

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Clonagem do gene MaSp1 da proteína da teia da aranha *Nephila clavipes* e
inserção na cianobactéria *Synechococcus elongatus***

Michelle Dias Hornes da Rosa

Pelotas, 2014

Michelle Dias Hornes da Rosa

**Clonagem do gene MaSp1 da proteína da teia da aranha *Nephila clavipes* e
inserção na cianobactéria *Synechococcus elongatus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Vinicius Farias Campos
Orientador de estágio: Prof. Luis Fernando Fernandes Marins

Pelotas, 2014

R788c Rosa, Michelle Dias Hornes da

Clonagem do gene *masp1* da proteína da teia da aranha *nephila clavipes* e inserção na cianobactéria *synechococcus elongatus* / Michelle Dias Hornes da Rosa ; Vinicius Farias Campos, orientador. — Pelotas, 2014.

50 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Seda. 2. Biotecnologia. 3. Proteína recombinante. 4. Biofábrica. 5. Recombinação homóloga. I. Campos, Vinicius Farias, orient. II. Título.

CDD : 660.65

Michelle Dias Hornes da Rosa

Clonagem do gene MaSp1 da proteína da teia da aranha *Nephila clavipes* e inserção na cianobactéria *Synechococcus elongatus*

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 16 de dezembro de 2014

Banca examinadora:

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos (Orientador Acadêmico)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Carlos Frederico Ceccon Lanes
Doutor em Aquicultura pela Universidade de Nordland (Noruega)

Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride
Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada pela Universidade de Manchester (Inglaterra)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Pelotas, por me proporcionar a oportunidade de vivenciar a graduação que almejava.

Ao professor Luf, que se dispôs a abrir um espaço para mim em seu laboratório na FURG, me ajudando a dar o primeiro passo dentro da área de atuação que pretendo seguir, e tornando possível a concepção deste trabalho.

À minha mãe, pelo maior apoio que alguém poderia me dar, desde antes da entrada na faculdade, sustentando minha sanidade no curso pré-vestibular, também depois no momento da minha escolha profissional; e durante toda a trajetória no curso e em todos os setores de minha vida, estando sempre presente.

Aos mestres espirituais e irmãos de caminhada do G.O.D.U., por apresentarem o Mithraísmo como este veículo que me fez mudar tanto no último ano, psíquica e espiritualmente, nutrindo-me de foco e harmonia energética, auxiliando diretamente na realização deste TCC.

Aos meus primeiros orientadores: professor Luciano do Amarante (e todo o grupo da Bioquímica), por me encaminhar pacientemente em um mundo de tantas reações, enzimas, “CK”, “CTE”, etc., me fazendo aprender para ensinar; e ao querido professor “chefe” Fábio, por acreditar em mim ao conduzir-me em meu primeiro estágio de Iniciação Científica, e pelos bons momentos em churrascos e confraternizações com toda a turma dos “labs” 4 e 11.

Aos “quase orientadores”, também grandes fontes de inspiração: Alceu, pelos conselhos e apoio; Lívia, pelas conversas e parceria de viagem; Rodrigo, pelo acompanhamento e paciência; e por todo o aprendizado com as queridas Lu, Ana Paula, Ana Vianna, Sílvia e Beth. E mais especificamente nos últimos meses, me ajudando assiduamente principalmente na parte experimental desse trabalho, Fred, Márcio, Natália, Raíza e a equipe do “Lab Biomol”, com vocês aprendi muito, obrigada.

Aos professores que ficaram marcados: Vinicius, por aceitar orientar na elaboração do trabalho; Alan, por me prover um maior crescimento na língua inglesa, seja discutindo artigos no *Journal Club* ou conversando pelos corredores; Luciana Dode, por ser esta incentivadora do pensamento, criatividade e criticismo; Luciana Zanini, por passar-nos informações tão “retas” do Direito de forma tão

descontraída; e todo o corpo da Biotecnologia, em cada professor tive mais um contribuidor fiel para minha formação.

Ao meu pai e minha família de Macaé, meu irmãozinho e madrasta, que enviavam seu apoio mesmo de longe.

À minha tia do coração, Marilena, por fazer o papel de 2ª mãe durante o período que estive em Pelotas, e ao tio Nelsom pelas caronas e toda a boa vontade em me ajudar.

Ao meu companheiro, Vinicius, por dar toda atenção, carinho e companheirismo possível, principalmente durante a morada em Pelotas.

Às amigas Gabriela Suanes, Jéssica e todo o pessoal da van, que por 2 anos me fizeram companhia diariamente, no trajeto Rio Grande – Capão, resultando muitas risadas e amizades que pretendo cultivar enquanto puder.

Às colegas e amigas Ana e Larissa, que caminharam junto à mim nessa jornada, fica evidente que vocês foram partes importantes, e que sem o nosso companheirismo, teria sido tudo mais difícil.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, deixo meus agradecimentos de coração, é fato que na vida não se sobe sozinho, por isso faz-se importante demonstrar aqui minha sincera gratidão.

Profunda satisfação.

Resumo

DA ROSA, Michelle Dias Hornes. Clonagem do gene MaSp1 da proteína da teia da aranha *Nephila clavipes* e inserção na cianobactéria *Synechococcus elongatus*. 2014. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Os fios tecidos pelas aranhas possuem grande interesse industrial, principalmente na engenharia de materiais e em biomedicina, pois agregam propriedades únicas, sendo altamente resistentes e proporcionalmente elásticos. Atualmente há uma união de esforços para desenvolver materiais semelhantes e também métodos de produção artificial da seda, e alguns sistemas de expressão já foram testados, tais como *Escherichia coli*, células de mamíferos, células de insetos, larvas de bicho da seda, plantas e leveduras. Pouco se tem dito sobre os benefícios das pesquisas com cianobactérias, devido ao fato de contaminações ambientais por suas toxinas; no entanto, há um grande número de produtos de interesse econômico que poderão ser derivados de cianobactérias, inclusive a expressão de proteínas recombinantes biotecnológicas. O presente trabalho tem como objetivo a clonagem de um gene de seda de aranha e transformação da cianobactéria *Synechococcus elongatus*, para posterior produção da proteína. Para a construção genética, o gene de interesse (proteína MaSp1 da teia de *Nephila clavipes*), contido no vetor pMK-RQ foi amplificado por PCR, e o vetor de expressão (pSyn-psba2-green) foi clivado para a ligação do fragmento MaSp. Concluída a construção genética pSyn-psba2-MaSp, bactérias *E. coli* foram transformadas com o plasmídeo, através de eletroporação, prosseguindo a prova de restrição das transformadas. Após a produção do plasmídeo em larga escala, foi feita a transformação das cianobactérias, que depois foram testadas por PCR, confirmando ser positivas para a presença do pSyn-psba2-MaSp em seus genomas, abrindo horizontes para pesquisas e aplicações futuras.

Palavras-chave: seda, biotecnologia, proteína recombinante, biofábrica, recombinação homóloga

Abstract

DA ROSA, Michelle Dias Hornes. MaSp1 Gene cloning from *Nephila clavipes*' spider silk and insertion in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. 2014. 50p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Due to its unique properties – high resistance and elasticity – the silks woven by spiders have a large industrial interest, especially for materials engineering and biomedicine. Currently there is a joint effort to develop similar materials and also artificial silk production methods, and some expression systems have been tested, such as *Escherichia coli*, mammalian cells, insect cells, silkworm larvae, plants and yeast. Little has been said about the benefits of research with cyanobacteria owing to the fact of environmental contamination by their toxins; however, there are a lot of products of economic interest that may be derived from cyanobacteria, including the expression of biotechnological recombinant proteins. The present work aims the cloning of a spider silk gene and transformation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, for later production of the protein. For the genetic construct, the gene of interest (MaSp1 protein of *Nephila clavipes* web), contained in the vector pMK-RQ was amplified by PCR, and the expression vector (pSyn-psba2-green) was cloned for the binding of MaSp fragment. Once concluded the genetic construct pSyn-psba2-MaSp, *E. coli* bacteria were transformed with the plasmid by electroporation, proceeding the restriction test of transformed ones. After large-scale plasmid production, cyanobacteria transformation was performed followed by a PCR test, which confirmed the colonies to be positive for the presence of pSyn-psba2-MaSp in their genomes, opening horizons for future research and applications.

Key-words: silk, biotechnology, recombinant protein, biofactory, homologous recombination

Lista de figuras

Figura 1	Processo de formação, polimerização e extrusão das fibras de aranha.....	15
Figura 2	Comparação da composição de quatro proteínas de teias de aranha.....	17
Figura 3	Ilustração dos motivos proteicos de sedas conservados entre as espécies de aranhas.....	18
Figura 4	Representação dos tipos de teias de aranha e as glândulas produtoras.....	18
Figura 5	Plasmídeo pMK-RQ.....	28
Figura 6	Plasmídeo pSyn-psba2- <i>green</i>	30
Figura 7	Gel da PCR para extração da banda “MASP”.....	35
Figura 8	Gel da PCR para extração da banda “PSYN”.....	36
Figura 9	Plasmídeo pSyn-psba2-MaSp.....	37
Figura 10	Gel da restrição dos plasmídeos extraídos das colônias de <i>E. coli</i> recombinantes.....	39
Figura 11	Placa de cianobactérias transformadas.....	39
Figura 12	Gel da PCR confirmatória da integração do pSyn-psba2-MaSp na <i>S. elongatus</i>	40

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Objetivo geral.....	12
1.2	Objetivos específicos.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Fibras de teias de aranha.....	13
2.1.1	Apresentação das teias de aranha.....	13
2.1.2	Mecanismo de produção da seda.....	14
2.1.3	Tipos de teias, composição e propriedades.....	15
2.1.4	Aplicação das teias de aranha e modelos de produção já testados.....	19
2.2	Cianobactérias.....	21
2.2.1	Apresentação das cianobactérias.....	21
2.2.2	Metabólitos e produtos naturais de cianobactérias.....	22
2.2.3	Interesse e aplicação das cianobactérias no contexto atual.....	22
2.2.4	Cianobactérias como modelo para expressão de biomoléculas.....	23
2.2.5	A cianobactéria <i>S. elongatus</i>	24
2.2.6	Recombinação homóloga em <i>S. elongatus</i>	25
2.3	Considerações sobre a produção de seda de aranha em cianobactérias.....	26
3	METODOLOGIA.....	27
3.1	Construção genética.....	27
3.1.1	Preparação do gene de interesse.....	27
3.1.2	Preparação do vetor.....	29
3.1.3	Ligação do inserto ao vetor.....	29
3.2	Transformação de <i>E. coli</i>	31
3.3	Extração plasmidial e prova de restrição.....	31

3.4	Clonagem do plasmídeo pSyn-psba2-MaSp.....	32
3.5	Cultivo e transformação das cianobactérias.....	32
3.6	Confirmação final das cianobactérias transformadas.....	33
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Construção genética e transformação bacteriana.....	35
4.2	Prova de restrição e clonagem do plasmídeo.....	38
4.3	Transformação da cianobactéria <i>S. elongatus</i> e PCR confirmatória.....	38
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO.....	43
	Referências.....	44

1. INTRODUÇÃO

A Biotecnologia, mais precisamente a tecnologia do DNA recombinante, é o que tem permitido diversos avanços na produção de compostos úteis (ex.: óleos, etanol combustível, enzimas para bioprocessos) e biofármacos de alto valor agregado (ex.: insulina, eritropoetina e interferon recombinantes). No contexto da produção de fibras de aranhas não é diferente, a expressão de proteínas da teia com sequências programadas e estrutura correta já é possível hoje, graças às pesquisas na área (BEER et al., 2009; FERRO, 2010).

Apesar de normalmente se encontrar mais informações negativas sobre cianobactérias em contaminações ambientais por suas toxinas, deve-se levar em conta seu potencial de uso em diversas áreas como na alimentação e agricultura, além de sua facilidade de cultivo. Um novo enfoque poderia ser discutido para esses organismos, atuando como biofábricas de sedas de aranha, substâncias extremamente resistentes e também elásticas, residindo em suas propriedades químicas o segredo de seu desempenho.

Diante do exposto, o presente estudo mostra-se como uma alternativa à produção de sedas, com o desenvolvimento de mais um possível sistema de expressão, a cianobactéria *Synechococcus elongatus*. Tendo em vista o sucesso da integração do plasmídeo pSyn-psba2-green nessa mesma cianobactéria (BRUM, 2014), desempenhou-se uma estratégia baseada em PCR, restrição e ligação para a realização de uma construção genética contendo gene de proteína de aranha, e para inserção da construção em *S. elongatus* fez-se uso de recombinação homóloga.

1.1 Objetivo geral

O objetivo em questão é a clonagem do gene da proteína MaSp1 (*Major Ampullate Spidroin 1*), da “teia de segurança” da aranha *Nephila clavipes*, e transferência para a cianobactéria *S. elongatus*, visando a futura obtenção da proteína.

1.2 Objetivos específicos

- Amplificar o gene da MaSp1 do vetor pMK-RQ;
- Inserir o gene da MaSp1 no vetor de expressão pSyn-psba2;
- Transformar a cianobactéria *S. elongatus* com o vetor pSyn-psba2-MaSp;
- Avaliar a integração do vetor na cianobactéria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fibras de teias de aranha

2.1.1 Apresentação das teias de aranha

As aranhas são artrópodes pertencentes à ordem Araneae e à classe dos aracnídeos, apresentando grande diversidade e ocupando a maioria dos ambientes naturais. Porém, devido a natureza agressiva e predatória, é difícil sua domesticação, o que impulsionou pesquisas para entender a estrutura molecular de suas sedas visando o desenvolvimento de sedas sintéticas, através de estratégias alternativas de produção, como a tecnologia do DNA recombinante (MENEZES, 2010).

A seda (ou “teia”) de aranha é uma substância fibrosa (proteica) constituída de biopolímeros secretados pelas glândulas especializadas nas fieiras das aranhas. Essa substância é utilizada pelas aranhas em todos os aspectos de sua vida, diferentemente de insetos e bichos da seda, que a usam somente para proteção de seus ninhos e pupas (OLIVEIRA, 2012).

Sendo a produção de seda uma característica geral e essencial às aranhas, sabe-se que algumas espécies são capazes de produzir até sete tipos diferentes de seda (FOELIX, 1996; LEWIS, 2006). Cada um dos tipos desempenha uma função específica, e são usados pelas aranhas com múltiplos fins, sendo principalmente: captura de presas; revestimento de sacos ovígeros, espermatóforos e ninhos; construção de abrigos; dispersão de filhotes, no chamado voo aracnídeo; e ainda como reserva alimentar (TADASHI et al., 2004).

A espécie *Nephila clavipes* possui particularidades interessantes, o que a torna um modelo visado para experimentação, pela sua ampla distribuição geográfica (encontram-se por toda a América) e características de sua seda – talvez por isso sejam chamadas de “aranhas da seda de ouro” (*gold silk spiders*). A seda do tipo “linha de segurança” produzida ultrapassa a resistência do aço e a força do

Kevlar – fibra que é atualmente usada em coletes à prova de balas (TERMONIA, 1994).

Os fios tecidos pelas aranhas possuem grande interesse industrial, pois agregam propriedades únicas, sendo altamente resistentes e proporcionalmente elásticos – o aço, em comparação, é altamente resistente, mas não é flexível –, biocompatíveis e biodegradáveis. Por conta disso, pesquisadores atualmente estão investindo em análises a fim de relacionar a estrutura química da seda para desenvolver materiais semelhantes, e também em métodos de produção artificial da seda (FAPESP, 2014).

Nesse contexto, o Brasil, devido a biodiversidade (onde encontram-se diversas espécies de aranha, conseqüentemente, diversas opções de teias), tem a capacidade de vir a desenvolver essas sedas que agregam valor econômico estratégico, principalmente em indústrias de engenharia de materiais (ex.: cordas e redes de pesca, pára-quedas, coletes à prova de balas) e biomedicina (ex.: fios de sutura para cirurgia, material regenerativo tecidual, moléculas carreadoras de fármacos, etc.) (CIB, 2014).

2.1.2 Mecanismo de produção da seda

A formação das fibroínas que irão compor a teia ocorre dentro das glândulas sericígenas das aranhas, e são estocadas como polímeros de alta densidade em estrutura micelar – moléculas anfipáticas, com a parte interior hidrofóbica, e parte exterior, hidrofílica (JIN & KAPLAN, 2003). Cada micela abriga várias proteínas, e é estabilizada pela presença dos grupamentos N- (amina, $-NH_2$) e C-terminal (ácido carboxílico, $-CO_2H$). As glândulas são ligadas a vários canalículos na extremidade das fiandeiras que se abrem para o meio exterior, chamados fúsculas, que são os locais por onde a aranha “tece” a seda (UNESP, 2014).

O mecanismo de fiação da seda envolve a polimerização das proteínas solúveis para fibras insolúveis. O processo inicia com um aumento na concentração da proteína no lúmen glandular, formando a solução de fiação (HIJIRIDA et al., 1996), e durante a passagem da mesma pelo ducto, ocorre um rápido agrupamento das proteínas, tornando-as insolúveis após a saída das micelas (SCHEIBEL et al.,

2004). O ducto age similarmente a uma membrana de diálise, controlando a troca de água e íons que permitirá a estruturação das proteínas. Ao final, a fibra é então puxada para fora pelas patas traseiras das aranhas, resultando na formação do fio da seda (SCIENCEBLOGS, 2014). A Figura 1 demonstra a esquematização do processo de formação, polimerização e extrusão da fibra.

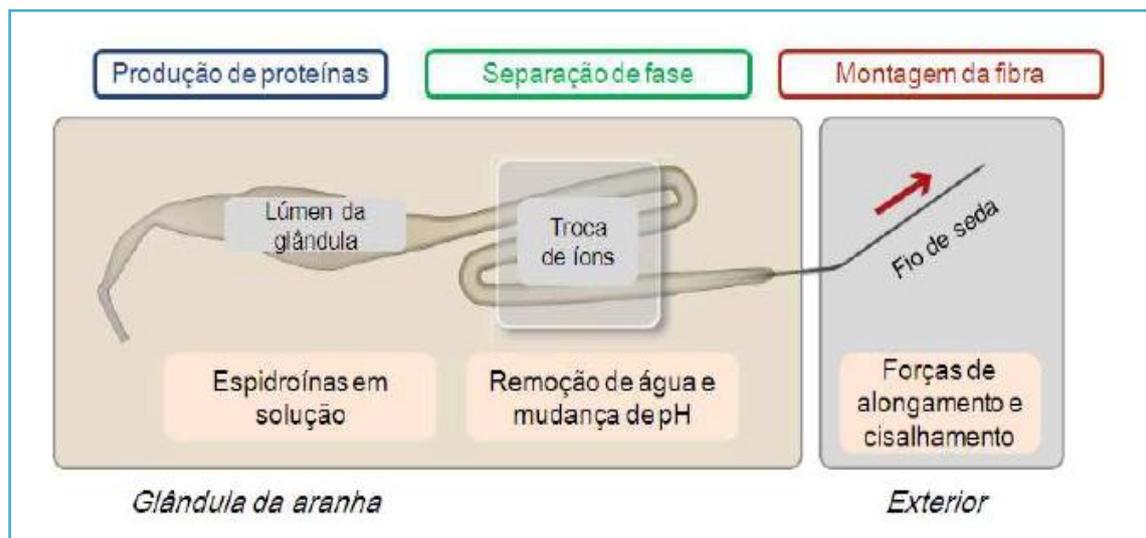


Figura1 - Processo de formação, polimerização e extrusão das fibras de aranha. As proteínas da teia são produzidas e armazenadas sob forma micelar, em solução aquosa, no lúmen da glândula. No momento da extrusão, o ducto age trocando íons e removendo água da solução contendo as fibras, ocasionando uma mudança de pH e saída das proteínas das micelas, que quando são forçadas ao meio exterior, devido às forças de alongamento e cisalhamento, formam os fios sólidos da seda. Fonte: MENEZES (2010).

2.1.3 Tipos de teias, composição e propriedades

Segundo OLIVEIRA (2012), “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”. As espidroínas, ou fibroínas, são as proteínas filamentosas que compõem as sedas de aranhas, polímeros compostos por blocos hidrófilos e hidrófobos.

Estima-se que 10 a 25% de sua composição seja de um componente cristalino (proteínas estruturadas em folhas- β), sequências de aminoácidos

hidrofóbicos responsáveis pela resistência mecânica da fibra, com motivos representados por “(GA)_n” – glicina e alanina *n* vezes repetido – ou “(GGX)_n” – duas glicinas e outro aminoácido qualquer, repetido *n* vezes; e 75 a 90% de um componente amorfo (proteínas estruturadas em α-hélices), sequências de aminoácidos hidrofílicos que conferem a elasticidade, representadas pelos motivos “(GPGXX)_n” – glicina, prolina, glicina e outros dois aminoácidos quaisquer – ou “(GPGGX)_n” – glicina, prolina, duas glicinas e outro aminoácido qualquer. (CETINKAYA et al., 2011). A Figura 2 compara as estruturas primárias (aminoácidos) e secundárias (folhas-β ou α-hélices) de alguns tipos de teias.

As teias de aranhas na natureza são altamente conservadas entre espécies (Figura 3), possuindo uma sequência consenso de motivos estruturais repetitivos, sendo a diferente combinação desses motivos o que as diferencia e afeta as propriedades mecânicas. Combinações artificiais dos motivos conservados também são possíveis na Engenharia Genética, apresentando as proteínas as performances mecânicas de acordo com suas estruturas primárias e processo de *spinning* (extrusão).

Dentre todos os tipos de seda, a da glândula ampolada maior, chamada linha de segurança (*dragline silk*), é a mais resistente, sendo cinco vezes mais forte que o aço (XU et al., 1990; GOSLINE et al., 1999), por isso também a mais estudada. As aranhas a utilizam para dar o primeiro suporte para a teia, a estrutura principal. É formada por proteínas de dois tipos, as chamadas MaSp1 e MaSp2 – *Major Ampullate Spidroin 1* e *2* (XU et al., 1990), existentes em todas as aranhas orbiculares. A MaSp1 contém regiões ricas em resíduos de alanina e glicina e também unidades GGX (X = leucina, tirosina, serina, alanina), e está relacionada à força; a MaSp2 une o motivo rico em resíduos de alanina ao motivo GPGXX (X = glicina, tirosina, serina, alanina ou glutamina), sendo a base da elasticidade. A diferença entre MaSp1 e MaSp2 é a presença do aminoácido prolina na MaSp2 e não existência do mesmo na MaSp1 (HU et al., 2006).

A seda da glândula ampolada menor (*minor ampullate spidroin* - MISp) é bem menos elástica e resistente que a da glândula ampolada maior, sendo usada como um reforço, formando a espiral auxiliar. A mais elástica de todas as sedas, produzida pela glândula flageliforme, chama-se seda flageliforme, e forma a espiral principal

(de captura) da teia. É formada pela proteína Flag, que contém o motivo já descrito $(\text{GPGXX})_n$, a base da elasticidade. A glândula agregata produz um tipo de cola adesiva, uma substância pegajosa glicoproteica que é a responsável pelo mantimento da presa no espiral principal da teia (UNESP, 2014).

As demais glândulas presentes nas aranhas são: piriforme, que produz os discos de adesão da teia ao substrato; aciniforme, usada na imobilização de presas; e cilíndrica ou tubuliforme, que é usada para confeccionar os casulos de deposição de ovos, na época reprodutiva (HAYASHI et al., 1998). A Figura 4 demonstra os tipos de teias citados.

É importante ressaltar, sobre as propriedades das sedas de aranhas, sua configuração variável, sendo adaptáveis a diferentes condições de temperatura, contração/extensão e umidade. As sedas sofrem supercontração quando umedecidas ou molhadas pela chuva, podendo resistir ao peso de várias gramas de orvalho em seus fios.

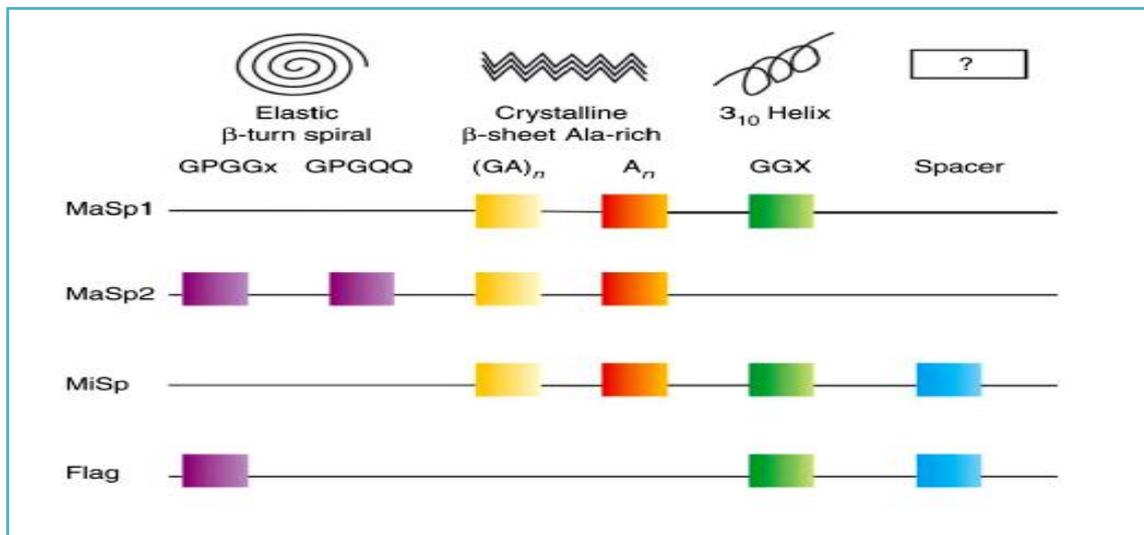


Figura 2 - Comparação da composição de quatro proteínas de teias de aranha. Os blocos coloridos indicam que o motivo faz parte da proteína em questão. Fonte: adaptado de TEULÉ et al. (2009).

MaSp1	
<i>N. cruentata</i>	GG-AGQGGYGGLGGQ-----GAG-----QGAGAAAAA- 27
<i>N. clavipes</i>	GG-AGQGGYGGLGSQ-----GAGRGLGG---QGAGAAAAA- 33
<i>N.i.madagascariensis</i>	GG-AGQGGYGGLGSQ-----GAGRGGYGG---QGAGAAAAA- 33
<i>A. trifasciata</i>	GGQGGQGGYGGLGXQGAGQGYGAGSGGQGGXG--QGGAAAAAAA 43
<i>A. diadematus</i> (ADF-2)	GGQGGQGGQGGGLGSQ-----GAGGAGQGGYGAGQGGAAAAAAA 39
Flag	
<i>N. cruentata</i>	[GPGGX] ₁₈ [GGX] ₁ TVIEDLDITVNGPGGPITISEELTVGGPGAGGS [GPGGX] ₂₄
<i>N. clavipes</i>	[GPGGX] ₄₂ TIIEDLDITIDGADGPPITISEELTIS-GAGGS [GPGGX] ₂₆
<i>N.i.madagascariensis</i>	[GPGGX] ₃₆ [GGX] ₇ TVIEDLDITIDGADGPITISEELTIGGAGAGGS [GPGGX] ₁₉
<i>A. trifasciata</i>	[GPGGX] ₆ GPVTVDVDVSVGGAPGG [GPGGX] ₅ [GGX] ₄ [GPGGX] ₇

Figura 3 - Ilustração dos motivos proteicos de sedas conservados entre as espécies de aranhas. A cor verde indica o motivo GGX; a amarela, o motivo (GA)_n; a vermelha, o motivo A_n; em roxo, os motivos GPGGX; e em azul, os motivos ainda desconhecidos (descritos como “espaçadores”). Fonte: adaptado de TEULÉ et al. (2009).

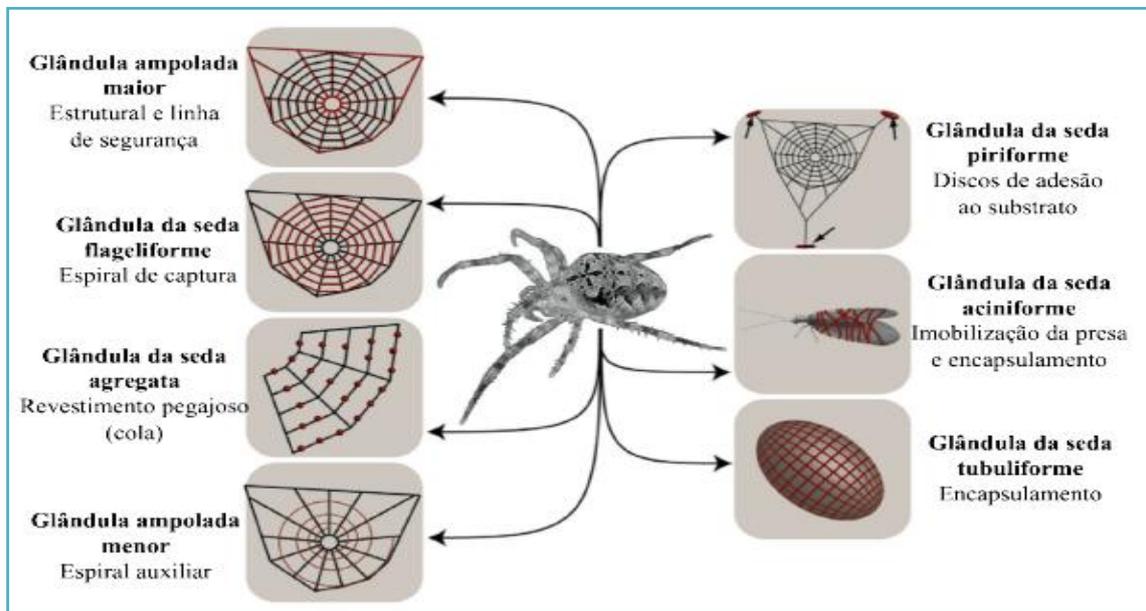


Figura 4 - Representação dos tipos de teias de aranha e as glândulas produtoras. Fonte: OLIVEIRA (2012).

2.1.4 Aplicação das teias de aranha e modelos de produção já testados

Trabalhos recentes ressaltam a utilização das sedas em sistemas carreadores de genes para células tumorais (NUMATA et al., 2012), entrega direcionada de fármacos (LAMMEL et al., 2011), e como suporte para regeneração de tecidos e terapia celular (EISOLDT et al., 2011), graças às suas características de anfipaticidade (moléculas que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica – atração e repulsão à moléculas de H₂O, respectivamente), biodegradabilidade e não citotoxicidade. Outros relatos incluem as sedas em aplicações balísticas, produtos esportivos e têxteis.

A tecnologia do DNA recombinante possibilita hoje a produção de fibras de aranhas com sequências determinadas, correta estruturação e arquitetura e peso molecular definido (RABOTYAGOVA et al., 2009). As etapas básicas de um processo de produção de seda de aranha recombinante são: o planejamento (escolha) do gene de um dos tipos de seda e posterior síntese em cassete; a inserção do segmento escolhido em um vetor pré-determinado; transferência do cassete gênico para um sistema de expressão; seleção dos transformados; e expressão e purificação da proteína (PALOMARES et al., 2014).

No momento, as proteínas das teias estão sendo produzidas em folhas e sementes de plantas, em bactérias, no leite de animais transgênicos, entre outros; de forma a avaliar qual sistema de expressão se mostrará mais eficiente, em relação a produção em larga escala e custo reduzido (SILVA et al., 2013). Moléculas de cDNA da teia de segurança já foram clonadas e expressas em *Escherichia coli*, células de mamíferos, células de insetos e larvas de bicho da seda; enquanto que genes sintéticos também de teia de segurança de *N. clavipes* já foram expressos em *Pichia pastoris*, *E. coli* e plantas (TOKAREVA et al., 2013).

A maioria das sedas recombinantes foram produzidas em *E. coli* (FAHNESTOCK et al., 1997; WANG et al., 2006; RABOTYAGOVA et al., 2009; AN et al., 2011; TEULÉ et al., 2012), pela sua facilidade de manipulação e custo relativamente baixo. Contudo, alguns problemas foram observados na produção de teias recombinantes nesse organismo, como erros de transcrição, deleções, recombinação homóloga e formação de corpos de inclusão, reduzindo a taxa de

expressão da proteína, o que acredita-se estar associado à estrutura altamente repetitiva e à grande extensão das sequências proteicas das sedas.

A levedura *P. pastoris* é outro organismo que tem sido usado a fim de minimizar a presença de proteínas truncadas e permitir a secreção da seda para o meio extracelular. O grupo FAHNESTOCK et al. (1997) obteve altos níveis de expressão de genes sintéticos quando da ação do promotor P_{AOX1} .

Linhagens celulares de mamíferos, tais como as de epitélio alveolar mamário bovino e de rins de hamster já foram usadas para expressar MaSp1 e MaSp2 (LAZARIS et al., 2002). Os resultados demonstraram que, apesar da expressão ter de fato ocorrido, quanto maior era o tamanho da proteína da seda em questão, menor era a taxa de produção, na qual vários fatores podem estar atribuídos, como transcrição e secreção ineficiente, além de limitações traducionais. Outra constatação que se fez importante foi que as sedas produzidas sem cauda de histidina tiveram melhores propriedades mecânicas do que as que incluíam a cauda.

Da mesma forma, a produção de teias recombinantes foi experimentada através de animais transgênicos (camundongos e cabras). A produção foi direcionada para as glândulas mamárias, e sua secreção se deu no leite (LAZARIS et al., 2002; WILLIAMS, 2003; XU et al., 2007). A expressão foi controlada pelo promotor da β -caseína, sendo as proteínas da seda observadas apenas nos tecidos mamários; no entanto a taxa de expressão foi menor (11.7 mg/L) em comparação com a expressão em bactérias (300 mg/L, máxima acumulação descrita).

As plantas são sistemas de expressão de fácil manejo e baixo custo. Batata e tomate transgênicos já foram testados para a produção de MaSp1 de *N. clavipes*, porém a acumulação da proteína no retículo endoplasmático dessas plantas não passou de 2%. (SCHELLER et al., 2001).

Outros candidatos para a investigação da produção de seda de aranha recombinante são os bichos da seda (*Bombyx mori*). Já há relatos de transferência gênica para estes sistemas através de baculovírus, que infecta as células se replicando rapidamente e produzindo boa quantidade de proteína nas larvas. (MOTOHASHI et al., 2005).

2.2 Cianobactérias

2.2.1 Apresentação das cianobactérias

Cianobactérias são organismos procariontes fotossintetizantes que possuem organelas fotossintéticas semelhantes a cloroplastos, sendo por este motivo anteriormente classificadas como algas, chamadas “algas verde-azuladas” ou cianofíceas. Atualmente esses seres são compreendidos no Sistema Bacteriano de Classificação (STANIER, 1977; OREN, 2004), sendo um filo dentro do domínio Bacteria, pelo fato de suas paredes celulares corarem como as de bactérias Gram-negativas (ECODEBATE, 2011).

A maioria das espécies habitam águas continentais (rios, lagos, etc.), algumas podem ser encontradas em solos úmidos, sob o folhiço de florestas, ambientes congelados, dentre outros, sendo eventualmente seres endossimbiontes. Os ambientes que melhor propiciam seu crescimento são águas neutroalcalinas (pH 6,0 – 9,0) em temperaturas variadas (15 – 30 °C) e com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Devido ao seu dinamismo fisiológico, morfológico e ecológico, as cianobactérias demonstram grande capacidade adaptativa (MISCHKE, 2003).

Dentre os microrganismos aquáticos, as cianobactérias desempenham um importante papel como produtores primários de matéria orgânica (WETZEL, 1983) e fixadores de nitrogênio. Quanto à estrutura celular, dispõem de uma parede celular semelhante à de bactérias Gram-negativas, constituída de mureína, uma camada dupla de polissacarídeos e bainha de mucilagem (evita dessecação). Não possuem flagelos, porém algumas espécies se locomovem por meio de proteínas da parede celular.

No que tange aos processos fisiológicos e bioquímicos, na maior parte das espécies, a maquinaria fotossintética encontra-se em pregas da membrana celular, denominadas tilacóides; e algumas outras espécies podem realizar quimiossíntese a partir de sulfureto de hidrogênio, como fazem também outras bactérias (MADIGAN et al., 2004). As cianobactérias realizam fotossíntese através de dois centros de reação, os fotossistemas I e II, nos quais ocorre a conversão de energia luminosa

em fotoquímica (SADAVA et al., 2009). A clorofila reside no fotossistema II, juntamente com aceptores de elétrons associados a heterodímeros chamados D1 e D2, codificados pelos genes *psbA* e *psbD*, respectivamente. (BRUM, 2014; EICHORN et al., 2014).

As cianobactérias foram os principais produtores primários da biosfera há 3 bilhões de anos, quando a Terra continha apenas 0,0001% de oxigênio. Esses organismos encheram a atmosfera com oxigênio, possibilitando o surgimento dos seres hoje existentes. Os estromatólitos – formações calcáreas dispostas em camadas – são a evidência fóssil que comprova essa ação, tendo como componentes principais as cianobactérias (BRYSON, 2005).

2.2.2 Metabólitos e produtos naturais de cianobactérias

Quanto a pigmentos fotossintéticos para o processo de respiração celular, as cianobactérias possuem, em sua maioria, clorofila *a* juntamente com ficobilinas (pigmentos que conferem às células uma cor azulada) nas lamelas fotossintetizantes; no entanto alguns gêneros não produzem ficobilinas e tem clorofila *b*, ao invés de clorofila *a*. A substância de reserva energética é o glicogênio, e outros pigmentos acessórios, como carotenoides e ficoeritrina (pigmento de cor vermelha) também já tiveram sua produção reportada (PINOTTI et al., 1991).

As cianobactérias também produzem toxinas (cianotoxinas), entre as quais a anatoxina-a, aplisiatoxina, cilindrospermopsina, ácido domóico, microcistina, nodularina e saxitoxina; algumas destas possuindo ação hepatóxica e neurotóxica, podendo ainda causar gastroenterites e complicações mais graves, inclusive na espécie humana (SIQUEIRA et al., 2004). Provavelmente essas substâncias começaram a ser produzidas como meio de defesa desses organismos (CARMICHAEL et al., 1992; AZEVEDO et al., 2006).

2.2.3 Interesse e aplicação das cianobactérias no contexto atual

As cianobactérias constituem um grande potencial nos dias de hoje, estando seus usos imersos nas mais diversas áreas, como na alimentação (fontes ricas em

proteínas, carboidratos, lipídeos e vitaminas), agricultura (inoculante de solos), indústria de combustíveis (produção de metano, hidrogênio, biodiesel), cosméticos, tratamento de resíduos, etc. (PINOTTI et al., 1991).

Uma grande vantagem é a necessidade única de água, CO₂, luz e substâncias inorgânicas para seus processos vitais. Em contrapartida, podem representar danos ao meio ambiente através de suas toxinas – fato que deve ser levado em consideração quando de sua utilização como biomassa produtora de compostos bioativos –; águas poluídas por detritos industriais, por exemplo, propiciam a floração (crescimento excessivo de cianobactérias). Por este motivo, deve-se investir cada vez mais na purificação de água para uso humano e no estudo dos efeitos ambientais (AZEVEDO et al., 2006; DI BERNARDO et al., 2002).

2.2.4 Cianobactérias como modelo para expressão de biomoléculas

Pouco se tem dito sobre os benefícios das pesquisas com cianobactérias, devido ao fato de contaminações ambientais por suas toxinas; no entanto, há um grande número de produtos especiais de interesse econômico que poderão ser (e, em alguns casos, já são) derivadas de cianobactérias – inclusive a expressão de proteínas recombinantes biotecnológicas.

Atualmente vem crescendo os investimentos em “energia verde”, os biocombustíveis tem ganhado espaço no cenário de matrizes energéticas, e uma grande utilidade para a biomassa de cianobactérias (especialmente as que crescem em águas residuárias), é a produção de metano e biodiesel (BECKER et al., 1981; BENEMANN et al., 1990). Segundo pesquisa da USP (Universidade de São Paulo), um hectare de milho produz 168 litros de biodiesel, o equivalente ao mesmo hectare de cianobactérias poderia produzir 140 mil litros, ou seja, quase mil vezes mais (UOL Notícias, 2013).

Especificamente para o campo da Biotecnologia, destaca-se o uso dos pigmentos ficocianina e ficoeritrina como marcadores fluorescentes para diagnósticos. Esses pigmentos têm sido também utilizados como reagentes de cor na indústria de cosméticos (KYLE et al., 1989; BENEMANN et al., 1990).

No ramo alimentício, a produção de óleos essenciais ômega-3 e ômega-6, atribuídos à redução do risco de doenças coronarianas, pode ser um mercado promissor futuramente. O sucesso desta ideia dependerá do melhoramento genético do conteúdo de gordura e ácidos graxos das cianobactérias, assim como da redução dos custos de produção e estabelecimento de um processo de obtenção mais controlado e homogêneo com respeito à composição do óleo (KYLE, 1989).

2.2.5 A cianobactéria *Synechococcus elongatus*

Cianobactérias do gênero *Synechococcus* são bem difundidas no ambiente marinho e de água doce, e seus indivíduos podem apresentar forma cilíndrica ou ovoide, formando grupos pareados, lineares, ou de indivíduos isolados. É através da fotossíntese que *Synechococcus spp.* realizam biossíntese e respiração celular (NADDAF, 2004).

A espécie *S. elongatus* foi encontrada apenas em água doce, e não é conhecida por causar doenças. Duas cepas da espécie já tiveram seus genomas sequenciados e caracterizados: *S. elongatus* PCC 6301 e *S. elongatus* PCC 7942, apresentando grande similaridade. O pigmento principal requerido para fotossíntese em *S. elongatus* é a clorofila *a* (também comum em plantas), podendo incluir pigmentos acessórios, sendo os mais comuns da classe das ficobiliproteínas: ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina (MICROBE WIKI, 2011).

A linhagem PCC7942 foi primeiramente descrita como *Anacystis nidulans* (RIPPKA et al., 1979), mas atualmente se encontra na literatura como *S. elongatus* (WILMOTE & STAM, 1984), mais frequentemente, ou ainda como *S. leopoliensis* (SHESTAKOV & REASTON, 1987) – denominação adotada na Coleção de Culturas do Instituto Pasteur (NADDAF, 2004). Essa cepa possui genoma de tamanho 2.7 Mb, contendo genes para 2662 proteínas e 53 RNAs (NCBI, 2014), sendo considerada uma boa plataforma para expressão heteróloga pelo seu genoma pequeno e de sequência já conhecida (por isso de fácil manipulação).

Entretanto, há a necessidade da utilização de promotores fortes para expressão de proteínas em cianobactérias, já que as taxas de produção ainda são baixas. Algumas pesquisas têm destacado o promotor do fotossistema (pbsA) como

um dos mais fortes de *S. elongatus*, e frente a isto BRUM (2014) produziu um plasmídeo (pSyn-psba2-green) contendo o promotor psba2, tendo como base o plasmídeo comercial pSyn_1.

2.2.6 Recombinação homóloga em *S. elongatus*

Um fato interessante ao se trabalhar com biologia sintética em *S. elongatus* é sua alta capacidade de adquirir DNAs exógenos, através da recombinação homóloga. Este processo é um tipo de recombinação genética, que envolve a realocação de genes entre moléculas de DNA (ou dentro de uma mesma molécula) que compartilhem regiões de homologia, através da substituição de genes do genoma da célula-alvo pelos contidos no vetor. No caso do vetor final desse estudo (pSyn-psba2-MaSp), as sequências flanqueantes que permitirão a troca são denominadas “sítios neutros”, também presentes no genoma da *S. elongatus*. (BRUM, 2014; CLERICO et al., 2007; NELSON, 2011).

Em bactérias, a recombinação homóloga representa um processo de reparo de DNA, podendo também ocorrer durante a conjugação, quando material genético é transferido de uma para outra bactéria. Em eucariotos, essa recombinação tem papel na replicação e divisão celular, incluindo o reparo de forquilhas de replicação bloqueadas, ocorrendo com alta frequência durante a meiose. Um exemplo deste mecanismo, em humanos, é a geração da diversidade de anticorpos, a qual só é possível devido à recombinação que ocorre nos genes responsáveis por coordenar as regiões variáveis das imunoglobulinas, contornando assim a capacidade limitada do DNA codificante. (COX, 2001).

São raros os exemplos em que a integração do inserto no genoma-alvo se dá de maneira estável, já que na maioria dos casos isso ocorre por recombinação heteróloga, a qual o gene se insere em locais aleatórios do genoma (WATSON, 2009). Além disso, a clonagem com base em enzimas de restrição necessita de uma estratégia diferente para cada gene, dependendo dos sítios de restrição disponíveis. Nesse sentido métodos de recombinação homóloga foram um avanço importante, abrindo a possibilidade de trabalhar com qualquer vetor, permitindo a troca de vários genes simultaneamente (WATSON, 2009).

2.3 Considerações sobre a produção de sedas de aranha em cianobactérias

O primeiro desafio relacionado com a produção de sedas de aranha requer a descoberta da melhor biofábrica possível para a síntese – o que pode incluir melhoramento genético –, já que até o momento nenhum trabalho conseguiu reproduzir teias com propriedades mecânicas equivalentes às de teias naturais.

Além disso, a polimerização das fibras em laboratório é dificultada pelos processos de desidratação e de esticamento da fibra. A técnica de polimerização normalmente utilizada é o *wet spinning*, no qual as proteínas (após purificadas e liofilizadas) são solubilizadas em HFIP a 25-30% (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol). Já a extrusão das fibras é feita pelo equipamento SpinLine System (DACA Instruments, EUA), por meio de um banho de álcool isopropílico (TEULÉ et al., 2009). Por último, o esticamento da seda pode se dar em banho aquoso, melhorando as propriedades mecânicas das fibras formadas (AN et al., 2011).

E em relação as cianobactérias, a possibilidade de cultivo em fotobiorreatores é uma vantagem que muito interessa, além de serem também utilizados meios eutrofizados para seu crescimento (SIQUEIRA et al., 2004). Programas de cultivo industrial em larga escala foram e estão sendo desenvolvidos (BECKER, 1981; BENNEMAN, 1990), e necessitam ser bem estabelecidos para que os produtos de cianobactérias possam chegar ao mercado.

3. METODOLOGIA

3.1 Construção genética

3.1.1 Preparação do gene de interesse

Visando a amplificação da MaSp (sequência gênica codificante da proteína MaSp1) para posterior inserção no vetor de expressão pSyn-psba2, iniciadores (*primers*) foram construídos com base na análise *in silico* da sequência do plasmídeo pMK-RQ (Figura 5) cedido por Lewis e colaboradores (*University of Utah*, EUA). Feito o desenho dos iniciadores, estes foram sintetizados (Life Technologies, Brasil) resultando nas sequências MASP(*Bgl*II)-FOR: CGCAGATCTATGACCGGTGGTGCAGGTCA; e MASP(*Not*I)-REV: ATAGCGGCCGCCCTCCGGAGGCTGCTGCCGC.

Inicialmente, para a “PCR teste”, foram experimentadas três diluições do plasmídeo original pMK-RQ – 50x, 100x e 200x – e três temperaturas de anelamento para os iniciadores, a fim de definir a melhor condição de amplificação. Em termociclador as amostras foram submetidas ao programa: (94 °C por 2 minutos; 94 °C por 30 segundos; 56 °C/58 °C/60 °C por 30 segundos¹) em 30, 35 e 40 ciclos ²; 72°C por 1 minuto e 15 segundos; 72°C por 5 minutos.

Após aproximadamente duas horas e meia as amostras foram retiradas do equipamento e aplicadas em gel de agarose 1% para prosseguir a eletroforese, utilizando como parâmetro o marcador 1 kb Plus (Invitrogen, Brasil). O tamanho esperado de banda para o produto MaSp é de 1048 pb.

¹ Temperaturas de anelamento testadas para os iniciadores, desempenhadas em blocos diferentes do aparelho termociclador.

² Números de ciclos testados, em ocasiões diferentes.

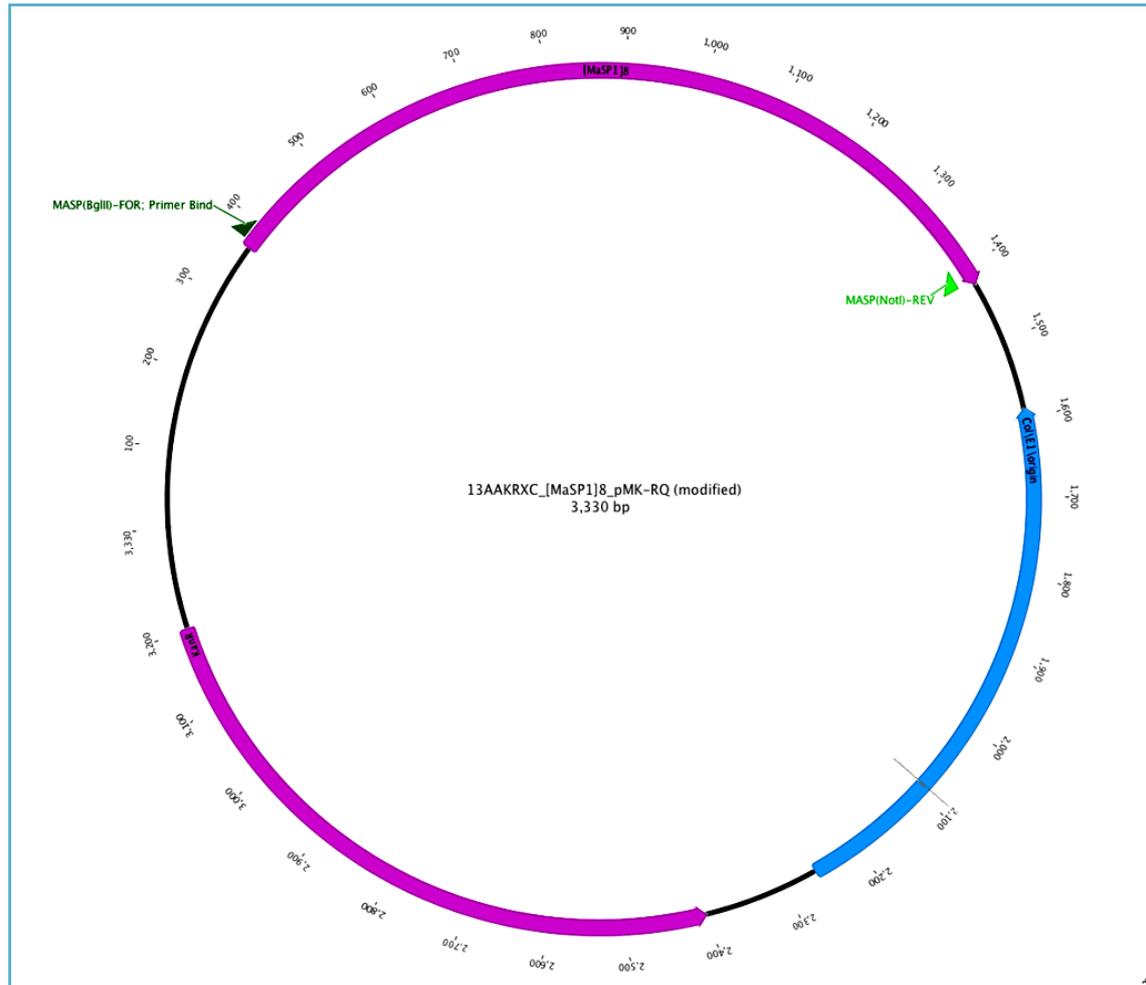


Figura 5 - Plasmídeo pMK-RQ. Em verde, indicadas as regiões de anelamento dos iniciadores, FOR (*Forward* ou senso) e REV (*Reverse* ou antisenso), usados para amplificar “[MaSP1]8” (em roxo, acima). Em azul, indicada a região de origem de replicação bacteriana do plasmídeo “ColE1\origin”; e a região de resistência à kanamicina (antibiótico) indicada em roxo, abaixo - “KanR”.

A partir da parametrização das melhores condições de amplificação, outra PCR foi realizada aumentando-se o volume de reação, para depois excisar a banda no gel referente ao fragmento MaSp. O programa da PCR utilizado foi o anteriormente otimizado e, para a eletroforese, todo o volume do amplificado foi adicionado em gel de agarose 1%, permitindo a obtenção e purificação da banda MaSp (1048 pb).

Com a banda excisada, prosseguiu-se o protocolo de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Invitrogen, Brasil). Depois de purificada a sequência, fez-se a quantificação em fluorímetro Qubit (Life Technologies, Brasil),

determinando assim a concentração do fragmento. Logo após as enzimas *Bgl*II (New England Biolabs Inc.) e *Not*I-HF (New England Biolabs Inc.) foram usadas para preparar o inserto para a ligação, fazendo a digestão a fim de deixar complementares os terminais MaSp e pSyn-psba2. A purificação e quantificação da restrição foram realizadas passadas três horas de reação.

3.1.2 Preparação do vetor

Para a construção, foi utilizado como base o plasmídeo pSyn-psba2-*green*, produzido anteriormente por BRUM (2014). Este plasmídeo (Figura 6) possui um sítio de recombinação homóloga, chamado sítio neutro 1 (NS1), o qual permite uma integração direcionada do transgene; além do promotor psba2 de *Synechocystis* sp. e um gene de resistência ao antibiótico espectinomicina, para a seleção das cepas transformadas.

Para a conclusão do plasmídeo de interesse pSyn-psba2-MaSp, foi preciso linearizar o plasmídeo pSyn-psba2-*green* retirando o fragmento *green* através de restrição pelas enzimas *Bam*HI-HF e *Not*I-HF, para a ligação do fragmento MaSp. Após três horas a 37 °C, a reação foi aplicada em gel de agarose 1%, como feito anteriormente em seguida da PCR do fragmento MaSp, para excisar a banda do gel, purificar e quantificar.

3.1.3 Ligação do inserto ao vetor

Devido ao fato de as enzimas *Bam*HI-HF e *Bgl*II-HF serem substituíveis uma pela outra, ou seja, resultam em terminais coesivos após o corte, foi possível usar as duas, uma para cada restrição, garantindo mesmo assim extremidades de corte que não prejudicariam a ligação.

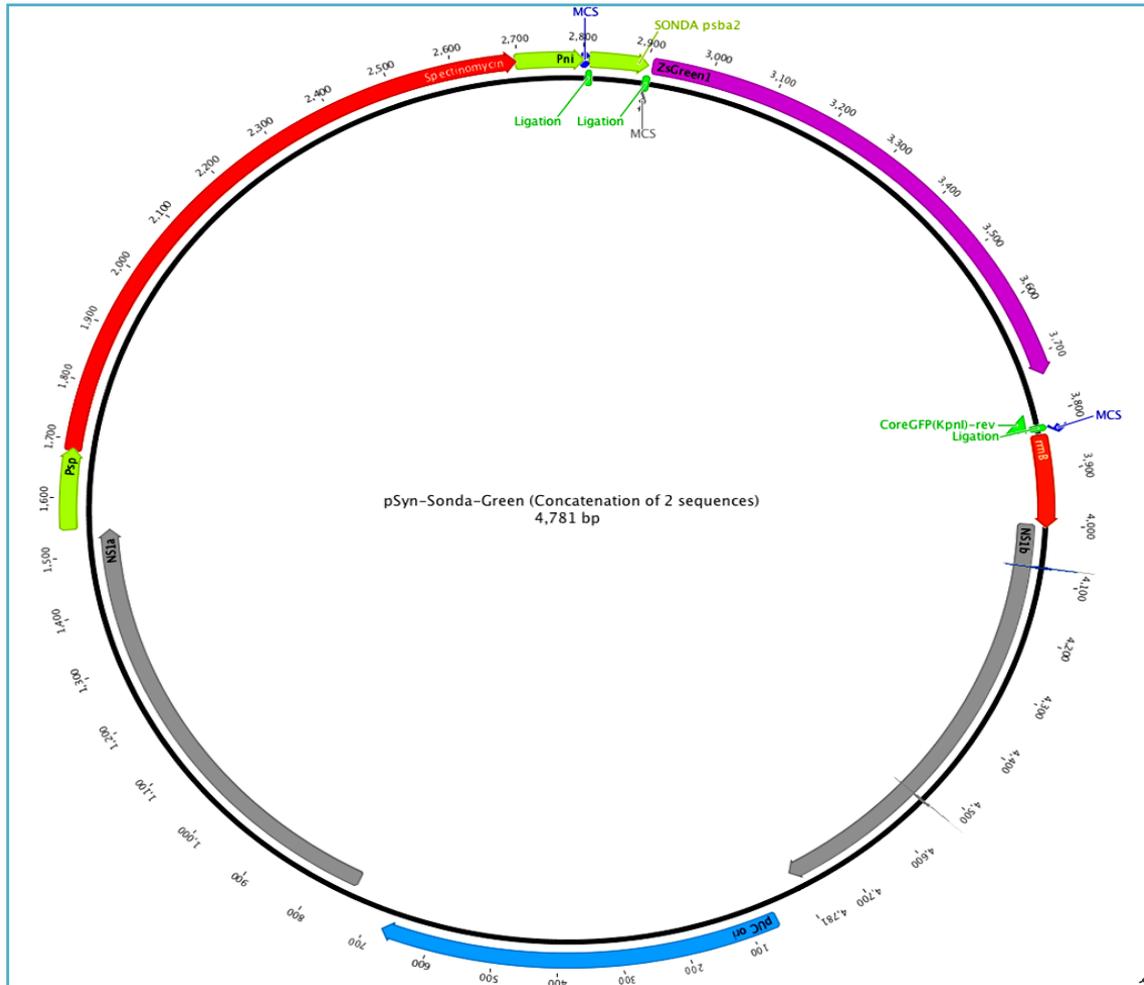


Figura 6 - Plasmídeo pSyn-psba2-green. “Spectinomycin” – gene de resistência à espectinomicina; “Pni+psba2” – promotor híbrido construído (BRUM, 2014) pela união de um promotor sensível a níquel (“Pni”, de *Synechocystis sp.*) com um promotor do fotossistema II envolvido na fotossíntese (“psba2”, também de *Synechocystis*); “ZsGreen1” – gene da proteína fluorescente green; “rnb” – região de terminação de transcrição; NS1a e NS1b – sítios também presentes no genoma de *S. elongatus* que orientam a recombinação homóloga do DNA contido entre os sítios neutros do vetor (CLERICO et al., 2007); “PUC ori” – permite a replicação do plasmídeo em muitas cópias; “Psp” – promotor do gene da espectinomicina.

Para a ligação dos fragmentos e formação do plasmídeo pSyn-psba2-MaSp, seguiu-se uma reação de 10 μ L, sendo 5 μ L (200 ng) de inserto (MaSp), 3,8 μ L (174 ng) de vetor (pSyn-psba2), 0,2 μ L (600 U) de T7 DNA ligase e 1 μ L do tampão específico para funcionamento da enzima. O microtubo contendo a ligação permaneceu na bancada por três horas a temperatura ambiente (~ 22 °C).

3.2 Transformação de *E. coli*

Com a ligação pSyn-psba2-MaSp pronta, o protocolo do kit *Eletrocomp* (Invitrogen) foi desempenhado em ordem a propagar o plasmídeo através da maquinaria celular da bactéria *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen, Brasil). Oitenta microlitros das células eletrocompetentes (*E. coli*) foram usados em cada tubo, em um sendo adicionado de 1 ng de pChlamy (controle positivo) e em outro adicionado de 3 µl da ligação.

Deixados os cultivos em contato com os vetores por um minuto, estes foram transferidos para cubetas de eletroporação e em seguida submetidos a corrente elétrica em equipamento eletroporador, a uma capacitância de 25 µF, resistência de 200 Ω e voltagem de 2500 V. Aplicada a corrente, imediatamente foram adicionados 480 µL de meio SOC às misturas, e estas foram então transferidas para tubos de 15 mL para incubação em agitador orbital (*shaker*) à 37 °C com agitação de 150 rpm durante uma hora e meia.

Concluído o tempo de incubação, os cultivos foram retirados do agitador e então plaqueados (100 µL por placa), a fim de se fazer a seleção das cepas transgênicas. As placas para o controle foram constituídas de meio LB-ágar (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e 15 g de ágar em 1 L de H₂O) adicionado de ampicilina (concentração final de 50 µg/mL), e para os possíveis transformantes do plasmídeo pSyn-psba2-MaSp, de LB + espectinomicina (concentração final de 100 µg/mL), de acordo com os genes de resistência presentes em cada plasmídeo; sendo deixadas sob incubação por cerca de 14 horas a 37 °C.

3.3 Extração plasmidial e prova de restrição

No dia seguinte à transformação, as placas que ficaram de um dia para o outro (*overnight*) na estufa foram observadas quanto ao crescimento de colônias e, após constatação das não fluorescentes em transluminador Safelmager (Invitrogen, Brasil) – pois há a possibilidade de algumas internalizarem plasmídeos que não foram cortados/ligados corretamente, permanecendo a porção *green* –, foram realizados cultivos líquidos em meio LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura,

10 g de NaCl em 1 L de H₂O) adicionado de espectinomicina (concentração final de 100 µg/mL) de 10 colônias selecionadas. Os cultivos permaneceram em agitador orbital com agitação de 150 rpm, a 37 °C por 14-16 horas.

Após o crescimento das colônias selecionadas em meio líquido, observou-se a turbidez dos meios para proceder a extração plasmidial daquelas colônias com crescimento satisfatório, utilizando-se o protocolo *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Health Care, Brasil). Os plasmídeos recuperados foram submetidos à restrição com as enzimas *EcoRI* e *NotI*-HF por 3 h a 37 °C, e posterior eletroforese, para verificar se o padrão de banda conferiria com o tamanho da sequência MaSp (1048 pb).

3.4 Clonagem do plasmídeo pSyn-psba2-MaSp

A fim de se ter uma quantidade (concentração) suficiente de plasmídeo para uma posterior transformação das cianobactérias, uma nova transformação de *E. coli* foi feita, apenas com aqueles plasmídeos que demonstraram padrões de corte corretos (possuíam bandas do tamanho da MaSp), provenientes das colônias classificadas como positivas. A transformação transcorreu como da primeira vez, seguidas as mesmas condições, ao fim provendo placas de bactérias específicas, contendo apenas plasmídeos sabidamente completos.

3.5 Cultivo e transformação das cianobactérias

O cultivo da cianobactéria *S. elongatus* cepa PCC 7942 se deu em estufa a 34 °C e luz constante, em meio líquido BG-11 (A1379901/A1379902 - Life Technologies, Brasil) suplementado com carbonato de cálcio (15 mM).

A fim de inserir o plasmídeo construído no organismo final de expressão, uma terceira transformação foi realizada. Essa transformação foi desempenhada baseada no protocolo *Transforming Synechococcus elongatus PCC 7942* (Invitrogen, Brasil). A medição da Densidade Óptica (OD₇₅₀) do cultivo da cianobactéria é o primeiro passo a se fazer. Em espectrofotômetro, a medição da absorbância de 1 mL do cultivo previamente preparado resultou em OD de 0,5. Como o protocolo recomenda

que se utilize OD₇₅₀ entre 1 e 2, foram usados 3 mL de cultivo para a transformação no lugar de 1,5 mL, como recomendado pelo fabricante.

Feitas duas centrifugações e ressuspensões consecutivas do pellet em meio líquido BG-11, 5,5 µL de pSyn-psba2-MaSp (equivalentes a 1 µg) foram adicionados aos cultivos, em modelo de triplicata, sendo três amostras tratamento (*Synechococcus* + pSyn-psba2-MaSp 1, 2 e 3) mais dois controles (*Synechococcus* sem plasmídeo e com antibiótico / *Synechococcus* sem plasmídeo e sem antibiótico) totalizando cinco casos.

A incubação dos cultivos se deu em tubos no equipamento de banho-maria, 4 h à 34 °C. Passado este período os cultivos foram retirados do banho e imediatamente plaqueados (100 µL) em placas de meio BG-11-ágar + espectinomicina (exceto no controle sem antibiótico) para então permanecerem de uma a duas semanas a temperatura ambiente para seleção (crescimento) das colônias transformadas.

3.6 Confirmação final das cianobactérias transformadas

Como prova substancial da eficiência da transformação das cianobactérias com o plasmídeo construído pSyn-psba2-MaSp, tem-se a PCR “de colônia” (*Colony PCR*). Ao utilizar um iniciador senso que se ligue no gene de resistência à espectinomicina, contido no plasmídeo pSyn-psba2-MaSp; e um iniciador antisenso que se ligue em uma região dentro do genoma da *S. elongatus* (na porção que antecede o sítio neutro NS1a), temos certeza de que o plasmídeo está integrado ao genoma, caso o resultado da PCR seja positivo (haverá amplificação de uma banda com tamanho de 1400 pb). As sequências de iniciadores utilizados foram S7942(REC)-FOR: TGCTGCGCGTAACATCGTTGCTGCT; e S7942(REC)-REV: ATGTGATCGGAACCCTGAGCCGT.

Para este procedimento, primeiramente foram repicadas dez colônias da placa de *S. elongatus* feita após a transformação, e cada uma foi posta em microtubo com 10 µL de água mili-Q. Destes 10 µL, 1 µL foi adicionado a 2 mL de meio BG-11 (para se ter cultivos simples) e os outros 9 µL foram aquecidos a 95 °C

por 5 minutos em termociclador, para que ocorresse a lise das células e liberação do DNA genômico para amplificação na PCR.

Na PCR propriamente dita, fez-se um mix para 12 amostras – as 10 colônias repicadas, 1 controle negativo e 1 positivo (amostras anteriormente já testadas), além do branco (controle habitual, sem DNA). Em termociclador, as amostras foram submetidas ao programa: 94 °C – 2', (94 °C – 30'', 58 °C – 30'', 72 °C – 1'30'')35x, 72 °C – 5'. Após duas horas e vinte minutos as amostras foram retiradas do aparelho, aplicadas em gel de agarose 1% e, feita a eletroforese, o gel foi observado em luz UV e então fotografado.

4. RESULTADOS

4.1 Construção genética e transformação bacteriana

A PCR teste indicou 58 °C como a melhor temperatura de anelamento para os iniciadores, e a amostra 50x diluída com a banda mais evidenciada, em 40 ciclos. A banda de 1048 pb (referente à sequência MaSp) do gel da segunda PCR performada (Figura 7) pôde ser cortada e purificada seguindo-se os protocolos, resultando em uma concentração final de 60 ng/μL, determinada pela quantificação.

A partir do gel da eletroforese da reação de restrição do pSyn-psba2-*green* (Figura 8), foi excisada a banda de tamanho 3900 pb, correspondente a fração pSyn-psba2 (o tamanho do plasmídeo completo pSyn-psba2-*green* era de 4781 pb), que foi purificada pelo mesmo protocolo usado para a obtenção do fragmento MaSp e também quantificada pelo protocolo já citado, demonstrando uma concentração de 34,8 ng/μL. Já para o produto MaSp não houve necessidade de eletroforese; após cortado, purificado e quantificado (40 ng/μL), já estaria pronto para a ligação com pSyn-psba2.

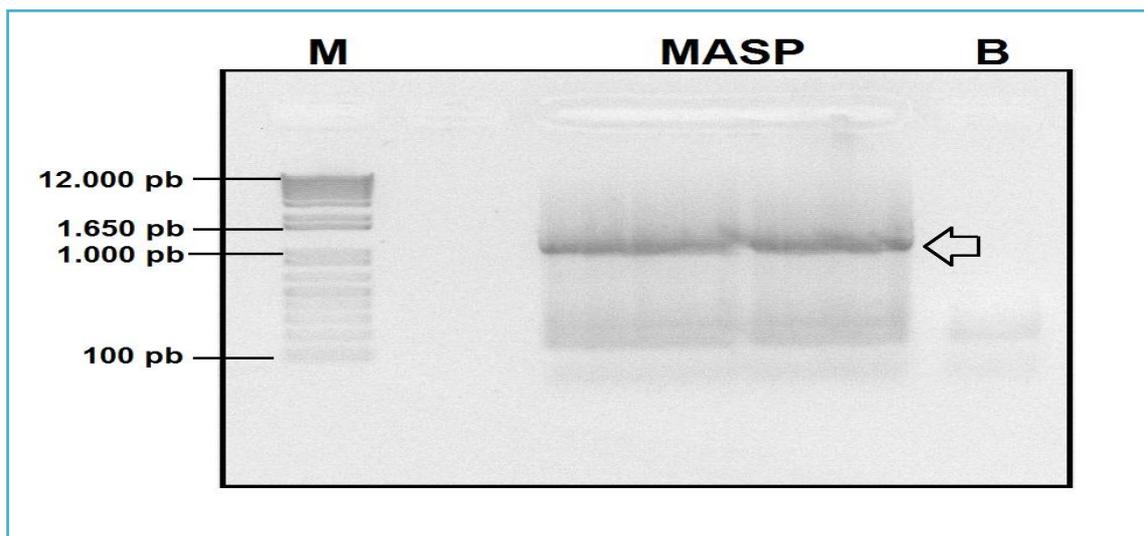


Figura 7 - Gel da PCR para extração da banda "MASP". Destaque pela seta para a banda MaSp, correspondente a 1048 pb, que foi excisada. M: marcador 1kb Plus com alguns tamanhos correspondentes de bandas; MaSp: reação de PCR; B: branco.

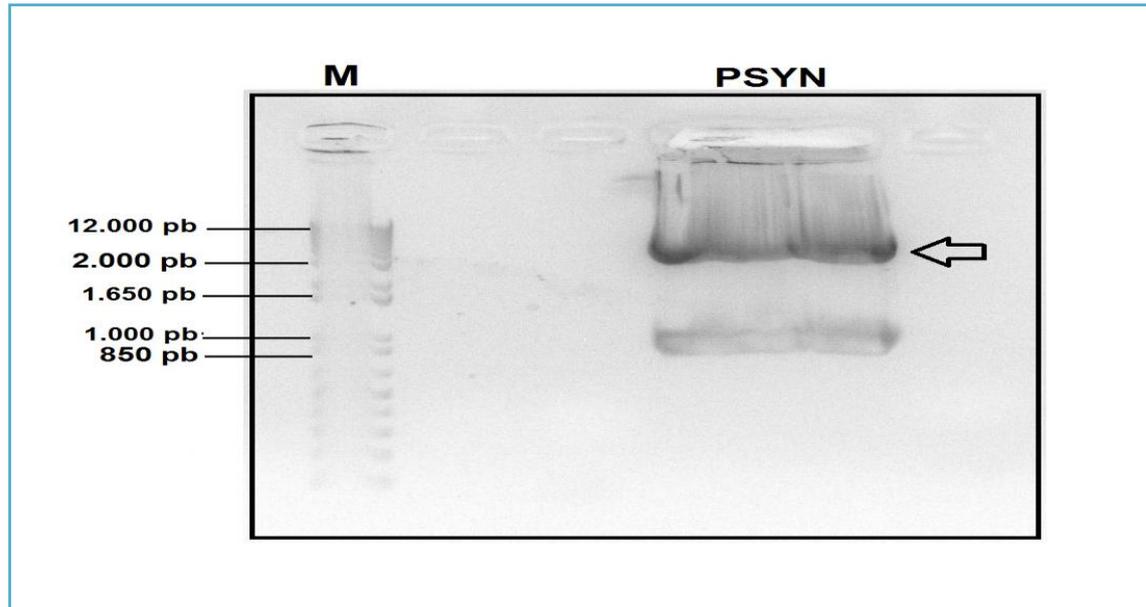


Figura 8 - Gel da PCR para extração da banda “PSYN”. Destaque pela seta para a banda “PSYN” (pSyn-psba2), correspondente a 3900 pb, que foi excisada. M: marcador 1kb Plus; PSYN: reação de restrição.

A Figura 9 demonstra o resultado final da construção, o plasmídeo pSyn-psba2-MaSp. Com 4984 pares de base resultantes, o plasmídeo final contém todos os elementos do vetor pSyn-psba2: promotor e gene de um antibiótico de seleção (espectinomicina), um promotor híbrido forte (feito pela ligação de dois tipos de promotores – Pni e psba2), origem de replicação, terminador de transcrição e os sítios neutros de recombinação (NS1a e NS1b); juntamente com o gene da proteína MaSp1, retirado do plasmídeo pMK-RQ.

Espera-se que, ao adentrar o genoma da *S. elongatus* através da recombinação homóloga mediada pelos sítios neutros, o plasmídeo pSyn-psba2-MaSp induza a produção da proteína MaSp através da forte ação do promotor Pni+psba2, e que as colônias transformadas possam se distinguir pela sua resistência à espectinomicina.

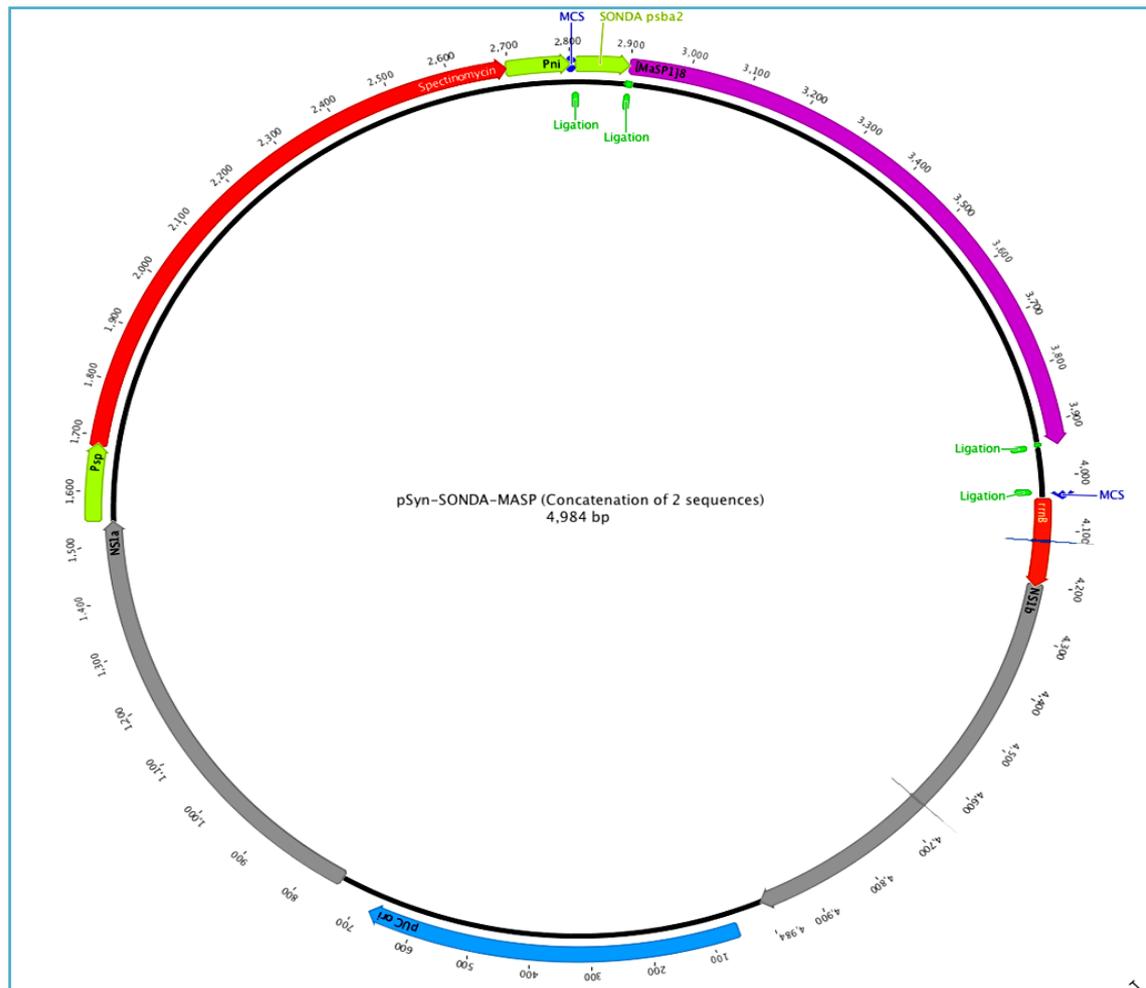


Figura 9 - Plasmídeo pSyn-psba2-MaSp. “[MaSP1]8” (em roxo, acima) – sequência inserida do gene MaSp; “Spectinomycin” – gene de resistência à espectinomicina; “Pni+psba2” – promotor híbrido; “rrnB” – região de terminação de transcrição; NS1a e NS1b – sítios para recombinação homóloga; “PUC ori” – origem de replicação; “Psp” – promotor do gene da espectinomicina.

Após o período de incubação da primeira transformação, todas as colônias crescidas seriam, a princípio, possuidoras do plasmídeo pSyn-psba2-MaSp por crescerem em meio com espectinomicina, já que a resistência é dada pelo plasmídeo (as não possuidoras do plasmídeo seriam inibidas pelo antibiótico). Entretanto, devido a falta de evidência da eficácia da ligação MaSp+pSyn-psba2, essa comprovação só seria constatada no momento da observação da placa com as colônias.

Como o gene de resistência está contido no plasmídeo pSyn-psba2-green, a substituição de green por MaSp não alteraria sua presença, fazendo-se assim

possível que, na placa de transformados, surgissem também colônias fluorescentes oriundas de plasmídeos mal cortados/ligados, já que estes também conferem resistência. Desta forma, uma confirmação das verdadeiras colônias transformadas foi feita através da observação da placa contra a luz ultravioleta. As colônias não fluorescentes foram marcadas para a extração plasmidial, e em relação a totalidade da placa corresponderam a uma pequena parcela.

4.2 Prova de restrição e clonagem do plasmídeo

Onze colônias foram selecionadas para cultivo, e procedidas as extrações plasmidiais. A Figura 10 é um gel pós-eletroforese ilustrando o padrão de banda que as colônias positivas demonstraram (1048 pb – referentes à MaSp).

Tendo constatado as colônias positivas pelas digestões dos plasmídeos recuperados, procedeu-se então a segunda transformação bacteriana. Essa transformação foi feita em ordem a se obter uma quantidade satisfatória de pSyn-psba2-MaSp, em placa individual. Da nova placa de bactérias assumidamente possuidoras da construção, foram repicadas colônias para se fazer cultivos em que se extraiu e estocou o plasmídeo em boa concentração.

4.3 Transformação da cianobactéria *S. elongatus* e PCR confirmatória

As placas de BG-11-ágar contendo as colônias de *S. elongatus* transformadas são referenciadas na Figura 11. Como suposto, todas as colônias testadas por PCR foram positivas, ou seja, amplificaram bandas de 1400 pb, provendo indícios de que possam ser produtoras da proteína MaSp1 (Figura 12). Ou seja: das 10 colônias de cianobactérias selecionadas da placa para crescimento em meio líquido, das quais se extraiu o DNA, em todas conseguiu-se amplificar o fragmento que confirma a integração do inserto no genoma da cianobactéria. O que permite essa afirmação é justamente o fato de o iniciador antisense anelar dentro do genoma da *S. elongatus*.

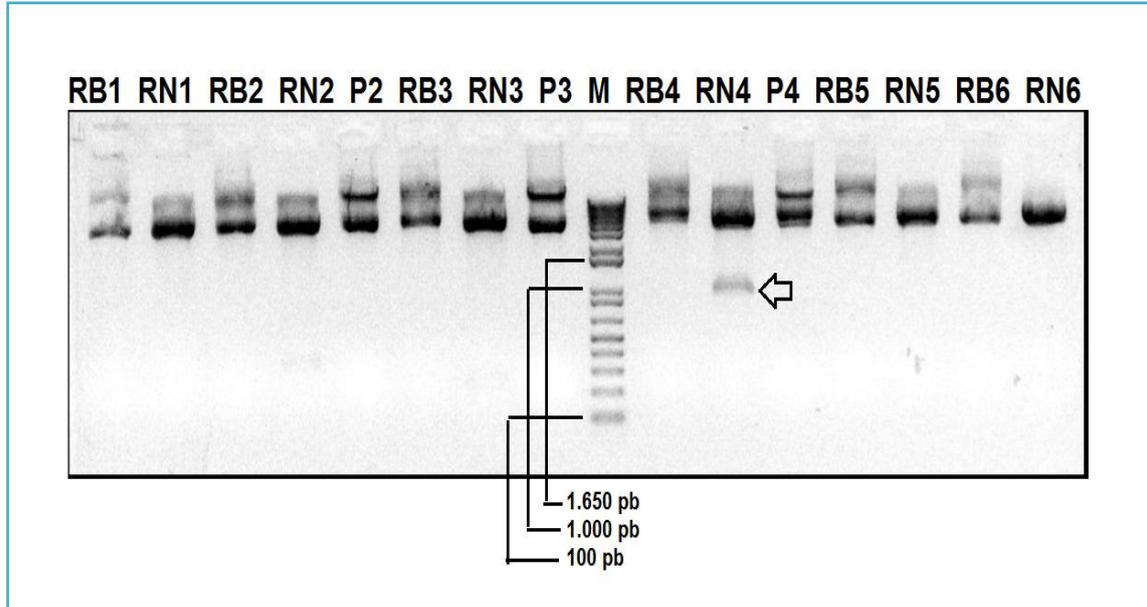


Figura 10 - Gel da restrição dos plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* recombinantes. A pretensão da restrição feita com *Bam*HI + *Eco*RI seria apenas linearizar o plasmídeo (já que o sítio de *Bam*HI foi perdido), enquanto que com *Eco*RI + *Not*I-HF seria cortar o plasmídeo nas regiões flangeantes à MaSp (resultando em uma banda de 1048 pb). A seta destaca a colônia positiva para pSyn-psba2-MaSp. RB1: restrição do plasmídeo da colônia 1 (1) com *Bam*HI + *Eco*RI; RN1: restrição de (1) com *Eco*RI + *Not*I-HF; RB2: restrição do plasmídeo da colônia 2 com *Bam*HI + *Eco*RI; RN2: restrição de (2) com *Eco*RI + *Not*I-HF; P2: plasmídeo fechado 2; RB3: restrição de (3) com *Bam*HI + *Eco*RI; RN3: restrição de (3) com *Eco*RI + *Not*I-HF; P3: plasmídeo fechado 3; M: marcador 1kb Plus; RB4: restrição de (4) com *Bam*HI + *Eco*RI; RN4: restrição de (4) com *Eco*RI + *Not*I-HF; P4: plasmídeo fechado 4; RB5: restrição de (5) com *Bam*HI + *Eco*RI; RN5: restrição de (5) com *Eco*RI + *Not*I-HF; RB6: restrição de (6) com *Bam*HI + *Eco*RI; RN6: restrição de (6) com *Eco*RI + *Not*I-HF.

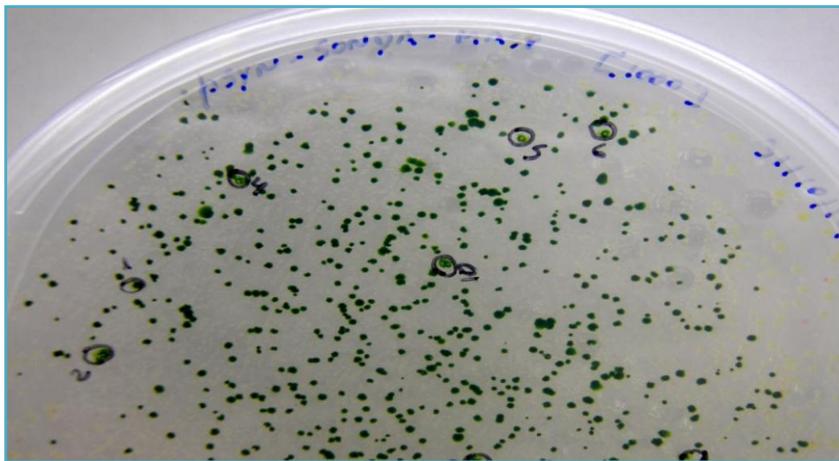


Figura 11 - Placa de cianobactérias transformadas.

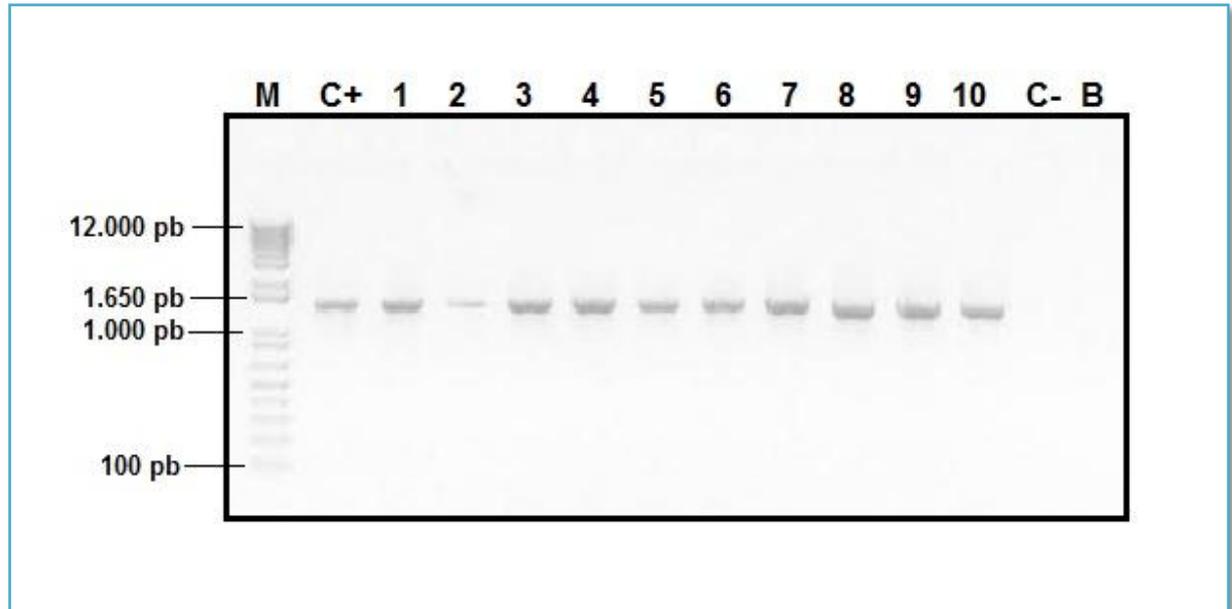


Figura 12 - Gel da PCR confirmatória da integração do pSyn-psba2-MaSp na *S. elongatus*. O tamanho do fragmento do marcador (1400 pb) foi atingido por todos os amplificados (amostras 1-10). M: marcador 1kb Plus; C+: controle positivo; 1-10: amplificados das colônias testadas; C-: controle negativo; B: branco (sem DNA).

5. DISCUSSÃO

O plasmídeo pSyn-psbA2-MaSp foi usado para transformar *E. coli*, tendo a transformação ocorrido com sucesso, fato que afirma o reconhecimento do promotor Pni+psbA2 pelo sistema de transcrição das bactérias. Shibato et al. (1998) já haviam constatado que o promotor psbA2 da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* é reconhecido pelas RNAs polimerases de *E. coli*, e ainda que a expressão direcionada pelo promotor seria constitutiva e independente da presença de luz no momento do cultivo das bactérias. Quando o mesmo plasmídeo foi utilizado para transformar *S. elongatus*, o crescimento de colônias em placas contendo espectinomicina foi o indício da ocorrência da transformação, não sendo observada nenhuma colônia nas placas das cianobactérias não transformadas, demonstrando a sensibilidade ao agente seletivo.

Acerca dos métodos para transformação, a eletroporação tem sido usada para muitas estirpes, mas é um procedimento que pode causar mutações. A conjugação (incubação) é o procedimento mais geral para transformar cianobactérias, e foi primeiramente descrito por Wolk e colaboradores (1984). O maior problema, nesse caso, é a presença de muitas enzimas de restrição em diversas espécies de cianobactérias (ex.: *Aval*, *AvaW*, and *Avalll*), por isso se o inserto contém sítios de reconhecimento de quaisquer destas enzimas, a eficiência de transformação é reduzida (VIOQUE, 2007).

A partir das colônias de cianobactérias resistentes ao antibiótico, foi feita PCR para confirmar a inserção do plasmídeo em seus genomas. De 11 colônias analisadas, 11 foram positivas para a integração, ou seja, 100% foram classificadas transgênicas. Isto é sustentável pelos dados de Chen (2013), o qual verificou uma transformação eficiente ao utilizar o plasmídeo pSyn_1.

A grande vantagem de se produzir proteínas em cianobactérias está relacionada ao seu cultivo, com a necessidade única de água, CO₂, luz e substâncias inorgânicas, existe a possibilidade do cultivo em larga escala em fotobiorreatores, além da utilização de meios eutrofizados e águas residuais. Outro ponto positivo é a presença de sítios neutros para recombinação no genoma de algumas espécies, como a *S. elongatus*. Além do sítio neutro 1 (NS1) usado neste estudo, há ainda a possibilidade de utilização de mais dois outros sítios (NS2 e

NS3), fazendo assim mais modificações genômicas e inserções gênicas de forma independente, como relatado por Niederholtmeyer (2010).

Contudo, foi constatado que a produção de seda de aranha em outros organismos gera stress celular, com aumento da tradução de proteínas relacionadas a stress e aumento da demanda de glicil-tRNAs, dado o alto conteúdo de glicina das proteínas da seda. Xia e colaboradores (2010) comprovaram essa hipótese e conseguiram aumentar a expressão de uma proteína de *N. clavipes* em *E. coli* através do aumento do pool de glicil-tRNAs por engenharia metabólica. Essas e outras questões relativas à expressão de sedas recombinantes em cianobactérias deverão ser esclarecidas em pesquisas futuras.

6. CONCLUSÃO

Com a finalização da construção genética pSyn-psba2-MaSp, pôde-se constatar sua inserção genômica no organismo *S. elongatus* PCC 7942, segundo os resultados da PCR.

Não existindo até a data na literatura trabalhos que relacionem as espécies aqui utilizadas – *N. clavipes* e *S. elongatus* –, tampouco que relatem produção de proteínas de aranha por cianobactérias, novos horizontes estão a surgir, e o sucesso da ideia das teias de aranha recombinantes provavelmente estará relacionado com estudos genéticos e estabelecimento de processos industriais em larga escala.

As cepas de *S. elongatus* ao final confirmaram sua transgenicidade. Passos futuros da pesquisa serão a obtenção de dados sobre a expressão da proteína MaSp, para determinar assim a eficiência das cianobactérias na produção.

Referências

- AN, B., HINMAN, M.B., HOLLAND, G.P., et al. Inducing β -sheets formation in synthetic spider silk fibers by aqueous post-spin stretching. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 2375–2381. 2011.
- ASK NATURE. Bacterial enzymes produce hydrocarbons: *Synechococcus elongatus* cyanobacteria. Disponível em: <<http://www.asknature.org/strategy/b0d3fbc913dffc72f1bcc77d266aab3a#.VH7TDvldWnY>>. Acesso em: 3 nov 2014.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; VASCONCELOS, V. “**Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública**”. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações*. Ed. Rima. 2006. p. 433-452.
- BECKER, E. W. Algae mass cultivation – production and utilization. **Process. Biochem.**, v. 16, n. 5, p. 10-14. 1981.
- BEER, L. L. et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, n.3, p.264-71, 2009.
- BENNEMANN, J. R. Microalgae products and production: an overview. **Dev. Ind. Microbiol.**, v. 31, p. 347-256. 1990.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R. Cianobactéria Invasora – Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindropermopsis raciborskii* no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 82-90. 2003.
- BRYSON, B. **Breve história de quase tudo**. Companhia das Letras, 2005. 544 p.
- BRUM, R. J. **Produção de uma construção genética contendo o promotor pbsA para expressão heteróloga em *Synechococcus elongatus***. 2014. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande.
- CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites - The Cyanotoxins. **Journal Applied of Bacteriology**, v. 72, p. 445-459. 1992.

CETINKAYA, M.; XIAO, S.; MARKERT, B.; et al. Silk Fiber Mechanics from Multiscale Force Distribution Analysis. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 5, p. 1298–1305. 2011.

CHEN, X. **Engineering heavy metal resistance in cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC794**. 2013. Thesis degree (Graduate College in Agricultural and Biological Engineering) - University of Illinois, Urbana-Champaign.

CIB. A biotecnologia, a sustentabilidade e a biodiversidade brasileira. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/biotecnologia_sustentabilidade_biodiversidade%20.pdf>. Acesso em: 12 nov 2014.

CLERICO, E. M.; DITTY, J. L.; GOLDEN, S. S. Specialized techniques for site-directed mutagenesis in cyanobacteria. **Methods Mol. Biol.**, v. 362, p. 155-171. 2007.

COX, M. M. Historical overview: searching for replication help in all of the rec places. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 98, p. 8173-8180. 2001.

DI BERNARDO, L.; DI BERNARDO, A; CENTURIONE-FILHO, P. L. **Ensaio de tratabilidade de água e dos resíduos gerados em estações de tratamento de água**. Rima, 2002. 237 p.

ECODEBATE. Cianobactérias: um panorama geral. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2011/10/28/cianobacterias-um-panorama-geral-artigo-de-fernanda-de-matos-campos-e-lourdes-maria-duarte/>>. Acesso em: 3 nov 2014.

EICHORN, S. E.; RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

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

FAHNESTOCK, S.R. & IRWIN, S.L. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 47, p. 23-32. 1997.

FAPESP. Teias de laboratório. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2014/02/12/teias-de-laboratorio/>>. Acesso em: 28 out 2014.

FERRO, E. S. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 109-121. 2010.

FOELIX, R. F. **Biology of Spiders**. Oxford: Oxford University Press, 1996. p. 330.

GOSLINE, J. M.; GUERETTE, P. A.; ORTLEPP, C. S.; et al. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. **J. Exp. Biol.**, v. 202, n. 23, p.3295-3303. 1999.

HAYASHI, C. Y.; LEWIS, R. V. 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. 1998.

HAYASHI, C. Y.; SHIPLEY, N. H.; LEWIS, R. V. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.24, n. 2, p. 271-275. 1999.

HIJIRIDA, D. H.; DO, K. G.; MICHAL, C.; et al. ¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 6, p. 3442–3447. 1996.

HU, X.; VASANTHAYADA, K.; KOHLER, K.; et al. Molecular mechanisms of spider silk. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 63, p. 1986–1999. 2006.

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

KYLE, D. Market applications for microalgae, **JAOCs**, v. 66, n. 5, p. 648-652. 1989.

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

LAZARIS, A.; ARCIDIACONO, S.; HUANG, Y.; et al. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. **Science**, v. 295, p. 472–476. 2002.

LEWIS, R. V. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 9, p. 3762-3774. 2006.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION©. **GeneArt® *Synechococcus* Engineering Kits For expression of recombinant proteins in *Synechococcus elongatus***. Catalog Numbers A14259, A14263. 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.; et al. **Brock Biología de los Microorganismos**. 10 ed. Pearson Educación, 2004. 1011 p.

MENEZES, G. M. **Investigações estruturais de fibra sintéticas de aranha produzidas por meio de expressão recombinante**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

MICROBE WIKI. *Synechococcus elongatus*. Disponível em: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Synechococcus_elongatus>. Acesso em: 3 nov 2014.

MISCHKE, U. Cyanobacteria associations in shallow polytrophic lakes: influence of environmental factors. **Acta Oecologica**, v. 24, p. 11–S23. 2003.

MOTOHASHI, T.; SHIMOJIMA, T.; FUCAGAWA, T.; et al. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 326, p. 564–569. 2005.

NADDAF, Y. G. **Análise proteômica de *Synechococcus leopoliensis* PCC7942 em resposta ao cádmio**. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

NCBI. Genome – *Synechococcus elongatus*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/430>>. Acesso em: 18 dez 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.

NIEDERHOLTMEYER, H.; WOLFSTADTER, B. T.; SAVAGE, D. F. et al. Engineering Cyanobacteria To Synthesize and Export Hydrophilic Products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3462–3466. 2010.

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, p.1605-1610. 2012.

OLIVEIRA, P. E. F. **Produção e Caracterização Molecular de Fibras Sintéticas das Aranhas *Parawixia bistriata* e *Nephilengys cruentata***. 2012. 83 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1895–1902. 2004.

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O.T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. **Methods Mol. Biol**, v. 267, p. 15-52. 2014.

PINOTTI, M.H.P.; SEGATO, R. Cianobactérias: importância econômica. **Semina**, v. 12, n. 4, p. 270-280. 1991.

RABOTYAGOVA, O.S.; CEBE, P., KAPLAN, D.L. Selfassembly of genetically engineered spider silk block copolymers. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 229–236. 2009.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; et al. Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Society for General Microbiology**, v. 111, p. 1–61. 1979.

SADAVA, D.; HELLER, C.; ORIAN, G.; et al. **Coleção Vida: A Ciência da Biologia**. 8ª ed. Artmed, 2009.

SCHEIBEL T.; BLOOM, J.; LINDQUIST, S. L. The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 8, p. 2287-92. 2004.

SHELLER, J.; GUHRS, K.H.; GROSSE, F.; et al. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. **Nat. Biotechnol.**, v. 19, p. 573–577. 2001.

SHESTAKOV, S. V.; REASTON, J. Gene-transfer and host vector systems of cyanobacteria. **Cell Biology**, v. 4, p. 137-166. 1987.

SHIBATO, J.; MUNEHIKO, A.; MAKOTO, S. et al. Specific recognition of the cyanobacterial psbA promoter by RNA polymerases containing principal sigma factors. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 296-303. 1998.

SILVA, L.P.; RECH, E.L. Unravelling the biodiversity of nanoscale signatures of spider silk fibres. **Nature Communications**. 2013.

SIQUEIRA, D. B.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, p. 109-127. 2004.

STANIER, R. Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 255–274. 1977.

SCIENCEBLOGS. A química supramolecular das aranhas. Disponível em: <http://scienceblogs.com.br/quimicaviva/2010/07/a_quimica_supramolecular_das_a/>. Acesso em: 28 out 2014.

TADASHI, M.; MAEZONO, Y.; SHIMAZAKI, A. Silk feeding as an alternative foraging tactic in a kleptoparasitic Spider under seasonally changing environments. **Journal of Zoology**, v. 262, n. 3, p. 225- 229. 2004.

TAMAGNINI, P.; LEITÃO, E.; OLIVEIA, P. **Biohidrogênio: produção de H₂ utilizando cianobactérias**. EMBRAPA – Boletim de Biotecnologia. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/bio3_000g7gq9ghm02wx5ok0wtedt3n4jlb3w.pdf>. Acesso em: 26 nov 2014.

TERMONIA, Y. Molecular Modeling of Spider Silk Elasticity. **Macromolecules**, v. 2, n. 25, p. 7378–7381. 1994.

TEULÉ, F.; ADDISON, B.; COOPER, A.R.; et al. Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. **Biopolymers**, v. 97, p. 418–431. 2012.

TEULÉ, F.; COOPER, A.R.; FURIN, W.A.; et al. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. **Nat. Protoc.**, v. 4, p. 341–355. 2009.

TOKAREVA, O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; RECH, E. L. Recombinant DNA production of spider silk proteins. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 651–663, 2013.

UNESP. O comportamento de construção de teias Parte A. Disponível em: <http://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/2_qualidade_vida_humana/Animais_dome sticos_sinatropicos/aranha/construcao_teias.htm>. Acesso em: 28 out 2014.

UOL Notícias Meio Ambiente. Biodiesel produzido por cianobactérias rende quase mil vezes mais do que o de milho, aponta pesquisa da USP. Disponível em: <<http://noticias.uol.com.br/meio-ambiente/ultimas-noticias/redacao/2013/03/02/biodiesel-produzido-por-cianobacterias-rende-quase-mil-litros-a-mais-do-que-o-de-milho-aponta-pesquisa-da-usp.htm>>. Acesso em: 29 out 2014.

VIOQUE, AGUSTÍN. Transformation of Cyanobacteria. In: LEÓN, R.; GALVÁN, A.; FERNÁNDEZ, E. **Transgenic Microalgae as Green Cell Factories**. New York: Landes Bioscience / Springer Science+Business Media, 2007. p. 12-23.

WANG, C.; PATWARDHAN, S.V.; BELTON, D.J.; et al. Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 9428–9433. 2006.

WATSON, J. D.; MYERS, R. M.; CAUDY, A. A.; et al. **DNA Recombinante**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 496p.

WETZEL, R. G. **Limnology**. 2 ed. BookDepart: Shepherdstown, 1983.

WILLIAMS, D. Sows' ears, silk purses and goats' milk: new production methods and medical applications for silk. **Med. Device Technol.**, v. 14, p. 9–11. 2003.

WOLK C.P.; VONSHAK, A.; KEHOE, P.; et al. Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p. 1561-1565. 1984.

XIA, X.; QIAN, Z.; KI, C. S.; et al. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. **PNAS**, v. 107, n. 32, p. 14059-14063. 2010.

XU, H.T.; FAN, B.L.; YU, S.Y.; et al. Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. **Anim. Biotechnol.**, v. 18, p. 1–12. 2007.

XU, M. & LEWIS, R.V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 7120-7124. 1990.