

Modelagem e produção de espidroína sintética de seda de aranha para aplicações biomédicas

Gleiciane Pinheiro de Sousa¹, Valquíria Alice Michalczechen Lacerda², Grácia Maria Soares Rosinha³, Elíbio Leopoldo Rech Filho⁴, Betúlia de Moraes Souto⁵, Betania Ferraz Quirino⁶, João Ricardo Moreira de Almeida⁷, Daniela Matias de Carvalho Bittencourt⁸

Resumo

Sedas de aranhas são biopolímeros com extraordinárias características físico-químicas. Elas podem ser processadas e utilizadas em diversos biomateriais inovadores como partículas, além da forma natural de fibras. Entretanto, por causa da limitação da obtenção desse material in natura, é necessário o desenvolvimento de sistemas de produção heteróloga de proteínas de seda de aranha (espidroínas). Neste trabalho, buscou-se, por meio da biologia sintética, a produção de uma espidroína em *Escherichia coli* BL21(DE3). A espidroína sintética foi baseada na sequência da proteína MaSp2 da aranha do Cerrado brasileiro *Parawixia bistriata*, aqui denominada Engenheirada 1 (Eng1). Para isso, a espidroína Eng1 foi sintetizada no plasmídeo pET24a, contendo um peptídeo-sinal de secreção de uma β -xilosidase e mais oito repetições da região de interesse da MaSp2, além de regiões bioativas para endereçamento celular. As bactérias foram transformadas, e as proteínas foram produzidas por autoindução em frasco Erlenmeyer de 2 L. Logo após, as células foram precipitadas por centrifugação, e o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração para posterior purificação das espidroínas por cromatografia de afinidade. A produção da Eng1, com 33,54 kDa, foi confirmada por SDS-PAGE corado com nitrato de prata e *Western blot*. A partir deste trabalho, foi possível desenvolver um sistema heterólogo para a produção de espidroínas sintéticas de sedas de aranhas. A vantagem deste sistema está na capacidade do peptídeo-sinal de secretar a espidroína sintética para o meio de cultura.

Termos para indexação: *Parawixia bistriata*, *Escherichia coli*, MaSp2, espidroína sintética.

Introdução

As proteínas de seda de aranha (espidroínas) inspiram pesquisadores, por suas propriedades mecânicas, pois são elásticas e resistentes ao mesmo tempo, além de manterem essas propriedades em temperaturas extremas (-70 °C a 200 °C). Isto as torna um material de alto valor visando a aplicações biomédicas, por exemplo, na Odontologia, Dermatologia e Medicina Regenerativa (Johari et al., 2022). As aranhas que formam redes orbiformes podem ter até sete tipos diferentes de glândulas produtoras de seda: a ampolada maior, a ampolada menor, a flageliforme, a tubuliforme, a aciniforme, a agregada e a piriforme. A seda *dragline* (linha de segurança) é produzida na glândula ampolada maior, e é composta pelas espidroínas MaSp 1 e MaSp 2 (Bhattacharyya et al., 2021). As fibras formadas por essas duas espidroínas apresentam extraordinárias características mecânicas, sendo cinco vezes mais resistentes do que o aço e três vezes mais resistentes do que a fibra sintética de alta qualidade Kevlar (Connor et al., 2023).

¹ Engenheira de bioprocessos e biotecnologia, mestra em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, sousanebio@gmail.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, valquiria.michalczechen@gmail.com

³ Engenheira-agrônoma, doutora em Bioquímica e Imunologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, gracia.rosinha@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Life Sciences, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, elibio.rech@embrapa.br

⁵ Bióloga, mestra em Biologia Molecular, Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em Biologia Molecular e Celular, Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

⁸ Médica-veterinária, doutora em Biologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, daniela.bittencourt@embrapa.br

As espidroínas são constituídas por três regiões: a região N-terminal e a região C-terminal, que não se repetem e são altamente conservadas, e a terceira, que é formada por uma região central contendo módulos repetitivos e ricos em aminoácidos alanina (A), glicina (G) e prolina (P) (Finnigan et al., 2020). As unidades repetitivas presentes nas espidroínas podem ser agrupadas em quatro categorias: 1) GPGXX/GPGQQ; 2) (GA)_n/An; 3) GGX; e 4) regiões espaçadoras (*spacers*). Tais motivos estruturais são considerados responsáveis por proporcionar elasticidade, resistência mecânica, leveza, extensibilidade e flexibilidade às fibras de seda de aranhas (Bittencourt et al., 2007).

No entanto, o acesso às fontes naturais da seda de aranha e os métodos de processamentos são limitados. Graças aos avanços tecnológicos da biologia sintética, hoje é possível sintetizar novas sequências genéticas que codificam proteínas de seda de aranha sintéticas. Esse processo de design in silico de novas espidroínas, utilizando módulos diferentes das proteínas de sedas de aranhas, e a inclusão de regiões bioativas específicas podem resultar em proteínas que adotem novas funções para a produção de biomateriais voltados para aplicações biomédicas (Connor et al., 2023; Finnigan et al., 2020). No entanto, mesmo com os avanços tecnológicos, ainda se faz necessário o desenvolvimento de sistemas de produção heterólogos eficientes e que permitam o escalonamento da produção de espidroínas sintéticas para diferentes aplicações.

Desse modo, este trabalho teve por objetivo modelar uma espidroína sintética para o desenvolvimento de nanopartículas carreadoras de ácidos nucleicos, denominada Engenheirada 1 (Eng1), baseada na seda da aranha *Parawixia bistrriata*, natural do Cerrado brasileiro, e otimizar sua produção em *Escherichia coli*, por meio da inserção de um peptídeo-sinal para secretar a espidroína sintética produzida para o meio de cultivo e facilitar o seu processo de purificação.

Material e métodos

Clonagem da espidroína, expressão e purificação da proteína

O plasmídeo contendo a espidroína Eng1 foi sintetizado pela empresa *Epoch Life Science* (Texas, Estados Unidos), no plasmídeo pET24a para a expressão em bactéria *E. coli* BL21(DE3). A espidroína foi modulada contendo cinco partes de interesse: 1) o peptídeo-sinal de secreção da β -xilosidase Bgl11 inserido antes da cauda de histidina na porção N-terminal do próprio plasmídeo (Souto et al., 2021); 2) um peptídeo internalizador celular; 3) a espidroína MaSp2 contendo oito módulos *in tandem*; 4) uma região de polilisina (15) para ligação de ácido nucleico; e 5) peptídeo de localização nuclear (Figura 1).

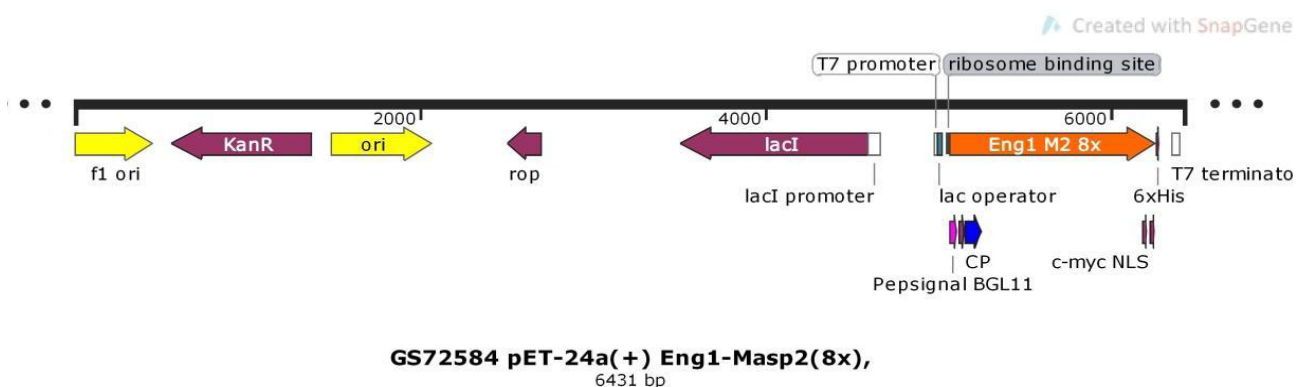


Figura 1. Mapa do plasmídeo pET24a contendo o material genético da proteína Eng1.

O plasmídeo foi inserido em bactéria *E. coli* BL21(DE3) por transformação de choque térmico. A bactéria foi cultivada em meio MDAG-135, uma alíquota foi retirada para realização de

minipreparação de plasmídeo, e a confirmação dele foi feita por enzimas de restrições. Em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para 500 mL de meio ZY(2X)M-5052 pH 8,0 (Studier, 2005) em Erlenmeyer de 2 L, contendo antibiótico canamicina 100 µg/mL. O cultivo ocorreu a 37 °C com agitação a 300 rpm por ~4 horas, momento em que a OD600 chegou a 0,8. Nesse momento, a temperatura foi diminuída para 18 °C, e as bactérias foram cultivadas por mais 48 horas, na mesma rotação.

Após o cultivo, as células foram precipitadas por centrifugação a 8.000 ×g por 30 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado e concentrado pelo sistema de ultrafiltração por agitação/pressão. Uma alíquota desse volume concentrado foi aquecida a 95 °C por 30 min, centrifugada a 14.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi avaliado por SDS-PAGE para verificar a produção da espidroína.

A partir do restante do volume concentrado (~50 mL), a espidroína sintética Eng1 foi então purificada por cromatografia de afinidade (AKTA-GE), utilizando-se uma coluna de sefarose carregada com níquel (5 mL Histrap FF -GE). Para isso, adicionou-se o mesmo volume de solução tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH 10,0, 50 mM NaCl, 20 mM imidazol) na amostra, antes de iniciar o processo de purificação. Após a passagem de toda a amostra na coluna, ela foi lavada com 100 mL da mesma solução tampão de ligação, e, ao final, a proteína foi eluída em 10 mL de solução tampão 20 mM Tris-HCl pH 10,0, 50 mM NaCl, 500 mM imidazol. Para verificação da eficiência do processo de purificação, as frações do volume passado, lavado e eluído foram avaliadas por SDS-PAGE corado com nitrato de prata 20% ao final (Nesterenko et al., 1994). Após purificação, a proteína foi quantificada por Nanodrop (Thermo Fischer) na absorvância de 280 nm, para verificação do rendimento de produção e foi avaliada qualitativamente por *Western blot*, utilizando um anticorpo comercial contra cauda de histidina, conjugado com fosfatase alcalina (A5588-Sigma).

Resultados e discussão

Decorrido o cultivo da bactéria, a OD600 estava em 7,8 e o pH diminuiu de 8 para 7,05. Após a centrifugação, a massa celular úmida precipitada foi medida, rendendo 10,13 g. Apesar de Studier (2005) afirmar que essa metodologia permite um crescimento de células em alta densidade (OD600 ≥ 10), com estabilidade do plasmídeo, não foi o que ocorreu neste caso. Observando o valor encontrado do pH, a sua queda não foi o fator limitante do crescimento da bactéria. Normalmente isso acontece quando o pH fica muito ácido (~5,5). Uma possível explicação da OD600 não ter alcançado os valores de referência pode estar relacionado à composição da espidroína, que demanda uma alta quantidade de aminoácidos glicina (29,6%), alanina (24,8%), glutamina (10,9%) e prolina (9,6%), o que pode ter limitado o metabolismo basal da *E. coli*. Outra possibilidade está relacionada ao fato de a proteína não estar na porção intracelular, ou seja, à medida que a bactéria produziu a proteína, ela foi secretada, e a energia utilizada neste processo pode ter interferido na multiplicação bacteriana.

A proteína de seda Eng1 tem 33,54 kDa com ponto isoelétrico em 10.26, e foi identificada na porção do extrato proteico do meio de cultura (500 mL para 50 mL). Desse meio, uma amostra de 1 mL foi fervida, centrifugada e submetida a SDS-PAGE corado com prata (Figura 2B) e *Western blot* contra cauda de histidina (Figura 2A), o que permitiu sua identificação (Figura 2). Em razão de sua natureza hidrofóbica, é natural que ela migre pelo gel de poli(acrilamida), diferentemente do padrão esperado.

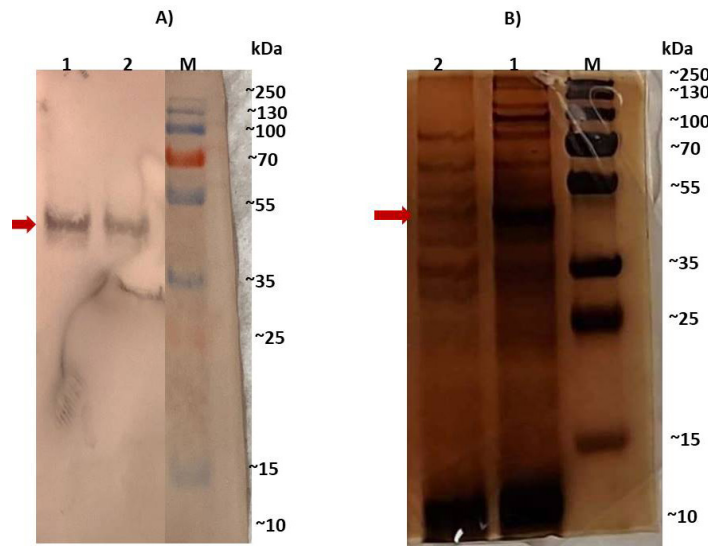


Figura 2. Extrato proteico de seda Eng1 (seta vermelha) separada em SDS-PAGE e analisada por (A) Western blot e (B) nitrato de prata. 1–Amostra não fervida. 2–Amostra fervida. M– Marcador de peso molecular.

Esse resultado confirmou a produção da espidroína sintética Eng1 em *E. coli* e a sua secreção para o meio de cultivo, além de confirmar sua termoestabilidade similar à apresentada pelas espidroínas naturais. Isso facilita não só o processo de purificação da espidroína sintética, uma vez que a elevada temperatura normalmente tem a capacidade de desnaturar proteínas, mas também a posterior aplicação da Eng1 no desenvolvimento de diferentes biomateriais.

A Eng1 foi purificada a partir do meio de cultivo concentrado por cromatografia de afinidade, e as frações referentes ao volume passado E1A1 a E1A3 (Figura 3A), ao lavado E1B1 a E1B3 (Figura 3A) e às eluições A1 a B5 (Figura 3) foram analisadas qualitativamente por SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Figura 3). Como a Eng1 possui uma cauda com dez histidinas, isso permitiu uma aderência eficiente da molécula na coluna, beneficiando o processo da purificação. Com esse processo foi possível adquirir um rendimento de produção de 11,46 mg de proteína.

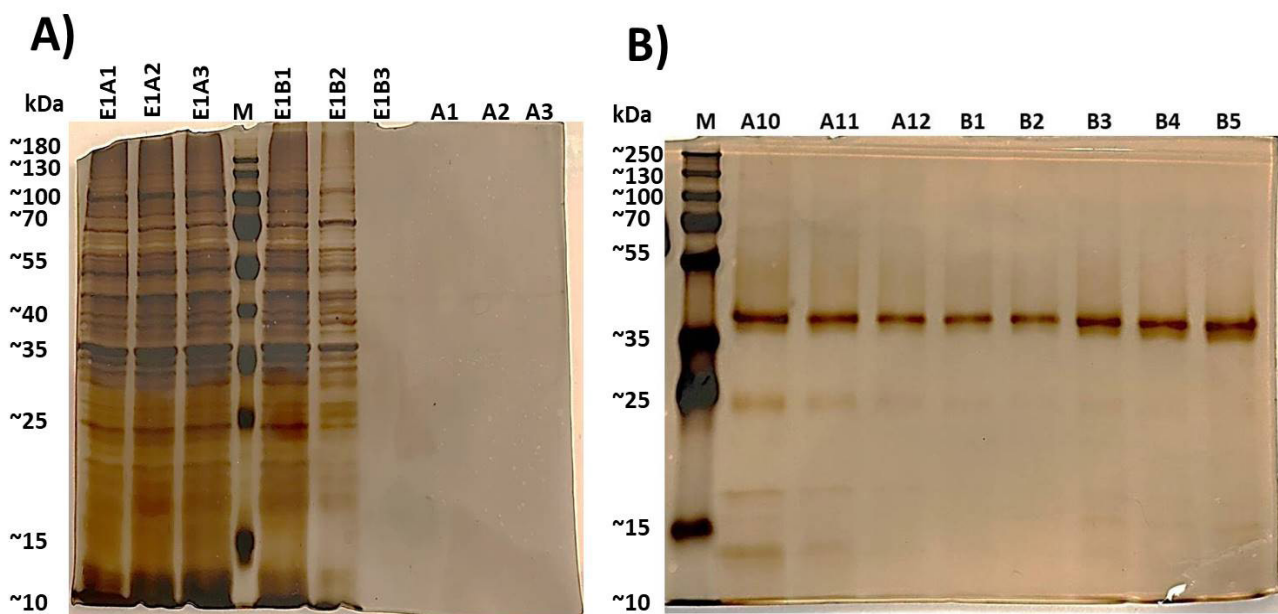


Figura 3. A proteína de seda Eng1 purificada foi separada em gel SDS-PAGE e analisada por nitrato de prata. Amostras E1A1 a E1A3 volume passado; E1B1 a E1B3 lavado; A1 a B5 frações de purificação; M–Marcador de peso molecular.

Interessantemente, durante a quantificação da Eng1 em Nanodrop, foi possível verificar a contaminação da proteína purificada com ácidos nucleicos. Embora a presença de ácidos nucleicos no extrato proteico puro seja indesejada, esse resultado traz indícios de que inserção da região rica em lisina na Eng1 contribuirá para a produção de nanopartículas carreadoras de ácidos nucleicos.

Conclusão

A partir do conhecimento da composição e da estrutura das espidroínas produzidas por aranhas, foi possível desenvolver espidroínas híbridas sintéticas para aplicação de interesse biomédico nas condições do estudo. A proteína Eng1 derivada da aranha do cerrado *P. bistriata* foi produzida por bactéria *E. coli* e secretada no meio de cultivo de autoindução. Foi utilizado um peptídeo-sinal proveniente da enzima Bgl11, uma β -xilosidase produzida por uma bactéria não cultivada, previamente identificada em uma biblioteca metagenômica de rúmen de caprinos. Esse processo permitiu a purificação da espidroína diretamente do meio de cultivo, evitando uma etapa de lise celular. Além disso, a espidroína mostrou-se termoestável e com capacidade de ligação a ácidos nucleicos. Os resultados alcançados neste trabalho serão utilizados para o escalonamento da produção da espidroína Eng1 em biorreatores, objetivando a produção de nanopartículas capazes de carrear e entregar ácidos nucléicos em células de mamíferos.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), processo #00193-00001028/2021-41.

Referências bibliográficas

- BHATTACHARYYA, G.; OLIVEIRA, P.; KRISHNAJI, S. T.; CHEN, D.; HINMAN, M.; BELL, B.; HARRIS, T. I.; GHAZITABATABAEI, A.; LEWIS, R. V.; JONES, J. A. Large scale production of synthetic spider silk proteins in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 183, 2021. Article 105839.
- BITTENCOURT, D.; SOUTO, B. M.; VERZA, N. C.; VINECKY, F.; DITTMAR, K.; SILVA, P. I.; ANDRADE, A. C.; SILVA, F. R. da; LEWIS, R. V.; RECH, E. L. Spidroins from the Brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 147, n. 4, p. 597-606, 2007.
- CONNOR, A.; WIGHAM, C.; BAI, Y.; RAI, M.; NASSIF, S.; KOFFAS, M.; ZHA, R. H. Novel insights into construct toxicity, strain optimization, and primary sequence design for producing recombinant silk fibroin and elastin-like peptide in *E. coli*. **Metabolic Engineering Communications**, v. 16, 2023. Article e00219.
- FINNIGAN, W.; ROBERTS, A. D.; LIGORIO, C.; SCRUTTON, N. S.; BREITLING, R.; BLAKER, J. J.; TAKANO, E. The effect of terminal globular domains on the response of recombinant mini-spidroins to fiber spinning triggers. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Article 10671.
- JOHARI, N.; KHODAEI, A.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; REIS, R. L.; KUNDU, S. C.; MORONI, L. Ancient fibrous biomaterials from silkworm protein fibroin and spider silk blends: biomechanical patterns. **Acta Biomaterialia**, v. 153, p. 38-67, 2022.
- NESTERENKO, M. V.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minutes detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 28, n. 3, p. 239-242, 1994.
- SOUTO, B. D. M.; DE ARAUJO, A. C. B.; HAMANN, P. R. V.; BASTOS, A. de R.; CUNHA, I. de S.; PEIXOTO, J.; KRUGER, R. H.; NORONHA, E. F.; QUIRINO, B. F. Functional screening of a Caatinga goat (*Capra hircus*) rumen metagenomic library reveals a novel GH3 β -xylosidase. **Plos one**, v. 16, n. 1, 2021. e0245118.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-234, 2005.