

Comparativo metodológico na produção de espidroínas sintéticas de aranhas da biodiversidade brasileira em bactérias

Valquíria Alice Michalczechen Lacerda¹, Gleiciane Pinheiro de Sousa², Grácia Maria Soraes Rosinha³, Elíbio Leopoldo Rech Filho⁴, João Ricardo Moreira de Almeida⁵, Daniela Matias de Carvalho Bittencourt⁶

Resumo

As proteínas de seda de aranha (espidroínas) são consideradas um material ideal para a produção de biomateriais inovadores com diferentes aplicações biotecnológicas. Dessa forma, diferentes grupos de pesquisa e a indústria têm investido na otimização de sistemas heterólogos de produção, com o objetivo de aumentar a eficiência da produção de espidroínas sintéticas. Assim, procurou-se avaliar dois métodos para a indução da expressão de cinco espidroínas sintéticas distintas em bactéria *Escherichia coli*, a expressão por autoindução e pela adição de IPTG no meio de cultivo. Para tal, ela foi cotransformada com um plasmídeo que adapta o metabolismo da bactéria para a produção de espidroínas, e um plasmídeo para expressão das espidroínas. Essas proteínas foram moduladas de acordo com as espidroínas de aranhas da biodiversidade brasileira, *Parawixia bistriata* e *Nephilengys cruentata*. Após o crescimento do pré-inóculo bacteriano, uma alíquota foi induzida com IPTG e por autoindução (n=3). Ao final, a OD600 e o pH foram adquiridos e as amostras foram precipitadas. As proteínas extraídas foram analisadas qualitativamente por SDS-PAGE, e identificadas por *Western blot*. Nos dois métodos, o pH não foi um fator limitante para o crescimento bacteriano. A indução com IPTG produziu três espidroínas avaliadas, enquanto o processo da autoindução produziu todas as cinco proteínas. Nesse caso, o protocolo da autoindução teve uma eficiência maior quando comparado à indução com IPTG para a produção em *E. coli* de diferentes espidroínas sintéticas de aranhas da biodiversidade brasileira.

Termos para indexação: *Parawixia bistriata*, *Nephilengys cruentata*, MaSp, Flag, autoindução, IPTG.

Introdução

As sedas de aranha apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade e possuem excelentes propriedades mecânicas, como elasticidade e resistência, ao mesmo tempo. Estes biopolímeros são constituídos por proteínas (espidroínas) compostas por três regiões específicas: regiões N (1) e C (2) terminal conservadas, e uma região modular altamente repetitiva (3). Esta é composta por grande quantidade de aminoácidos alanina (A), glicina (G) e prolina (P). Dentre as sedas que a aranha produz, as da glândula ampolada maior são as mais resistentes, sendo formada por espidroínas do tipo MaSp1 e MaSp2. A região modular da MaSp1 é composta por regiões de polialanina (A/GA) e poliglicina GGX (X=aminoácido Y, L ou Q). As sequências de poli-A e poli-GA proporcionam estruturas secundárias do tipo folhas-beta na proteína, enquanto os domínios GGX formam uma hélice 3_{10} . Já a região modular da MaSp2 é formada por regiões de poli-A, poli-GA e domínios GPGGX. Em relação

¹ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, pós-doutora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, valquiria.michalczechen@gmail.com

² Engenheira de bioprocessos e biotecnologia, mestra em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, sousanebio@gmail.com

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

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

⁵ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

⁶ Médica-veterinária, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, daniela.bittencourt@embrapa.br

às espidroínas Flag, da glândula Flageliforme, elas produzem uma seda altamente elástica, pela estruturação das regiões espaçadoras, GPGXX e GGX (Tokareva et al., 2014).

No entanto, na natureza, a aranha produz quantidade insuficiente desse recurso natural para o desenvolvimento de biomateriais. Assim, nas últimas décadas, diferentes grupos de pesquisa desenvolveram várias maneiras de produzir espidroínas sintéticas usando bactérias, plantas, bichos-da-seda, leveduras e até cabras geneticamente modificadas (Bittencourt et al., 2022). Apesar de alguns desses sistemas heterólogos de produção não serem escalonáveis, métodos como a fermentação com bactérias e leveduras estão sendo usados por empresas como a Spiber, a AMSilk e a Bolt Thread.

Por causa do potencial de aplicação inovador que os biopolímeros sintéticos de sedas de aranhas apresentam, é eminente a necessidade de aprimorar a sua produção por métodos fermentativos. Por consequência, a maioria dos grupos de pesquisa utiliza isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um indutor artificial que mimetiza a ação da lactose, que desencadeia a transcrição do *operon lac* e, portanto, é usado para induzir a expressão de proteínas onde o gene está sob o controle desse operador. No entanto, Studier (2014) descreveu um protocolo de autoindução, com potencial para produção de diversas proteínas em alta densidade. Uma das vantagens desse método é não depender de IPTG para a produção das proteínas heterólogas, que é um componente não biodegradável e oneroso (Edlund et al., 2016). Portanto, este trabalho teve por objetivo comparar os métodos de expressão por autoindução com o do IPTG em bactéria *E. coli*, na produção de diferentes espidroínas sintéticas, baseadas nas diferentes proteínas de seda de aranhas da biodiversidade brasileira, *Parawixia bistriata* e *Nephilengys cruentata*.

Materiais e métodos

O metabolismo de bactéria *E. coli* foi modificado por meio da construção de um plasmídeo pTetgly2glyA (XIA et al., 2010). Ele contém duas cópias do gene *glyVXY* e uma cópia do gene *glyA* (GenBank AC_000091.1) da bactéria W3110, que foram introduzidos no plasmídeo pACYC184. Esses genes são responsáveis pelo aumento da disponibilidade de glicil-tRNA e aminoácido glicina, respectivamente.

Os módulos referentes às espidroínas foram identificados a partir da construção de uma biblioteca de cDNA em um estudo anterior (PI 0701826-6; US 10,889,624). Os genes das espidroínas sintéticas foram construídos por engenharia modular utilizando as espidroínas MaSp1 e MaSp2 da aranha do cerrado *P. bistriata* até atingirem 8 módulos a 16 módulos para a MaSp2, e 4 módulos a 8 módulos para a MaSp1+2 (Michalczechen-Lacerda, 2015). Posteriormente, esses genes foram inseridos no plasmídeo de expressão pET28a. O gene referente à espidroína sintética Flag2222, da aranha *N. Cruentata*, da Mata Atlântica, foi sintetizado no mesmo plasmídeo pela empresa *Epoch Life Science*. Nesse processo, a sequência do DNA foi adaptada ao códon de bactéria, contendo uma cauda de dez aminoácidos histidina na porção N-terminal.

Após a transformação dos plasmídeos em *E. coli* BL21(DE03) e pré-inóculo em 3 mL de meio de cultivo, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para 10 mL de cada meio de indução (n=3), e foi cultivada em tubos de 50 mL a 37 °C a 250 rpm. No caso do método com IPTG, assim que a OD600 chegou a 1,0, adicionou-se 1 mM do indutor, permanecendo por 4 horas (Teulé et al., 2009). Já no caso da autoindução, as células cresceram em meio ZYM-5052 por 4 horas a 37 °C, 250 rpm. Assim que a OD600 chegou a 0,6–0,8, a temperatura foi alterada para 18 °C, permanecendo por 48 horas, sob a mesma agitação (Studier, 2014). Ao final, a OD600 e o pH foram medidos, e todas as amostras foram precipitadas com centrifugação, sendo congeladas para processamento posterior.

Após o descongelamento da biomassa, ela foi diluída em 500 μ L de solução tampão de lise (Tris- HCl 50 mM pH 10,0, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM) contendo lisozima 200 μ g/mL por 30 min. Após aquecimento a 95 $^{\circ}$ C por 60 min, os tubos foram centrifugados a 13.148 $\times g$ por 15 min. O sobrenadante contendo o extrato proteico total foi transferido para outro tubo e a proteína total foi quantificada por absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. A detecção das espidroínas produzidas ocorreu por *Western blot*, utilizando-se um anticorpo comercial contra cauda de histidina conjugado com fosfatase alcalina (A5588, Sigma Aldrich).

Resultados e discussão

As espidroínas sintéticas avaliadas neste experimento são compostas predominantemente pelos aminoácidos glicina, alanina e prolina, os quais representam mais do que 70% da sua estrutura. Portanto, os genes referentes à engenharia metabólica da bactéria são responsáveis por aumentar a disponibilidade dos RNA transportador de glicina do tipo VXY (*glyVXY*), e da enzima serinametiltransferase (*glyA*), que metaboliza a serina em glicina. Isso se fez necessário, uma vez que as espidroínas de aranhas são constituídas de módulos repetitivos, ricos em glicina, apresentando uma composição diferenciada quando comparada às outras proteínas na natureza

A referência de crescimento foi estabelecida pelos valores de OD600 (Figura 1, A e B). No método com IPTG, as células ficaram sob indução por 4 horas, e apresentaram um crescimento menor (Figura 1A) quando comparado ao método da autoindução, que permaneceu em cultivo por 48 horas (Figura 1B). A bactéria que produziu a MaSp1+2 4 \times teve o menor crescimento, média da OD600 igual a 0,93, enquanto a que continha o dobro desse mesmo módulo (MaSp1+2 8 \times) obteve o maior crescimento, média de OD600 igual a 3,73 (Figura 1A). Quando se observam os resultados pela autoindução, o controle negativo foi que apresentou o menor crescimento, média de 3,8, enquanto a bactéria responsável por produzir a MaSp2 8 \times obteve a maior média de OD600, com 6,67. Em relação aos valores de pH, por estarem próximos ao pH neutro, ou levemente ácidos ($\geq 6,0$), pode-se dizer que eles são compatíveis com o crescimento das células (colunas laranjas na Figura 1). Normalmente, sistemas de expressão cultivados que resultam em pH ácidos ($\leq 5,5$) impedem o crescimento das bactérias (Studier, 2005).

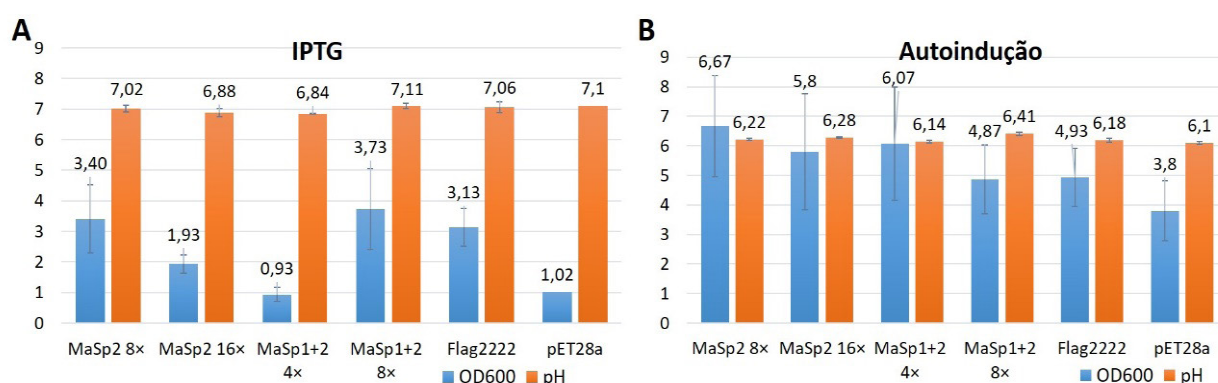


Figura 1. Gráficos representativos dos valores referentes à OD600 (colunas azuis) e ao pH (colunas laranjas) após o cultivo de bactérias para a produção de espidroínas. A) Indução por IPTG. B) Protocolo de autoindução.

Como cada bactéria apresentou um perfil de crescimento específico, os valores referentes à quantificação de proteína do extrato proteico bruto foram normalizados pelos valores de OD600 igual a 1 (menor taxa de crescimento observada) (Figura 2). Estabelecido isso, é possível verificar que os valores médios da quantificação de extrato proteico total para o cultivo com IPTG mantiveram

um perfil bem específico para cada espidroína (Figura 2A). Já no processo da autoindução, os valores de rendimento proteico total estão próximos, com exceção da amostra MaSp1+2 8x, que obteve um rendimento maior (Figura 2B). Esses resultados mostram que o rendimento proteico total não teve relação direta com a composição ou o tamanho da espidroína sintética produzida.

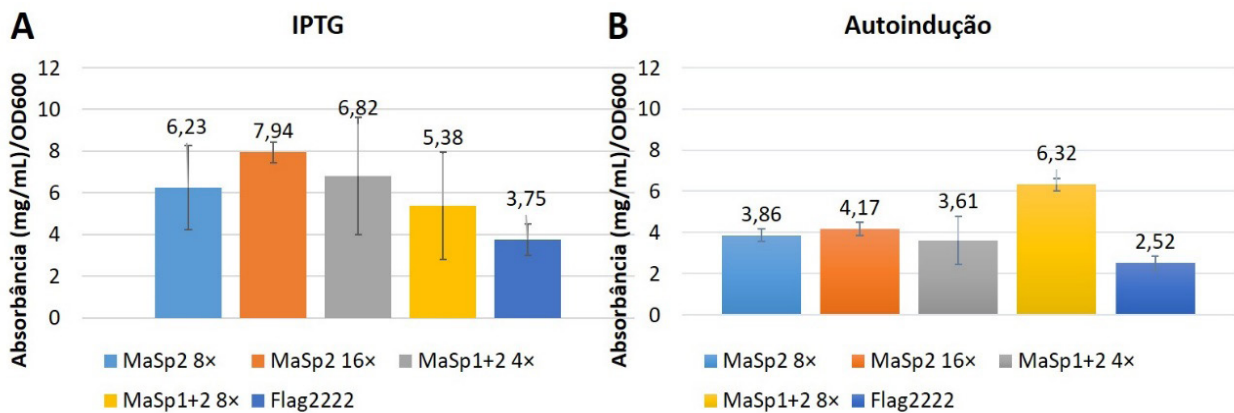


Figura 2. Gráficos representativos dos valores referentes à razão do quantitativo do extrato proteico total pela OD600 (=1). A) Resultados obtidos com indução por IPTG. B) Resultados obtidos com protocolo de autoindução.

Posteriormente, a produção das espidroínas sintéticas foi confirmada por *Western blot* em amostras do extrato proteico bruto. A produção das espidroínas com IPTG foi confirmada para as três espidroínas, MaSp2 8x, MaSp2 16x e Flag2222. Já as outras duas espidroínas, MaSp1+2 4x e MaSp1+2 8x, não apareceram nas três réplicas (Figura 3A), sinalizando a não produção dessas espidroínas com IPTG. No que se refere ao método da autoindução, as cinco espidroínas (MaSp2 8x, MaSp2 16x, MaSp1+2 4x, MaSp1+2 8x e Flag2222) foram identificadas nas três réplicas (Figura 3B). Como esperado, não foram identificadas proteínas no controle negativo nos dois métodos (Figura 3 A e B). A massa molecular de cada espidroína sintética é de ~28 kDa para a MaSp2 8x; para a MaSp2 16x é de ~54 kDa; para a MaSp1+2 4x é ~40 kDa; a MaSp1+2 8x é de ~77 kDa; e, a menor dentre elas, para a Flag2222 a massa é de ~22 kDa.

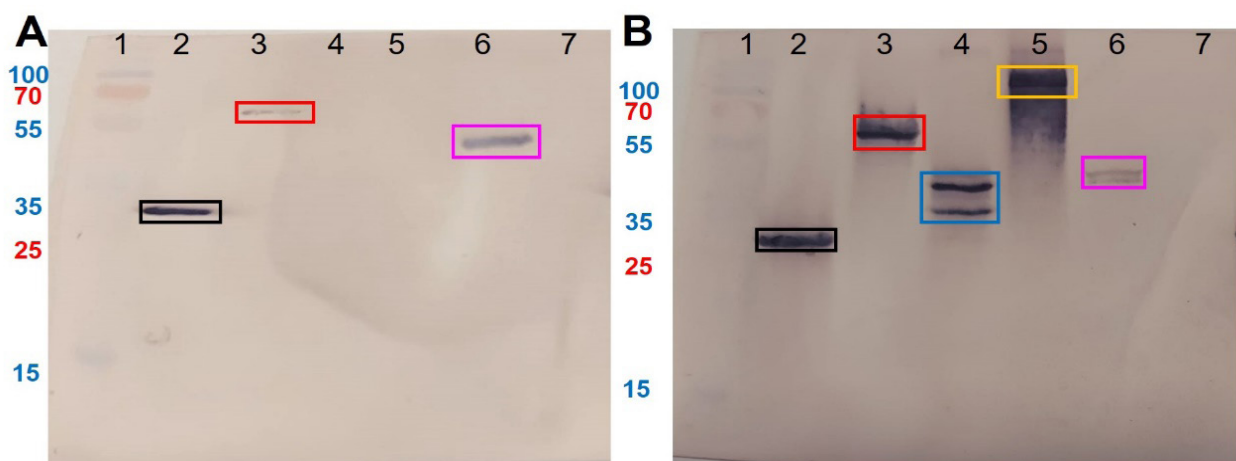


Figura 3. Fotografia representativa do resultado da análise por *Western blot* utilizando anticorpo contra *histag*. A) Indução com IPTG. B) Autoindução. 1) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (26619 Thermo Scientific). 2) MaSp2 8x (28 kDa). 3) MaSp2 16x (54 kDa). 4) MaSp1+2 4x (40 kDa). 5) MaSp1+2 8x (77 kDa). 6) Flag2222 (22 kDa). 7) Controle negativo.

Como foram utilizadas as mesmas bactérias e os mesmos plasmídeos para as duas metodologias, pode-se dizer que neste estudo o processo de autoindução apresentou uma eficiência maior em relação à diversidade de produção de espidroínas, quando comparado ao método de indução com IPTG. Isso aconteceu porque o processo da autoindução possibilitou a produção de todas as espidroínas avaliadas, enquanto a indução com IPTG produziu apenas três.

Conclusão

A expressão de espidroínas sintéticas pelo protocolo de autoindução em *E. coli* produziu todas as cinco construções avaliadas, enquanto o protocolo com indução por IPTG só conseguiu produzir três delas. Neste caso, houve uma limitação pela indução por IPTG, mesmo com as bactérias apresentando metabolismo adaptado para a produção dessas proteínas. Dessa forma, este trabalho mostra a variabilidade de diferentes métodos na produção de espidroínas sintéticas em tamanhos e composições distintos, que ainda precisam ser investigados quanto ao rendimento. A utilização do método de autoindução, em substituição ao método de indução da expressão por IPTG, tem a capacidade de tornar o processo de produção de espidroínas mais viável para a indústria, por ser um processo mais sustentável e com menor custo. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), processo #00193-00001028/2021-41

Referências bibliográficas

- BITTENCOURT, D. M. de C.; OLIVEIRA, P.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; ROSINHA, G. M. S.; JONES, J. A.; RECH, E. L. Bioengineering of spider silks for the production of biomedical materials. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022. 958486.
- EDLUND, A.; LEWIS, R.; JONES, J.; QUINN, J. C. Optimization of *E. coli* fermented synthetic spider silk for commercial viability. In: TECHCONNECT BRIEFS. **Materials for energy, efficiency and sustainability**. Washington, 2016. p. 126-129.
- MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A. **Produção de proteínas MaSp da Aranha *Parawixia bistriata* por bactérias modificadas metabolicamente, e caracterização molecular das fibras sintéticas**. 2015. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- 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.
- TEULÉ, F.; COOPER, A. R.; FURIN, W. A.; BITTENCOURT, D.; RECH, E. L.; BROOKS, A.; LEWIS, R. V. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 341-355, 2009.
- TOKAREVA, O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; RECH, E. L.; KAPLAN, D. L. Recombinant DNA production of spider silk proteins. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 651-663, 2013.
- XIA, X.X., QIAN, Z. G.; KI, C. S.; PARK, Y. H.; KAPLAN, D. L.; LEE, S. Y. 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. 14059-14063, 2010.