



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Produção e Caracterização Molecular de Fibras Sintéticas das Aranhas *Parawixia bistriata* e *Nephilengys cruentata*

Tese de Doutorado apresentada à
banca examinadora do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Molecular
do Departamento de Biologia Celular da
Universidade de Brasília.

Paula Elizabeth Farias e Oliveira

Orientador: Elíbio Leopoldo Rech Filho, PhD.

Brasília
2012

Dedico esse trabalho à minha mãe, Siomara.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, à minha mãe, Siomara, por todo amor, apoio incondicional e incentivo que permitiram estar onde estou. À minha avó, pelo grande amor e carinho que sempre teve por mim. Ao meu irmão, Daniel, pela amizade e companheirismo. Vocês são meu porto seguro!

Ao meu orientador, Dr. Elibio Rech, por ter acreditado na minha capacidade de trabalho, desde o mestrado, e pelo incentivo à continuação de meus estudos acadêmicos.

Aos Dr. Luciano Paulino da Silva, pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Ao Dr. Randy Lewis, por ter me recebido com entusiasmo em seu laboratório, na Universidade do Wyoming, para a realização do doutorado sanduíche.

Agradecimento especial à Dra. Florence Teulé e ao Dr. David Perry, cujo apoio, co-orientação e amizade foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas queridas amigas Gisele, Kelley, Leah, Amy e Ginny que com o calor de sua amizade amenizaram meus dias de solidão, quando estava tão longe de casa.

À minha amiga Betulia, com quem posso contar em todos os momentos, principalmente naqueles em que sua calma e equilíbrio fazem a diferença. Obrigada pela ajuda!

Aos amigos Larissa, Gabi e Nicolau, por estarmos sempre juntos, nos

apoiando mutuamente. E a Luísa, que mesmo longe, sempre está presente. Adoro vocês!

Às minhas amigas de longa data, com quem posso contar todas as horas, Alana, Maeda, Cinara e Anne.

Aos amigos, antigos e novos, que fiz durante todos esses anos na Embrapa, Júlio, Cristiano, Giovanni, Maria Laine, Bárbara, Thaina, Valquíria, Emanuel, Welcimar, Aninha, Andréa Rachel, Elsa e Gustavo, entre outros.

Aos membros da banca, Dra. Daniela Bittencourt, Dr. Marcelo Brígido, Dr. Thales Rocha e Dr. André Murad. Obrigada por aceitarem meu convite.

Ao departamento de Biologia Celular da UnB, pela oportunidade de cursar o doutorado.

À Embrapa, pela disponibilidade dos equipamentos e materiais que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Ao CNPq e Capes pela concessão das bolsas de estudo.

“Se eu vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton
(1642-1727)

Lista de Figuras

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	x
Capítulo 1	4
Figura 1: Funções das sedas produzidas pelas glândulas sericígenas de diversas aranhas tecedoras de teias orbitais. Adaptado de Eisoldt et al., 2011.....	5
Figura 2: Aranha <i>Nephilengys cruentata</i> . 2A: Dimorfismo sexual de tamanho entre o macho (menor) e a fêmea (maior) (Kuntner e Agnarsson, 2011). 2B: Fêmea coletada na Mata Atlântica em São Paulo – Brasil (foto por Felipe Rodrigues da Silva).....	8
Figura 3: Distribuição intercontinental da aranha <i>Nephilengys cruentata</i> (Năpărus e Kuntner, 2012).	8
Figura 4. As aranhas <i>P. bistriata</i> e o conjunto de teia formado por elas (Foto por Danilo Guarda).....	9
Figura 5. Modelo do processo de polimerização das sedas. A solução de fição é secretada e armazenada dentro da glândula. Quando a formação da fibra se inicia a solução passa por um fino canal onde ocorre a troca de íons e começa o processo de separação de fase. A fibra é puxada (patas traseiras das aranhas/gravidade) e resulta na rápida formação do fio da seda. Existem duas teorias de como ocorre o processo molecular dentro do ducto. A primeira sugere que as proteínas da seda formam uma solução de fição líquida-cristalina.....	10
enquanto a segunda defende que as proteínas da solução de fição se organizam na forma de micelas. (Adaptado de (Romer e Scheibel, 2008))	11
Figura 6. Sequências parciais de resíduos de aminoácidos referentes às regiões consenso repetitivas das proteínas produzidas pela glândula ampolada maior (MaSp 1 e 2). (-) Indica resíduos não presentes em relação a outras sequências. Espécies das aranhas: <i>Nep.c.</i> , <i>Nephila clavipes</i> ; <i>Nep.m.</i> , <i>Nephila madagascariensis</i> ; <i>Nep.s.</i> , <i>Nephila senegalensis</i> ; <i>Lat.g.</i> , <i>Lactrodectus geometricus</i> ; <i>Arg.t.</i> , <i>Argiope trifasciata</i> ; <i>Arg.a.</i> , <i>Argiope aurantia</i> ; <i>Gas.m.</i> , <i>Gasteracantha mammosa</i> ; <i>Ara.b.</i> , <i>Araneus bicentenarius</i> ; <i>Ara.d.</i> , <i>Araneus</i>	12
<i>diadematus</i> ; <i>Tet.k.</i> , <i>Tetragnatha kanaiensis</i> ; <i>Tet.v.</i> , <i>Tetragnatha versicolor</i> . (Adaptado de Lewis, 2006).	13
Figura 7. Modelo esquemático da estrutura da seda linha de segurança. A fibra é composta de pequenas regiões cristalinas formadas por subunidades ricas em folhas- β (região em destaque), separadas por estruturas amorfas. As partes cristalinas são covalentemente conectadas, garantindo força e maleabilidade. Adaptado de (Romer e Scheibel, 2008).....	14
Figura 8. Modelos estruturais encontrados nas proteínas de seda de aranha (Adaptado de Eisoldt et al., 2011)	15
Figura 9. Sequências consensos da seda Flageliforme de diferentes aranhas que produzem teias orbiculares (Bittencourt et al., 2007).	15
Capítulo 2 - Produção e Caracterização molecular de fibras sintéticas do tipo flageliforme da aranha <i>Nephilengys cruentata</i>	26

Figura 1. (a) Sequência de aminoácido da proteína flageliforme da aranha orbicular <i>N. cruentata</i> e seus diferentes motivos estruturais (GPGGX em vermelho, GGX em verde e a região espaçadora em azul). (b) As quatro unidades sintetizadas utilizadas na construção da sequência de seda sintética. (c) Sequência primária da proteína rNcFlag2222.....	34
Figura 2. (a) Análise eletroforética em gel de agarose do vetor prNcFlag 2222 (inserto de 765 pb). O plasmídeo foi digerido com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> . A banda menor corresponde ao inserto da Flag e a banda maior é o vetor pET19b-kan linearizado (5.8 kpb). Marcador 1 Kb DNA Ladder Invitrogen. (b) Análise de SDS-PAGE mostrando a proteína Flag purificada detectada por coloração por Coomassie blue. Padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Bio Rad (c) Análise de western blot usando anticorpo anti-poliHistidina. A seta apontam a proteína rNcFlag2222.....	35
Figura 3. Características morfológicas da fibra Flag sintética. (a) Imagem da fibra Flag sintética adquirida por microscopia de luz (40x; barra de escala = 30 μm) (b) e (c) Micrografias eletrônicas de varredura da fibra sintética em diferentes magnificações. A imagem em (b) mostra a aspecto geral da fibra (1000x; barra de escala = 20 μm), e em (c) pode-se observar os grânulos presentes na superfície da fibra (5000x; barra de escala = 5 μm). (d) Imagem 3-D de MFA mostra detalhes topográficos da superfície da fibra Flag sintética.....	37
Figura 4. Espectro Raman (acima) e decomposição espectral da região amida I (abaixo) da fibra sintética rNcFlag2222. Estruturas: random coil (1641 cm ⁻¹), α-hélices/helices PPII (1656 cm ⁻¹), folha-β (1670 cm ⁻¹) e β-turns (1685 cm ⁻¹) (Lefèvre et al., 2011).	41
Figura 5. Análise de dispersão de raios x de grandes ângulos da fibra sintética não processada rNcFlag2222. As setas apontam para dois anéis amorfos de diferentes intensidade com os centros em 4.4Å and 10.5Å.....	42
Capítulo 3 - Produção e Caracterização molecular de fibras sintéticas do tipo linha de segurança da aranha <i>Parawixia bistriata</i>	48
Figura 1. (a) Análise eletroforética em gel de agarose do vetor prPbMaSp1-16x (inserto de 1947 pb). O plasmídeo foi digerido com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> . A banda menor corresponde ao inserto da MaSp1 e a banda maior é o vetor pET19k linearizado (5.8 kpb). Marcador 1 Kb DNA Ladder Invitrogen. (b) Análise de SDS-PAGE mostrando a proteína MaSp1 purificada detectada por coloração por Coomassie blue. Padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Bio Rad. (c) Análise de western blot usando anticorpo anti-poliHistidina. As setas apontam a proteína rPbMaSp1-16x.....	56
Figura 2. Curva de força-extensão das fibras rPbMaSp1 não processadas (acima) e processadas (abaixo).....	57
Figura 3. Características morfológicas das fibras MaSp1 sintéticas, processadas e não processadas. (a) e (b) imagem da fibra MaSp1 sintética não processada e processada adquiridas por microscopia de luz (40x; barra de escala = 30 μm). (c) e (d) Imagens 3-D de MFA mostram detalhes topográficos das superfícies da fibra MaSp1 sintética não processada e processada, respectivamente.	60

Figura 4. Decomposição espectral da região amida I da fibra sintética rPbMaSp1 não processada (acima) e da fibra processada (abaixo). Estruturas: random coil (1641 cm^{-1}), α -hélices/helices PPII (1656 cm^{-1}), folha- β (1670 cm^{-1}) e β -turns (1685 cm^{-1}) (Lefèvre et al., 2011)..... 62

Figura 5. Análise de dispersão de raios x de grandes ângulos das fibras sintéticas rPbMaSp1 (a) não processada e (b) processada..... 63

Lista de Tabelas

Capítulo 1	4
Tabela 1. Comparação das propriedades mecânicas de diferentes materiais (Adaptado de Romer e Scheibel, 2008).....	6
Capítulo 3 - Produção e Caracterização molecular de fibras sintéticas do tipo linha de segurança da aranha <i>Parawixia bistriata</i>	48
Tabela 1. Sequência da proteína da seda sintética e o tamanho do gene e da proteína correspondente.....	50
Tabela 2. Valores médios das propriedades mecânicas das fibras rPbMaSp1 sintéticas.....	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

Å: angstrom

Amp: ampicilina

GPa: gigapascal

MPa: megapascal

TAE: tampão que contem tris, ácido acético e EDTA

DNA: ácido desoxirribonucléico

pH: potencial hidrogênionico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl: ácido clorido

MgCl₂: cloreto de magnésio

OD₆₀₀: densidade óptica no comprimendo de onda de 600 nm

nm: nanometro

°C: graus Celsius

C-terminal: carboxi terminal

N-terminal: amino terminal

NaCl: cloreto de sódio

MFA: microscopia de força atômica

MEV: microscopia eletrônica de varredura espectroscopia Raman

WAXS: dispersão de raios x de grandes ângulos

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

DNA: ácido desoxirribonucléico

g: força gravitacional

g: grama

h: hora

HFIP: hexafluoroisopropanol

His: histidina

Hz: hertz (unidade de frequência)

IPTG: isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

Kan: kanamicina

pb: par(es) de base(s)

kDa: kilodalton(s)

mA: miliampere

mg: miligrama

mm: milimetro

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

μ L: microlitro

μ m: micrometro

N: newton (unidade de força)

pb: Par(es) de base(s)

poli-Ala: poli-Alanina

PVDF: fluoreto de polivinilideno

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

Sumário

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	x
Capítulo 1	4
1 Introdução Geral.....	4
1.1 Aranhas e suas sedas.....	4
1.1.1 <i>Nephilengys cruentata</i>	7
1.1.2 <i>Parawixia bistriata</i>	8
1.2 Produção das sedas nas aranhas.....	9
1.3 A seda linha de segurança.....	11
1.4 A seda flageliforme.....	14
1.5 Produção sintética de sedas de aranhas e polimerização in vitro.....	16
1.6 Aplicações das sedas	17
1.7 Caracterização de sedas.....	18
2 Hipóteses	19
3 Justificativa.....	19
4 Objetivo Geral	20
5 Objetivos Específicos	20
6 Referências Bibliográficas	21
Capítulo 2 - Produção e Caracterização molecular de fibras sintéticas do tipo flageliforme da aranha <i>Nephilengys cruentata</i>	26
1 Introdução.....	26
2 Material e métodos.....	28
2.1 Elaboração da sequência sintética da Flag	28
2.2 Expressão gênica e produção da proteína Flag recombinante	29
2.3 Detecção e análise das proteínas por SDS-PAGE e Western blot.....	30
2.4 Produção da fibra sintética.....	31
2.5 Microscopia de força atômica (MFA)	31
2.6 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	32
2.7 Espectroscopia Raman	32
2.8 Dispersão de raios X de grandes ângulos (WAXS)	33
3 Resultados e Discussão.....	33
3.1 Expressão e purificação da proteína Flag recombinante	33
3.2 Características topográficas e moleculares das fibras Flag sintéticas.....	35
3.3 Análises por espectroscopia Raman e dispersão de raios x de grandes ângulos (WAXS).....	38
4 Referências Bibliográficas	43
Capítulo 3 - Produção e Caracterização molecular de fibras sintéticas do tipo linha de segurança da aranha <i>Parawixia bistriata</i>	48
1 Introdução.....	48
2 Material e métodos.....	49
2.1 Elaboração da sequência sintética da MaSp1	49
2.2 Expressão gênica e produção da proteína MaSp1 recombinante.....	50
2.3 Purificação da proteína de seda recombinante	51

2.4	Detecção e análise das proteínas por SDS-PAGE e Western blot.....	52
2.5	Produção da fibra sintética e processamento após a extrusão.....	52
2.6	Teste mecânico	53
2.7	Microscopia de força atômica (MFA)	53
2.8	Espectroscopia Raman	54
2.9	Dispersão de raios X de grandes ângulos (WAXS)	54
3	Resultados e Discussão.....	55
3.1	Expressão e purificação da proteína MaSp1 recombinante.....	55
3.2	Influência do processamento na performance mecânica das fibras	56
3.3	Características topográficas e moleculares das fibras MaSp1 sintéticas ..	59
3.4	Análises por espectroscopia Raman e dispersão de raios x de grandes ângulos (WAXS)	61
4	Referências Bibliográficas.....	64
	Conclusões e perspectivas	68
	Publicação	70

Abstract

Spider silk are characterized by diversity in their chemistry, structure and functions, ranging from very extensible silk (flagelliform) and remarkably strong fiber (dragline). In order to better understand the relationship between the elastomeric behavior of flagelliform silk and its molecular structure, we expressed a recombinant silk protein based on the native flagelliform protein (Flag) from *Nephilengys cruentata* and spun it into fibers. Raman spectroscopy studies of the synthetic fibers showed that the Flag-like protein accommodated a mixture of several secondary structures, dominated by helical and β -turn structures. Wide Angle X-ray Scattering (WAXS) data shows the presence of two diffuse rings of different intensities that are consistent with the presence of helical structures. Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses showed that the surface of the synthetic fiber was amorphous suggesting that the physical properties of Flag-like spider silk depend on the spinning process and on the primary sequence of the Flag-like protein. We also expressed a recombinant protein based on *Parawixia bistriata* Major Ampullate Spidroin 1 (MaSp1) from dragline and spun into fibers. As spun fibers were post spin stretched. Mechanical test results showed that postspin stretched fibers had better overall mechanical properties. Raman spectroscopy and WAXS studies of those fibers revealed that the postspin treatment promoted the formation of β -sheet, indicating that this process is key to help the proteins in the fiber form correct secondary structures, leading to better quality fibers. Atomic Force Microscopy (AFM) analyses showed that the surface of these as spun fibres is characterized by the presence of nanoglobular structures, while the topographical landscape of postspin stretched fibers is uniform and smooth. The present study was able to evaluate synthetic Flag-like and MaSp1-like fibers describing the conformation, mechanical properties, orientation of the proteins and unique details of the synthetic spider fibers surface structure and internal molecular organization.

Keywords: flagelliform, dragline, *Nephilengys cruentata*, WAXS, AFM, SEM, MaSp1, *Parawixia bistrriata*, Raman spectroscopy.

Resumo

Sedas de aranhas são caracterizadas pela diversidade química, estrutural e funcional, variando de sedas muito elásticas (flageliforme) a fibras extremamente resistentes (linha de segurança). Para melhor entender a relação entre o comportamento elastomérico da seda flageliforme e sua estrutura molecular, foi expressa uma proteína recombinante em bactéria baseada na sequência nativa da flageliforme (Flag) da aranha *Nephilengys cruentata* e, a partir dessa proteína, foi polimerizada uma fibra sintética. Estudos de espectroscopia Raman das fibras sintéticas mostraram que a proteína Flag recombinante possui uma mistura de várias estruturas secundárias, dominada por estruturas helicoidais e β -turn. Análises de dispersão de raios X de grandes ângulos (WAXS) mostrou a presença de dois anéis difusos de diferentes intensidades que são consistentes com a presença de estruturas helicoidais. Análise de microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que a superfície dessa fibra sintética é amorfa o que sugere que processo de extrusão e a sequência primária da proteína interfere nas propriedades físicas da fibra. Uma proteína recombinante baseada na sequência da proteína MaSp1, presente na seda linha de segurança da aranha, *Parawixia bistrriata* também foi expressa em bactéria e fibras recombinantes foram formadas. Após a extrusão essas fibras foram processadas. Testes mecânicos mostraram que as fibras processadas possuem melhores propriedades mecânicas. Estudos de espectroscopia Raman e WAXS dessas fibras revelaram que o processamento promove a formação de folhas- β , o que indica que esse processo é muito importante na formação correta das estruturas secundárias, o que leva a formação de fibras de melhor qualidade. A análise do tipo MFA mostrou que a fibra não processada é caracterizada pela presença de estruturas nanoglobulares, enquanto a fibra processada apresenta uma aparência lisa e uniforme. O presente estudo avaliou fibras Flag e MaSp1 sintéticas descrevendo

suas conformações, propriedades mecânicas, orientação das proteínas e detalhes das superfícies das fibras, além de sua organização molecular interna.

Palavras-chave: flageliforme, linha de segurança, *Nephilengys cruentata*, WAXS, MFA, MEV, MaSp1, *Parawixia bistrata*, espectroscopia Raman

Capítulo 1

1 Introdução Geral

1.1 Aranhas e suas sedas

As aranhas são animais artrópodes pertencentes à ordem Araneae e à classe dos aracnídeos. Elas apresentam grande diversidade, abundância e ocupam a maioria dos ambientes naturais. A ordem Araneae possui 42751 espécies incluídas em 110 famílias (Platnick, 2012). Um quarto das espécies são de aranhas que produzem teias orbiculares, essas aranhas podem produzir até seis tipos de seda e uma cola (Vollrath, 1992). A diversidade de espécies se deve, em grande parte, à capacidade das aranhas de produzir sedas durante sua vida e também à utilização especializada dos diferentes tipos produzidos.

A ordem Araneae 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.

Diferente dos bichos da seda e de outros insetos, que usam a seda somente para proteger seus ninhos e para suas pupas, as aranhas (especialmente as orbiculares) utilizam suas sedas em todos os aspectos de suas vidas (Lewis, 2006). O sucesso evolutivo das aranhas foi possível em grande parte por causa de suas sedas (Vollrath, 1992; Hayashi, 2002). As funções referentes a cada uma das sedas produzidas estão representadas na Figura 1.

Devido ao importante papel que possuem no ciclo de vida das aranhas, estas desenvolveram sedas com características extraordinárias. As teias de aranha possuem excepcionais propriedades mecânicas dentre as estruturas biológicas, combinando uma elevada força tensora com uma elevada elasticidade (Hinman et al., 2000). Por essa razão, existe um crescente interesse na utilização de tais estruturas como modelos para o desenvolvimento de biomateriais. Sabe-se que as propriedades mecânicas das teias de aranha são devidas à organização intra e intermolecular do complexo de proteínas que as constituem, denominado espidroínas.

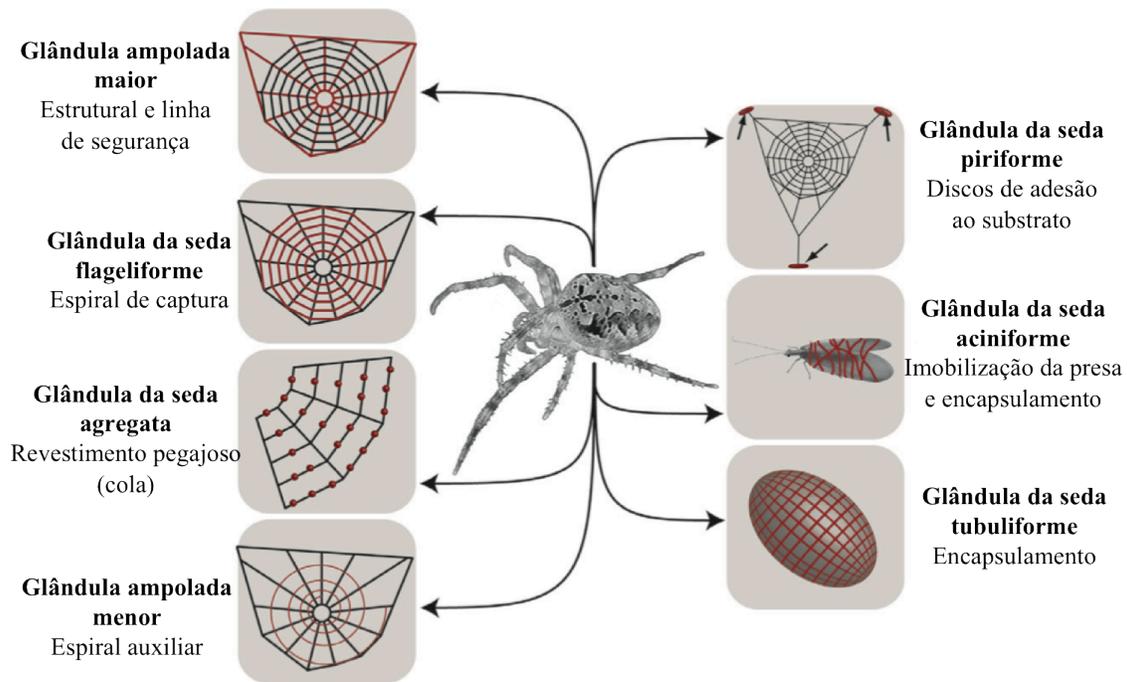


Figura 1: Funções das sedas produzidas pelas glândulas sericígenas de diversas aranhas tecedoras de teias orbitais. Adaptado de Eisoldt et al., 2011.

Dentre todos os tipos de seda, a da glândula ampolada maior (linha de segurança) é a mais resistente. É cinco vezes mais forte que o aço e possui uma força tensora comparável ao Kevlar ($4 \times 10^9 \text{ N m}^{-2}$) e uma elasticidade de 35% (Xu e Lewis, 1990; Gosline et al., 1999). As aranhas usam esse tipo de seda como linha de segurança e para construir a estrutura principal da teia. A seda da glândula ampolada menor é bem menos elástica e menos resistente que a

seda da glândula ampolada maior. Ela é usada como reforço na teia e também forma a espiral auxiliar. A seda flageliforme, extremamente elástica, forma a espiral de captura da teia. Uma cola produzida pela glândula agregata forma uma camada pegajosa sobre a espiral de captura da teia. A seda da glândula piriforme é usada como discos de adesão da teia ao substrato. A seda da glândula aciniforme é usada no envolvimento e na imobilização das presas e também, em conjunto com a seda da glândula tubuliforme, na formação dos sacos de ovos.

A aranha *Nephila clavipes* foi uma das primeiras espécies utilizadas como modelo para estudo, devido à facilidade de coleta e de extração da glandula produtora de seda (Hinman et al., 2000). A Tabela 1 contém comparações das propriedades mecânicas de alguns tipos de sedas da espécie de aranha *Nephila clavipes* em relação a alguns materiais naturais ou sintéticos.

Tabela 1. Comparação das propriedades mecânicas de diferentes materiais (Adaptado de Romer e Scheibel, 2008).

Material	Força tensora σ_{\max}/ GPa	Elasticidade (%)	Resistência MJ/m³
Seda de <i>B. mori</i>	0,6	18	70
Linha de segurança	1,1	27	160
Seda flageliforme	0,5	270	150
Nylon	0,95	18	80
Kevlar®	3,6	2,7	50
Aço de alta tensão	1,5	0,8	6

A inabilidade em domesticar as aranhas, devido a natureza agressiva e predatória, para produzir quantidade suficiente de sedas, com essas características mecânicas, induziu o desenvolvimento de estudos para entender

a natureza molecular dessas sedas visando ao desenvolvimento de materiais sintéticos com características similares às sedas das aranhas.

As fibras sintéticas produzidas neste estudo foram baseadas nos motivos presentes na seda flageliforme da aranha *Nephilengys cruentata* e da seda da glândula ampolada principal da aranha *Parawixia bistrata*.

1.1.1 *Nephilengys cruentata*

As espécies do gênero *Nephilengys* (Araneae: Nephilidae) 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 e Agnarsson, 2011). A espécie *Nephilengys cruentata* (Figura 2), é uma aranha arborícola. Sua distribuição pode ser observada na Figura 3, mostrando sua presença na África tropical e subtropical e na região sudeste do Brasil (Năpărus e Kuntner, 2012) geralmente encontrada em residências construídas em São Paulo, Brasil (Chuck-Paim e Alonso, 2001).

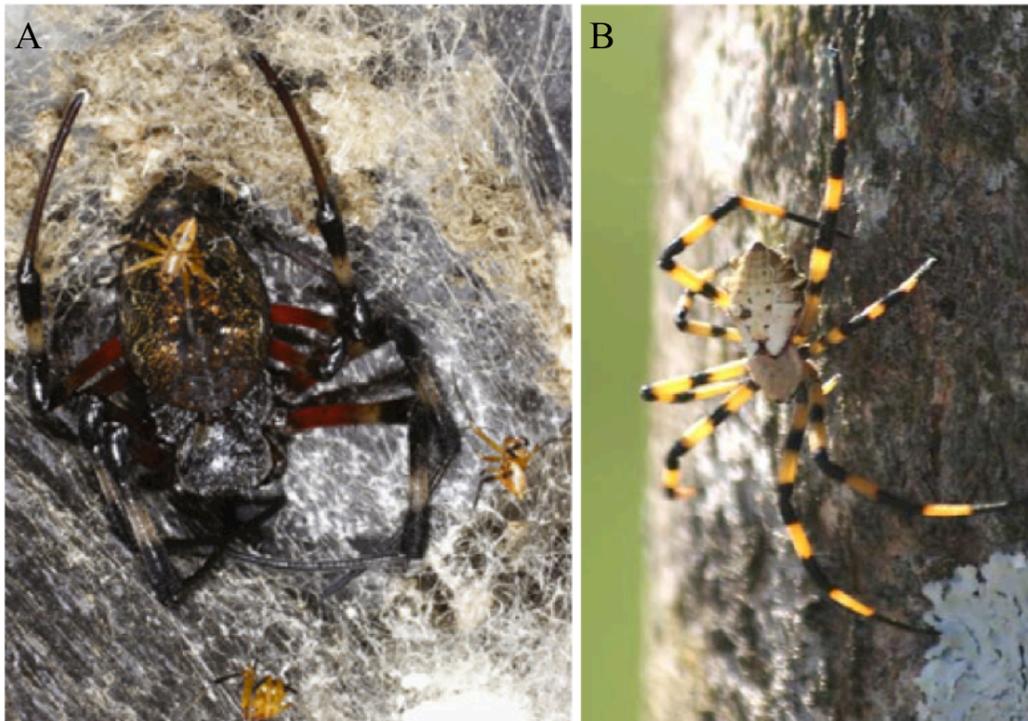


Figura 2: Aranha *Nephilengys cruentata*. 2A: Dimorfismo sexual de tamanho entre o macho (menor) e a fêmea (maior) (Kuntner e Agnarsson, 2011). 2B: Fêmea coletada na Mata Atlântica em São Paulo – Brasil (foto por Felipe Rodrigues da Silva).

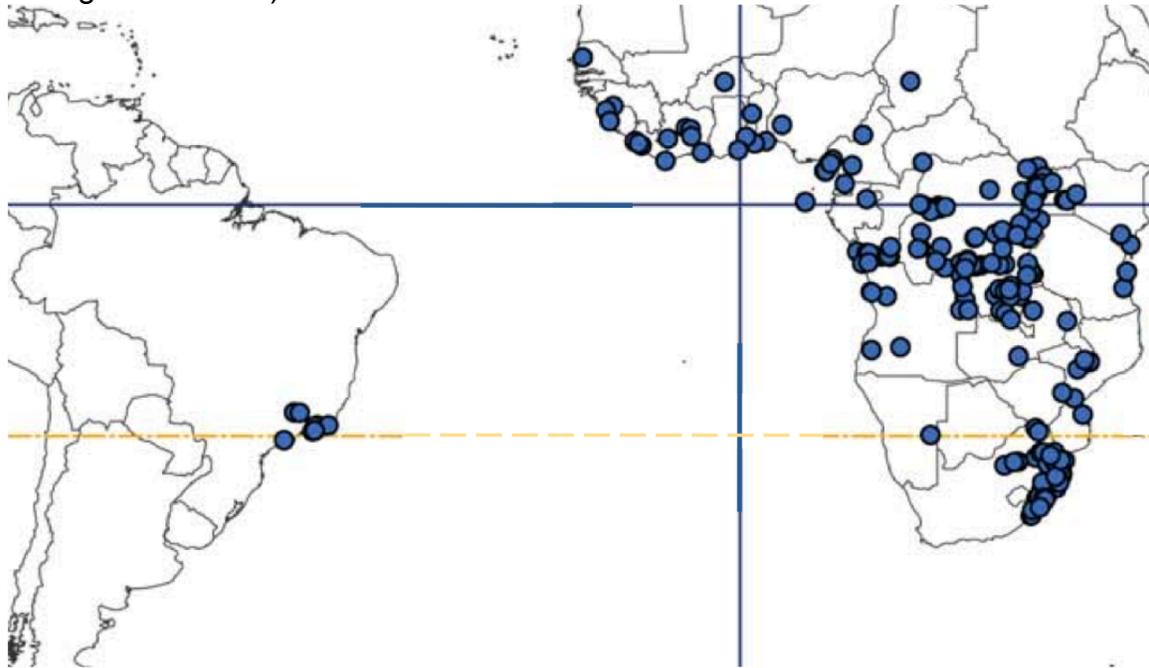


Figura 3: Distribuição intercontinental da aranha *Nephilengys cruentata* (Năpărus e Kuntner, 2012).

1.1.2 *Parawixia bistriata*

A aranha *Parawixia bistriata* (Araneae: Araneidae) é uma espécie da biodiversidade brasileira típica do cerrado, mas ocorre também na Bolívia, Paraguai e Argentina. Diferentemente da maioria das outras aranhas, indivíduos dessa espécie vivem em grupo, sem canibalismo ou territorialismo, sendo conhecida como espécie “quase social” (não há formação de castas, como nos insetos sociais). Quando presas grandes são capturadas, as aranhas vizinhas cooperam na manipulação e alimentação (Fowler e Gobbi, 1988). A teia, na verdade o conjunto delas, é notável pelo tamanho (Figura 4). Cada aranha tece, a cada noite, sua própria teia orbital, em uma estrutura colonial unificadora de vários metros, com até 200 aranhas (Fowler e Gobbi, 1988).



Figura 4. As aranhas *P. bistriata* e o conjunto de teia formado por elas (Foto por Danilo Guarda).

1.2 Produção das sedas nas aranhas

As aranhas desenvolveram um sistema complexo de glândulas especializadas em secretar seda. Cada glândula de seda possui tamanho e forma distintos, porém elas são funcionalmente organizadas de maneira similar. A glândula ampolada maior é a maior de todas as glândulas e sua seda possui as melhores propriedades mecânicas, por esse motivo a maioria do que se sabe sobre a produção de sedas em aranhas é baseada nessa glândula.

O mecanismo de fiação, ou seja, a polimerização das proteínas solúveis em água para fibras insolúveis, é um processo que se inicia com um aumento na concentração da proteína, até 50% (w/v), no lúmen glandular, formando a

solução de fiação (Hijirida et al., 1996). No lúmen glandular a organização estrutural das proteínas é de praticamente *random coil*, durante a passagem pelo ducto ocorre um rápido agrupamento dessas proteínas, que se tornam insolúveis em água (Figura 5)(Scheibel, 2004). O ducto age como uma membrana de diálise, que controla precisamente as condições que permitem a estruturação das proteínas (pH, concentração iônica e quantidade de água).

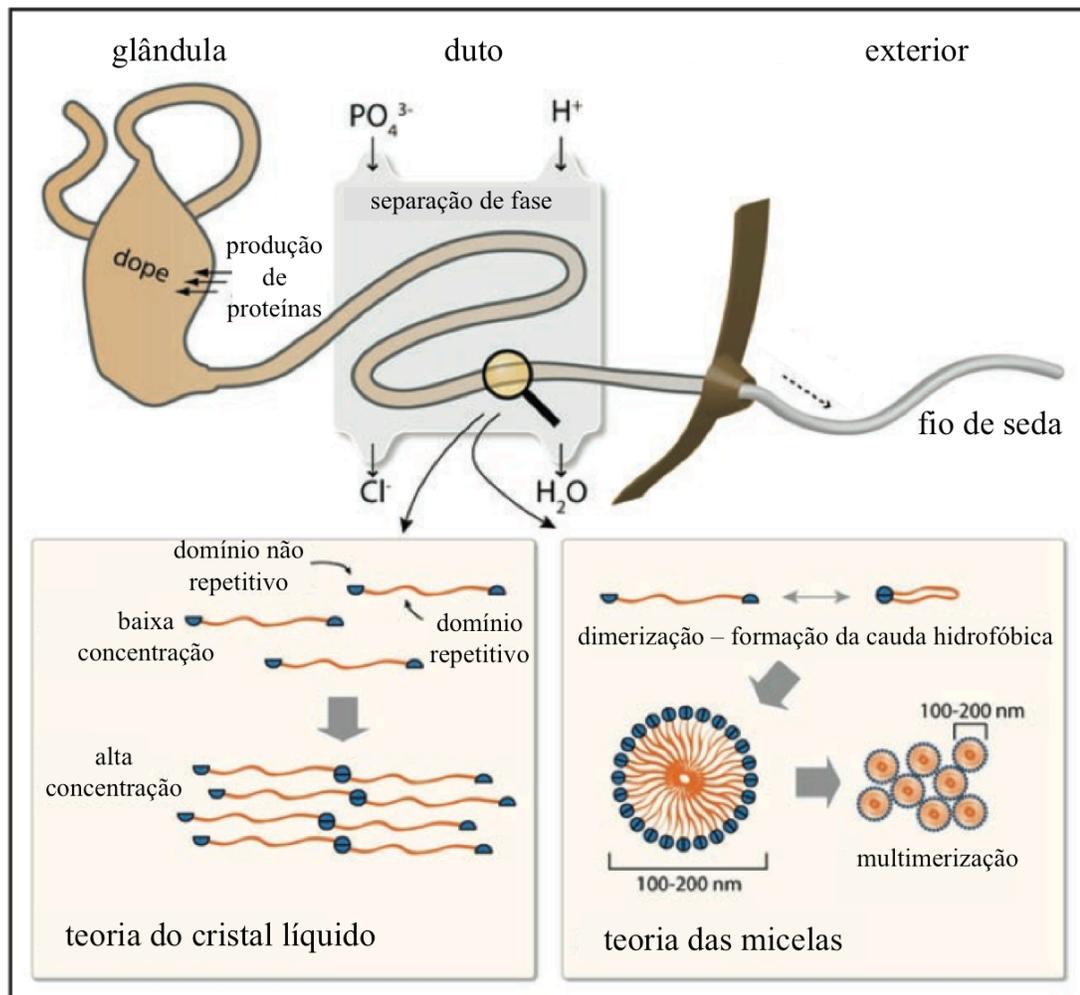


Figura 5. Modelo do processo de polimerização das sedas. A solução de fiação é secretada e armazenada dentro da glândula. Quando a formação da fibra se inicia a solução passa por um fino canal onde ocorre a troca de íons e começa o processo de separação de fase. A fibra é puxada (patas traseiras das aranhas/gravidade) e resulta na rápida formação do fio da seda. Existem duas teorias de como ocorre o processo molecular dentro do ducto. A primeira sugere que as proteínas da seda formam uma solução de fiação líquida-cristalina

enquanto a segunda defende que as proteínas da solução de fiação se organizam na forma de micelas. (Adaptado de (Romer e Scheibel, 2008))

Existem duas teorias relacionadas ao processo molecular que ocorre no interior do ducto. No primeiro, as forças envolvidas no mecanismo de fiação promovem a transição entre o estado líquido e o sólido, resultando em uma espécie de fibra preliminar, parcialmente cristalina, em que as cadeias do polímero nas regiões cristalinas tornam-se paralelamente orientadas em relação ao eixo da fibra (Vollrath e Knight, 2001). O segundo modelo sugere a organização das proteínas solúveis em pequenas micelas, com diâmetro de aproximadamente 100-200 nm, devido as suas propriedades anfífilicas, dentro do ducto de fiação (Jin e Kaplan, 2003). Essas micelas se aglomeram e formam glóbulos (Figura 5) com diâmetros em escala micrométrica e as forças que surgem durante a passagem pelo ducto forçariam estes glóbulos a adotarem uma forma alongada, finalmente levando à formação da fibra (Romer e Scheibel, 2008).

1.3 A seda linha de segurança

Dentre as diferentes sedas produzidas pelas aranhas, a linha de segurança, produzida pela glândula ampolada maior, tem sido a mais estudada por ser extremamente rígida e possuir propriedades mecânicas interessantes, tais como alta elasticidade e resistência à tensão (Gosline et al., 1999). 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 (Xu e Lewis, 1990; Hinman et al., 1992; Hayashi et al., 1999).

Diferentemente das outras sedas, a linha de segurança pode ser “coletada” diretamente das aranhas. Esse fator faz com que a linha de segurança seja a seda mais bem caracterizada em termos de propriedades mecânicas e também em relação a estrutura e função das suas proteínas.

A linha de segurança é formada por dois tipos de proteínas produzidas pela glândula ampolada maior, denominadas de MaSp1 (Xu e Lewis, 1990) e MaSp 2 (Hinman e Lewis, 1992)(Major ampullate Spidroin 1 e 2). Essas duas proteínas existem em todas as aranhas orbiculares já estudadas, e as unidades repetitivas são muito conservadas na família *Araneidae* (Hayashi, 2002)(Figura 6). Na sequência consenso, diferentes sequências repetidas de aminoácidos formam motivos que são responsáveis pelas características mecânicas da linha de segurança. Diferentes motivos controlam diferentes aspectos estruturais e funcionais da seda.

MaSp1	
<i>Nep.c.</i>	GGA--GQGGYGGLGSQGA-----GRGGLGGQ--GA--GAAAAA----
<i>Nep.m.</i>	GGA--GQGGYGGLGSQGA-----GRGGYGGQ--GA--GAAAAA----
<i>Nep.s.</i>	GGA--GQGGYGGLGGQGA-----GAAAAA----
<i>Tet.k.</i>	GGLGGGQ-GAGQGGQQAGCQGGYGSGLGGAGQ-----GASAAAAA
<i>Tet.v.</i>	GGLGGGQGGY-----GSGLGGAGQGGQQAGCQGAAAAASAAA
<i>Lat.g.</i>	GGA--GQGGY-----GQ-----GGQGA-----GAAAAA
<i>Arg.a.</i>	GGQ--GGXGGYGGLGSQGAGQ--GYGSGLGGQGGAGCQG--GAAAAA
<i>Arg.t.</i>	GGQ--GGQGGYGGLGXQGAGQ--GYGAGSGGQGGXGQG--GAAAAA
<i>Ara.d.(ADF-2)</i>	GGQ--GGQGGQGGGLGSQGAG----GAGQGGY-GAGCQG----GAAAAA

MaSp 2	
<i>Nep.c.</i>	---GPG--QQGPGGYGPG---QQGPGGYGPGQQGPGSGPGSAAAAA
<i>Nep.m.1</i>	---GPG--QQGPGGYGPG---QQGPGGYGPGQQGPGSGPGSAAAAA
<i>Nep.s.</i>	---GPG--QQGPGXY-----GPGSGPGSAAAAA
<i>Lat.g.</i>	-----GPGGYGPGPGXQQGY-----GPGGSGAAAAA
<i>Arg.a.</i>	GGYGPAGQQGPGSQQPGSGGQQGPGGX----GPYGPSAAAAA
<i>Arg.t.1</i>	GGYGPAGQQGPGSQQPGSGGQQGPGGQ----GPYGPSAAAAA
<i>Gas.m.</i>	GGYGPAGSQQGPGSQQPGSGGQQGPGGQ----GPYGPASAAAAA
<i>Ara.b.</i>	GGYGPAGSQQGPGGQ-----GPGGQ----GPYGPASAAAAA
<i>Ara.d.1</i>	GGYGPAGSQQGPGGQ-----GPGGQ----GPYGPASAAAAA
<i>Nep.m.2</i>	-GRGPGGY--GPGGQ-----GPGGPGAAAAA
<i>Arg.t.2</i>	---GPGGQ--GPGGQ-----GPGGYGPS--GPGASAAAAA
<i>Ara.d.2</i>	---GPGGY--GPGSQQGPGS-----GPGAYGPG--GP-GSSAAAAA

Figura 6. Sequências parciais de resíduos de aminoácidos referentes às regiões consenso repetitivas das proteínas produzidas pela glândula ampolada maior (MaSp 1 e 2). (-) Indica resíduos não presentes em relação a outras sequências. Espécies das aranhas: *Nep.c.*, *Nephila clavipes*; *Nep.m.*, *Nephila madagascariensis*; *Nep.s.*, *Nephila senegalensis*; *Lat.g.*, *Lactrodectus geometricus*; *Arg.t.*, *Argiope trifasciata*; *Arg.a.*, *Argiope aurantia*; *Gas.m.*, *Gasteracantha mammosa*; *Ara.b.*, *Araneus bicentenarius*; *Ara.d.*, *Araneus*

diadematus; Tet.k., Tetragnatha kanaiensis; Tet.v., Tetragnatha versicolor. (Adaptado de Lewis, 2006).

A MaSp1 é formada principalmente por regiões ricas em resíduos de alanina e glicina (poli-A e GA) e por unidades de GGX (X=leucina, tirosina, serina, alanina). Tais motivos estão associados, respectivamente, à formação de folhas- β cristalinas (Lefevre et al., 2007; Holland et al., 2008; An et al., 2011; Teulé, Miao et al., 2012), responsáveis pela alta força tensora (Hinman e Lewis, 1992; Hayashi et al., 1999), e de hélices 3_{10} ricas em resíduos de glicina envolvidas na formação de uma matriz constituída por agregados amorfos que separam as regiões ricas em folhas- β (Holland et al., 2008)(Figura 7). A MaSp 2, por sua vez, conjuga o motivo rico em resíduos de alanina ao motivo GPGXX (X= glicina, tirosina, serina, alanina ou glutamina), que é base para a elasticidade da fibra, repetido no máximo 9 vezes em cada unidade (Hayashi e Lewis, 1998). Tal motivo é responsável por formar estruturas helicoidais (Jenkins et al., 2010). Esses motivos estruturais e repetitivos, em conjunto, são considerados os responsáveis pelas características mecânicas da fibra (Figura 7).

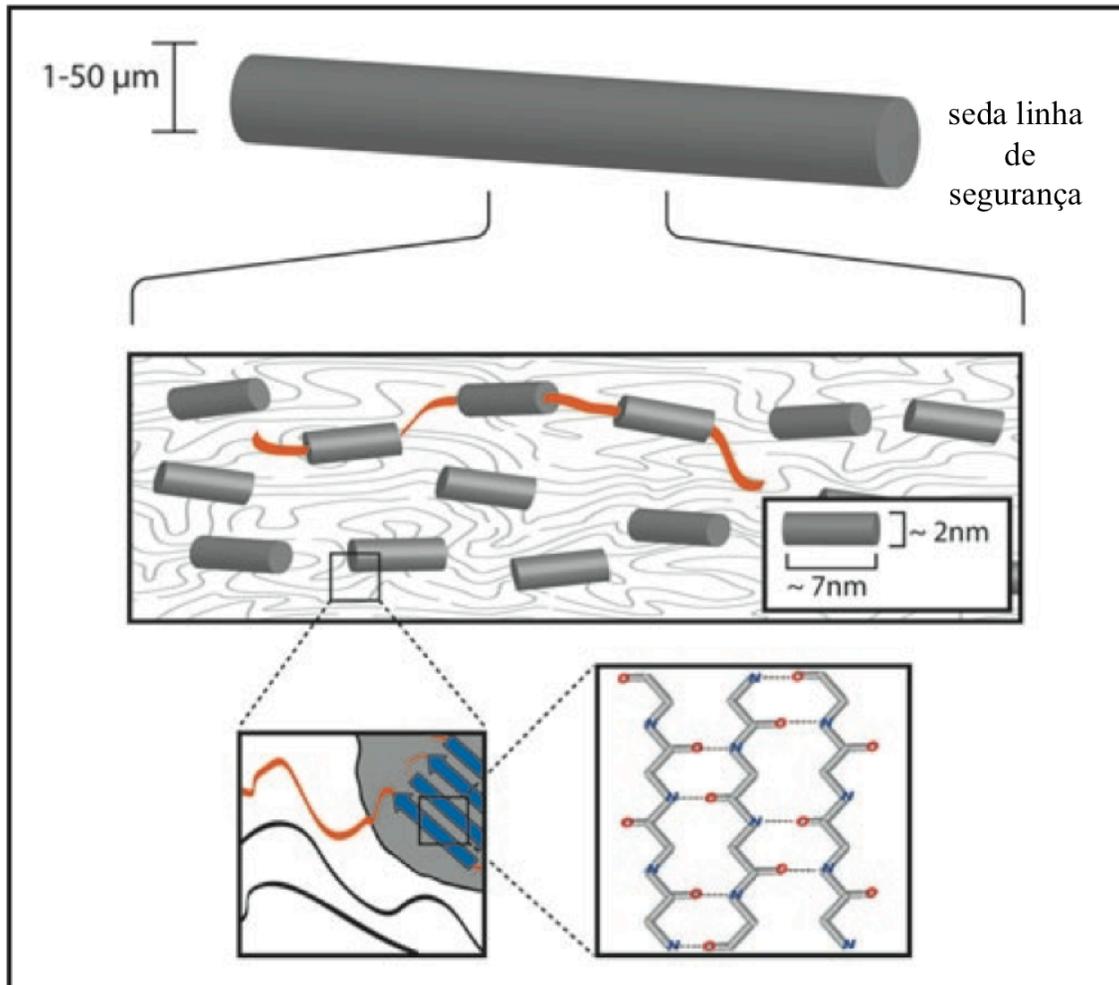


Figura 7. Modelo esquemático da estrutura da seda linha de segurança. A fibra é composta de pequenas regiões cristalinas formadas por subunidades ricas em folhas- β (região em destaque), separadas por estruturas amorfas. As partes cristalinas são covalentemente conectadas, garantindo força e maleabilidade. Adaptado de (Romer e Scheibel, 2008)

1.4 A seda flageliforme

É formada somente por uma proteína chamada Flag. Essa fibra é responsável pela formação da espiral de captura da teia. Ela causa bastante interesse por ser uma seda extremamente elástica, o que facilita na captura de presas sem que ocorra o rompimento do fio (Gosline et al., 1999). Testes mecânicos demonstram que sua seda tem uma elasticidade superior a 200% (Tabela 1), maior do que qualquer borracha natural (Xu e Lewis, 1990; Gosline et al., 1999; Hayashi et al., 1999). Analisando sua sequência, a composição de

motivos após os resultados de estudos mecânicos que mostram que o motivo pentapeptídico GPGXX, que é a base da elasticidade (Hayashi e Lewis, 1998), se repete 43-62 vezes em cada unidade repetitiva. Este motivo forma β -turns do tipo II (Jenkins et al., 2010) e se comporta como nanomolas (Hayashi et al., 1999; Becker et al., 2003). Os grandes módulos formados pela repetição do motivo GPGGX são interrompidos por pequenos motivos GGX e por uma região espaçadora (Figura 7). Os motivos GGX formam 3_{10} hélices (Holland et al., 2004) e a estrutura da região espaçadora ainda é desconhecida. A sequência de aminoácidos da região espaçadora é muito conservada e não é típica de fibras de aranha, não possui motivos repetidos e é caracterizada pela presença de aminoácidos carregados e hidrofílicos e por poucos resíduos de glicina e prolina (Figura 9).

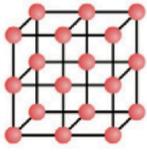
proteína \ motivos	(A) ₄₋₁₃	(GA) ₄₋₆	GGX	GPGXX	Spacer
Major ampullate Spidroin 1 (MaSp1)	✓		✓		
Major ampullate Spidroin 2 (MaSp2)	✓			✓	
Flagelliform spidroin (Flag)			✓	✓	✓
structural role					
	crystalline		amorphous	elastic	spacer

Figura 8. Modelos estruturais encontrados nas proteínas de seda de aranha (Adaptado de Eisoldt et al., 2011)

Flag

N. cruentata [GPGGX]₁₉[GGX]₃ TVIEDLDITVNGPGGPITISEELTVGGPAGGS [GPGGX]_n₂₄
N. clavipes [GPGGX]₄₁ TIIEDLDITIDGADGPPITISEELTIS-GAGGS [GPGGX]_n₂₆
N. madagascariensis [GPGGX]₃₆[GGX]₇ TVIEDLDITIDGADGPITISEELTIGGAGAGGS [GPGGX]_n₁₉
A. trifasciata [GPGGX]_n₆ GPVTVDVDVSVGGAPGG [GPGGX]_n₅[GGX]₆ [GPGGX]_n₇

Figura 9. Sequências consenso da seda Flageliforme de diferentes aranhas que produzem teias orbiculares (Bittencourt et al., 2007).

1.5 Produção sintética de sedas de aranhas e polimerização in vitro

Genes sintéticos de sedas de aranha baseados na sequência nativa das proteínas têm sido construídas e proteínas sintéticas de sedas tem sido expressas em diferentes tipos de organismos. *E. coli*, a ferramenta mais utilizada na biologia molecular para expressão de proteínas recombinantes, tem sido usada para produzir vários tipos de proteínas sintéticas de aranhas (Teulé et al., 2007; Brooks et al., 2008; Xia et al., 2010; An et al., 2011; Teulé et al., 2012). Porém, esse sistema não é viável comercialmente por ter um alto custo e usualmente não é capaz de produzir proteínas recombinantes maiores que 100 kDa. Proteínas nativas de sedas de aranhas possuem mais de 300 kDa. Xia e colaboradores (Xia et al., 2010) foram capazes de expressar uma proteína MaSp1 sintética em uma linhagem geneticamente modificada de *E. coli* capaz de produzir proteínas com alto peso molecular, porém, o nível de expressão foi muito baixo e diminuía consideravelmente com o aumento do tamanho da proteína a ser expressa.

Além de bactérias, genes sintéticos de aranhas já foram clonados em batata e tabaco (Scheller et al., 2001) e alfafa (dados não publicados). Esses sistemas podem produzir grandes proteínas recombinantes e são viáveis economicamente. Células de mamíferos também já foram utilizadas para expressão de proteínas MaSp1 e 2 recombinantes (Lazaris et al., 2002). Animais também tem sido utilizados para produção de proteínas de seda sintéticas. Proteínas Masp1 e 2 recombinantes foram expressas no leite de camundongos (Xu et al., 2007) e cabras (dados não publicados) transgênicos.

Um dos grandes obstáculos para a produção sintética de fibras de aranha é a dificuldade de descobrir-se um sistema de expressão de proteínas que seja também capaz de formar as fibras sintéticas. Buscando superar essa limitação, Teulé e colaboradores (Teulé et al., 2012) mostraram que bichos da seda transformados com genes de seda de aranha produziram sedas com propriedades mecânicas melhoradas. Nenhum desses trabalhos conseguiu reproduzir as propriedades mecânicas das sedas nativas de aranhas.

Além disso, polimerização de fibras em laboratório é dificultada pela necessidade de separação dos processos de alinhamento das proteínas, de desidratação e de esticamento da fibra. A técnica de polimerização é feita pelo método “wet spinning”, no qual 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 (Teulé et al., 2009). O posterior processamento das fibras por meio do esticamento destas em um banho aquoso melhora as propriedades mecânicas das fibras formadas (An et al., 2011).

1.6 Aplicações das sedas

A seda de aranha tem despertado fascinação por muitos anos. Os gregos e os romanos usavam a seda de aranha em curativos de feridas (Eisoldt et al., 2011), por serem biocompatíveis e possuir baixa imunogenicidade. Durante os últimos 2 séculos sedas eram usadas nas suturas de cirurgias. A seda de aranha é um material fascinante que combina propriedades mecânicas excepcionais com uma baixa densidade e biodegradabilidade. Por possuir essas propriedades e pela descrição histórica de suas aplicações médicas, a seda de aranha pode ser eleita o biomaterial ideal.

Sedas recombinantes de aranhas possuem um grande potencial para diferentes aplicações biomédicas porque são fortes, leves, elásticas, flexíveis, biodegradáveis e podem ser processadas em diferentes formatos, incluindo estruturas em 3D (Romer e Scheibel, 2008).

Por possuírem baixa toxicidade, sedas já foram utilizadas em sistemas carreadores de genes para células tumorais, (Numata et al., 2011), sendo ainda ideais na produção de polímeros para sistemas de “drug delivery” (Lammel et al., 2011), devido a suas propriedades anfifílica, biodegradável e não citotóxica.

A seda linha de segurança, que possui características de força e elasticidade, se mostrou ainda um excelente material para cordas de violino,

formando uma estrutura empacotada única que gerou um timbre intenso e aveludado (Osaki, 2012).

As várias aplicações em potencial da teia de aranha na confecção de diversos materiais tornam necessária sua produção em escala industrial. Entretanto, o isolamento de grandes quantidades de fibras, a partir da produção das próprias aranhas, não é viável (Eisoldt et al., 2011).

Nas últimas décadas, muito avanço nessa área foi feito, revelando os mecanismos de produção das sedas pelas aranhas. Porém, certas questões acerca da solubilidade da proteína recombinante, armazenamento da solução e extrusão da fibra, que são cruciais para a produção em escala industrial dessas proteínas, ainda estão sem respostas.

Tecnologias de produção recombinantes irão permitir a criação de biopolímeros de sedas de aranhas em larga escala para diferentes aplicações técnicas e industriais. As sedas poderão ser usadas em cordas e redes de pesca especiais, pára-quadras, em aplicações balísticas (coletes à prova de balas), produtos esportivos e na indústria têxtil.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que materiais feitos a partir da proteína de seda exibiram várias vantagens, tais como baixa taxa de degradação e ausência de imunorreatividade, sendo muito promissora a sua utilização como suporte de regeneração de tecidos e terapia celular (Eisoldt et al., 2011).

1.7 Caracterização de sedas

Várias técnicas têm sido utilizadas para investigar a natureza de diversos tipos de sedas, buscando melhor entender suas estruturas e comportamento mecânico. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises de dispersão de raios-x de grandes ângulos (WAXS) foram utilizadas para demonstrar a estrutura nanofibrilar da seda de *B. mori* (Putthanarat et al., 2000), e para analisar estrutural e morfológicamente fibras sintéticas de aranha (Teulé et al., 2012). Outros trabalhos objetivaram ainda descrever as propriedades mecânicas

de fibras de aranha, utilizando-se principalmente de testes tensores (Du et al., 2006; Elices et al., 2009) e espectroscopia Raman (Sirichaisit et al., 2003). A espectroscopia Raman informa a estrutura secundária, orientação molecular e a composição de aminoácidos da proteína (Lefèvre et al., 2012).

A microscopia de força atômica (MFA) tem se mostrado uma técnica bastante promissora na investigação da estrutura de fibras. Trabalhos relacionados às sedas produzidas pela espécie *B. mori* e por certas espécies de aranhas reportam a utilização da MFA como uma técnica bastante informativa e adequada à caracterização da superfície destas fibras (Hakimi et al., 2006; Schafer et al., 2008; Perez-Rigueiro et al., 2009).

Essas técnicas foram escolhidas por serem adequadas à caracterização das fibras sintéticas de aranha, pela possibilidade de análise topográfica, estrutural e morfológicas da fibras produzidas.

2 Hipóteses

- A presença da região espaçadora duplicada na fibra Flag sintética modificará o padrão estrutural da fibra?
- Fibras sintéticas submetidas a processamento após a extrusão terão suas propriedades alteradas?

3 Justificativa

A seda de aranha é um material com propriedades excepcionais. Entender sua composição e o seu design é crucial não somente para produzir fibras sintéticas semelhantes como para alterar sua composição e, conseqüentemente, suas propriedades, buscando a formação de fibras com características muito superiores as sedas nativas.

Os dois tipos de fibras sintéticas gerados no presente trabalho possuem as principais características de interesse no desenvolvimento de novos

biomateriais: resistência e elasticidade. A capacidade de dominar a técnica de engenheirar os módulos repetitivos da seda, que conferem suas propriedades físicas, depende de um estudo completo das estruturas moleculares. É importante entender o relacionamento das estruturas de aminoácidos das proteínas recombinantes com as propriedades das fibras sintéticas, além de analisar os fatores que influenciam na formação dessas fibras. O presente estudo propõe a caracterização de fibras geradas a partir de duas proteínas sintéticas baseadas na seda de duas espécies de aranhas, de forma a agregar conhecimento com relação à estrutura destas fibras e às propriedades mecânicas apresentadas por elas.

4 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar, molecular e estruturalmente, fibras sintéticas do tipo linha de segurança e flageliforme das aranhas *Parawixia bistriata* e *Nephilengys cruentata*

5 Objetivos Específicos

- Expressar e purificar proteínas Flag e MaSp1 recombinantes.
- Produzir fibras sintéticas a partir destas proteínas recombinantes.
- Processar essas fibras após a extrusão.
- Testar as propriedades mecânicas das fibras processadas e não processadas.
- Caracterizar as fibras processadas e não processadas usando técnicas de MFA, MEV, WAXS e espectroscopia Raman.

6 Referências Bibliográficas

AN, B.; HINMAN, M. B.; HOLLAND, G. P.; YARGER, J. L.; LEWIS, R. V. 2011. Inducing B-Sheets Formation in Synthetic Spider Silk Fibers by Aqueous Post-Spin Stretching. *Biomacromolecules*, v.12, n.6, 2011/10/13, p.2375-2381.

BECKER, N.; OROUDJEV, E.; MUTZ, S.; CLEVELAND, J. P.; HANSMA, P. K.; HAYASHI, C. Y.; MAKAROV, D. E.; HANSMA, H. G. 2003. Molecular nanosprings in spider capture-silk threads. *Nat Mater*, v.2, n.4, Apr, p.278-83.

BITTENCOURT, D.; SOUTO, B. M.; VERZA, N. C.; VINECKY, F.; DITTMAR, K.; SILVA, P. I., JR.; ANDRADE, A. C.; DA SILVA, F. R.; LEWIS, R. V.; RECH, E. L. 2007. Spidroins from the Brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v.147, n.4, Aug, p.597-606.

BROOKS, A. E.; STRICKER, S. M.; JOSHI, S. B.; KAMERZELL, T. J.; MIDDAGH, C. R.; LEWIS, R. V. 2008. Properties of Synthetic Spider Silk Fibers Based on *Argiope aurantia* MaSp2. *Biomacromolecules*.

CHUCK-PAIM, C.; 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.

DU, N.; LIU, X. Y.; NARAYANAN, J.; LI, L.; LIM, M. L.; LI, D. 2006. Design of superior spider silk: from nanostructure to mechanical properties. *Biophys J*, v.91, n.12, Dec 15, p.4528-35.

EISOLDT, L.; SMITH, A.; SCHEIBEL, T. 2011. Decoding the secrets of spider silk. *Materials Today*, v.14, n.3, p.80-86.

ELICES, M.; PLAZA, G. R.; ARNEDO, M. A.; PEREZ-RIGUEIRO, J.; TORRES, F. G.; GUINEA, G. V. 2009. Mechanical Behavior of Silk During the Evolution of Orb-Web Spinning Spiders. *Biomacromolecules*, Jun 8.

FOWLER, H. G.; GOBBI, N. 1988. Cooperative prey capture by an orb-web spider. *Naturwissenschaften*, v.75, n.4, p.208-209.

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*, v.202, n.Pt 23, Dec, p.3295-303.

HAKIMI, O.; KNIGHT, D. P.; KNIGHT, M. M.; GRAHN, M. F.; VADGAMA, P. 2006. Ultrastructure of insect and spider cocoon silks. *Biomacromolecules*, v.7, n.10, Oct, p.2901-8.

HAYASHI, C. Y. 2002. Evolution of spider silk proteins: insight from phylogenetic analyses. *EXS*, n.92, p.209-23.

HAYASHI, C. Y.; LEWIS, R. V. 1998. Evidence from Flagelliform Silk cDNA for the Structural Basis of Elasticity and Modular Nature of Spider Silks. *Journal of Molecular Biology*, v.275, p.773-784.

HAYASHI, C. Y.; SHIPLEY, N. H.; LEWIS, R. V. 1999. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int J Biol Macromol*, v.24, n.2-3, Mar-Apr, p.271-5.

HIJIRIDA, D.; DO, K.; MICHAL, C. A.; WONG, S.; ZAX, D. B.; JELINSKI, L. 1996. ¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophysical journal*, v.71, n.6, p.3442-3447.

HINMAN, M.; DONG, Z.; XU, M.; LEWIS, R. V. 1992. Spider silk: a mystery starting to unravel. *Results Probl Cell Differ*, v.19, p.227-54.

HINMAN, M.; LEWIS, R. V. 1992. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. *Journal of Biological Chemistry*, v.267, n.27, p.19320-19324.

HINMAN, M. B.; JONES, J. A.; LEWIS, R. V. 2000. Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends Biotechnol*, v.18, n.9, Sep, p.374-9.

HOLLAND, G. P.; CREAGER, M. S.; JENKINS, J. E.; LEWIS, R. V.; YARGER, J. L. 2008. Determining secondary structure in spider dragline silk by carbon-carbon correlation solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, v.130, n.30, Jul 30, p.9871-7.

HOLLAND, G. P.; LEWIS, R. V.; YARGER, J. L. 2004. WISE NMR characterization of nanoscale heterogeneity and mobility in supercontracted *Nephila clavipes* spider dragline silk. *J Am Chem Soc*, v.126, n.18, May 12, p.5867-72.

JENKINS, J. E.; CREAGER, M. S.; BUTLER, E. B.; LEWIS, R. V.; YARGER, J. L.; HOLLAND, G. P. 2010. Solid-state NMR evidence for elastin-like β -turn structure in spider dragline silk. *Chemical Communications*, v.46, n.36, p.6714-6716.

JIN, H. J.; KAPLAN, D. L. 2003. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, v.424, n.6952, Aug 28, p.1057-61.

KUNTNER, M. 2007. A monograph of Nephilengys, the pantropical 'hermit spiders' (Araneae, Nephilidae, Nephilinae). *Systematic Entomology*, v.32, n.1, p.95-135.

KUNTNER, M.;AGNARSSON, I. 2011. Biogeography and diversification of hermit spiders on Indian Ocean islands (Nephilidae: Nephilengys). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.59, n.2, p.477-488.

LAMMEL, A.; SCHWAB, M.; HOFER, M.; WINTER, G.;SCHEIBEL, T. 2011. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials*, v.32, n.8, p.2233-2240.

LAZARIS, A.; ARCIDIACONO, S.; HUANG, Y.; ZHOU, J. F.; DUGUAY, F.; CHRETIEN, N.; WELSH, E. A.; SOARES, J. W.;KARATZAS, C. N. 2002. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science*, v.295, n.5554, Jan 18, p.472-6.

LEFEVRE, T.; LECLERC, J.; RIOUX-DUBE, J. F.; BUFFETEAU, T.; PAQUIN, M. C.; ROUSSEAU, M. E.; CLOUTIER, I.; AUGER, M.; GAGNE, S. M.; BOUDREAULT, S.; CLOUTIER, C.;PEZOLET, M. 2007. Conformation of Spider Silk Proteins In Situ in the Intact Major Ampullate Gland and in Solution. *Biomacromolecules*, v.8, n.8, p.2342-2344.

LEFÈVRE, T.; PAQUET-MERCIER, F.; RIOUX-DUBÉ, J.-F.;PÉZOLET, M. 2012. Structure of silk by Raman spectromicroscopy: From the spinning glands to the fibers. *Biopolymers*, v.97, n.6, p.322-336.

LEWIS, R. V. 2006. Spider Silk: Ancient Ideas for New Biomaterials. *Chemical Reviews*, v.106, n.9, p.3762-74.

NĂPĂRUS, M.;KUNTNER, M. 2012. A GIS Model Predicting Potential Distributions of a Lineage: A Test Case on Hermit Spiders (Nephilidae: Nephilengys). *PLoS ONE*, v.7, n.1, p.e30047.

NUMATA, K.; REAGAN, M. R.; GOLDSTEIN, R. H.; ROSENBLATT, M.; KAPLAN, D. L. 2011. Spider Silk-Based Gene Carriers for Tumor Cell-Specific Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, v.22, n.8, 2012/03/16, p.1605-1610.

OSAKI, S. 2012. Spider silk violin strings with a unique packing structure generate a soft and profound timbre. *Phys Rev Lett.*, v.108, n.15, p.154301.

PEREZ-RIGUEIRO, J.; BIANCOTTO, L.; CORSINI, P.; MARSANO, E.; ELICES, M.; PLAZA, G. R.;GUINEA, G. V. 2009. Supramolecular organization of regenerated silkworm silk fibers. *Int J Biol Macromol*, v.44, n.2, Mar 1, p.195-202.

PLATNICK, N. I. 2012. The world spider catalog, version 12.5. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>. DOI: 10.5531/db.iz.0001

PUTTHANARAT, S.; STRIBECK, N.; FOSSEY, S. A.; EBY, R. K.; ADAMS, W. W. 2000. Investigation of the nanofibrils of silk fibers. *Polymer*, v.41, n.21, p.7735-7747.

ROMER, L.; SCHEIBEL, T. 2008. The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. *Prion*, v.2, n.4, p.154-61.

SCHAFFER, A.; VEHOFF, T.; GLISOVIC, A.; SALDITT, T. 2008. Spider silk softening by water uptake: an AFM study. *Eur Biophys J*, v.37, n.2, Feb, p.197-204.

SCHEIBEL, T. 2004. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb Cell Fact*, v.3, n.1, Nov 16, p.14.

SCHELLER, J.; GUHRS, K. H.; GROSSE, F.; CONRAD, U. 2001. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol*, v.19, n.6, Jun, p.573-7.

SIRICHAISIT, J.; BROOKES, V. L.; YOUNG, R. J.; VOLLRATH, F. 2003. Analysis of structure/property relationships in silkworm (*Bombyx mori*) and spider dragline (*Nephila edulis*) silks using Raman spectroscopy. *Biomacromolecules*, v.4, n.2, Mar-Apr, p.387-94.

TEULÉ, F.; ADDISON, B.; COOPER, A. R.; AYON, J.; HENNING, R. W.; BENMORE, C. J.; HOLLAND, G. P.; YARGER, J. L.; LEWIS, R. V. 2012. Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers*, v.97, n.6, p.418-431.

TEULÉ, F.; COOPER, A. R.; FURIN, W. A.; BITTENCOURT, D.; RECH, E. L.; BROOKS, A.; LEWIS, R. V. 2009. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nat Protoc*, v.4, n.3, p.341-55.

TEULÉ, F.; FURIN, W. A.; COOPER, A. R.; DUNCAN, J. R.; LEWIS, R. V. 2007. Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. *Journal of Material Science*, v.42, p.8974-8985.

TEULÉ, F.; MIAO, Y.-G.; SOHN, B.-H.; KIM, Y.-S.; HULL, J. J.; FRASER, M. J.; LEWIS, R. V.; JARVIS, D. L. 2012. Silkworms transformed with chimeric silkworm/spider silk genes spin composite silk fibers with improved mechanical properties. *PNAS*, v.109, n.3, January 17, 2012, p.923-928.

VOLLRATH, F. 1992. Spider webs and silks. *Scientific American*, v.266, p.70-76.

VOLLRATH, F.;KNIGHT, D. P. 2001. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, v.410, n.6828, Mar 29, p.541-8.

XIA, X.-X.; QIAN, Z.-G.; KI, C. S.; PARK, Y. H.; KAPLAN, D. L.;LEE, S. Y. 2010. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *PNAS*, v.107, n.32, p.14049-14063.

XU, H. T.; FAN, B. L.; YU, S. Y.; HUANG, Y. H.; ZHAO, Z. H.; LIAN, Z. X.; DAI, Y. P.; WANG, L. L.; LIU, Z. L.; FEI, J.;LI, N. 2007. Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. *Anim Biotechnol*, v.18, n.1, p.1-12.

XU, M.;LEWIS, R. 1990. Structure of a Protein Superfiber: Spider Dragline Silk. *PNAS*, v.87, p.7120-7124.

Capítulo 2 - Produção e Caracterização molecular de fibras sintéticas do tipo flageliforme da aranha *Nephilengys cruentata*

1 Introdução

Aranhas orbiculares podem produzir até seis diferentes tipos de sedas com propriedades físicas extraordinárias, comparáveis aos melhores materiais sintéticos já produzidos (Gosline et al., 1984; Gosline et al., 1999; Lewis, 2006). Dentre as sedas produzidas por essas aranhas, a linha de segurança e a flageliforme são as mais estudadas por possuírem propriedades físicas de interesse para a produção de novos biomateriais. A linha de segurança é a seda mais resistente (4 GPa), enquanto a seda flageliforme, que forma a espiral de captura, é a fibra mais elástica (200%) (Xu e Lewis, 1990; Gosline et al., 1999; Hayashi et al., 1999). Visando o desenvolvimento de novos materiais a partir de seda de aranha, diversos laboratórios tiveram sucesso em produzir fibras sintéticas de proteínas recombinantes, para fins médicos e industriais (Lazaris et al., 2002; Huemmerich et al., 2004; Hardy e Scheibel, 2010; Elices et al., 2011; Teulé et al., 2012a; Teulé et al., 2012b; Miao et al., 2012).

As proteínas das sedas das aranhas são constituídas de repetições de diferentes módulos de aminoácidos que são responsáveis pelas propriedades mecânicas das fibras, como força e elasticidade (Xu e Lewis, 1990; Simmons et al., 1994; Simmons et al., 1996; Parkhe et al., 1997; Hayashi e Lewis, 1998; Gosline et al., 1999; Hayashi et al., 1999; Hayashi e Lewis, 2000; Lewis, 2006). A seda flageliforme é constituída por uma proteína (Flag), que como outras proteínas elastoméricas, como a elastina e a abductina, contém uma grande quantidade de resíduos de glicina (Hayashi e Lewis, 1998; Hayashi et al., 1999; Hayashi e Lewis, 2000; Martino et al., 2000). Sua sequência primária é organizada em várias repetições de módulos ricos em glicina e/ou prolina

flanqueando uma sequência muito conservada e não típica de sedas de aranhas, uma região espaçadora não-repetitiva (“*spacer*”) que é caracterizada pela presença de aminoácidos carregados e hidrofílicos e por poucos resíduos de glicina e prolina (Hayashi et al., 1999; Hayashi e Lewis, 2000).

A natureza elástica da seda flageliforme é originada da grande quantidade de motivos GPGGX (Urry, 1988; Hayashi e Lewis, 2001; Gosline et al., 2002; Urry et al., 2002). A função estrutural da região espaçadora ainda é desconhecida, porém, por ser uma sequência bastante conservada entre as espécies e por possuir resíduos de aminoácidos negativamente carregados, aspartato (D) e glutamato (E), interrompendo as unidades ricas em glicina e/ou prolina da proteína, sugere que este módulo seja um componente crítico na formação da seda flageliforme (Hayashi e Lewis, 1998).

A relação entre estrutura e função da flageliforme tem sido analisada por meio da expressão de proteínas Flag recombinantes. A estrutura secundária de um polipeptídeo recombinante baseado na sequência da proteína Flag da aranha *Nephila clavipes* foi investigada extensivamente por difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. Essas análises sugeriram que motivos GPGGYGPGGS podem adotar conformações do tipo β -turns que permitem a formação de espirais do tipo β , porém esse modelo estrutural é inválido para os motivos GPGGAGPGGA (Zhou et al., 2001; Ohgo et al., 2006; Rauscher e Pomès, 2012). Recentemente, um estudo mais completo, combinando análises estrutural, morfológica e mecânica de proteínas quiméricas Flag/MaSp2 em solução e de suas fibras foi publicado (Teulé et al., 2012a). Análises mecânicas dessas fibras demonstraram que o motivo GPGGX é responsável pela extensibilidade da fibra e que a presença de água torna as regiões com os motivos GPGGX mais flexíveis enquanto promove o aumento da formação de cristais de folhas- β nas regiões dos motivos poli(A) (Teulé et al., 2012a).

Com o intuito de investigar a relação entre o comportamento elastomérico da seda flageliforme e sua estrutura molecular, neste trabalho, fibras sintéticas foram formadas a partir de proteínas Flag recombinantes. A proteína Flag

sintética (rNcFlag2222) foi elaborada a partir de um estudo do transcriptoma das glândulas de seda da aranha orbicular *Nephilengys cruentata* (Bittencourt et al., 2007). Ela é formada pela duplicação dos módulos repetitivos estruturais, com os motivos GGX e GPGGX flanqueando a região espaçadora. A morfologia e a nanoestrutura dessas fibras artificiais foram caracterizadas usando técnicas de microscopia de força atômica (MFA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia Raman e dispersão de raios x de grandes ângulos (WAXS)

2 Material e métodos

2.1 Elaboração da sequência sintética da Flag

A engenharia modular para a elaboração da sequência foi feita previamente no nosso laboratório (Souto, 2008) com base na sequência da proteína Flag de *Nephilengys cruentata* (Bittencourt et al., 2007). Nesta proteína, foram identificados três módulos repetitivos diferentes (chamados de unidades 1, 2 e 4) e um espaçador (unidade 3). A sequência de cada uma dessas unidades são:

Unidade 1:

**5'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 3'**

Unidade 2:

**5' CTC GAG CAT ATG CCC GGG CCG GGT GGT GCT GGT CCG GGT GGT
TAC GGT CCG GGT GGT TCC GGA TAA GGA TCC 3'**

Unidade 3 (Spacer):

**5'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 3'**

Unidade 4:

**5' CTC GAG CAT ATG CCC GGG CCG GGT GCT GGT GGT TCC GGT CCG
GGT GGT GCT GGT CCG GGT GGT GCT GGT CCG GGT GGT GCT GGT
CCG GGT GGT GTT GGT CCG GGT GGT GCT GGT GGT CCG GGT GGT
GCT GGT GGT CCG TTC GGT CCG GGT GGT TCC GGT CCG GGT GGT
GCT GGT GGT GCT GGT TCC GGA TAA GGA TCC 3'**

Como esses módulos se apresentam várias vezes em um único gene na aranha, eles foram repetidos duas vezes e colocados *in tandem*, usando o protocolo descrito por Teulé et al, 2009. O produto final, chamado de rNcFlag2222 possui 765 pb e é constituído de: [(Unid 1)₂-(Unid 2)₂-(Unid 3)₂-(Unid 4)₂]₁.

Todos os passos intermediários de digestão enzimática, de purificação dos fragmentos e a construção final foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (agarose 1% em tampão TAE 1x) e visualizadas por brometo de etídio usando protocolo previamente estabelecido (Sambrook et al., 1989). A construção final foi verificada por sequenciamento de DNA. O peso molecular esperado para a proteína rNcFlag2222 com his-tag é de 23 kDa.

2.2 Expressão gênica e produção da proteína Flag recombinante

O fragmento final rNcFlag2222 foi clonada no vetor pET19b-Kan^R nos sítios de restrição *Nde*I e *Bam*HI e esse vetor pNcFlag2222 foi introduzido na bactéria *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) para expressão. O vetor pET19b-Kan^R é uma versão modificada do vetor pET19b (Novagen) no qual o marcador seletivo de resistência é kanamicina (Dr. M. Hinman Utah state University em Logan UT, dado não publicado). Ver Teulé et al., 2007 para mais detalhes.

Uma colônia recombinante foi cultivada em um fermentador BioFlo 415 de 19.5 L (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) usando o meio recomendado pelo fabricante até as células atingirem uma OD₆₀₀ entre 15-20. Após, foi adicionado IPTG em concentração final de 1 mM, resultando na indução da expressão da proteína Flag recombinante que foi maximizada após 4 horas. Em seguida, as

células foram centrifugadas por 15 min à 5.300g à 4°C. O pellet resultante foi ressuspenso numa razão 1:3 (w/v) em tampão de lise 1X (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) contendo 0,25 mg/mL de lisozima e congelado à -80 °C por 24 h para auxiliar no processo de lise celular.

2.3 Purificação da proteína de seda recombinante

Cada 600 mL de suspensão de células em tampão de lise, previamente guardada à -80°C, foram descongelados em temperatura ambiente e sonicada por 2 vezes por 2 min à 95 W no Sonicador 3000 (Misonix, Inc. Farmingdale, NY). A amostra foi centrifugada por 30 min à 30.000g à 20 °C, o sobrenadante foi removido e submetido à temperatura de 80 °C por 20 min para precipitar a maioria das proteínas nativas de *E. coli*. De fato, proteínas recombinantes de seda de aranhas são estáveis quando submetidas a altas temperaturas, enquanto a maioria das proteínas nativas de *E. coli* se tornam insolúveis (Teulé et al., 2007; Teulé et al., 2009). Após o aquecimento a amostra foi centrifugada novamente por 30 min à 30,000g à 20 °C para precipitar as proteínas nativas desnaturadas. O sobrenadante foi removido e diluído 1:1 (v/v) com tampão binding 1X (5 mM imidazole, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8). A proteína Flag recombinante foi purificada utilizando cromatografia de afinidade por íons metálicos (níquel) imobilizados (IMAC) no AKTA™ 150 Avant (GE Healthcare, Piscataway, NJ) usando uma coluna de 100 mL HisTrap™ HP (GE Healthcare). As concentrações de imidazole no tampão binding 1X foram ajustadas de 100mM a 250mM para lavar (600 mL) as proteínas contaminantes e eluir (300 mL) a proteína Flag recombinante, respectivamente. As frações eluídas foram dialisadas por 2 dias contra água antes de serem liofilizadas.

2.4 Detecção e análise das proteínas por SDS-PAGE e Western blot

Todas as frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE. A eletroforese das proteínas foi feita em géis (duplicata) de SDS-PAGE (4-20%)

pré-moldado (Precise Protein Gel, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) com o tampão Tris-Hepes-SDS recomendado pelo fabricante (Pierce). Após a corrida, um dos géis era corado com uma solução de Biosafe Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA), e o outro era submetido a uma transferência elétrica para uma membrana de PVDF/Immobilon™ P (Millipore), usando o Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad). Todas as transferências foram feitas por 16 h à temperatura ambiente e a uma corrente constante de 25 mA.

Após a fixação das proteínas, as membranas foram submetidas a análises por Western blot usando anticorpo primário anti His-tag® (Novagen) e anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG HRP (Novagen) conjugado à peroxidase. Os blots eram revelados por detecção quimioluminescente usando o reagente ECL™ Western Blotting Detection (Amersham Biosciences) e filmes fotográficos Kodak Standard® (Kodak).

2.5 Produção da fibra sintética

A proteína liofilizada foi solubilizada em hexafluoroisopropanol (HFIP; TCI America, Portland OR) em uma concentração final de 25% (w/v), de acordo com método descrito em Teulé et al., 2009. A extrusão da solução foi feita em um banho de isopropanol 100% a uma velocidade de 0.5 mm/minuto com a seringa Hamilton Gastight® (Hamilton company) de 1mL acoplada a um tubo PEEK de 10cm com diâmetro interno de 0,0635 mm. As fibras formadas foram coletadas, secas, cortadas em pedaços de 3 cm e coladas em uma lâmina para observação com o microscópio Nikon Eclipse E200 usando lentes objetivas de 40x.

2.6 Microscopia de força atômica (MFA)

As fibras formadas pela proteína recombinante foram depositadas numa superfície de vidro após a extrusão e sua análise no microscópio de força atômica foi feita com a fibra em condição ambiente. As medidas de MFA foram

feitas no instrumento SPM-9600 (Shimadzu, Japan). As imagens foram adquiridas no modo dinâmico usando um cantilever de 125 μm de comprimento (constante de mola de ~ 42 N/m, frequência de ressonância de ~ 330 kHz) com ponteira cônica (raio de curvatura < 10 nm). As imagens adquiridas a uma frequência de 0.5 Hz possuem resolução de 512 x 512 pixels. O processamento consiste em um nivelamento global e as imagens foram mostradas em 2D e 3D com perspectiva de altura.

2.7 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Após as análises de MFA, a fibra Flag sintética foi coberta 1 \times com uma camada de ouro (Emitech K550) e visualizadas em um microscópio DSM 962 Zeiss. As fibras foram fotografadas em ampliações de 1000x e 5000x.

2.8 Espectroscopia Raman

As fibras foram cortadas em pedaços de 3 cm, coladas em slides de quartzo e analisadas com o microscópio New Dimension Raman (Snowy Range Instruments) equipado com um laser de 1064 nm. Um controle de polistireno foi usado para calibrar o instrumento antes de cada coleta de dados e os picos usados na calibração foram: 620, 795.8, 1001.4, 1450.5 and 1602.3 cm^{-1} . Os dados de Raman foram adquiridos 2 vezes por 10 seg ou 20 seg usando uma longa distância de trabalho (objetiva de 20x). Os dados foram analisados no software GRAMS (Thermo Scientific) e suavizados usando o método Savitzky-Golay (polinomial 3 pontos = 17), corrigido pela linha de base e depois comparados.

2.9 Dispersão de raios X de grandes ângulos (WAXS)

Os experimentos de difração de raios X foram feitos no setor 14 BM-C/BioCARS da Advanced Photon Source (APS) localizado no Laboratório Nacional de Argonne, IL, USA (Graber et al., 2011). Para a coleta de dados, as fibras foram colocadas perpendicularmente ao foco do feixe de raio x monocromático (150 x 200 micron; energia incidente de 12.67 keV ou 0.978 Angstrom). Os dados de WAXS foram gravados usando um detector 9-chip ccd (ADSC Quantum-315) posicionado 300 mm atrás da amostra. Para cada amostra, cinco fases foram coletadas usando um feixe de amostra com uma distância de parada de 50 mm e um tempo de exposição de 60 segundos. Os ruídos foram subtraídos dos dados WAXS apresentados.

3 Resultados e Discussão

3.1 Expressão e purificação da proteína Flag recombinante

Utilizando protocolos previamente publicados (Teulé et al., 2009), uma sequência sintética da proteína Flag foi engenheirada, clonada e produzida em bactéria. A sequência do clone rNcFlag2222 possui 3 módulos repetitivos e uma região espaçadora duplicados (Figura 1) da proteína Flag da aranha *N. cruentata* (Bittencourt et al., 2007).

A estratégia utilizada resultou em um aumento da região espaçadora na proteína recombinante, o que tornou esse motivo o foco desse estudo. A sequência resultante de 765 pb foi clonada no vetor pET19b-Kan^R e este foi introduzido em células *E. coli* BL21 (DE3) para expressão (Figura 2a). A proteína recombinante com his-tag rNcFlag2222 foi facilmente purificada, por meio de cromatografia de afinidade por íons metálicos, do extrato proteico total submetido previamente ao tratamento de calor. A proteína rNcFlag2222 mostrou

ser resistente ao calor como outras proteínas recombinantes de seda descritas anteriormente (Scheller et al., 2001; Teulé et al., 2007).

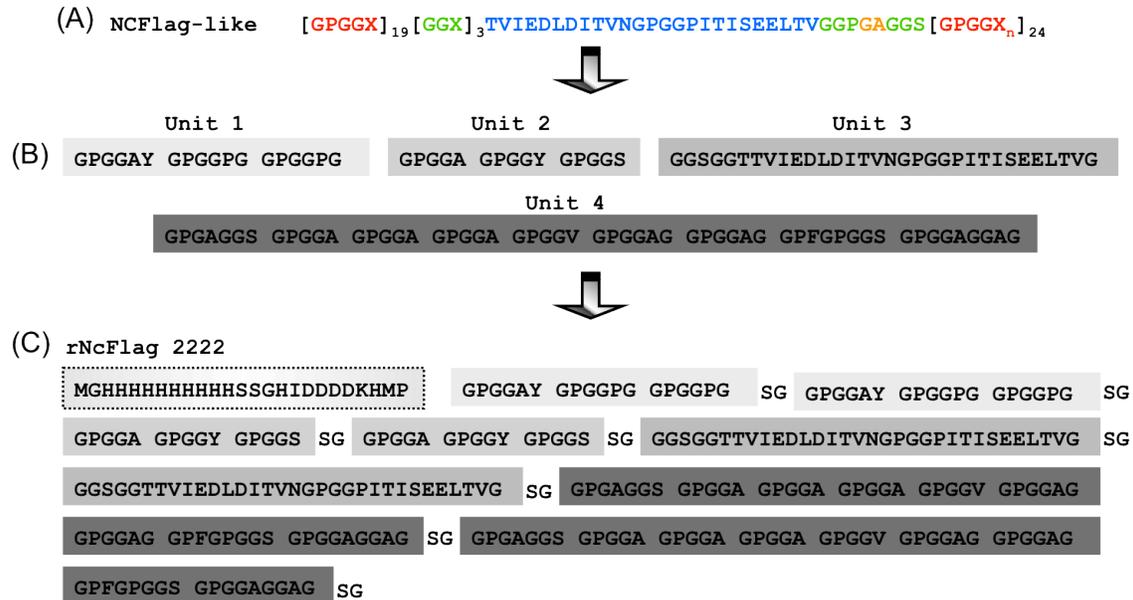


Figura 1. (a) Sequência de aminoácido da proteína flageliforme da aranha orbicular *N. cruentata* e seus diferentes motivos estruturais (GPGGX em vermelho, GGX em verde e a região espaçadora em azul). (b) As quatro unidades sintetizadas utilizadas na construção da sequência de seda sintética. (c) Sequência primária da proteína rNcFlag2222.

A análise feita por SDS-PAGE mostra a pureza da proteína rNcFlag2222 (Figura 2b). Embora o tamanho molecular esperado para a proteína seja de 23 kDa, o gel de SDS-PAGE mostrou que o peso molecular aparente da proteína rNcFlag2222 foi de quase 30 kDa. Análises por *western blot* usando anticorpo anti-poli-histidina confirmaram esse resultado (Figura 2c). Essa redução da mobilidade eletroforética da proteína rNcFlag2222 pode ser explicada pela presença de aminoácidos carregados negativamente que compõem a região espaçadora (unidade 3) dessa proteína flageliforme recombinante. Esse fato pode ser corroborado com outros estudos que reportaram que grandes quantidades de aminoácidos carregados em proteínas podem afetar a mobilidade eletroforética da mesma em análise por SDS-PAGE (Mcgrath et al., 1992; Armstrong e Roman, 1993; Hu e Ghabrial, 1995).

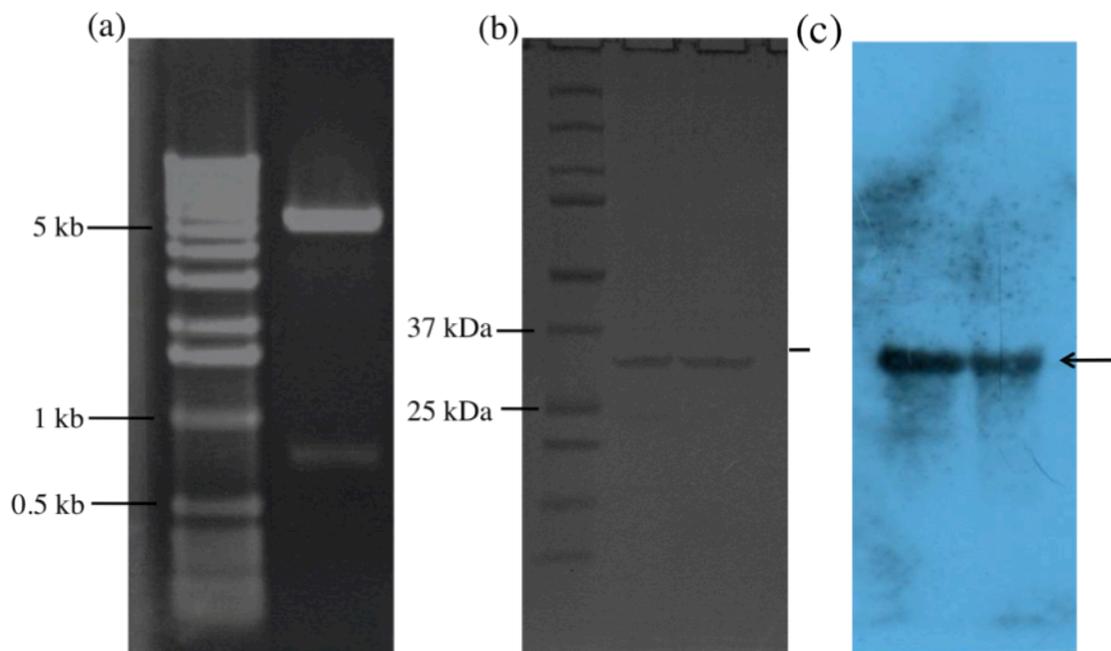


Figura 2. (a) Análise eletroforética em gel de agarose do vetor prNcFlag 2222 (inserto de 765 pb). O plasmídeo foi digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. A banda menor corresponde ao inserto da Flag e a banda maior é o vetor pET19b-kan linearizado (5.8 kpb). Marcador 1 Kb DNA Ladder Invitrogen. (b) Análise de SDS-PAGE mostrando a proteína Flag purificada detectada por coloração por Coomassie blue. Padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Bio Rad (c) Análise de western blot usando anticorpo anti-poliHistidina. A seta apontam a proteína rNcFlag2222.

3.2 Características topográficas e moleculares das fibras Flag sintéticas

Buscando avaliar potencial da proteína recombinante rNcFlag2222 em formar fibra foi preparada uma solução (dope) dissolvendo a proteína recombinante liofilizada em um solvente orgânico (HFIP). A extrusão da fibra foi feita em um banho coagulante de 100% isopropanol, resultando na produção de fibras flageliformes sintéticas. Diferente do que Heim et al. (2010) sugerem, e de acordo com trabalhos de outros grupos de pesquisa em proteínas de sedas de aranha (Lazaris et al., 2002; Teulé et al., 2007; Xia et al., 2010; An et al., 2011; Teulé et al., 2012a), podemos demonstrar que a ausência das porções nativas C- e/ou N-terminal da proteína rNcFlag2222 não comprometeu a formação da fibra sintética. Além disso, a proteína foi capaz de se agregar e formar uma fibra

compacta apesar do seu tamanho reduzido de 23 kDa, quando comparada a proteínas de mais de 50 kDa, tipicamente utilizadas para formação de fibras sintéticas de aranhas (Geurts et al., 2010; Gnesa et al., 2012; Teulé et al., 2007; An et al., 2011; Teulé et al., 2012; Xia et al., 2010). Na Figura 3a, fotografia feita usando um microscópio de luz, pode-se observar a aparência uniforme e regular da fibra sintética produzida. As imagens de MEV (Figura 3b e 3c) confirmam essas características moleculares e indicam que as fibras são compactas. Estudos de MEV mostraram a presença de nanofibrilas em sedas de bicho da seda (Miller et al., 1999; Putthanarat et al., 2000), em sedas nativas de aranhas (Miller et al., 1999) e em fibras sintéticas de aranhas processadas após a extrusão (Xia et al., 2010; Elices et al., 2011; Teulé et al., 2012a). Esses resultados corroboram com outros estudos publicados de fibras sintéticas de MaSp2 e de Flag-MaSp2 (Lazaris et al., 2002; Teulé et al., 2012a), e diferem bastante da aparência esponjosa da fibra linha de segurança regenerada no trabalho de Seidel et al. (2000). Entretanto, no caso da rNcFlag2222, a fibra sintética não possui o nível de organização estrutural descrito para outras fibras sintéticas de aranhas processadas após a extrusão (Xia et al., 2010; Elices et al., 2011; Teulé et al., 2012a).

Análises por MFA foram utilizadas visando elucidar a organização supra e nanoestrutural das fibras Flag sintéticas (Figura 3d). Os dados de MFA complementam os dados de MEV (Figura 3c e 3d) e mostram que a superfície topográfica dessas fibras sintéticas é granular, caracterizada pela presença de estruturas nanoglobulares encontradas em fibras de sedas sintéticas já descritas (Elices et al., 2011). No entanto a presença de rachaduras na superfície da fibra indica uma estrutura menos uniforme quando comparada com fibras sintéticas processadas. Além disso é possível observar áreas com imperfeições e uma superfície não muito estruturada, o que contrasta com os dados de MEV e MFA para sedas nativas de aranhas e do bicho da seda (Miller et al., 1999; Putthanarat et al., 2000).

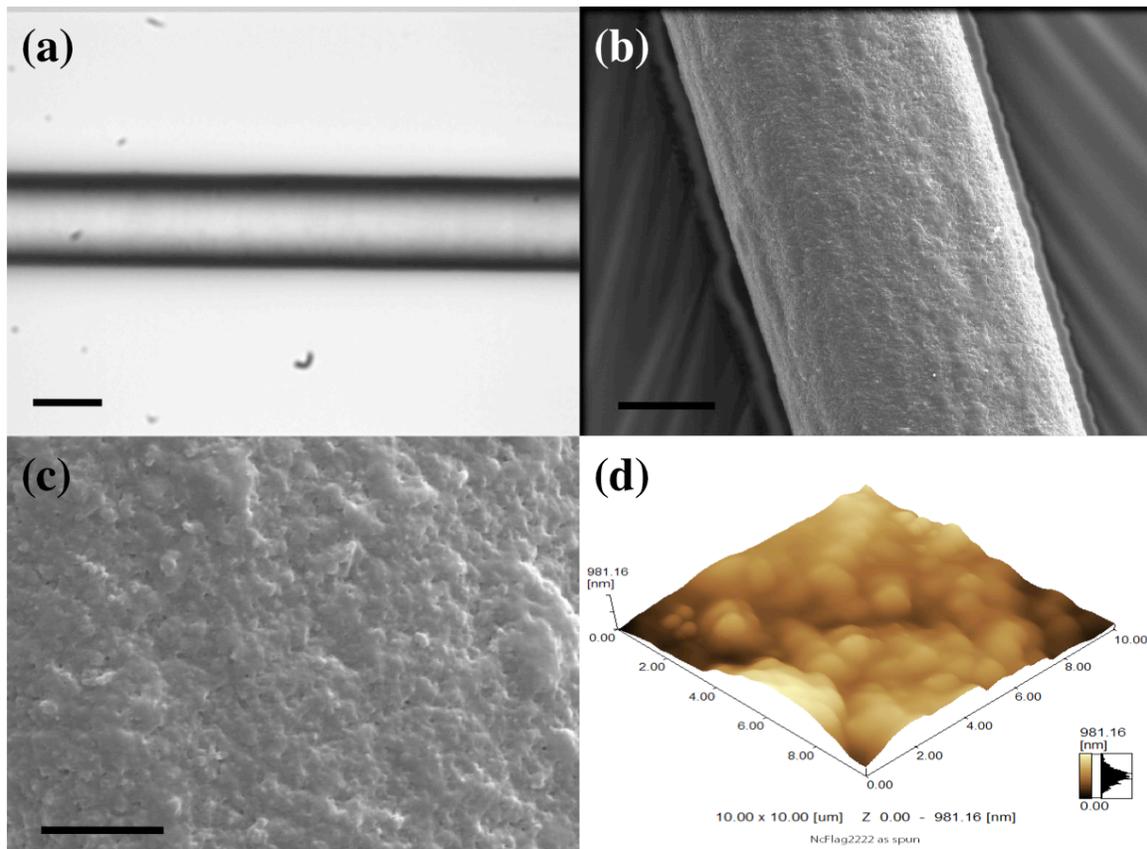


Figura 5. Características morfológicas da fibra Flag sintética. (a) imagem da fibra Flag sintética adquirida por microscopia de luz (40x; barra de escala = 30 μm) (b) e (c) Micrografias eletrônicas de varredura da fibra sintética em diferentes magnificações. A imagem em (b) mostra a aspecto geral da fibra (1000x; barra de escala = 20 μm), e em (c) pode-se observar os grânulos presentes na superfície da fibra (5000x; barra de escala = 5 μm). (d) Imagem 3-D de MFA mostra detalhes topográficos da superfície da fibra Flag sintética.

Embora uma conexão direta entre características estruturais investigadas por MFA e a estrutura secundária da proteína ainda não tenha sido demonstrada para fibras naturais nem para fibras flageliforme recombinantes, as estruturas primárias e secundárias presentes na fibra rNcFlag2222 pode ter um papel importante nas observações nanoestruturais. O tamanho da proteína recombinante é muito menor que o das proteínas nativas, o que confere menos oportunidade para interações moleculares e conseqüentemente forma uma fibra com estrutura menos estável. É sabido que o processamento da fibra após a extrusão aumenta significativamente as propriedades estruturais das mesmas (An et al., 2011; Teulé et al., 2012a). O tamanho pequeno da proteína

rNcFlag2222 pode ter impossibilitado o processamento eficiente dessas fibras sintéticas.

3.3 Análises por espectroscopia Raman e dispersão de raios x de grandes ângulos (WAXS)

O espectro de Raman coletado das fibras não processadas formadas a partir da proteína rNcFlag2222 está mostrado na Figura 5. É possível observar regiões entre 800 and 1800 cm^{-1} que contêm bandas características de resíduos de aminoácidos da proteína recombinante. A banda 1415 cm^{-1} indica a presença de resíduos de glicina nas proteínas (Lefèvre et al., 2012), e está visível no espectro da fibra Flag sintética já que 46% do total de aminoácidos desta proteína recombinante são de resíduos de glicina. Embora, a proteína rNcFlag2222 possua apenas 1,5% de resíduos de tirosina e menos de 1 % de resíduos de fenilalanina, a presença destes pode ser detectada pela apresentação das bandas de 1615 cm^{-1} e de 1003 cm^{-1} , respectivamente (Lefèvre et al., 2012).

Como proposto para as proteínas glúten e elastina (Urry et al., 1995; Van Dijk, 1997), o pentapeptídeo GPGGX presente nas proteínas de aranha conferem elasticidade à fibra por meio das estruturas do tipo β -turn. Estas formam “nanomolas” em espirais β , com cada volta da espiral contendo dois motivos do pentapeptídeo (Hayashi e Lewis, 2001; Becker et al., 2003; Porter et al., 2005). Porém, estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) em peptídeos presentes na Flag (GGPGGA)₆G (Ohgo et al., 2006) e análises de dicroísmo circular comparando proteínas Flag recombinantes com peptídeos GPGGA (Teulé et al., 2007) indicam que o motivo GPGGX adota uma conformação randômica e não uma estrutura do tipo espiral β . Na seda flageliforme uma região espaçadora está presente entre as unidades básicas repetitivas, essa sequência não é típica de seda de aranha já que não é rica em glicina e contém predominantemente resíduos de aminoácidos carregados e

hidrofílicos (Hayashi e Lewis, 2001). A função e estrutura dessa região ainda são desconhecidas.

O espectro de Raman da fibra rNcFlag2222 mostrou a presença de uma banda larga de amida I no intervalo de 1600-1700 cm^{-1} , como já mostrado em outras análises feitas com a seda flageliforme nativa (Lefèvre et al., 2012). A análise da região amida I do espectro de sedas tem se mostrado muito informativa para as estruturas de fibras nativas de aranhas (Zhou et al., 2004; Rousseau et al., 2009; Lefèvre et al., 2012). De acordo com o espectro de Raman das fibras sintéticas (Figura 4), a banda amida I da proteína rNcFlag2222 é larga e o seu pico está em 1659 cm^{-1} , um pouco abaixo do reportado para sedas flageliformes nativas (Lefèvre e Pezolet, 2012). O fato do pico da banda amida I ser largo indica a presença de uma mistura heterogênea de estruturas secundárias, como já foi sugerido para proteínas Flag nativas (Rousseau et al., 2009; Lefèvre et al., 2012). Nessa região foram encontrados sinais de estruturas random coil (1641 cm^{-1}), α -hélices/hélices PPII (1656 cm^{-1}), folha- β (1670 cm^{-1}) e β -turns (1685 cm^{-1}) (Lefèvre et al., 2012). O pico mais proeminente e definido de todas as estruturas identificadas na região amida I é o que representa as estruturas helicoidais (α -hélices/hélices PPII). Embora nenhuma quantificação estrutural tenha sido feita, a banda amida I da proteína rNcFlag2222 está localizada mais abaixo (1659 cm^{-1}), quando comparada com análises feitas em sedas flageliformes nativas (1668 a 1670 cm^{-1}). Essa mudança na posição da região amida I ocorreu devido a intensidade do pico relativo às estruturas helicoidais. Esse deslocamento pode estar relacionado ao fato da proteína rNcFlag2222 possuir duas regiões espaçadoras e também pela presença do domínio GGX (Hayashi e Lewis, 2001; Rising et al., 2005; Teulé et al., 2012a).

Por outro lado, o pico relativo a estrutura β -turn é o mais largo e está relacionado a presença do polipeptídeo GPGGX presente na rNcFlag2222, que é responsável pela natureza elástica das sedas de aranha (Hayashi e Lewis, 2001; Teulé et al., 2012a). Nenhum modelo ainda tinha proposto a presença de folhas- β na seda flageliforme por várias razões: 1) esta seda possui uma força tensora pequena e uma extraordinária elasticidade quando comparada a seda

linha de segurança, 2) a proteína Flag é rica em resíduos de prolina que não são favoráveis a formação de folhas- β (Rousseau et al., 2009) e 3) a ausência de motivos que formam folhas- β como poli(A) e poli(GA) (Teulé et al., 2007; An et al., 2011; Teulé et al., 2012a; Teulé et al., 2012b; Miao et al., 2012). Porém Lefèvre e Pezolet (2012) publicaram recentemente um estudo feito em fibras flageliformes usando espectroscopia Raman, mostrando que embora inesperado, a seda da Flag contem algumas folhas- β e exibe um certo nível de orientação ao longo do eixo da fibra e que a região espaçadora (ou outros tipos de proteínas da seda) pode estar envolvida na formação dessas folhas- β .

Os dados de WAXS coletados da fibra rNcFlag2222 (Figura 5) mostraram dois anéis com centros em 4.4 e 10.5 Å. Esse padrão de dois anéis é característico de estruturas helicoidais e de folhas- β (Hauser et al., 2011). O anel de 10.5 Å é característico de fibras Flag sintéticas (Dra. Florence Teulé, Utah State University, comunicação pessoal) e o anel com centro em 4.4 Å é consistente com a estrutura amorfa e desordenada da fibra (Teulé et al., 2012) e sugere que a estrutura da proteína rNcFlag2222 seja dominada por estruturas helicoidais do tipo hélice PPII, devido ao fato da região espaçadora dessa proteína estar duplicada.

Os dados apresentados sugerem que a extrusão da fibra sintética em HFIP (solvente conhecido por promover a formação de estruturas helicoidais) pode ser a causa da agregação dessas hélices em folhas- β inesperadas, provavelmente na região espaçadora. Como não foi possível processar a fibra para se ter mais dados estruturais que provassem que as estruturas folhas- β permaneceriam após o processamento e assim eliminar qualquer artefato do método de extrusão utilizado, não se pode afirmar que o componente helicoidal é responsável pela formação de folhas- β .

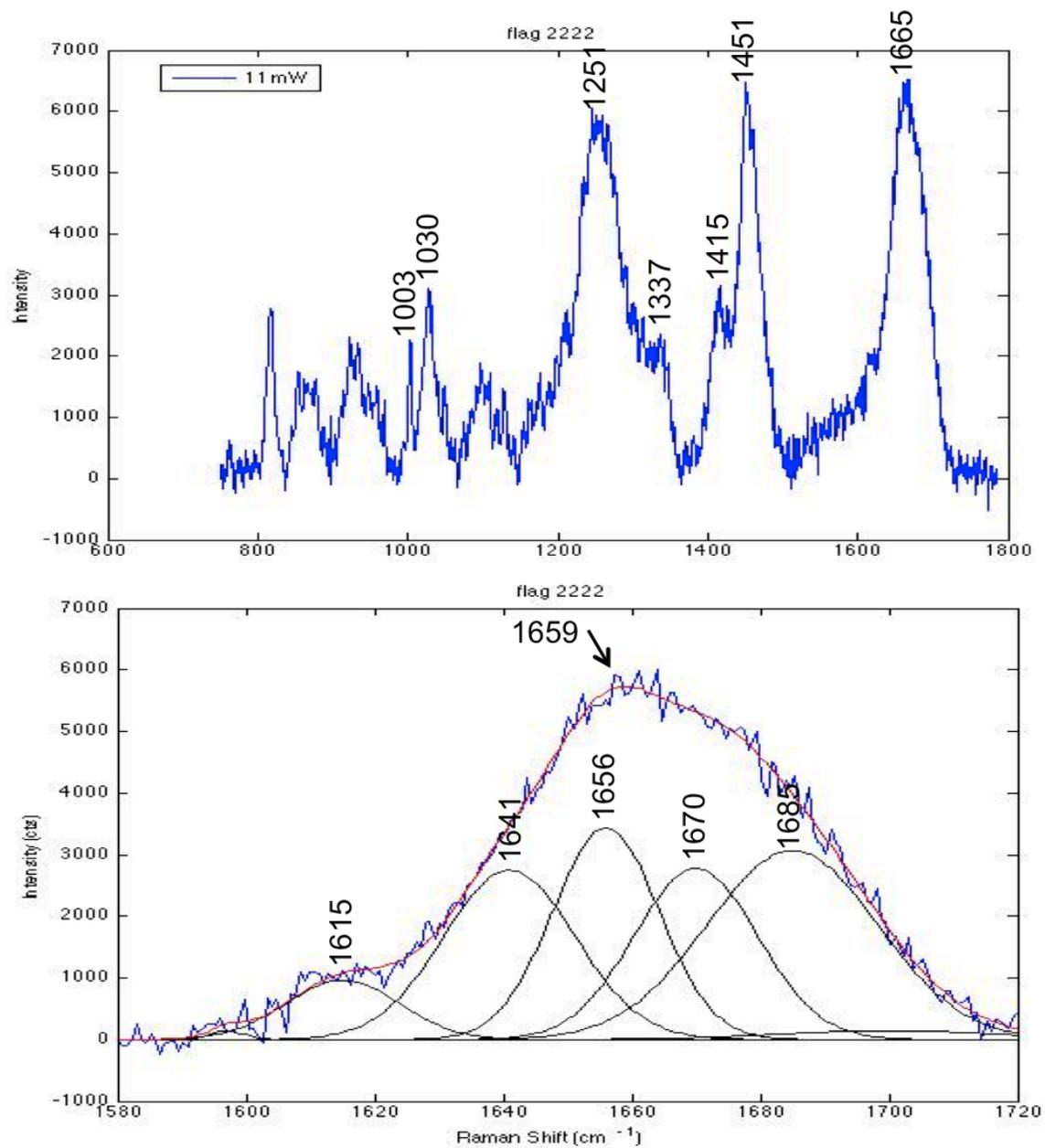


Figura 4. Espectro Raman (acima) e decomposição espectral da região amida I (abaixo) da fibra sintética rNcFlag2222. Estruturas: random coil (1641 cm^{-1}), α -hélices/hélices PPII (1656 cm^{-1}), folha- β (1670 cm^{-1}) e β -turns (1685 cm^{-1}) (Lefèvre et al., 2011).

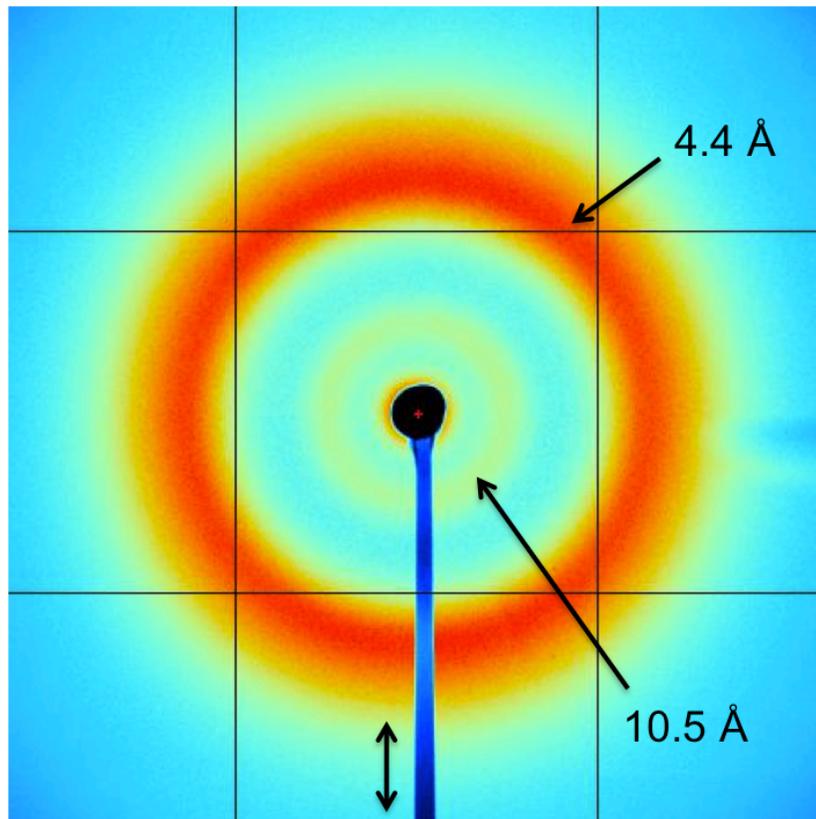


Figura 5. Análise de dispersão de raios x de grandes ângulos da fibra sintética não processada rNcFlag2222. As setas apontam para dois anéis amorfos de diferentes intensidade com os centros em 4.4Å and 10.5Å.

4 Referências Bibliográficas

AN, B.; HINMAN, M. B.; HOLLAND, G. P.; YARGER, J. L.; LEWIS, R. V. 2011. Inducing B-Sheets Formation in Synthetic Spider Silk Fibers by Aqueous Post-Spin Stretching. *Biomacromolecules*, v.12, n.6, 2011/10/13, p.2375-2381.

ARMSTRONG, D. J.; 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.192, n.3, p.1380-1387.

BECKER, N.; OROUDJEV, E.; MUTZ, S.; CLEVELAND, J. P.; HANSMA, P. K.; HAYASHI, C. Y.; MAKAROV, D. E.; HANSMA, H. G. 2003. Molecular nanosprings in spider capture-silk threads. *Nat Mater*, v.2, n.4, Apr, p.278-83.

BITTENCOURT, D.; SOUTO, B. M.; VERZA, N. C.; VINECKY, F.; DITTMAR, K.; SILVA, P. I., JR.; ANDRADE, A. C.; DA SILVA, F. R.; LEWIS, R. V.; RECH, E. L. 2007. Spidroins from the Brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v.147, n.4, Aug, p.597-606.

ELICES, M.; GUINEA, G. V.; PLAZA, G. R.; KARATZAS, C.; RIEKEL, C.; AGULLÓ-RUEDA, F.; DAZA, R.; PÉREZ-RIGUEIRO. 2011. Bioinspired Fibers Follow the Track of Natural Spider Silk. *Macromolecules*, v.44, n.5, p.1166-1176.

GEURTS, P.; ZHAO, L.; HSIA, Y.; GNESE, E.; TANG, S.; JEFFERY, F.; MATTINA, C. L.; FRANZ, A.; LARKIN, L.; VIERRA, C. 2010. Synthetic Spider Silk Fibers Spun from Pyriform Spidroin 2, A Glue Silk Protein Discovered in Orb-Weaving Spider Attachment Discs. *Biomacromolecules*, v.11, n.12, 2012/03/18, p.3495-3503.

GNESE, E.; HSIA, Y.; YARGER, J. L.; WEBER, W.; LIN-CEREGHINO, J.; LIN-CEREGHINO, G.; TANG, S.; AGARI, K.; VIERRA, C. 2012. Conserved C-Terminal Domain of Spider Tubuliform Spidroin 1 Contributes to Extensibility in Synthetic Fibers. *Biomacromolecules*, v.13, n.2, 2012/03/18, p.304-312.

GOSLINE, J.; LILLIE, M.; CARRINGTON, E.; GUERETTE, P.; ORTLEPP, C.; SAVAGE, K. 2002. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.357, n.1418, Feb 28, p.121-32.

GOSLINE, J. M.; DENNY, M. W.; DEMONT, M. E. 1984. Spider silk as rubber. *Nature*, v.309, n.5968, p.551-2.

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*, v.202, n.Pt 23, Dec, p.3295-303.

GRABER, T.; ANDERSON, S.; BREWER, H.; CHEN, Y. S.; CHO, H. S.; DASHDORJ, N.; HENNING, R. W.; KOSHELEVA, I.; MACHA, G.; MERON, M.; PAHL, R.; REN, Z.; RUAN, S.; SCHOTTE, F.; SRAJER, V.; VICCARO, P. J.; WESTFERRO, F.; ANFINRUD, P.; MOFFAT, K. 2011. BioCARS: a synchrotron resource for time-resolved X-ray science. *Journal of Synchrotron Radiation*, v.18, n.4, p.658-670.

HARDY, J. G.; SCHEIBEL, T. R. 2010. Composite materials based on silk proteins. *Progress in Polymer Science*, v.35, n.9, p.1093-1115.

HAUSER, C. A. E.; DENG, R.; MISHRA, A.; LOO, Y.; KHOE, U.; ZHUANG, F.; CHEONG, D. W.; ACCARDO, A.; SULLIVAN, M. B.; RIEKEL, C.; YING, J. Y.; HAUSER, U. A. 2011. Natural tri- to hexapeptides self-assemble in water to amyloid β -type fiber aggregates by unexpected α -helical intermediate structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.108, p. 1361–1366.

HAYASHI, C. Y.; LEWIS, R. V. 1998. Evidence from Flagelliform Silk cDNA for the Structural Basis of Elasticity and Modular Nature of Spider Silks. *Journal of Molecular Biology*, v.275, p.773-784.

HAYASHI, C. Y.; LEWIS, R. V. 2000. Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. *Science*, v.287, n.5457, p.1477-9.

HAYASHI, C. Y.; LEWIS, R. V. 2001. Spider flagelliform silk: lessons in protein design, gene structure, and molecular evolution. *Bioessays*, v.23, n.8, p.750-6.

HAYASHI, C. Y.; SHIPLEY, N. H.; LEWIS, R. V. 1999. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int J Biol Macromol*, v.24, n.2-3, p.271-5.

HEIM, M.; ACKERSCHOTT, C. B.; SCHEIBEL, T. Characterization of recombinantly produced spider flagelliform silk domains. 2010. *Journal of Structural Biology*, v.170, n.2, p.420-425.

HU, C. C.; 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. *Journal of Virological Methods*, v.55, n.3, p.367-379.

HUEMMERICH, D.; SCHEIBEL, T.; VOLLRATH, F.; COHEN, S.; GAT, U.; ITTAH, S. 2004. Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Curr Biol*, v.14, n.22, Nov 23, p.2070-4.

LAZARIS, A.; ARCIDIACONO, S.; HUANG, Y.; ZHOU, J.-F.; DUGUAY, F. O.; CHRETIEN, N.; WELSH, E. A.; SOARES, J. W.; KARATZAS, C. N. 2002. Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells. *Science*, v.295, n.5554, p.472-476.

LEFÈVRE, T.; PAQUET-MERCIER, F.; RIOUX-DUBÉ, J.-F.; PÉZOLET, M. 2012. Structure of silk by raman spectromicroscopy: From the spinning glands to the fibers. *Biopolymers*, v.97, n.6, p.322-336.

LEFÈVRE, T.; PEZOLET, M. 2012. Unexpected β -sheets and molecular orientation in flagelliform spider silk as revealed by Raman spectromicroscopy. *Soft Matter*, v.8, n.23, p.6350-6357.

LEWIS, R. V. 2006. Spider Silk: Ancient Ideas for New Biomaterials. *Chemical Reviews*, v.106, n.9, p.3762-74.

MARTINO, M.; BAVOSO, A.; GUANTIERI, V.; COVIELLO, A.; TAMBURRO, A. M. 2000. On the occurrence of polyproline II structure in elastin. *Journal of Molecular Structure*, v.519, n.1-3, p.173-189.

MCGRATH, K. P.; FOURNIER, M. J.; MASON, T. L.; TIRRELL, D. A. 1992. Genetically directed syntheses of new polymeric materials. Expression of artificial genes encoding proteins with repeating $-(\text{AlaGly})_3\text{ProGluGly}$ - elements. *Journal of the American Chemical Society*, v.114, n.2, p.727-733.

MILLER, L. D.; PUTTHANARAT, S.; EBY, R. K.; ADAMS, W. W. 1999. Investigation of the nanofibrillar morphology in silk fibers by small angle X-ray scattering and atomic force microscopy. *Int J Biol Macromol*, v.24, n.2-3, p.159-65.

OHGO, K.; KAWASE, T.; ASHIDA, J.; ASAKURA, T. 2006. Solid-State NMR Analysis of a Peptide $(\text{Gly-Pro-Gly-Gly-Ala})_6\text{-Gly}$ Derived from a Flagelliform Silk Sequence of *Nephila clavipes*. *Biomacromolecules*, v.7, n.4, p.1210-1214.

PARKHE, A. D.; SEELEY, S. K.; GARDNER, K.; THOMPSON, L.; LEWIS, R. V. 1997. Structural studies of spider silk proteins in the fiber. *J Mol Recognit*, v.10, n.1, p.1-6.

PORTER, D.; VOLLRATH, F.; SHAO, Z. 2005. Predicting the mechanical properties of spider silk as a model nanostructured polymer. *Eur Phys J E Soft Matter*, v.16, n.2, p.199-206.

PUTTHANARAT, S.; STRIBECK, N.; FOSSEY, S. A.; EBY, R. K.; ADAMS, W. W. 2000. Investigation of the nanofibrils of silk fibers. *Polymer*, v.41, n.21, p.7735-7747.

RAUSCHER, S.; POMÈS, R. 2012. Structural Disorder and Protein Elasticity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.725, p.159-183.

RISING, A.; NIMMERVOLL, H.; GRIP, S.; FERNANDEZ-ARIAS, A.; STORCKENFELDT, E.; KNIGHT, D. P.; VOLLRATH, F.; ENGSTROM, W. 2005. Spider silk proteins-mechanical property and gene sequence. *Zoolog Sci*, v.22, n.3, Mar, p.273-81.

ROUSSEAU, M.-E.; LEFÈVRE, T.; PÉZOLET, M. 2009. Conformation and Orientation of Proteins in Various Types of Silk Fibers Produced by *Nephila clavipes* Spiders. *Biomacromolecules*, v.10, n.10, p.2945-2953.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual.: Cold Spring Harbor Laboratory, v.2.

SHELLER, J.; GUHRS, K. H.; GROSSE, F.; CONRAD, U. 2001. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol*, v.19, n.6, Jun, p.573-7.

SEIDEL, A.; LIIVAK, O.; CALVE, S.; ADASKA, J.; JI, G.; YANG, Z.; GRUBB, D.; ZAX, D. B.; JELINSKI, L. W. 2000. Regenerated Spider Silk: Processing, Properties, and Structure *Macromolecules*, v.33, p.775-780.

SIMMONS, A.; RAY, E.; JELINSKI, L. W. 1994. Solid-State ¹³C NMR of *Nephila clavipes* Dragline Silk Establishes Structure and Identity of Crystalline Regions. *Macromolecules*, v.27, n.18, p.5235-5237.

SIMMONS, A. H.; MICHAL, C. A.; JELINSKI, L. W. 1996. Molecular Orientation and Two-Component Nature of the Crystalline Fraction of Spider Dragline Silk. *Science*, v.271, n.5245, p.84-87.

SOUTO, B. Expressão e Purificação de Proteínas de Glândulas Produtoras de Seda das Aranhas *Nephilengys cruentata* e *Avicularia juruensis*. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília. 2008.

TEULÉ, F.; ADDISON, B.; COOPER, A. R.; AYON, J.; HENNING, R. W.; BENMORE, C. J.; HOLLAND, G. P.; YARGER, J. L.; LEWIS, R. V. 2012. Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers*, v.97, n.6, p.418-431.

TEULÉ, F.; COOPER, A. R.; FURIN, W. A.; BITTENCOURT, D.; RECH, E. L.; BROOKS, A.; LEWIS, R. V. 2009. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nat Protoc*, v.4, n.3, p.341-55.

TEULÉ, F.; FURIN, W. A.; COOPER, A. R.; DUNCAN, J. R.; LEWIS, R. V. 2007. Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. *Journal of Material Science*, v.42, p.8974-8985.

TEULÉ, F.; MIAO, Y.-G.; SOHN, B.-H.; KIM, Y.-S.; HULL, J. J.; FRASER, M. J.; LEWIS, R. V.; JARVIS, D. L. 2012. Silkworms transformed with chimeric silkworm/spider silk genes spin composite silk fibers with improved mechanical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.109, n.3, January 17, 2012, p.923-928.

URRY, D. W. 1988. Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics. *J Protein Chem*, v.7, n.1, Feb, p.1-34.

URRY, D. W.; HUGEL, T.; SEITZ, M.; GAUB, H. E.; SHEIBA, L.; DEA, J.; XU, J.; PARKER, T. 2002. Elastin: a representative ideal protein elastomer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.357, n.1418, p.169-184.

URRY, D. W.; LUAN, C. H.; PENG, S. Q. 1995. Molecular biophysics of elastin structure, function and pathology. *Ciba Found Symp*, v.192, p.4-22; discussion 22-30.

VAN DIJK, A. A., VAN WIJK, L. L., VAN SWIETEN, E., ROBILLARD, G. T., DE BOEF, E., BEKKERS, A. AND HAMER, R. J. 1997. Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins. II. Characterization in solution and in the dry state. *Protein Science*, v.6, n.6, p.649-656.

XIA, X.-X.; QIAN, Z.-G.; KI, C. S.; PARK, Y. H.; KAPLAN, D. L.; LEE, S. Y. 2010. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.107, n.32, p.14049-14063.

XU, M.; LEWIS, R. 1990. Structure of a Protein Superfiber: Spider Dragline Silk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.87, p.7120-7124.

ZHOU, P.; XIE, X.; KNIGHT, D. P.; ZONG, X. H.; DENG, F.; YAO, W. H. 2004. Effects of pH and calcium ions on the conformational transitions in silk fibroin using 2D Raman correlation spectroscopy and ¹³C solid-state NMR. *Biochemistry*, v.43, n.35, p.11302-11.

ZHOU, Y.; WU, S.; CONTICELLO, V. P. 2001. Genetically Directed Synthesis and Spectroscopic Analysis of a Protein Polymer Derived from a Flagelliform Silk Sequence. *Biomacromolecules*, v.2, n.1, February 13, 2001, p.111-125.

Capítulo 3 - Produção e Caracterização molecular de fibras sintéticas do tipo linha de segurança da aranha *Parawixia bistriata*

1 Introdução

As extraordinárias propriedades mecânicas das sedas de aranhas tem provocado fascínio na humanidade por anos. Somente no final do século 20 pesquisadores começaram a desvendar as razões que tornam essa fibra um material tão único. Diferente dos bichos da seda, as aranhas não foram domesticadas para produzirem fibras em escala industrial, devido a sua natureza territorial e predatória. Por esse motivo, entender as características moleculares dessas sedas para criar fibras sintéticas com essas propriedades usando técnicas de biologia molecular é o meio mais viável de tentar produzir esse material em grande quantidade.

Dentre as diferentes sedas produzidas pelas aranhas, a seda linha de segurança produzida pela glândula ampolada maior, é o tipo de seda mais descrito até hoje (Scheibel, 2004), principalmente por combinar alta força tensora (Work, 1977; Gosline et al., 1999; Vollrath et al., 2001) a razoáveis viscoelasticidade e extensibilidade (Scheibel, 2004), quando a maior parte das fibras produzidas pelo homem exibe alta força tensora e dureza, ou alta extensibilidade e baixa força tensora (Agnarsson et al., 2010). A combinação dessas características confere a essa seda resistência extremamente alta e uma robustez que supera a dos tendões, a da seda produzida pelo bicho da seda, a da borracha sintética e até mesmo a do aço (Scheibel, 2004).

A seda linha de segurança é formada por duas proteínas, a MaSp1 (Xu e Lewis, 1990) e a MaSp2 (Hinman e Lewis, 1992). Essas proteínas contêm motivos poli(A) e/ou poli(GA) caracterizados como domínios cristalinos ou formadores de folhas β (Lefèvre et al., 2007; Holland, Creager et al., 2008; An et

al., 2011; Teulé et al., 2012), motivos GGX que formam 3_{10} -hélices (Holland, Creager et al., 2008) e motivos GPGXX que adotam estruturas do tipo β -turns (Jenkins et al., 2010). O motivo poli(A), que normalmente adota uma estrutura helicoidal (Lin et al., 2004; Palenčár e Bleha, 2011), nas sedas de aranha forma folhas- β antiparalelas. Essas estruturas foram primeiramente observadas por difração de raios x (Gosline et al., 1984) e posteriormente visando identificar a relação das folhas- β com os motivos de aminoácidos por ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho (Simmons et al., 1994; Parkhe et al., 1997; Rathore e Sogah, 2001; Holland, Jenkins et al., 2008). Essas folhas- β antiparalelas são elementos chave porque formam segmentos cristalinos responsáveis pela alta resistência das sedas.

A linha de segurança da aranha orbicular brasileira *Parawixia bistrata* contém 90% de MaSp1 e o restante 10% de MaSp2 (dados não publicados), proporção equivalente a linha de segurança da aranha *Nephila clavipes* (An et al., 2011). Poucos estudos usando proteínas recombinantes baseadas na sequência da MaSp1 (Menassa et al., 2004; Xia et al., 2010; An et al., 2011) foram feitos até hoje. Neste trabalho, proteína recombinante baseada na sequência da MaSp1 foi expressa e fibras sintéticas foram formadas. Fibras processadas e não processadas foram analisadas mecânica e estruturalmente visando estudar as mudanças que acontecem nas fibras após o processamento.

2 Material e métodos

2.1 Elaboração da sequência sintética da MaSp1

A engenharia modular para a elaboração da sequência foi feita previamente no nosso laboratório (Oliveira, 2008) com base na sequência da proteína MaSp1 de *Parawixia bistrata* (dados não publicados). Nesta proteína,

foi identificado um módulo repetitivo com motivos GGX e poli(A). A sequência de DNA e de aminoácidos desse módulo é:

**5' CTC GAG CAT ATG CCC GGG GGT CTG GGT GGT CAG GGT GGT CTG
GGT GGT CTG GGT TCC CAG GGT GCT GGT CTG GGT GGT TAC GGT
CAG GGT GGT GCT GGT CAG GGT GGT GCT GCT GCT GCT GCT GCT
GCT GCT TCC GGA TAA GGA TCC 3'**
GGLGGQGLGGLGSLGAGLGGYGQGGAGQGGA

Como esse módulo se apresenta várias vezes em um único gene na aranha, ele foi repetido 16 vezes e colocado *in tandem*, usando o protocolo descrito por Teulé et al, (2009). O produto final, chamado de rPbMaSp1-16x possui 1947 pb (Tabela 1). Todos os passos intermediários de digestão enzimática, de purificação dos fragmentos e a construção final foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1% agarose in 1x TAE tampão) e visualizados por brometo de etídio, usando protocolo previamente estabelecido (Sambrook et al., 1989). A construção final foi verificada por sequenciamento de DNA. O peso molecular esperado para a proteína rPbMaSp1-16x com his-tag é de 49 kDa.

Tabela 1. Sequência da proteína da seda sintética e o tamanho do gene e da proteína correspondente.

	sequência da proteína	DNA (pb)	Proteína (kDa)
rMaSp1- 16x	(GGLGGQGLGGLGSLGAGLGGYGQGGAGQGGA ₆) ₁₆	1947	49

2.2 Expressão gênica e produção da proteína MaSp1 recombinante

A construção final rPbMaSp1-16x foi clonada no vetor pET19b-Kan^R nos sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* e esse vetor foi introduzido na bactéria *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) para expressão. O vetor pET19b-Kan^R é uma versão modificada do vetor pET19b (Novagen) no qual o marcador seletivo de

resistência é kanamicina (Dr. M. Hinman Utah State University em Logan UT, dado não publicado). Ver Teulé et al. (2007) para mais detalhes.

Uma colônia recombinante foi cultivada em um fermentador BioFlo 415 de 19.5 L (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) usando o meio recomendado pelo fabricante até as células atingirem uma OD₆₀₀ entre 15-20. Após, foi adicionado IPTG em concentração final de 1 mM, resultando na indução da expressão da proteína MaSp1 recombinante que foi maximizada após 2 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas por 15 min à 5.300g à 4°C. O pellet resultante foi ressuspenso numa razão 1:3 (w/v) em tampão de lise 1X (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) contendo 0,25 mg/mL de lisozima e congelado à -80 °C por 24 h para auxiliar no processo de lise celular.

2.3 Purificação da proteína de seda recombinante

Cada 600 mL de suspensão de células em tampão de lise, previamente guardada à -80°C, foi descongelada em temperatura ambiente e sonicada por 2 vezes por 2 min à 95 W no Sonicador 3000 (Misonix, Inc. Farmingdale, NY). A amostra foi centrifugada por 30 min à 30.000g à 20 °C, o sobrenadante foi removido e submetido à temperatura de 80 °C por 20 min para precipitar a maioria das proteínas nativas de *E. coli*. De fato, proteínas recombinantes de seda de aranhas são estáveis quando submetidas a altas temperaturas, enquanto a maioria das proteínas nativas de *E. coli* se tornam insolúveis (Teulé et al., 2007; Teulé et al., 2009). Após o aquecimento, a amostra foi centrifugada novamente por 30 min à 30,000g à 20 °C para precipitar as proteínas nativas desnaturadas. O sobrenadante foi removido e diluído 1:1 (v/v) com tampão binding 1X (5 mM imidazole, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8). A proteína MaSp1 recombinante foi purificada utilizando cromatografia de afinidade por íons metálicos (níquel) imobilizados (IMAC) no AKTA™ 150 Avant (GE Healthcare, Piscataway, NJ) usando uma coluna de 100 mL HisTrap™ HP (GE Healthcare). As concentrações de imidazole no tampão binding 1X foram ajustadas de 100mM a 250mM para lavar (600 mL) as proteínas contaminantes e eluir (300

mL) a proteína MaSp1 recombinante, respectivamente. As frações eluídas foram dialisadas por 2 dias contra água antes de serem liofilizadas.

2.4 Detecção e análise das proteínas por SDS-PAGE e Western blot

Todas as frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE. A eletroforese das proteínas foi feita em géis (duplicata) de SDS-PAGE (4-20%) pré-moldado (Precise Protein Gel, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) com o tampão Tris-Hepes-SDS recomendado pelo fabricante (Pierce). Após a corrida um dos géis foi corado com uma solução de Biosafe Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA), e o outro foi submetido a uma transferência elétrica para uma membrana de PVDF/Immobilon™ P (Millipore), usando o Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad). Todas as transferências foram feitas por 16 h à temperatura ambiente e à uma corrente constante de 25 mA.

Após a fixação das proteínas, as membranas foram submetidas a análises por Western blot usando anticorpo primário anti His-tag® (Novagen) e anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG HRP (Novagen) conjugado à peroxidase. Os blots foram revelados por detecção quimioluminescente usando o reagente ECL™ Western Blotting Detection (Amersham Biosciences) e filmes fotográficos Kodak Standard® (Kodak).

2.5 Produção da fibra sintética e processamento após a extrusão

A proteína liofilizada foi solubilizada em hexafluoroisopropanol (HFIP; TCI America, Portland OR) em uma concentração final de 30% (w/v), de acordo com método descrito em Teulé (Tulé et al., 2009). A extrusão da solução foi feita em um banho de isopropanol 100% a uma velocidade de 0.5 mm/minuto com a seringa Hamilton Gastight® (Hamilton company) de 1mL acoplada a um tubo PEEK de 10cm com diâmetro interno de 0.127 mm. Parte das fibras foram coletadas, secas e cortadas em pedaços de 2 cm. As fibras foram processadas

em um banho de isopropanol 80% por 1 min para hidratar. Após esse tempo as fibras foram esticadas devagar a partir de um dos lados, com o uso pinças. Durante esse processo elas eram mantidas dentro da solução, até atingirem um tamanho de 6 cm, quando eram então retiradas do banho para secarem.

2.6 Teste mecânico

As fibras formadas, não processadas e processadas foram secas, cortadas em pedaços de 3 cm e coladas em uma cartão retangular de 30 mm x 20 mm com um buraco de 15 mm no meio. Foram tiradas três fotos de cada fibra sintética usando um microscópio Nikon Eclipse E200 com lentes objetivas de 20x e 40x. O diâmetro médio das fibras foi calculado usando o programa ImageJ 1.42q (National Institute of Health, USA) antes destas serem submetidas ao teste. Os testes foram feitos em condições ambiente 21-22°C; umidade relativa = 18-20%) no aparelho MTS Synergie 100 (MTS corporation, Eden Prairie, MN) usando uma carga de 10g (Transducer Techniques, Temecula, CA). Os dados foram plotados no software MATLAB (Version 7.1), que foi ajustado para calcular a energia de rompimento ou a força máxima (área abaixo da curva de força/tensão). O módulo de Young, a extensão e o estresse máximo foram determinados a partir das curvas de força/tensão. Foram analisadas 10 fibras processadas e 12 fibras não processadas.

2.7 Microscopia de força atômica (MFA)

As fibras formadas pela proteína recombinante foram depositadas numa superfície de vidro após a extrusão e sua análise no microscópio de força atômica foi feita com a fibra em condição ambiente. As medidas de MFA foram feitas no instrumento SPM-9600 (Shimadzu, Japan). As imagens foram adquiridas no modo dinâmico usando um cantilever de 125 µm de comprimento (constante de mola de ~42 N/m, frequência de ressonância de ~330 kHz) com

ponteira cônica (raio de curvatura < 10 nm). As imagens adquiridas a uma frequência de 0.5 Hz possuem resolução de 512×512 pixels. O processamento consiste em um nivelamento global e as imagens foram mostradas em 2D e 3D com perspectiva de altura.

2.8 Espectroscopia Raman

As fibras foram cortadas em pedaços de 3 cm, coladas em slides de quartzo e analisadas com o microscópio New Dimension Raman (Snowy Range Instruments) equipado com um laser de 1064 nm. Um controle de polistireno foi usado para calibrar o instrumento antes de cada coleta de dados e os picos usados na calibração foram: 620, 795.8, 1001.4, 1450.5 and 1602.3 cm^{-1} . Os dados de Raman foram adquiridos 2 vezes por 10 seg ou 20 seg usando uma longa distância de trabalho (objetiva de 20x). Os dados foram analisados no software GRAMS (Thermo Scientific) e suavizados pelo método Savitzky-Golay (polinomial 3 pontos = 17), corrigidos pela linha de base e depois comparados.

2.9 Dispersão de raios X de grandes ângulos (WAXS)

Os experimentos de difração de raios X foram feitos no setor 14 BM-C/BioCARS da Advanced Photon Source (APS) localizado no Laboratório Nacional de Argonne, IL, USA (Graber et al., 2011). Para a coleta de dados, as fibras foram colocadas perpendicularmente ao foco do feixe de raio x monocromático (150 x 200 micron; energia incidente de 12.67 keV ou 0.978 Angstrom). Os dados de WAXS foram gravados usando um detector 9-chip ccd (ADSC Quantum-315) posicionado 300 mm atrás da amostra. Para cada amostra, cinco fases foram coletadas usando um feixe de amostra com uma distância de parada de 50 mm e um tempo de exposição de 60 segundos. Os ruídos foram subtraídos dos dados WAXS apresentados.

3 Resultados e Discussão

3.1 Expressão e purificação da proteína MaSp1 recombinante

Utilizando protocolos previamente publicados (Teulé et al., 2009), uma sequência sintética da proteína MaSp1 foi engenheirada, clonada e produzida em bactéria. A sequência do clone rPbMaSp1-16x possui 16 módulos repetitivos da proteína MaSp1 da aranha *P. bistriata*.

A sequência resultante de 1947 pb foi clonada no vetor pET19b-Kan^R e este foi introduzido em células *E. coli* BL21 (DE3) para expressão (Figura 1a). A proteína recombinante com his-tag rPbMaSp1-16x foi facilmente purificada, por meio de cromatografia de afinidade por íons metálicos, do extrato proteico total submetido previamente ao tratamento de calor. A proteína rPbMaSp1-16x mostrou ser resistente ao calor como outras proteínas recombinantes de seda descritas anteriormente (Scheller et al., 2001; Teulé et al., 2007). A análise feita por SDS-PAGE mostra a pureza da proteína rPbMaSp1-16x (Figura 1b) e o western blot, usando anticorpo anti-polihistidina, confirmou esse resultado (Figura 1c) mostrando que o tamanho da proteína corresponde ao tamanho estimado de 49 kDa.

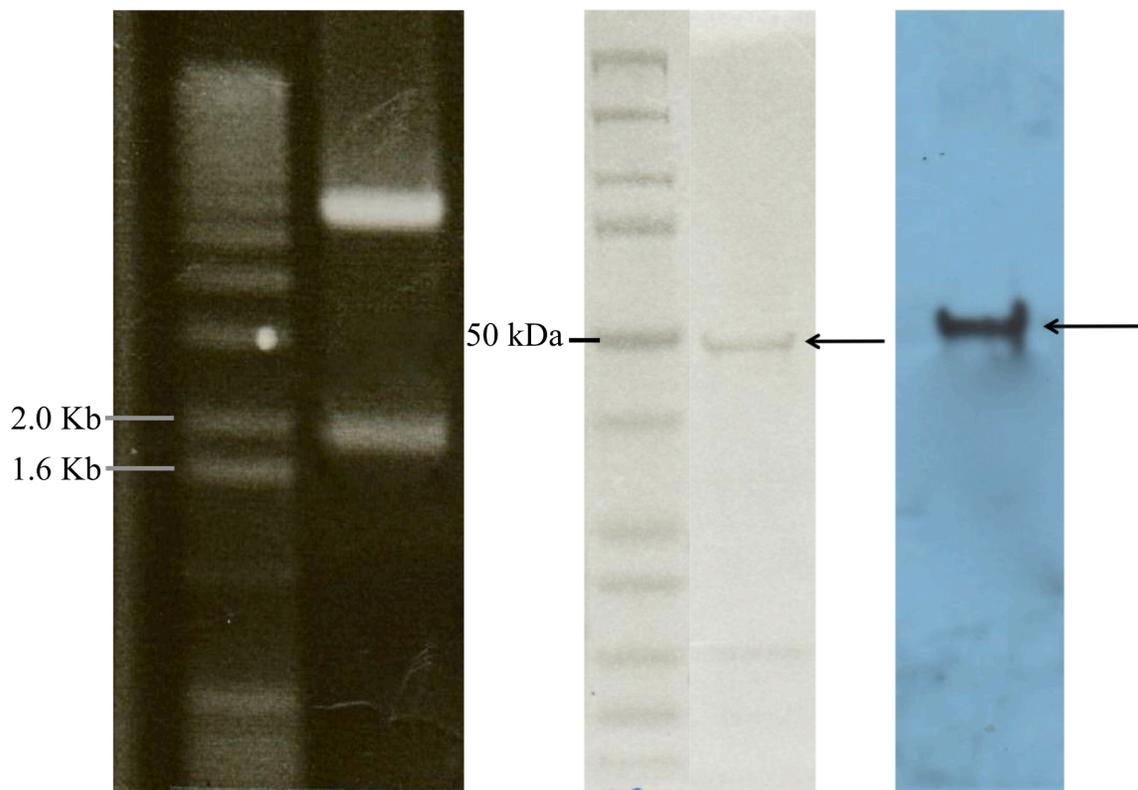


Figura 1. (a) Análise eletroforética em gel de agarose do vetor prPbMaSp1-16x (inserto de 1947 pb). O plasmídeo foi digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. A banda menor corresponde ao inserto da MaSp1 e a banda maior é o vetor pET19k linearizado (5.8 kpb). Marcador 1 Kb DNA Ladder Invitrogen. (b) Análise de SDS-PAGE mostrando a proteína MaSp1 purificada detectada por coloração por Coomassie blue. Padrão de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Bio Rad. (c) Análise de western blot usando anticorpo anti-poliHistidina. As setas apontam a proteína rPbMaSp1-16x.

3.2 Influência do processamento na performance mecânica das fibras

Após a extrusão, as fibras foram esticadas em um banho de isopropanol 80% com o intuito de torná-las maleáveis, já que essas fibras sintéticas se tornam solúveis em água. Essa interação depende principalmente do tamanho da proteína e das condições durante a formação da fibra (An et al., 2011). As fibras analisadas nesse estudo foram tratadas em isopropanol 80% e esticadas em três vezes o seu tamanho original com o intuito de reduzir potenciais variações geradas durante a formação da fibra. Durante o esticamento das fibras no banho pôde-se notar pequenas bolhas de ar saindo da superfície da fibra, o

que indica que pequenos buracos eram formados após a evaporação do solvente HFIP ou isopropanol. Esses buracos poderiam impedir a interação molecular e a orientação das fibras. As propriedades mecânicas das fibras processadas e não processadas foram analisadas, como pode ser observado na Figura 2 e na Tabela 1.

Foram testadas dez fibras não processadas com diâmetro médio de $22,09 \pm 4,3 \mu\text{m}$ e doze fibras processadas com diâmetros de $14,05 \pm 5,7 \mu\text{m}$. O fato do desvio padrão ser maior nas fibras processadas mostra que o esticamento das fibras feito de forma manual não é preciso.

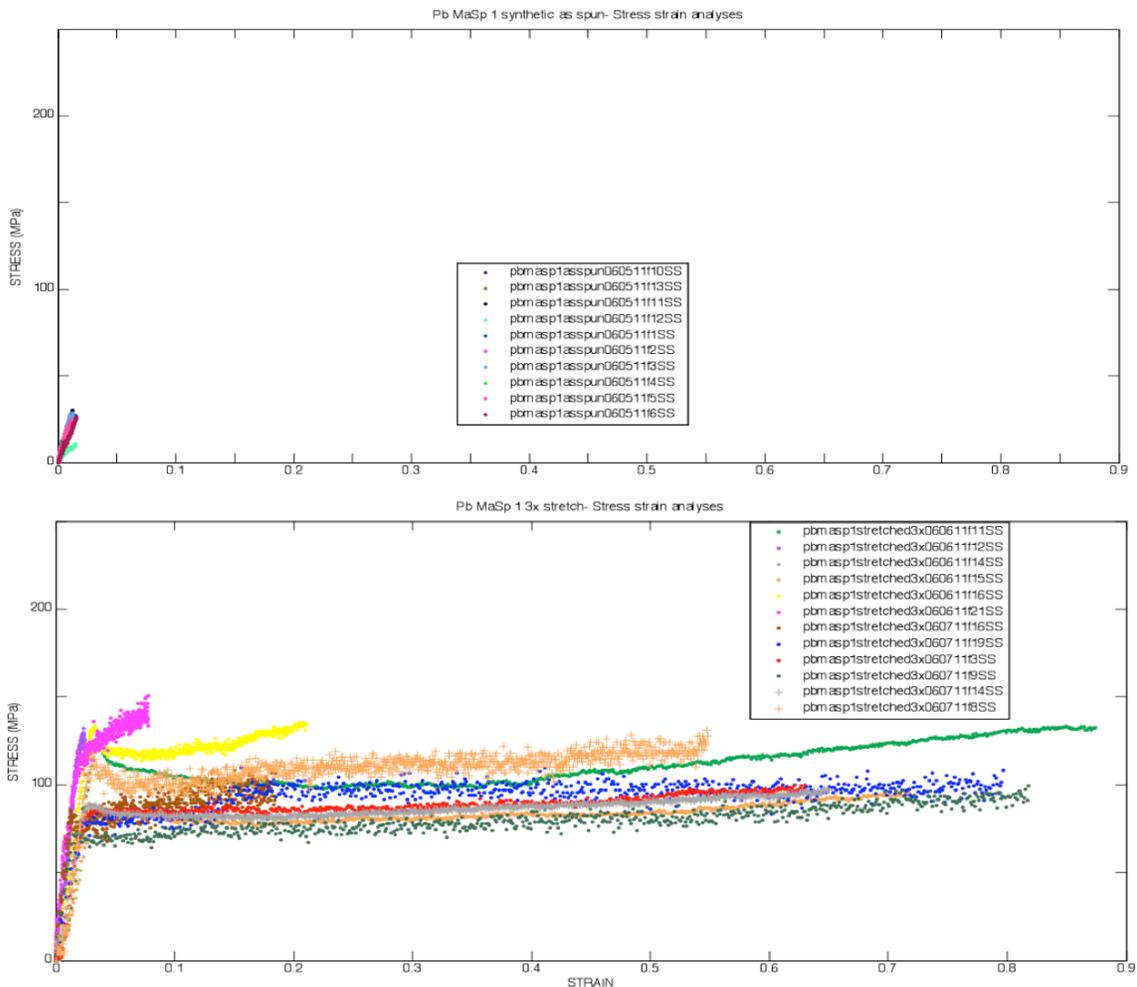


Figura 2. Curva de força-extensão das fibras rPbMaSp1 não processadas (acima) e processadas (abaixo).

Antes de serem processadas, as fibras eram muito frágeis (Tabela 1). O processamento em isopropanol 80% aumentou a energia de rompimento de 0,15 para 47,36 MJ/m³. Esses dados mostram a superioridade mecânica das fibras processadas.

É sabido que o tamanho da proteína interfere nas propriedades mecânicas: fibras formadas por proteínas maiores possuem mais interações intermoleculares o que leva a fibras com melhores características (Xia et al., 2010; An et al., 2011). As proteínas da seda da glândula ampolada principal possuem tamanhos que variam de 250-320 kDa (Sponner et al., 2005; Ayoub e Hayashi, 2007)

Tabela 2. Valores médios das propriedades mecânicas das fibras rPbMaSp1 sintéticas.

Fibra	Força máxima (MPa)	Extensão (%)	Módulo de Young (GPa)	Energia de rompimento (MJ/m ³)
rPbMaSp1-16x não processadas	23,16±6,16	1,24±0,28	2,29±0,53	0,15±0
rPbMaSp1-16x processadas	115,59±19,42	51,5±30,48	5,29±3,34	47,36±28,41

A rPbMaSp1-16x é aproximadamente 6 vezes menor que a proteína nativa, as fibras formadas e processadas possuem propriedades comparáveis, e até mesmo superiores que fibras MaSp1 sintéticas de tamanho semelhante (46 kDa) e até mesmo maior (70 kDa) (An et al., 2011). A fibra rPbMaSp1-16x processada pode ser comparada também à fibra sintética 32mer (100 kDa) produzida por Xia et al. (2010) e possui uma extensão média superior a esta (51,5% vs ~ 4%), porém a força máxima foi inferior (115,5 vs ~ 200 MPa).

As condições de extrusão e processamento são fases importantes na formação das fibras sintéticas, assim como a sequência primária da proteína e seu tamanho, (Lazaris et al., 2002). As aranhas desenvolveram seu impressionante sistema de fiação durante sua evolução (Vollrath e Knight, 2001) e ainda temos muito o que aprender com elas. A concentração de proteína na glândula de seda da aranha é de 40-50% (Peakall, 1965; Vollrath e Knight, 2001), enquanto que, em laboratório, a concentração máxima alcançada de

proteína de seda recombinante dissolvida em HFIP é de ~30%. Proteínas de tamanho molecular grande apresentam mais dificuldade para dissolver em HFIP, não conseguindo passar de uma concentração de 20% (Xia et al., 2010). O tamanho de 49 kDa da rPbMaSp1-16x permitiu que a solução de extrusão tivesse uma concentração de ~30%.

O processamento da fibra em um banho aquoso melhora as propriedades mecânicas da fibra. De fato, o processo de formação das sedas de aranha é todo baseado no controle da concentração de água durante a polimerização. O ideal seria achar outros solventes, de preferência aquosos, já que a presença de água parece ser um fator importante na formação de melhores fibras sintéticas.

3.3 Características topográficas e moleculares das fibras MaSp1 sintéticas

Para formar a fibra sintética, a proteína recombinante rPbMaSp1-16x liofilizada foi dissolvida em um solvente orgânico (HFIP) formando uma solução (dope). A extrusão dessa solução foi feita em um banho coagulante de 100% isopropanol, resultando na produção de fibras MaSp1 sintéticas. A Figura 3 (a e b) mostra os diâmetros e as superfícies das fibras não processadas e processadas. Pode-se observar a aparência uniforme e regular de ambas as fibras.

Análises por MFA foram feitas visando elucidar a organização supra e nanoestrutural das fibras MaSp1 sintéticas (Figura 3c e d). Os dados de MFA mostram a diferença que o processamento causa na superfície topográfica dessas fibras sintéticas. A fibra não processada é caracterizada pela presença de estruturas nanoglobulares encontradas em fibras de sedas sintéticas já descritas (Elices et al., 2011). Já a fibra processada apresenta uma aparência uniforme, lisa e sem imperfeições, o que corrobora com dados de sedas nativas de aranhas e do bicho da seda (Miller et al., 1999; Putthanarat et al., 2000)

Na fibra não processada, as proteínas podem não estar devidamente dobradas e alinhadas, aglomerando-se de forma inapropriada. O tratamento em isopropanol 80% e o esticamento das fibras podem ter homogeneizado e

uniformizado a superfície da fibra por meio da interação da água com suas estruturas amorfas, causando uma diminuição nas irregularidades topográficas. Nossos dados concordam com estudos recém-publicados de que o processamento da fibra após a extrusão aumenta significativamente as propriedades estruturais das mesmas (An et al., 2011; Teulé et al., 2012).

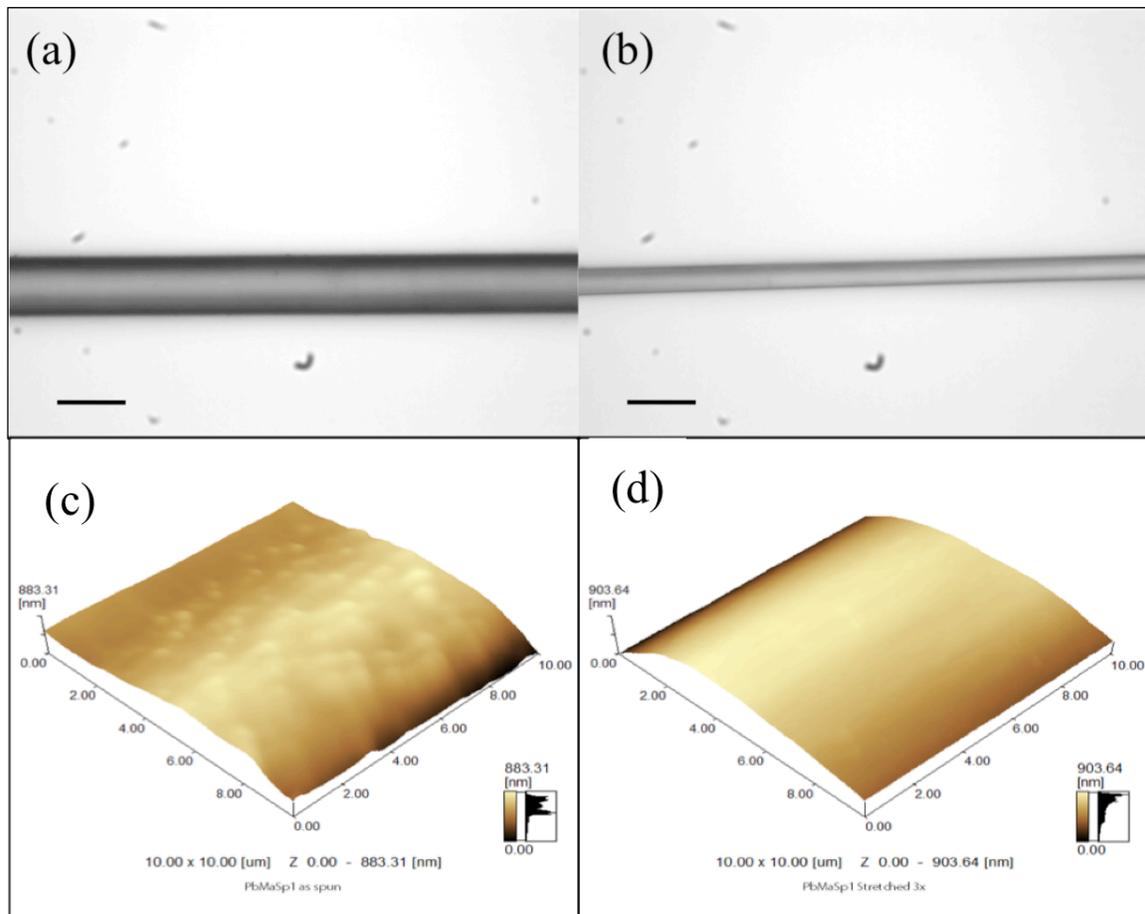


Figura 3. Características morfológicas das fibras MaSp1 sintéticas, processadas e não processadas. (a) e (b) imagem da fibra MaSp1 sintética não processada e processada adquiridas por microscopia de luz (40x; barra de escala = 30 μm). (c) e (d) Imagens 3-D de MFA mostram detalhes topográficos das superfícies da fibra MaSp1 sintética não processada e processada, respectivamente.

3.4 Análises por espectroscopia Raman e dispersão de raios x de grandes ângulos (WAXS)

Foram coletados espectros de Raman das fibras não processadas e processadas formadas a partir da proteína rPbMaSp1. As decomposições espectrais da região amida I das fibras não processadas e processadas estão mostradas na Figura 4. A análise da região amida I é muito informativa para o estudo estrutural de sedas de aranhas (Zong et al., 2004; Rousseau et al., 2009; Lefèvre et al., 2012). É nessa região que são encontrados sinais de estruturas random coil (1641 cm^{-1}), α -hélices/hélices PPII (1656 cm^{-1}), folha- β (1670 cm^{-1}) e β -turns (1685 cm^{-1}) (Lefèvre et al., 2012). A região amida I da fibra não processada possui um pico de 1656 cm^{-1} , mostrando que esta é dominada pela presença de estruturas helicoidais. O pico da amida I da solução de fiação da glândula ampogada maior da aranha *N. clavipes* é de 1658 cm^{-1} e sua estrutura também é dominada por estruturas helicoidais. Após sua extrusão pela aranha, a análise de Raman desta seda apresenta um deslocamento do pico da amida I para a direita (1670 cm^{-1}) (Lefèvre et al., 2011). Da mesma forma, a fibra processada rPbMaSp1-16x apresentou também um deslocamento para a direita (1671 cm^{-1}) quando comparada com a fibra não processada, devido ao domínio das estruturas folhas- β na proteína.

Os dados de WAXS coletados da fibra rPbMaSp1-16x não processada (Figura 5) mostraram dois anéis difusos com centros em 4 e 8.4 Å, que indicam um padrão isotrópico, ou seja, sem orientação. Já as fibras processadas apresentaram uma diferença nos anéis menos difusos, o que indica a presença de elementos estruturais, corroborando com os dados de Raman.

As análise dos dados de Raman e WAXS mostraram ausência de folhas- β nas fibras não processadas e indicaram que as folhas- β presentes nas fibras processadas estão orientadas paralelamente ao eixo desta, explicando a sua superioridade mecânica.

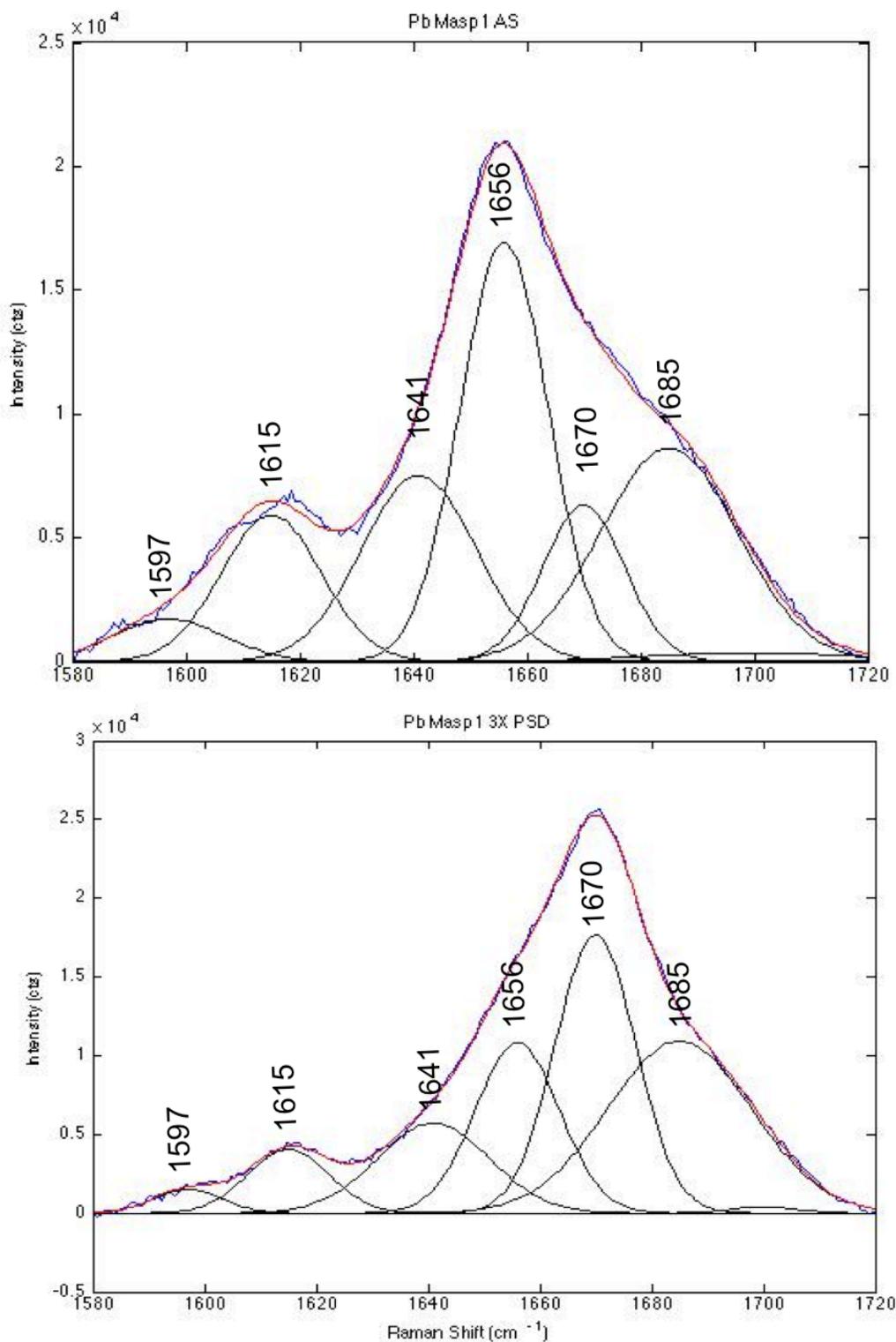


Figura 4. Decomposição espectral da região amida I da fibra sintética rPbMaSp1 não processada (acima) e da fibra processada (abaixo). Estruturas: random coil (1641 cm^{-1}), α -hélices/hélices PPII (1656 cm^{-1}), folha- β (1670 cm^{-1}) e β -turns (1685 cm^{-1}) (Lefèvre et al., 2011).

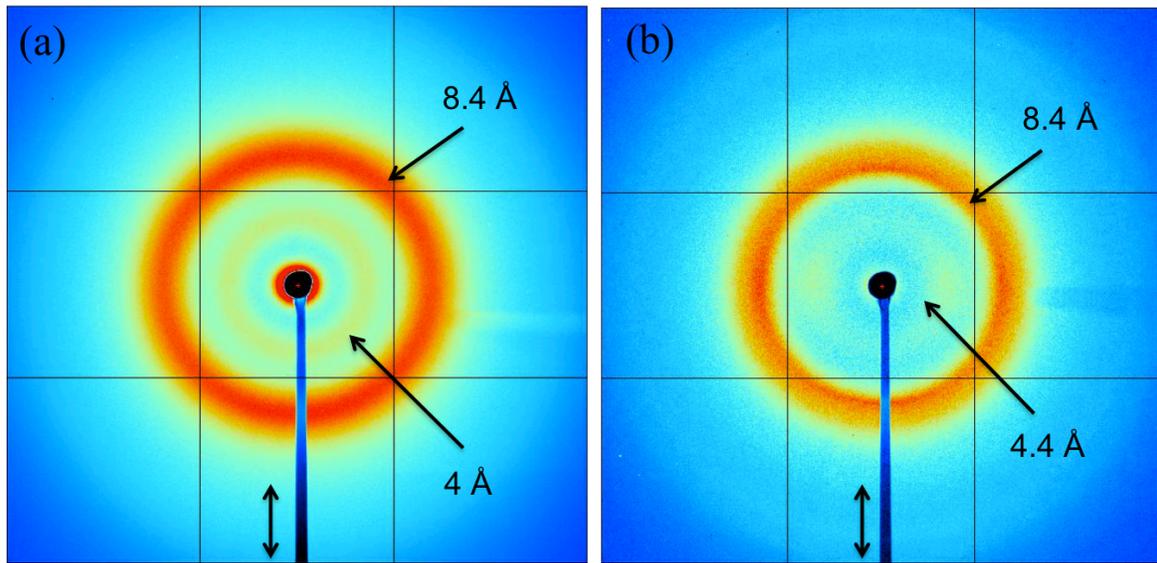


Figura 5. Análise de dispersão de raios x de grandes ângulos das fibras sintéticas rPbMaSp1 (a) não processada e (b) processada.

4 Referências Bibliográficas

AGNARSSON, I.; KUNTNER, M.; BLACKLEDGE, T. A. 2010. Bioprospecting Finds the Toughest Biological Material: Extraordinary Silk from a Giant Riverine Orb Spider. *PLoS ONE*, v.5, n.9, p.e11234.

AN, B.; HINMAN, M. B.; HOLLAND, G. P.; YARGER, J. L.; LEWIS, R. V. 2011. Inducing B-Sheets Formation in Synthetic Spider Silk Fibers by Aqueous Post-Spin Stretching. *Biomacromolecules*, v.12, n.6, 2011/10/13, p.2375-2381.

AYOUB, N. A.; HAYASHI, C. Y. 2007. Multiple Recombining Loci Encode MaSp1, the Primary Constituent of Dragline Silk, in Widow Spiders (*Latrodectus*: Theridiidae). *Mol Biol Evol*, Nov 28.

ELICES, M.; GUINEA, G. V.; PLAZA, G. R.; KARATZAS, C.; RIEKEL, C.; AGULLÓ-RUEDA, F.; DAZA, R.; PÉREZ-RIGUEIRO. 2011. Bioinspired Fibers Follow the Track of Natural Spider Silk. *Macromolecules*, v.44, n.5, p.1166-1176.

GOSLINE, J. M.; DENNY, M. W.; DEMONT, M. E. 1984. Spider silk as rubber. *Nature*, v.309, n.5968, p.551-2.

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*, v.202, n.Pt 23, Dec, p.3295-303.

GRABER, T.; ANDERSON, S.; BREWER, H.; CHEN, Y. S.; CHO, H. S.; DASHDORJ, N.; HENNING, R. W.; KOSHELEVA, I.; MACHA, G.; MERON, M.; PAHL, R.; REN, Z.; RUAN, S.; SCHOTTE, F.; SRAJER, V.; VICCARO, P. J.; WESTFERRO, F.; ANFINRUD, P.; MOFFAT, K. 2011. BioCARS: a synchrotron resource for time-resolved X-ray science. *Journal of Synchrotron Radiation*, v.18, n.4, p.658-670.

HINMAN, M.; LEWIS, R. V. 1992. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. *Journal of Biological Chemistry*, v.267, n.27, p.19320-19324.

HOLLAND, G. P.; CREAGER, M. S.; JENKINS, J. E.; LEWIS, R. V.; YARGER, J. L. 2008. Determining secondary structure in spider dragline silk by carbon-carbon correlation solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, v.130, n.30, Jul 30, p.9871-7.

HOLLAND, G. P.; JENKINS, J. E.; CREAGER, M. S.; LEWIS, R. V.; YARGER, J. L. 2008. Solid-State NMR Investigation of Major and Minor Ampullate Spider Silk in the Native and Hydrated States. *Biomacromolecules*, Jan 3.

JENKINS, J. E.; CREAGER, M. S.; BUTLER, E. B.; LEWIS, R. V.; YARGER, J. L.; HOLLAND, G. P. 2010. Solid-state NMR evidence for elastin-like β -turn structure in spider dragline silk. *Chemical Communications*, v.46, n.36, p.6714-6716.

LAZARIS, A.; ARCIDIACONO, S.; HUANG, Y.; ZHOU, J.-F.; DUGUAY, F. O.; CHRETIEN, N.; WELSH, E. A.; SOARES, J. W.; KARATZAS, C. N. 2002. Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells. *Science*, v.295, n.5554, January 18, 2002, p.472-476.

LEFÈVRE, T.; BOUDREAU, S.; CLOUTIER, C.; PÉZOLET, M. 2011. Diversity of Molecular Transformations Involved in the Formation of Spider Silks. *Journal of Molecular Biology*, v.405, n.1, p.238-253.

LEFÈVRE, T.; PAQUET-MERCIER, F.; RIOUX-DUBÉ, J.-F.; PÉZOLET, M. 2012. Structure of silk by Raman spectromicroscopy: From the spinning glands to the fibers. *Biopolymers*, v.97, n.6, p.322-336.

LEFÈVRE, T.; ROUSSEAU, M. E.; PEZOLET, M. 2007. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy. *Biophys J*, v.92, n.8, Apr 15, p.2885-95.

LIN, J. C.; BARUA, B.; ANDERSEN, N. H. 2004. The Helical Alanine Controversy: An (Ala)₆ Insertion Dramatically Increases Helicity. *Journal of the American Chemical Society*, v.126, n.42, 2012/05/25, p.13679-13684.

MENASSA, R.; ZHU, H.; KARATZAS, C. N.; LAZARIS, A.; RICHMAN, A.; BRANDLE, J. 2004. Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant Biotechnol J*, v.2, n.5, Sep, p.431-8.

MILLER, L. D.; PUTTHANARAT, S.; EBY, R. K.; ADAMS, W. W. 1999. Investigation of the nanofibrillar morphology in silk fibers by small angle X-ray scattering and atomic force microscopy. *Int J Biol Macromol*, v.24, n.2-3, Mar-Apr, p.159-65.

OLIVEIRA, PAULA E. F. Expressão e purificação do MaSp2 isolada da glândula produtora de teia da aranha *Parawixia bistriata*. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília-UCB, Brasília, 70p. 2008.

PALEŇČÁR, P.; BLEHA, T. 2011. Molecular dynamics simulations of the folding of poly(alanine) peptides. *Journal of Molecular Modeling*, v.17, n.9, p.2367-2374.

PARKHE, A. D.; SEELEY, S. K.; GARDNER, K.; THOMPSON, L.; LEWIS, R. V. 1997. Structural studies of spider silk proteins in the fiber. *J Mol Recognit*, v.10, n.1, Jan-Feb, p.1-6.

PEAKALL, D. B. 1965. Differences in regulation in the silk glands of the spider. *Nature*, v.207, n.4992, July 3, 1965, p.102-103.

PUTTHANARAT, S.; STRIBECK, N.; FOSSEY, S. A.; EBY, R. K.; ADAMS, W. W. 2000. Investigation of the nanofibrils of silk fibers. *Polymer*, v.41, n.21, p.7735-7747.

RATHORE, O.; SOGAH, D. Y. 2001. Self-assembly of beta-sheets into nanostructures by poly(alanine) segments incorporated in multiblock copolymers inspired by spider silk. *J Am Chem Soc*, v.123, n.22, Jun 6, p.5231-9.

ROUSSEAU, M.-E.; LEFÈVRE, T.; PÉZOLET, M. 2009. Conformation and Orientation of Proteins in Various Types of Silk Fibers Produced by *Nephila clavipes* Spiders. *Biomacromolecules*, v.10, n.10, p.2945-2953.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual.: Cold Spring Harbor Laboratory, v.2. 1989

SCHEIBEL, T. 2004. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb Cell Fact*, v.3, n.1, Nov 16, p.14.

SCHELLER, J.; GUHRS, K. H.; GROSSE, F.; CONRAD, U. 2001. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol*, v.19, n.6, Jun, p.573-7.

SIMMONS, A.; RAY, E.; JELINSKI, L. W. 1994. Solid-State ¹³C NMR of *Nephila clavipes* Dragline Silk Establishes Structure and Identity of Crystalline Regions. *Macromolecules*, v.27, n.18, p.5235-5237.

SPONNER, A.; SCHLOTT, B.; VOLLRATH, F.; UNGER, E.; GROSSE, F.; WEISSHART, K. 2005. Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk. *Biochemistry*, v.44, n.12, Mar 29, p.4727-36.

TEULÉ, F.; ADDISON, B.; COOPER, A. R.; AYON, J.; HENNING, R. W.; BENMORE, C. J.; HOLLAND, G. P.; YARGER, J. L.; LEWIS, R. V. 2012. Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers*, v.97, n.6, p.418-431.

TEULÉ, F.; COOPER, A. R.; FURIN, W. A.; BITTENCOURT, D.; RECH, E. L.; BROOKS, A.; LEWIS, R. V. 2009. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nat Protoc*, v.4, n.3, p.341-55.

TEULÉ, F.; FURIN, W. A.; COOPER, A. R.; DUNCAN, J. R.; LEWIS, R. V. 2007. Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. *Journal of Material Science*, v.42, p.8974-8985.

VOLLRATH, F.; KNIGHT, D. P. 2001. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, v.410, n.6828, Mar 29, p.541-8.

VOLLRATH, F.; MADSEN, B.; SHAO, Z. 2001. The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. *Proc Biol Sci*, v.268, n.1483, Nov 22, p.2339-46.

WORK, R. W. 1977. Dimensions, birefringences, and force-elongation behavior of major and minor ampullate silk fibers from orb-web-spinning spiders--the effects of wetting on these properties. *Textile Research Journal*, p.650-662.

XIA, X.-X.; QIAN, Z.-G.; KI, C. S.; PARK, Y. H.; KAPLAN, D. L.; LEE, S. Y. 2010. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *PNAS*, v.107, n.32, p.14049-14063.

XU, M.; LEWIS, R. 1990. Structure of a Protein Superfiber: Spider Dragline Silk. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.87, p.7120-7124.

ZONG, X. H.; ZHOU, P.; SHAO, Z. Z.; CHEN, S. M.; CHEN, X.; HU, B. W.; DENG, F.; YAO, W. H. 2004. Effect of pH and copper(II) on the conformation transitions of silk fibroin based on EPR, NMR, and Raman spectroscopy. *Biochemistry*, v.43, n.38, Sep 28, p.11932-41.

Conclusões e perspectivas

As sedas das aranhas apresentam propriedades mecânicas excepcionais e por esse motivo possuem um grande potencial na produção de novos biomateriais. Entender a natureza molecular dessas sedas e conseguir reproduzi-las para o nosso benefício tem sido o grande foco das pesquisas nessa área.

No presente trabalho foi possível produzir e caracterizar duas fibras sintéticas baseadas nas sequências nativas de duas espécies coletadas no Brasil. Essas fibras foram formadas a partir de proteínas recombinantes da Flag de *Nephilengys cruentata* e da MaSp1 de *Parawixia bistriata*.

A fibra Flag sintética produzida apresentou uma dominância de estruturas helicoidais, provavelmente devido à presença da região espaçadora que foi duplicada, o que confirma uma das hipóteses deste trabalho. Porém, é necessário analisar outras proteínas sintéticas com diferentes organizações dos módulos estruturais, principalmente da região espaçadora, para confirmar o que foi predito e melhorar o entendimento do mecanismo molecular da Flag.

As análises das fibras sintéticas rPbMaSp1-16x mostraram que o processamento é crucial para a formação de fibras com características comparáveis às sedas nativas, e permitiu examinar a relação entre as estruturas moleculares e as propriedades mecânicas dessas fibras.

As técnicas utilizadas para caracterizar as fibras sintéticas, visando uma organização estrutural precisa dessas fibras, mostraram que além do estudo da sequência de aminoácidos deve-se também considerar os elementos adicionais, como o tipo de solvente utilizado, concentração da solução de extrusão, processamento da fibra, entre outros.

Para elaborar uma melhor estratégia para a produção das fibras sintéticas é crucial o entendimento dos mecanismos bioquímicos responsáveis pela formação das sedas nas glândulas das aranhas e, mais importante, levar

isso em consideração na preparação das soluções para a extrusão dessas fibras.

Espera-se com esse trabalho contribuir para o estudo das características moleculares e estruturais das fibras sintéticas além de abrir possibilidades para produção de materiais de alta qualidade com diversas finalidades e aplicações.

Publicação