip 3” foi estimada uma produção de 0,8 mg/L de cultura.

São difíceis comparações com outros trabalhos realizados com Flag, devido à existência de poucos estudos na literatura. Além disso, foram utilizados diversos sistemas de expressão. Primeiro Zhou *et al.* (2001) descreveram a biossíntese de um polipeptídeo construído com base no domínio repetitivo da Flag de *N. clavipes* e obtiveram uma produção de 11,6 mg/L de cultura. Análises dessa proteína em solução e em filmes sólidos demonstraram a presença de voltas- β , como esperado. Shimizu *et al.* (2004a) expressaram Flag de *N. clavata* em *E. coli* e obtiveram uma produção de 50 mg/L de cultura. Esse mesmo grupo, com a mesma seqüência, utilizou células de inseto e sistemas de expressão de baculovírus. Uma expressão transiente da Flag foi obtida na fração solúvel e as estruturas voltas- β foram confirmadas por dicroísmo circular, comprovando a retenção das propriedades mecânicas (Shimizu *et al.*, 2004b). Miao *et al.* (2006a) usaram o sistema “BmNPV bacmid” para infectar linhagens de células de *B. mori*, com o intuito de expressar Flag de *N. clavata*. Resultados de SDS-PAGE e “Western blot” confirmaram a presença da proteína de 37 kDa. O nível de expressão encontrado foi de 0,08 mg por 6 mL (13 mg/L) de cultura da linhagem de célula. Continuando o trabalho, Miao *et al.* (2006b) expressaram o gene da Flag de *N. clavata* em larvas de *B. mori* utilizando o sistema de expressão Bac-to-Bac/BmNPV de baculovirus e obtiveram a expressão de uma proteína de 37 kDa com um rendimento de 45 μ g/mL (45 mg/L) de hemolinfa de larva.

Considerando as discussões realizadas acima, este projeto ainda contém vários passos que devem ser realizados. A expressão deve ser otimizada, testando-se mais parâmetros e ampliando estes, para todos os vetores construídos. Os vetores ECNCFlag3313 e 3323 devem ser reconstruídos, para que ocorra uma melhor comparação, além das construções de novas combinações, como ECNCFlag3221, 5411, 3614 e assim por diante. Esta engenharia de módulos pode ajudar em uma série de elucidações a respeito da importância das repetições nas características mecânicas das sedas de aranhas. Além disso, purificação e expressão devem ser realizadas em larga escala, para que a polimerização artificial seja realizada com sucesso.

Faz-se necessário realçar a importância do estudo de proteínas ainda desconhecidas, como a AJ Silk Gland Protein – 1. Esta pode estar relacionada com importantes processos no ciclo de vida da aranha *Avicularia juruensis*, como a estrutura da seda produzida por ela ou até mesmo proteção. A expressão em larga escala dessa proteína será importante para realização de testes de sua atividade.

6. CONCLUSÃO

AJSilk Gland Protein – 1

- O estudo e expressão da proteína AJSilk Gland Protein – 1 pode ajudar a elucidar importantes processos no ciclo de vida da aranha *Avicularia juruensis*, como a estrutura da seda produzida por ela ou até mesmo proteção. Pode ainda contribuir bastante na história evolutiva das espidroínas.

- A construção do vetor de expressão foi realizada com sucesso.

- Será necessária sua expressão em larga escala, tendo em vista a realização de testes de atividade.

NCFlag-like

- A estratégia utilizada na construção dos vetores de expressão para NCFlag-like mostrou-se eficiente.

- Além disso, a expressão das proteínas foi confirmada por “Western blot” tanto na fração solúvel, como na insolúvel.

- Porém seus níveis estão abaixo do esperado. Alguns testes com diferentes condições de expressão mostraram que é possível modificar este quadro e otimizar a quantidade de proteínas expressas na fração solúvel.

- Já a purificação ocorreu de forma efetiva. Desta forma será possível obter grandes quantidades da proteína pura, por meio da otimização da expressão e da purificação, para que a polimerização artificial seja realizada com sucesso.

7. PERSPECTIVAS

- O futuro deste trabalho visa a produção de diferentes fibras com propriedades mecânicas distintas para uso comercial. Desde a descoberta da natureza repetitiva das espidroínas, foi possível realizar uma engenharia modular, de forma a produzir polímeros com conjuntos de módulos que correspondem às características de interesse - como porcentagem de elasticidade, de resistência da fibra ou até a mistura das duas.

- Devem ser realizadas novas engenharias modulares, utilizando-se as regiões C-terminais e N-terminais.

- O entendimento de como funciona cada parte modular, que compõe o gene é de fundamental importância para produção de fibras, com características cada vez mais próximas do esperado.

- É muito visada a possibilidade de criar o biopolímero de interesse para o uso comercial: produtos cirúrgicos, farmacêuticos, indústria têxtil, militar entre outros.

- Bioengenheiros deverão desenvolver maquinarias para polimerização artificial de grandes quantidades de espidroínas em solução, para fins comerciais.

- Para que isso aconteça, devem ocorrer colaborações entre vários grupos de pesquisa, com a finalidade de potencializar os processos de manipulação gênica, expressão e polimerização para que possam ocorrer, da forma mais precisa possível.

- Se este trabalho futuro for efetivo, a produção de biopolímeros baseada em seda de aranha influenciará profundamente o uso de biomateriais em termos globais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allmeling, C., Jokuszies, A., Reimers, K., Kall, S. e Vogt, P.M. 2006. Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. *J Cell Mol Med.* 10:770-777.

Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J. e Kaplan, D.L. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials.* 24:401-416.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. e Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.

Andersen, S.O. 1970. Amino acid composition of spider silks. *Comp. Biochem. Physiol.* 35:705-711.

Arcidiacono, S., Mello, C., Kaplan, D., Cheley, S. e Bayley, H. 1998. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49:31-38.

Armstrong, D.J. e Roman, A. 1993. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:1380-1387.

Artkins, E. 2003. Silk's secrets. *Nature.*424:1010.

Balbás, P. 2001. Understanding the Art of Producing Protein and Nonprotein Molecules in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology.* 19:251-267.

Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology.* 10:411-421.

Barr, L.A., Fahnestock, S.R., Yang, J. 2004. Production and Purification of Recombinant DP1B Silk-like Protein in Plants *Mol. Breeding.* 13:345-356.

Beckwitt, R., Arcidiacono, S. e Stote, R. 1998. Evolution of repetitive proteins: spider silks from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentarius* (Araneidae). *Insect. Biochem. Molec.* 28:121-130.

Bini, E., Knight, D.P. e Kaplan, D.L. 2004. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *J. Mol. Biol.* 335:27-40.

Bittencourt, D., Souto, B.M., Verza, N.C., Vinecky, F., Dittmar, K., Silva Jr, P.I., Andrade, A.C., da Silva, F.R., Lewis, R.V. e Rech, E.L. 2007. Spidroins from the Brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae:Nephilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology.* 147(B):597-606.

Black, J. 1992. *Biological performance of materials.* 2nd ed. Marcel Dekker

- Blackledge, T.A. e Hayashi, C.Y. 2006. Unraveling the mechanical properties of composite silk threads spun by cribellate orb-weaving spiders. *J Exp Biol.* 209:3131-3140.
- Bondar, B., Fuchs, S., Motta, A., Migliaresi, C. e Kirkpatrick, C.J. 2008. Functionality of endothelial cells on silk fibroin nets: Comparative study of micro- and nanometric fibre size. *Biomaterials.* 29:561-572.
- Bram, A., Braenden, C.I., Craig, C., Snigireva, I.I. e Riekel, C.J. 1997. X-ray diffraction from single fibres of spider silk. *appl. crystallogr.* 30:390-392.
- Brescovit, A.D., Bertani, R., Pinto-da-Rocha, R. e Rheims, C.A. 2004. Aracnídeos da Estação Ecológica Juréia-Itatins: Inventário preliminar e história natural. In Marques, O. A. V. e Duleba, W. (Editores). Estação Ecológica Juréia-Itatins: Ambiente físico, flora e fauna. Ed. Holos. Ribeirão Preto. .198-221.
- Brescovit, A.D., Bonaldo, A.B., Bertani, R. e Rheims, C.A. 2002. Araneae. In Amazonian Arachnida and Myriapoda. Joachim Adis (Editor). Pensoft Publishers, Sofia-Moscow.:303-343.
- Capello, J., Crissman, J., Dorman, M., Mikolajczak, M., Textor, G., Marquet, M., Ferrari, F. 1990. Genetic engineering of structural protein polymers. *Biotechnol. Prog.* 6:198-202.
- Chen, X., Knight, D.P., Shao, Z. e 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.
- Chuck-Paim, C. e Alonso W.J. 2001. Deciding where to settle: conspecific attraction and web site selection in the orb-web spider *Nephilengys cruentata*. *Animal Behaviour.* 62:1007-1012.
- Coddington, J.A., Giribet, G., Harvey, M.S., Prendini, L. e Walter, D.E. 2004. Arachnida. In Cracraft, J.e.D., M., (Ed.): *Assembling the tree of life*, pp. 296-318. Oxford University Press., New York.
- Colgin, M.A. e 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. 1997. Evolution of arthropod silks *Annu Rev Entomol.* 42:231-267.
- Craig, C. 2003. *Spider webs and silk, tracing evolution from molecules to genes to phenotypes*. Oxford University press, New York.
- Das, A. 1990. Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: vectors, hosts, and strategies. *Methods Enzymol.* 182:93-112.

Denny, M.W. 1980. Silks - their properties and functions. In: Vincent, J.F.V., Currey, J.D. (Eds). *Mechanical properties of Biological Materials*. Cambridge University Press, Cambridge.247-272.

Dicko, C., Knight, D., Kenney, J.M. e Vollrath, F. 2004. Secondary structures and conformational changes in flagelliform, cylindrical, major, and minor ampullate silk proteins. Temperature and concentration effects. *Biomacromolecules*. 5:2105-2115.

Dicko, C., Vollrath, F. e Kenney, J.M. 2004. Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. *Biomacromolecules*. 5:704-710.

Dong, Z., Lewis, R.V. e Middaugh, C.R. 1991. Molecular mechanism of spider silk elasticity. *Arch Biochem Biophys*. 284:53-57.

Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. e Vuillard, L. 2004. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expression and Purification*. 37(1):203-206.

Edmonds, D. e Vollrath, F. 1992. The contribution of atmospheric water vapour to the formation and efficiency of a spider's web. *Proc. R. Soc. Lond*. 248:145-148.

Fahnestock, S.R. e Bedzyk, L.A. 1997. Production of synthetic spider dragline silk protein in Pichia pastoris. *Appl Microbiol Biotechnol*. 47:33-39.

Fahnestock, S.R. e Irwin, S.L. 1997. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol*. 47:23-32.

Foelix, R.F. 1996. *Biology of Spiders*. Oxford University Press, Inc. e Georg Thieme Verlag, New York.

Garb, J.E., DiMauro, T., Lewis, R.V. e Hayashi, C.Y. 2007. Expansion and intragenic homogenization of spider silk genes since the Triassic: evidence from Mygalomorphae (tarantulas and their kin) spidroins. *Mol Biol Evol*. 24:2454-2464.

Garb, J.E. e Hayashi, C.Y. 2005. Modular evolution of egg case silk genes across orb-weaving spider superfamilies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:11379-11384.

Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. e Lewis, R. 2001. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science*. 291:2603-2605.

Gobin, A.S., Rhea, R., Newman, R.A. e Mathur, A.B. 2006. Silk-fibroin-coated liposomes for long-term and targeted drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 1:81-87.

Gosline, J.M., DeMont, M.E., Denny, M.W. 1986. The structure and properties of spider silk. *Endeavour*. 10:31-43.

Gosline, J.M., Guerette, P.A., Ortlepp, C.S., Savage, K.N. 1999. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J. Exp. Biol.* 202:3295-3303.

Gosline, J.M., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C. e Savage, K. 2002. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357:121-132.

Grubb, D.T. e Ji, G. 1999. Molecular chain orientation in supercontracted and re-extended spider silk. *Int J Biol Macromol.* 24:203-210.

Guerette, P.A., Ginzinger, D.G., Weber, B.H. e Gosline, J.M. 1996. Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science.* 272:112-115.

Hannig, G., Makrides, S.C. 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tibtech.* 16:54-60.

Haupt, J. e Koor, J. 1993. Silk-gland system and silk production in Mesothelae (Araneae). *Ann Sci Nat Zool Biol Anim.* 14:35-48.

Hayashi, C.Y., Blackledge, T.A. e Lewis, R.V. 2004. Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. *Mol Biol Evol.* 21:1950-1959.

Hayashi, C.Y. e Lewis, R.V. 1998. Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *J Mol Biol.* 275:773-784.

Hayashi, C.Y. e Lewis, R.V. 2000. Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. *Science.* 287:1477-1479.

Hayashi, C.Y., Shipley, N.H. e Lewis, R.V. 1999. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int J Biol Macromol.* 24:271-275.

Hinman, M.B., Jones, J.A. e Lewis, R.V. 2000. Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends Biotechnol.* 18:374-379.

Hinman, M.B. e Lewis, R.V. 1992. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. *J Biol Chem.* 267:19320-19324.

Hu, C.C. e Ghabrial, S.A. 1995. The conserved, hydrophilic and arginine-rich N-terminal domain of cucumovirus coat proteins contributes to their anomalous electrophoretic mobilities in sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels. *J. Virol. Meth.* 55:367-379.

Hu, X., Lawrence, B., Kohler, K., Falick, A.M., Moore, A.M., McMullen, E., Jones, P.R. e Vierra, C. 2005. Araneoid egg case silk: a fibroin with novel

- ensemble repeat units from the black widow spider, *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry*. 44:10020-10027.
- Hu, X., Vasanthavada, K., Kohler, K., McNary, S., Moore, A.M. e Vierra, C.A. 2006. Molecular mechanisms of spider silk. *Cell Mol Life Sci*. 63:1986-1999.
- Huemmerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U. e Ittah, S. 2004. Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Curr Biol*. 14:2070-2074.
- Hutchinson, E. e Thornton, J. 1994. A revised set of potentials for the β -turn formation in proteins. *Protein Sci*. 3:2207-2216.
- Iakoucheva, L.M., Kimzey, A.L., Masselon, C.D., Smith, R.D., Dunker, A.K. e Ackerman, E.J. 2001. Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. *Protein Science*. 10:1353-1362.
- Jin, H.J. e Kaplan, D.L. 2003. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*. 424:1057-1061.
- Kaplan, D.L., Adams, W.W., Farmer, B. e Viney, C. 1994. Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology. *American Chemical Society Symposium Series*. 544:234-251.
- Kaplan, D.L., Mello, C. M., Arcidiacono, S., Fossey, S., Senecal, K. e Muller, W. 1998. Silk. In: McGrath, K., Kaplan, D. L. (Eds.), Protein Based Materials.
- Knight, D.P. e Vollrath, F. 2002. Spinning an elastic ribbon of spider silk. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 357:219-227.
- Koch, L. 1872. *Die Arachniden Australiens*, Nürnberg.
- Kümmerlen, J., van Beek, J.D., Vollrath, F. e Meier, B.H. 1996. Local structure in spider dragline silk investigated by two-dimensional spin-diffusion NMR. *Macromolecules*. 29:2920-2928.
- Kuntner, M. 2007. A monograph of Nephilengys, the pan tropical hermit spiders (Araneae, Nephilidae, Nephilinae). *Systematic Entomology*. 32:95-135.
- Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J.F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E.A., Soares, J.W. e Karatzas, C.N. 2002. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science*. 295:472-476.
- Lewis, R.V. 2006. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials. *Chem Rev*. 106:3762-3774.
- Lewis, R.V., Hinman, M., Kothakota, S. e Fournier, M.J. 1996. Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins. *Protein Expr Purif*. 7:400-406.

- Li, S.F.Y., McGhie, A.J., Tang, S.L. 1994. Comparative study of the internal structures of Kevlar and spider silk by atomic force microscopy. *J. Vac. Sci. Technol.* 12(4):1891-1894.
- Lombardi, S.J. e Kaplan, D.L. 1990. The amino acid composition of major ampullate gland silk (dragline) of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae). *J. Arachnol.* 18:297-306.
- Lucas, F. 1964. Spiders and Their Silks. *Discovery.* 25:20-26.
- Makrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews.* 60:512-538.
- McGrath, K.P., Fournier, M.J., Mason, T.L. e Tirrell, D.A. 1992. Genetically Directed Syntheses of New Polymeric Materials Expression of Artificial Genes Encoding Proteins with Repeating - (AlaGly)₃ProGluGly - Elements. *J. Am. Chem. Soc.* 114:727-733.
- Mello-Leitão, C.F. 1923. Theraphosidae do Brasil. *Rev. Mus. Paulista.* 13:1-438.
- Miao, Y., Zhang, Y., Nakagaki, K., Zhao, T., Zhao, A., Meng, Y., Nakagaki, M., Park, E.Y. e Maenaka, K. 2006 a. Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71:192-199.
- Miao, Y.G., Zhao, A.C., Zhang, Y.S., Nakagaki, K., Meng, Y., Zhao, T.F. e Nakagaki, M. . 2006 b. Silkworm, *Bombyx mori* larvae expressed the spider silk protein through a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus. *J. Appl. Entomol.* 130(5):297-301.
- Michal, C.A., Simmons, A.H., Chew, B.G., Zax, D.B. e Jelinski, L.W. 1996. Presence of phosphorus in *Nephila clavipes* dragline silk. *Biophys J.* 70:489-493.
- Minoura, N., Aiba, S., Higuchi, M., Gotoh, Y., Tsukada, M. e Imai, Y. 1995. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem Biophys Res Commun.* 208:511-516.
- Parker, S.P. 1982. *Synopsis and classification of living organisms*. McGraw-Hill Ed, New York.
- Parkhe, A.D., Seeley, S.K., Gardner, K., Thompson, L. e Lewis, R.V. 1997. Structural studies of spider silk proteins in the fiber. *J Mol Recognit.* 10:1-6.
- Platnick, N.I. 2008. The world spider catalog, version 8.5. *American Museum of Natural History*, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.
- Platnick, N.I. e Gertsch, W.J. 1976. The suborders of spiders: a cladistic analysis (Arachnida, Araneae). *Am Mus Novit.* 2607:1-15.

- Prince, J.T., McGrath, K.P., DiGirolamo, C.M. e Kaplan, D.L. 1995. Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry*. 34:10879-10885.
- Qin, X.X., Coyne, K.J. e Waite, J.H. 1997. Tough tendons. Mussel byssus has collagen with silk-like domains. *J Biol Chem*. 272:32623-32627.
- Riekel, C., Madsen, B., Knight, D. e Vollrath, F. 2000. X-ray diffraction on spider silk during controlled extrusion under a synchrotron radiation X-ray beam. *Biomacromolecules*. 1:622-626.
- Rising, A., Nimmervoll, H., Grip, S., Fernandez-Arias, A., Storckenfeldt, E., Knight, D.P., Vollrath, F. e Engstrom, W. 2005. Spider silk proteins--mechanical property and gene sequence. *Zoolog Sci*. 22:273-281.
- San, K.Y., Bennett, G.N., Aristidou, A.A. e Chou, C.H. 1994. Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 721:257-267.
- Scheibel, T. 2004. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb. Cell Fact*. 3:14.
- Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F. e Conrad, U. 2001. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol*. 19:573-577.
- Scheller, J., Henggeler, D., Viviani, A. e Conrad, U. 2004. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res*. 13:51-57.
- Selden, P.A. e Gall, J.C. 1992. A Triassic mygalomorph spider from the northern Vosges, France. *Palaeontology*. 35:211-235.
- Shimizu, K., Shiomi, K., Kajiura, Z. e Nakagaki, M. 2004 a. Nephila clavata flagelliform silk protein expressed in *E. coli*. *Journal of Sericultural Science of Japan*. 73(1):15-21
- Shimizu, K., Shiomi, K., Kajiura, Z. e Nakagaki, M. 2004 b. Nephila clavata flagelliform silk protein expressed in insect cells. *Journal of Sericultural Science of Japan*. 73/1:23-29.
- Silver, F.H. e Christiansen, D.L. 1999. Biomaterials Science and biocompatibility. *Springer*.
- Simmons, A.H., Michal, C.A. e Jelinski, L.W. 1996. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science*. 271:84-87.
- Simmons, A., Ray, E. e Jelinski, L.W. 1994. Solid state ¹³C-NMR of *N. clavipes* dragline silk establishes structure and identity of crystalline regions. *Macromolecules*. 27:5235-5237.

- Smith, D.M., Smith, A., Hayashi, C.Y. e Lewis, R.V. 2005. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampollate spider silk proteins. *Biomacromolecules*. 6:3152-3159.
- Stantcheva, N.N.P. e Mason, S.J.M. 2004. Molecular studies of a novel dragline silk from nursery web spider, *Euprosthenops* sp (Psauridae). *Comp. Biochem. Physiol.* 138:371-376.
- Stauffer, S., Cougill, S. e Lewis, R.V. 1994. Comparasion of physical properties of three silks from *Nephila clavipes* and *Araneus gemmoides*. *J. Arachnol.* 22:5-11.
- Takahashi, Y., Gehoh, M. e Yuzuriha, K. 1999. Structure refinement and diffuse streak scattering of silk (*Bombyx mori*). *Int J Biol Macromol.* 24:127-138.
- Tamburro, A.M., Guantieri, V., Scopa, A. e Drabble, J.M. 1991. Polypeptide Models of Elastin: CD and NMR Studies on Synthetic Poly(X-Gly-Gly). *Chirality*. 3:318-323.
- Tatham, A.S. e Shewry, P.R. 2000. Elastomeric Proteins: Biological roles, Structures and Mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 25:567-571.
- Teddei, P., Tinti, A. e Fini, G. 2001. Vibrational spectroscopy of polymeric biomaterials. *J Raman Spectrosc.* 32:619-629.
- Teulé, F., Furin, W.A., Cooper, A.R., Duncan, J.R. e Lewis, R.V. 2007. Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. *J Mater Sci Mater Med.* 42:8974-8985.
- Thorell, T. 1870. On European spiders. *Nov. Act. reg. Soc. sci.* 7:109-242.
- Tian, M. e Lewis, R.V. 2005. Molecular characterization and evolutionary study of spider tubuliform (eggcase) silk protein. *Biochemistry.* 44:8006-8012.
- Tian, M., Liu, C. e Lewis, R. 2004. Analysis of major ampullate silk cDNAs from two non-orb-weaving spiders. *Biomacromolecules.* 5:657-660.
- Tillinghast, E.K., Townley, M.A., Bernstein, D.T. e Gallagher, K.S. 1991. Comparative study of orb web hygroscopicity and adhesive spiral composition in three araneid spiders. *J. Exp. Zool.* 25:154-165.
- Urry, D., Luan, C.-H. e Peng, S. 1995. Molecular biophysics of elastin structure, function and pathology. *Ciba Found. Symp.* 192:4-30.
- van Beek, J.D., Hess, S., Vollrath, F. e Meier, B.H. 2002. The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:10266-10271.
- Van Dijk, A., Van Wijk, L., Van Vliet, A., Haris, P., Van Swieten, E., Tesser, G. e Robillard, G. 1997. Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins I. Model studies using cyclic and linear peptides. *Prot. Sci.* 6:637-648.

Van Dijk, A.A., De Boef, E., Bekkers, A., Van Wijk, L.L., Van Swieten, E., Hamer, R.J. e Robillard, G.T. 1997. Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins. II. Characterization in solution and in the dry state. *Protein Sci.* 6(3):649-656.

Vollrath, F. 1992. Spider webs and silk. *Sci. Am.* 266:70-76.

Vollrath, F., Fairbrother, W.J., Williams, R.J.P., Tillinghast, E.K., Bernstein, D.T., Gallagher, K.S. e Townley, M.A. 1990. Compounds in the droplets of the orb spider's viscid spiral. *Nature.* 345:526-528.

Vollrath, F. 2000. Strength and structure of spiders silks. *Reviews in Molecular Biotechnology.* 74:67-83.

Vollrath, F. e Knight, D.P. 2001. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature.* 410:541-548.

Weickert, M.J., Doherty, D.H., Best, E.A. e Olins, P.O. 1996. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology.* 7:494-499

Work, R.W. 1976. The force-elongation behavior of web fibers and silks forcibly obtained from orb-web-spinning spiders. *Texas Res. J.* 46:485-492.

Work, R.W. e Young, C.T. 1987. The amino acid composition of major and minor ampullate silks of certain orb-web building spiders (Araneae, Araneidae). *J. Arachnol.* 15:65-80.

Xu, M. e Lewis, R.V. 1990. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:7120-7124.

Zhang, Y., Hu, J., Miao, Y., Zhao, A., Zhao, T., Wu, D., Liang, L., Miikura, A., Shiomi, K., Kajiura, Z. e Nakagaki, M. 2007. Expression of EGFP-spider dragline silk fusion protein in BmN cells and larvae of silkworm showed the solubility is primary limit for dragline proteins yield. *Mol Biol Rep.*

Zhou, Y., Wu, S. e Conticello, V.P. 2001. Genetically directed synthesis and spectroscopic analysis of a protein polymer derived from a flagelliform silk sequence. *Biomacromolecules.* 2:111-125.

ANEXO I

I. MATERIAIS

1. Enzimas:

1.1. Enzimas de restrição

Tabela 7. Enzimas de restrição utilizadas.

Enzima	Sítio de clivagem	Origem	Temperatura	Fabricante
<i>Bam</i> HI	G [^] GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	37°C	Promega
<i>B</i> SpeI	T [^] CCGGA	<i>Bacillus</i> sp. (H. Kong)	37°C	New England Biolabs
<i>N</i> deI	CA [^] TATG	<i>Neisseria denitrificans</i>	37°C	Promega
<i>S</i> caI	AGT [^] ACT	<i>Streptomyces caespitosus</i>	37°C	New England Biolabs e Promega
<i>X</i> maI	C [^] CCGGG	<i>Xanthomonas malvacaerum</i>	37°C	Promega
<i>X</i> hoI	C [^] TCGAG	<i>Xanthomonas holcicola</i>	37°C	Promega

1.2. Outras enzimas:

- T4 DNA ligase – (Invitrogen)
- Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity – 5U/μl (Invitrogen)

2. Meios de cultura para bactérias:

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura utilizados foram autoclavados a 120°C por 20 minutos. Quando necessário foi adicionado o(s) antibiótico(s) apropriado, nas seguintes concentrações: ampicilina 100 μg/ml, e clorafenicol 30 μg/ml.

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	

Para LB sólido, foi adicionado ágar bacteriológico a 1,5% (p/v).

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. Soluções para eletroforese em gel de agarose:

Tampão de amostra 5X

Glicerol	50,0% (v/v)
Azul de bromofenol	0,2% (p/v)
Solvente TBE	2,5X

Estocar a 4°C.

Tampão de corrida para gel de agarose (TBE) 5X

Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5M (pH 8,0)	20 mL
H ₂ O destilada qsp	1 L

pH 8,3

Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio	5 mg/ml
-------------------	---------

Marcadores de massa molecular (MM) para DNA

- Marcador “1 kb Ladder” da Invitrogen;
- Marcador GeneRuler™ Express DNA Ladder da Fermentas;
- Marcador FastRuler Low Range DNA Ladder da Fermentas;
- Marcador FastRuler Middle Range DNA Ladder da Fermentas.

4. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante:

Gel Separador 12%

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

Gel Concentrador 5%

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

Soluções:

Tampão Tris 1,5M pH 8,8 com SDS 0,4%:

Tris Base	72,66 g
SDS	1,6 g

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

Tampão Tris 1,5M pH 6,8 com SDS 0,4%:

Tris Base	48,44 g
SDS	1,6 g

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

Tampão de corrida 10X:

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

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

Tampão de Amostra 3X: adicionar 4 ml de H₂O

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

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

Solução estoque acrilamida/bis-acrilamida 30%

Acrilamida	30% (p/v)
Bis-acrilamida	0,8% (p/v)

Dissolver em água bidestilada e filtrar em papel Whatman.

Solução de persulfato de amônio

Persulfato de amônio 10% (p/v)

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

Foi utilizado o reagente TEMED da companhia Organic Research.

Marcadores de massa molecular (MM) para proteínas:

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

5. Soluções e materiais para imuno-deteção:

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

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

pH ajustado para 8,3

TBS 10X

NaCl	137 mM
Tris base	20 mM

pH ajustado para 7,6 com HCl.

TBST

TBS com 0,1% Tween 20.

Solução de bloqueio

Leite em pó (Molico)	5% (p/v)
----------------------	----------

Diluído em TBST.

Membrana de nitrocelulose

Hybond C⁺ (Amersham Biosciences)

Anticorpos:

- Anticorpo primário policlonal anti-His (His probe, H-15 sc 803 rabbit polyclonal IgG) da Santa Cruz Biotechnology, utilizado na diluição de 1:1000;
- Anticorpo monoclonal anti-His conjugado à fosfatase alcalina da SIGMA, utilizado na concentração de 1:4000;
- Anticorpo secundário anti-rabbit da Santa Cruz Biotechnology, em uma concentração de 1:5000.

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

Assay Buffer:

Tris-HCl pH 9,5	20 mM
MgCl ₂	1 mM
Preparar 40 mL de solução	

Working solution:

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

Substrate Dilution Buffer:

Dietanolamina	0,1 M
MgCl ₂	1 mM
Usar água deionizada	

6. Soluções e materiais para purificação:**Coluna:**

“HisTrap™ HP Columns” empacotada com “Ni Sepharose High Performance” coluna de 1 mL da “GE Healthcare”.

Soluções:Ácido deoxicólico:

Ácido deoxicólico	40 mg/mL
-------------------	----------

DNase:

DNase I (pó) da SIGMA	1 mg/mL
-----------------------	---------

Todas as soluções passadas na coluna foram filtradas com Milipore 0,22 µm.

Binding Buffer:

Tampão fosfato de sódio pH 7,4	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazole	5 mM

Elution Buffer:

Tampão fosfato de sódio pH 7,4	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazole	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mM

Strip Buffer:

Tampão fosfato de sódio pH 7,4	20 mM
NaCl	0,5 M
EDTA	50 mM

Recharge Buffer:

NiSO ₄	0,1M
-------------------	------

7. Outras soluções utilizadas:

Mistura de dNTPs

dATP (Gibco)	4 mM
dCTP(Gibco)	4 mM
dGTP(Gibco)	4 mM
dTTP(Gibco)	4 mM

IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo)

IPTG	0,8 M
------	-------

Dissolvido em água MilliQ. Esta solução era esterilizada por filtração em membrana microbiológica com poros de 0,22µm (Millipore). Usado na concentração de 1 mM para expressão e

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactose)

X-gal

20 mg/ml

Dissolvido em N,N-Dimetilformamida.

II. MÉTODOS

1. Preparo de bactérias competentes:

1.1. Choque térmico:

Um pré-inóculo em 5 ml de meio LB a partir de uma colônia isolada de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foi preparado e incubado à 37°C sob agitação (220 rpm) por aproximadamente 16 horas. Em seguida, preparou-se um inóculo em 500 ml de meio LB a partir de 1mL do pré-inóculo, este foi incubado à 37°C sob agitação (220 rpm) até atingir uma OD₆₀₀ = 0,5-0,6. A cultura foi incubada em gelo durante 20 minutos. Logo após, as células foram sedimentadas por centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos à 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso cuidadosamente em 10 ml de TSS (85 % meio LB, 10% PEG (MW 8000), 5% DMSO e 50 mM MgCl₂ (pH 6,2)) gelado (0°C). Foram feitas alíquotas de 150 μ l e guardadas em -80°C.

1.2. Eletroporação:

A partir de uma colônia bacteriana isolada de *E. coli* XL1 Blue, preparou-se um pré-inóculo em 5 ml de meio LB, este foi incubado a 37°C sob agitação (200 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-inóculo preparado anteriormente. O inóculo foi incubado à 37°C sob agitação (250 rpm) até atingir uma OD₆₀₀ = 0,6-0,8. Após este período, a cultura bacteriana foi resfriada em gelo por 15 a 30 minutos, e as células sedimentadas a 4000 rpm por 15 minutos à 4°C. Após a centrifugação, todo sobrenadante foi descartado, e o sedimento suspenso em 1L de água MilliQ estéril e gelada. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 20 ml de uma solução gelada de glicerol 10%, para então serem mais uma vez centrifugadas e ressuspensas em 2 a 3 ml de glicerol 10% gelado. A solução

bacteriana foi então congelada em alíquotas de 45 µl em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

2. Transformação de bactérias competentes:

2.1. Choque térmico:

Células BL21 (DE3) pLysS competentes foram transformadas com os plasmídeos ECNCFlag1111, ECNCFlag2212, ECNCFlag2222, ECNCFlag3313, ECNCFlag3323, ECNCFlag4414 e ECNCFlag4424 por choque térmico. Um tubo com alíquota de 100 µl de cultura de bactéria competente, previamente preparada e guardada à -80°C foi reservada no gelo durante 10 min. Então, adicionou-se o DNA plasmidial (cerca de 20 ng) às células, misturando e incubando no gelo durante 30 minutos. Os tubos foram transferidos para um banho à 42°C durante exatamente 90 segundos. Após esse período, foi passado rapidamente para o gelo durante 1 a 2 minutos. Adicionou-se 800 µl de meio LB ao tubo, misturando suavemente. Esse foi transferido para um banho à 37°C por 45 min. Todo o conteúdo foi plaqueado em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina (resistência de pET19b) e 30 µg/mL de cloranfenicol (resistência de pLysS).

2. 2. Eletroporação:

Uma alíquota de células competentes foi descongelada em banho de gelo e 1 a 2 µl de DNA (1-10 ng) foi adicionado às bactérias, e incubado no gelo por 1 minuto. Após este período, a mistura células/DNA foi colocada numa cuveta de eletroporação previamente resfriada, com um espaço de 0,1 cm entre os eletrodos (BioRad). A eletroporação foi realizada em um aparelho “BioRad eletroporator” ajustado para as seguintes condições: resistência de 200 Ω, capacitância de 25 µF e uma voltagem de 1,8kV. Deve ser aplicado apenas um pulso. O tempo ideal de descarga (“time constant”) pode ser lido no equipamento após a eletroporação, este deve estar entre 4-5 ms para se obter eficiência máxima. Imediatamente após a eletroporação foram adicionados 600 µl de meio LB, e as células foram suspensas cuidadosamente e transferidas para um tubo de centrifuga. Estes foram incubados em banho-maria à 37°C

durante 1 hora. Uma leve agitação durante este período pode aumentar a eficiência do processo. Após esta etapa, a cultura foi plaqueada 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 foram utilizados vetores pGEM-T easy ou pBSK-, foram adicionados ao meio LB sólido X-gal (32 ng/ml) e IPTG (0,5 mM), para identificação de colônias positivas (brancas).

3. Digestão com enzimas de restrição:

As digestões foram realizadas conforme instruções do fabricante das enzimas. O tempo de incubação, as concentrações de DNA e da enzima variavam de acordo com o material a ser digerido e a eficácia da enzima. Geralmente foram utilizadas 1U da enzima para cada 1 µg de DNA, incubados a 37°C por 1-3 horas.

4. Análise de DNA em gel de agarose:

O gel de agarose foi preparado em tampão TEB 0,5X com a concentração variando entre 1 a 2% (p/v). Foi utilizado brometo de etídeo a uma concentração de 0,5 µg/ml. As amostras de DNA, misturadas em tampão de amostra para gel de agarose, foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB 0,5X. Para visualização de DNA, utilizou-se luz ultravioleta com transiluminador de luz ultravioleta (UV).

5. Precipitação de proteínas com TCA:

Foi adicionado 133 µl de TCA (ácido tricloroacético) 75% à 1 mL de amostra contendo a proteína. Deixou-se durante 30 minutos no gelo para ocorrer a precipitação. Após, a amostra foi centrifugada durante 15 minutos à 14000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e 500 µl de acetona foi acrescentado. Uma nova centrifugação foi realizada durante 15 minutos à 14000 rpm e 4°C. O pellet, contendo a proteína, foi ressuscitado em tampão de amostra 1X (no caso da amostra ser utilizada em SDS-PAGE) ou em água.

ANEXO II

Tabela 8. Lista dos Aminoácidos, suas abreviações e nomenclatura (fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Amino%C3%A1cido>)

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Glicina	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe ou Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propionico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propionico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propionico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropionico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropionico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico