

# Més resistent que l'acer i més flexible que el niló

---



**Disseny de una estructura molecular amb millors propietats mecàniques que la teranyina mitjançant càlculs de química computacional**

---

<sup>1</sup> IMATGE PRÒPIA

## RESUM

La investigació, disseny d'una estructura proteica amb més resistència que la teranyina, ha sigut el puntal d'aquesta monografia. En concret, el treball s'ha fet mitjançant el programa informàtic Chimera que és de la UCSF (Universitat de Califòrnia San Francisco).

L'objectiu principal d'aquest projecte és millorar les propietats mecàniques de la teranyina mitjançant la fixació d'àtoms de ferro. Però per fer-ho primer vaig estudiar de on li vénen aquestes propietats mecàniques tan sorprenents, com ara la resistència, la flexibilitat, duresa i rigidesa.

Per tant, m'interessava calcular l'energia mínima de la proteïna de la seda d'aranya sense àtoms de ferro i llavors, amb àtoms de ferro. Una vegada calculada la energia mínima amb l'optimització del Chimera, la he dividit pel nombre d'àtoms de cada proteïna i així he calculat la densitat d'energia atòmica, que és un bon indicador de la resistència de forma computacional.

Posteriorment he realitzat comparacions de l'energia de les proteïnes sense àtoms metàl·lics i les que havia àtoms de metall mitjançant els valors de densitat d'energia atòmica. Segons la meua hipòtesi inicial, la resistència augmenta afegint àtoms de ferro a l'estructura i per veure que si és cert, he comparat els valors per veure quin era el més petit, perquè el menor és el que té menys energia, més estabilitat i per tant més resistència.

Com a conclusió de la monografia, la proteïna amb àtoms de ferro és més resistent. Però he deixat oberta la investigació de les propietats de flexibilitat, rigidesa, duresa... així que un altre investigador algun dia pugui acabar la feina i sintetitzar una teranyina més resistent i elàstica que la seda d'aranya original.

## ÍNDIX

0. Introducció.....	pàgina 4
1. La <i>Nephila clavipes</i> .....	pàgina 5
2. La teranyina: composició química y secreció.....	pàgines 6- 13
3. Característiques de la teranyina.....	pàgines 13-20
4. Disseny virtual d'una estructura molecular de major resistència i flexibilitat que la natural de la seda d'aranya mitjançant química computacional ...	pàgines 21- 29
5. Conclusions .....	pàgines 29-30
6. Apèndix .....	pàgines 30- 37
6.1 Síntesis artificial de la teranyina .....	pàgines 30-33
6.2 Evolució de la teranyina .....	pàgines 33 -34
6.3 Efectes del agua a la teranyina .....	pàgina 34
6.4 La secreció de la teranyina.....	pàgines 34-36
6.5 Estructures proteiques .....	pàgines 36- 37
7. Bibliografia .....	pàgines 37-38

## 0. INTRODUCCIÓ

Atès que des de l'origen de la humanitat s'ha observat la natura per inspirar-nos en tot tipus de camps del coneixement: màquines, teixits, obtenció d'energia... Per exemple, l'avió va ser inspirat per les aus i les vespes, el panell solar per les plantes, etc. Per tant, amb les teranyines passa el mateix, moltes universitats i centres de recerca estan investigant-la per la seva increïble resistència, flexibilitat i propietats de l'absorció de gran quantitat d'energia sense trencar-se. Com Marcus Behuler del MIT o altres centres importants.

Com a conseqüència les seves propietats, les seves aplicacions van des de l'àmbit de la regeneració d'òrgans a compreses protectores. Ja que amb la seva biocompatibilitat i les altres propietats esmentades anteriorment, la teranyina es pot utilitzar per a la regeneració de teixits i òrgans, com a mètode quirúrgic o protecció (para-xocs i armilles antibales), etc. A més de millorar els teixits existents donant-los una major resistència o elasticitat.

Tot i així, ningú ha sintetitzat un teixit artificial semblant a la teranyina i, en conseqüència, hi ha molta gent dedicada a estudiar l'aranya, la causa de la de seva propietat... I, per aquest motiu, he fet el treball de recerca sobre aquest tema, per tal que altres persones puguin millorar les propietats mecàniques del teixit a partir del meu model i sintetitzar-ho artificialment.

## 1. LA NEPHILA CLAVIPES

La *Nephila clavipes* és una espècie d'aranyes coneguda com les aranyes de seda d'or a causa del color de la seva tela, com es veu en la imatge. El seu hàbitat natural és en el Nord i Sud-Amèrica. Aquesta espècie és la més estudiada per la resistència de la tela i la seva flexibilitat. Per aquest motiu m'he basat en les proteïnes d'aquesta aranya en la meua monografia. Recentment, aquesta seda també ha estat estudiada per avaluar la seva utilitat en la millora quirúrgica en regeneració neuronal dels mamífers. En experiments in vitro es va mostrar que aquesta seda pot portar una neurona tallada a través del cos al lloc on es va tallar, i la seda no provoca cap reacció al sistema i per tant no és rebutjada pel cos de l'hoste.



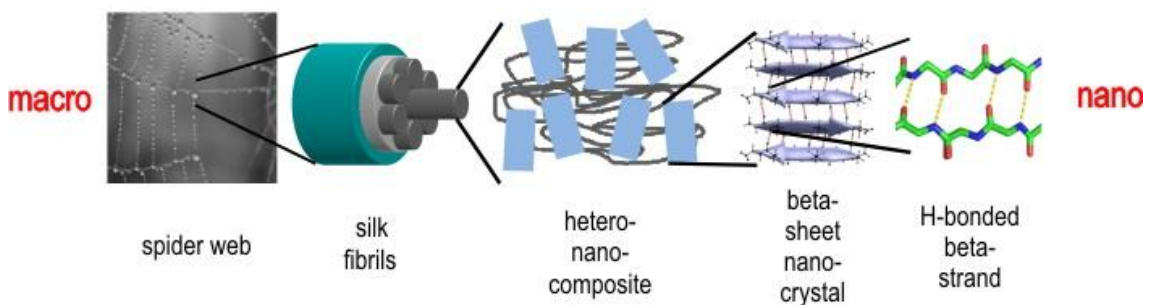
<sup>2</sup> Figura 1: Aranya *Nephila clavipes* en la seva tela.

---

<sup>2</sup> <http://www.asergeev.com/pictures/archives/compress/2005/462/20x.htm>

## 2. LA TERANYINA : COMPOSICIÓ QUÍMICA Y SECRECCIÓ

La química i la química computacional són essencials per entendre l'origen de les propietats sorprenents de teranyines, com ara la seva resistència i flexibilitat. I, l'estructura primària de les proteïnes, que consisteix en la seqüència lineal d'aminoàcids, descriu l'especificitat química d'interaccions moleculars, ocasionant no molt bones propietats al material. Però, la teranyina és un material que supera quasi totes les fibres sintètiques en resistència i flexibilitat. L'explicació d'aquest fenomen és l'estructura secundària de les proteïnes que es troben en unitats repetides a la tela d'aranya, que és mostra en la figura 2.



<sup>3</sup>Figura 2: composició de la tela d'aranya.

Aquesta imatge mostra la teranyina a diferents nivells de macro a micro. I, en la tercera imatge de la figura 2, veiem  $\beta$  - fulles (estructura secundària) de nano cristalls de les regions riques d'alanina que s'insereixen en una matriu de proteïnes semi-amorfes de les regions riques en glicina:

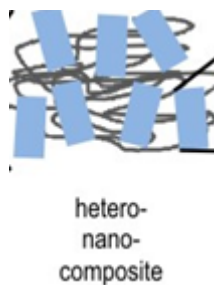


Figura 3: matriu semi amorfa amb nano cristalls de beta làmina (imatge retallada de la anterior).

<sup>3</sup> <http://web.mit.edu/mbuehler/www/research/f105.jpg>

Els estudis sobre la composició química de la teranyina han buscat les parts que tenen en comú totes les teranyines, que són les parts que donen resistència i flexibilitat. El resultat d'aquests estudis és que hi ha dues proteïnes amb poca variació entre les espècies que constitueixen fonamentalment la teranyina: MaSp1 y MaSp2.

En la teranyina de la *Nephila clavipes*, la teranyina més estudiada del món, MaSp1 conté zones riques de glicina repetida es (Gly o G): Gly – Gly – X seguides de GA y dominis de poli-alanina (Ala o A). On X usualment és alanina, tirosina, leucina o glutamina. Per altre part, MaSp2 conté també dominis de poli-alanina, i una unitat molt repetida composta de GPGQQ o GPGGY.

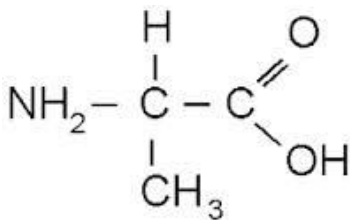
Un tros de la seqüència de MaSp1 de la *Nephila clavipes* és: GGAGQGGYGGLGSQGAGRGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYGGLGSQGAGRGL GGQGAG.<sup>4</sup>

Un tros de la seqüència de MaSp2 és:

GPGQQGPGGYGPGQQGPGGYGPGQQGPSGPGSAAAAAAAAAGPGQQGPGGYGPGQQG PGQQGPSGPGS.<sup>4</sup>

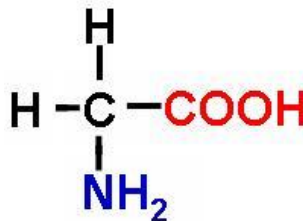
On:

A= alanina
G=glicina
L= leucina
Q= glutamina
R= arginina
S= serina
Y= tirosina



alanina

5



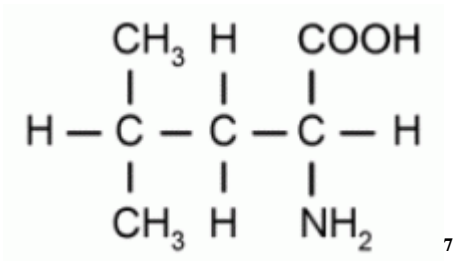
Glicina

6

<sup>4</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2988266/>

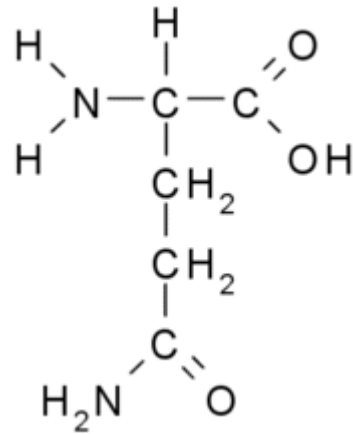
<sup>5</sup> <http://www.luenticus.org/articulos/02BdD001/index.html>

<sup>6</sup> <http://www.ecured.cu/index.php/Glicina>



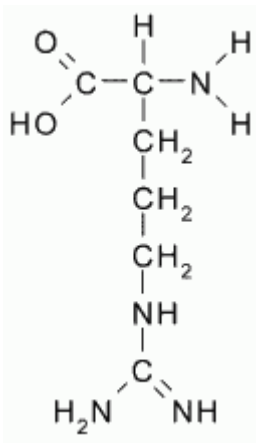
7

leucina



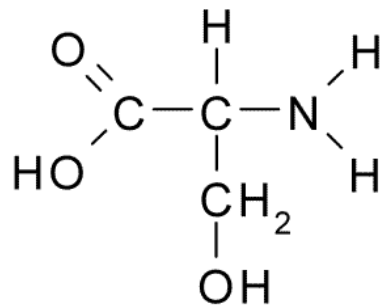
8

glutamina



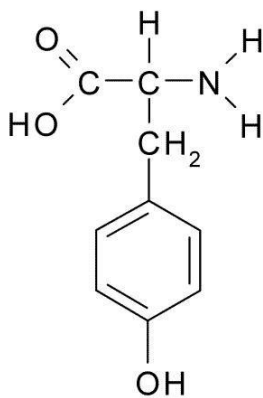
9

arginina



10

serina



11

tirosina

<sup>7</sup> <http://www.rdnatural.es/plantas-y-nutrientes-para-el-organismo/aminoacidos/leucina/>

<sup>8</sup> [http://www.ecured.cu/images/4/40/Struc\\_gluta\\_fuente\\_1.png](http://www.ecured.cu/images/4/40/Struc_gluta_fuente_1.png)

<sup>9</sup> <http://www.rdnatural.es/plantas-y-nutrientes-para-el-organismo/aminoacidos/arginina/>

<sup>10</sup> [http://www.explicatorium.com/quimica/Aminoacido\\_Serina.php](http://www.explicatorium.com/quimica/Aminoacido_Serina.php)

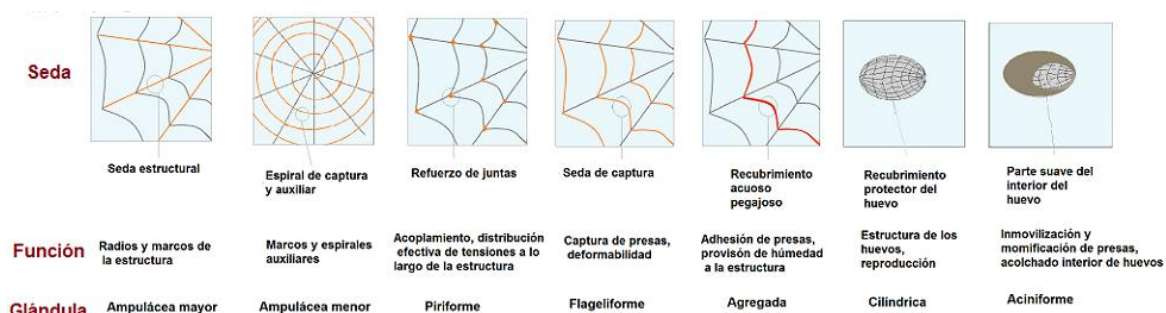
<sup>11</sup> <http://spanish.alibaba.com/product-free/l-tyrosine-106785286.html>



Per tenir el fil amb aquestes proteïnes específiques les aranyes fan el procés de segregació del fil. Les aranyes tenen set glàndules especialitzades que fan sedes amb diferents composicions d'aminoàcids. Els aminoàcids conformen les proteïnes, i les proteïnes defineixen les propietats mecàniques de la seda. Per això, les aranyes utilitzen sedes de diferents glàndules per realitzar diverses funcions:

Type of silk	Gland	Spinneret	Function of the silk
Dragline	Major ampullate	Anterior	Orb web frame, radii, safety line
Viscid	Flagelliform	Posterior	Prey capture, core fibers of adhesive spiral
Glue-like	Aggregate	Anterior and Posterior	Prey capture, adhesive silk of spiral
Minor ampullate	Minor ampullate	Medial	Orb web frame reinforcement
Cocoon	Tubuliform	Posterior	Reproduction
Wrapping	Aciniform	Anterior	Attachment disk and joining fibers
Attachment	Pyriform	Anterior	Attachment disk and joining fibers

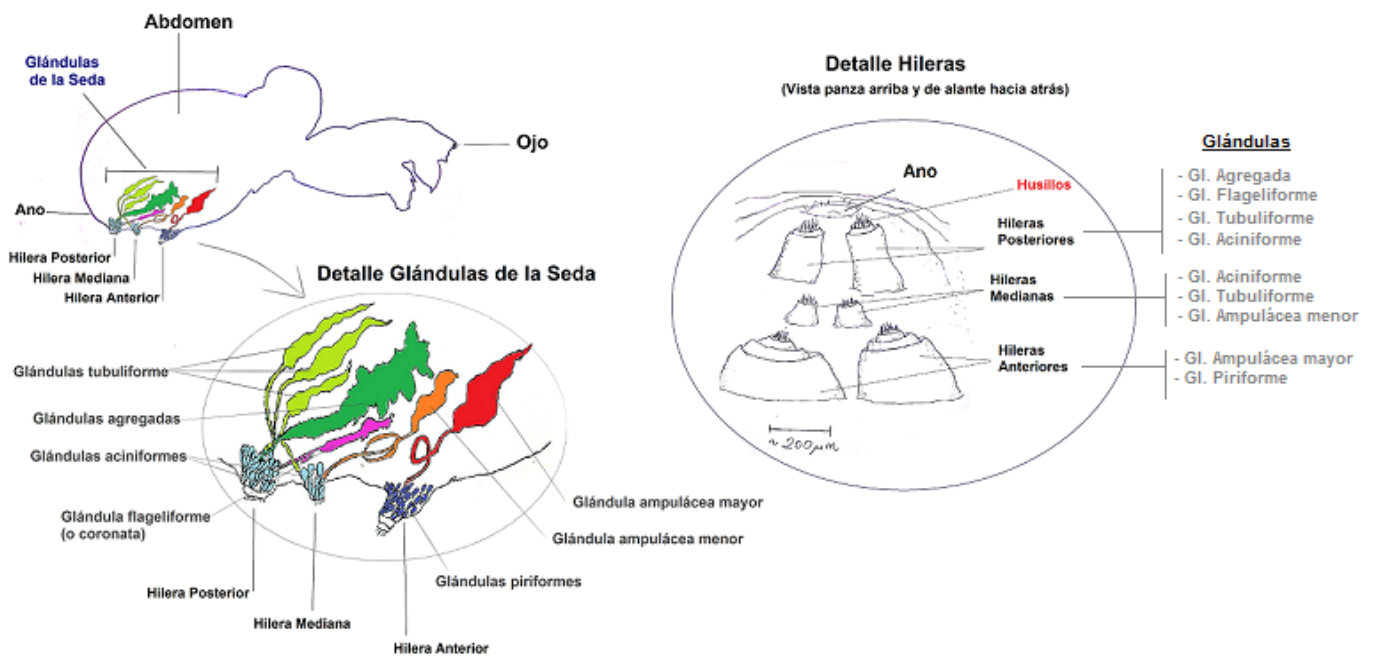
<sup>12</sup> Taula 1: Resum de les sedes, les seves funcions, i les glàndules d'origen per la *Nephila clavipes*.



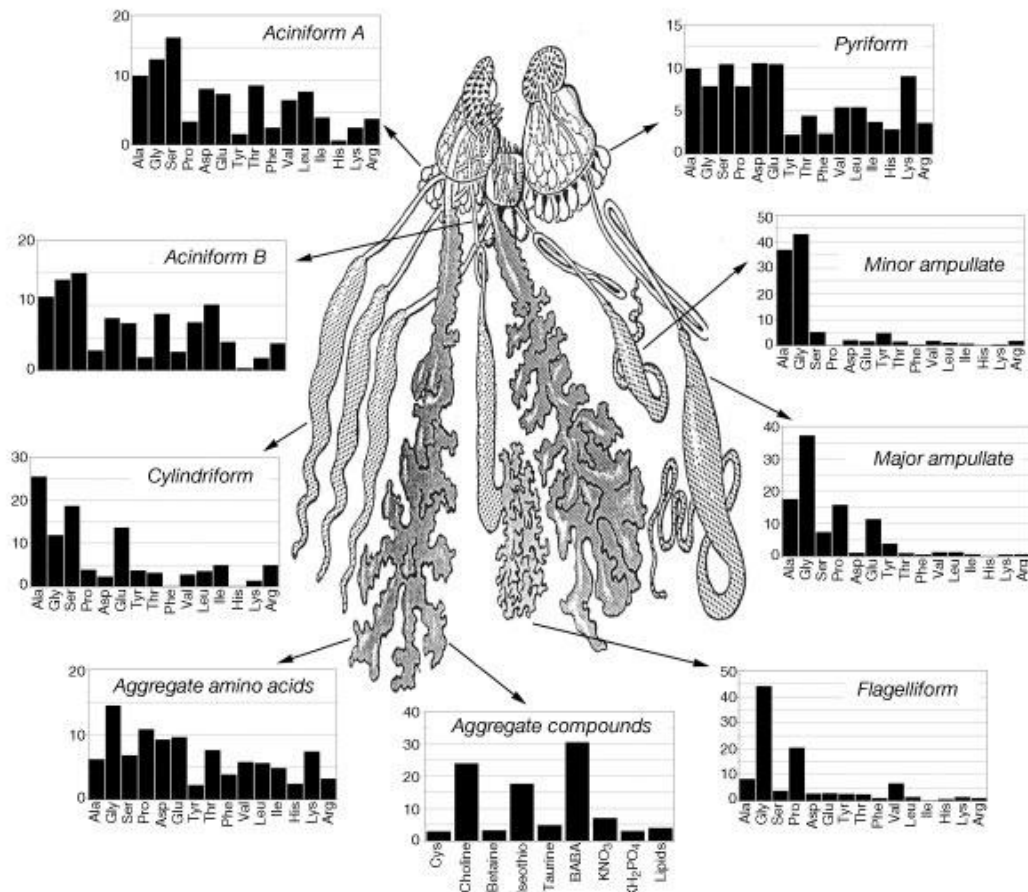
<sup>13</sup> Figura 4: glàndules i funcions de les diferents sedes per la *Nephila clavipes*.

<sup>12</sup> <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/07/07H157/t2.pdf>

<sup>13</sup> [http://es.wikipedia.org/wiki/Seda\\_de\\_ara%C3%B1a#mediaviewer/Archivo:Esquema-sedas-horizontal-peqb.png](http://es.wikipedia.org/wiki/Seda_de_ara%C3%B1a#mediaviewer/Archivo:Esquema-sedas-horizontal-peqb.png)



<sup>14</sup>Figura 5: tipus de glàndules de les aranyes.



<sup>15</sup>Figura 6: glàndules i la composició química de la seva seda.

<sup>14</sup> [http://es.wikipedia.org/wiki/Seda\\_de\\_ara%C3%B1a#mediaviewer/Archivo:Ara%C3%B1a-peqc.png](http://es.wikipedia.org/wiki/Seda_de_ara%C3%B1a#mediaviewer/Archivo:Ara%C3%B1a-peqc.png)

## Spider Silks and their Natural Functions in Cob weavers

<u>Silk Gland</u>	<u>Location of Silk</u>	<u>Fiber Proteins</u>
Major ampullate	Web frame, safety line (dragline)	MaSp1; MaSp2
Minor ampullate	Web reinforcement , safety line (dragline)	MiSp1-like
Flagelliform	Spiral capture silk*	Flag*
Aciniform	Wrapping silk, small diameter egg case fiber	AcSp1-like
Tubuliform	Large diameter egg case fiber	TuSp1; ECP-1; ECP-2
Aggregate	Glue coating for gumfooted lines	Unknown
Pyriiform	Attachment disk and joining fiber	PySp1

<sup>16</sup> *Taula 2: glàndules i les proteïnes de la seva seda*

En les diferents imatges que he posat es veuen les diferents glàndules, el tipus de seda que fan i les seves funcions.

Tot el procés de secreció està explicat als apèndix, però abans que la teranyina sigui expulsada, aquesta passa a través d'un conducte llarg y estret, on el cisallament del fluid obliga a les cadenes de proteïnes a estendre's en la direcció del flux. Això les empeny més properes una de les altres. Aquest procés augmenta la concentració (dissolució sobresaturada). Quan la seda és expulsada, la sobresaturació augmenta ràpidament amb l'evaporació i això indueix la nucleació de les cadenes de proteïnes. La força motriu de la nucleació de noves fases (cristalls) és  $\Delta\mu$  i es defineix com la diferència entre el potencial químic inicial  $\mu$  i  $\mu$  de la fase cristal·lina. La força motriu de la nucleació en termes de sobresaturació  $\sigma$  es defineix per:

$$\Delta\mu = kT \ln (1 + \sigma)^{17}$$

On  $k$  i  $T$  representen la constant de Boltzman i la temperatura,  $\sigma = \frac{C_i - C_i^{eq}}{C_i^{eq}}$   $C_i$  i  $C_i^{eq}$  representen les concentracions de soluts i el equilibri de concentracions de solut, i  $\sigma$  defineix la taxa d'evaporació quan la seda és expulsada. A altes velocitats la seda és expulsada més ràpidament, per tant  $\sigma$  és més gran. La força motriu determina el radi del nucli crític:

<sup>15</sup> <http://www.nature.com/nature/journal/v410/n6828/full/410541a0.html>

<sup>16</sup> <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/16711.pdf>

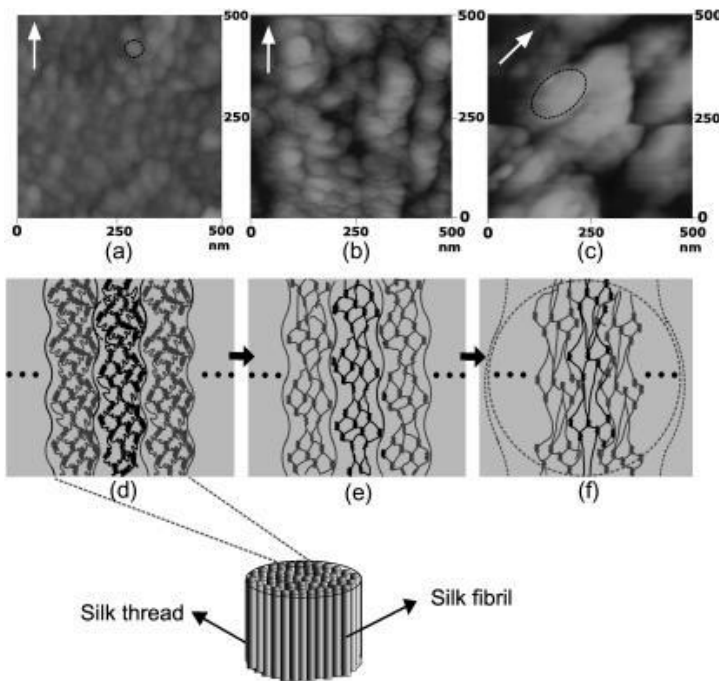
<sup>17</sup>

[https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fvenables.asu.edu%2Fgrad%2FLectures%2FJVAzNanoTechClust10.ppt&ei=oNujVLSmOs3oaty3gMAE&usg=AFQjCNG95VVvt3gMHNETjDVmc0pjJuAhgA&sig2=UMnWmf\\_hOYV97NlrAauDZg](https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fvenables.asu.edu%2Fgrad%2FLectures%2FJVAzNanoTechClust10.ppt&ei=oNujVLSmOs3oaty3gMAE&usg=AFQjCNG95VVvt3gMHNETjDVmc0pjJuAhgA&sig2=UMnWmf_hOYV97NlrAauDZg)

$$r \propto \frac{1}{\Delta\mu} = \frac{1}{kT \ln(1 + \sigma)}^{18}$$

Per tant, la mida del cristall es en proporció inversa amb  $\ln(1 + \sigma)$ . Per aquest motiu, a major velocitat de bobinatge els cristalls són més petits.

Com que les fibres de seda d'aranya no són només nano-cristalls de fulla  $\beta$ , l'orientació dels cristalls que forma les fibres i la distància intercrystalitzada també són propietats importants. Ambdós depenen de la velocitat de bobinatge. Quan la velocitat de bobinatge és més gran, l'orientació dels cristalls al llarg de l'eix és millor. Per la distància intercrystalitzada podem observar dues direccions diferents - equatorial i meridional. De la mateixa manera, la distància intercrystalitzada és menor si la velocitat de bobinatge és més petita. Quan augmenta la velocitat de bobinatge, la distància és més llarga. Quan s'arriba a la velocitat de bobinatge natural de l'aranya (10-20 mm), l'orientació dels cristalls arriba a un valor d'equilibri i també la mida del cristall arriba al seu valor més petit. També, a aquesta velocitat de bobinatge el mòdul de Young i el límit elàstic arriben als valors màxims i es millora la tensió de ruptura.



<sup>19</sup> Figura 7: Imatge topogràfica de la AFM de la seda de *N. clavipes* a diferents velocitats de bobinatge i el model proposat per a la corresponent variació en l'estructura amb les diferents velocitats de bobinatge: (a) a  $2.5 \text{ mms}^{-1}$ , (b) a  $25 \text{ mms}^{-1}$  y (c) a  $100 \text{ mms}^{-1}$ . La direcció del

18

[https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fvenables.asu.edu%2Fgrad%2FLectures%2FJVAzNanoTechClust10.ppt&ei=oNujVLSmOs3oaty3gMAE&usg=AFQjCNG95VVvt3gMHNETjDVMc0pjJuAhgA&sig2=UMnWMf\\_hOYV97NlrAauDZg](https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fvenables.asu.edu%2Fgrad%2FLectures%2FJVAzNanoTechClust10.ppt&ei=oNujVLSmOs3oaty3gMAE&usg=AFQjCNG95VVvt3gMHNETjDVMc0pjJuAhgA&sig2=UMnWMf_hOYV97NlrAauDZg)

<sup>19</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779941/figure/fig7/>

*fil és indicat per la fletxa. (d) A una baixa velocitat de bobinatge ( $< 2 \text{ mms}^{-1}$ ) no esta tan ben orientat i les cadenes amorfes estan relaxades. (e) Amb més velocitat de bobinatge, els cristalls són més petits i estan més ben orientats. La distància intercrystalitzada és més llarg (f). Amb encara més velocitat ( $>10 \text{ mms}^{-1}$ ) les nano fibres són més a prop. S'observa la mida de les partícules, que està indicada per un cercle de traços, que esdevé més gran, així que la distància entre els nano cristalls es torna més petita.*

Tots aquests controls geomètrics, que es poden controlar fàcilment amb només la velocitat de bobinatge, depenen de l'estructura i composició de la seda. A més, l'estructura natural està dissenyada per tenir les millors propietats mecàniques. Tot i així, les aranyes poden controlar aquestes propietats i obtenir el tipus de seda desitjada.

### **3. CARACTERÍSTIQUES DE LA TERANYINA**

La teranyina és un teixit sorprenent pel que fa a les seves propietats mecàniques: resistència, duresa, rigidesa i elasticitat. Per començar, s'ha de tenir molt clares les definicions dels conceptes:

La elasticitat (*elasticity*) és la capacitat que té un material per tornar a la seva posició inicial després de ser deformat.

La resistència (*strength*) és la resistència que ofereix un material quan està sotmès a una càrrega externa.

La rigidesa (*stiffness*) és la resistència a la desviació que ofereix un material.

La duresa (*toughness*) és la quantitat màxima de energia que pot absorbir el material abans de trencar-se.

Fiber Type	Density (g/cm <sup>3</sup> )	Strength $\sigma_R$ (GPa)	Elasticity $\epsilon_R$ (%)	Toughness (MJ/m <sup>3</sup> )	Stiffness (GPa)
<b>Spider Silk</b>					
<i>Araneus MA silk</i>	1.3	1.1	27	160	10
<i>Nephila clavipes</i>	1.3	1.3	12	80	22
<i>Araneus viscid silk</i>	1.3	0.5	270	150	0.003
<b>Silkworm silk</b>					
<i>Bombyx mori</i>	1.3	0.6	18	70	7
Nylon 6.6	1.1	0.95	18	80	5
Kevlar 49	1.4	3.6	2.7	50	130
carbon fibre	1.6	4	1.3	25	300
Steel	7.8	1.5	0.8	6	200
Syntethic rubber	1.2	0.05	850	100	0.001

<sup>20</sup>Taula 3: Propietats mecàniques de la teranyina i altres materials.

Mirant bé a la taula 2, podem veure que la teranyina de la *Araneus* és molt elàstica, que es trenca al 27% de la seva longitud inicial, mentre que els materials pertanyents a l'enginyeria (kevlar, fibra de carboni i acer) es trenquen entre el 1 i 3 per cent. La gran elasticitat de la seda MA, malgrat la seva resistència una mica inferior, fa que aquesta seda sigui més dura que els material d'enginyeria. De fet, amb una duresa de 160 MJ/FFFFF, la tela MA (glàndula ampul·làcia major) és de 3 - 10 vegades més dur que el kevlar, l'acer i la fibra de carboni.

La seda viscosa ofereix un interessant contrast en propietats, i no obstant això, també és un material amb duresa excepcional. La seva rigidesa, de 0.003 GPa, és tres ordres de magnitud inferior a seda MA i és comparable a el cautxú. De fet, la seda de la glàndula flabel·liforme (viscosa) és un bon cautxú. Amb una elasticitat del 270%, la seda viscosa no és excepcionalment elàstica en comparació amb el cautxú, però és resistent a 0,5 GPa, i això fa 10 vegades més resistent la seda la goma. Per aquest motiu, la seda viscosa és un bon material, i la combinació de resistència i elasticitat dóna una duresa més o menys idèntica a la seda de MA.

En resum, la teranyina té un bon equilibri entre les 4 propietats, mentre que, per exemple la fibra de carboni és 4 vegades més resistent que la teranyina, però la seva elasticitat és insignificant: 0.013. Per aquest motiu, la seda d'aranya és un teixit molt sorprenent.

<sup>20</sup> <http://jeb.biologists.org/content/202/23/3295.full.pdf>

Com es veu en la figura 6, el fil de la glàndula flabel·liforme (seda viscosa) té molta glicina i prolina, però gairebé no té alanina. Això és perquè, les regions riques en alanina són les que formen nano cristalls i donen resistència, mentre que les zones riques en glicina formen espais amorfs que dona elasticitat a la seda. D'altra banda, la seda flabel·liforme té gairebé les mateixes seqüències de la zona amorfa de la seda ampul·làcia major. Aquí he posat la seqüència d'aminoàcids d'aquesta glàndula, mostrant que GPGGX es repeteix 50 vegades, GGX 9 vegades i hi ha seqüències espaciadores que cometen 28 aminoàcids carregats elèctricament:

Glàndula Flabel·liforme (FL):

Nc-FL-1: (GPGGX) $N \approx 50$  - (GGX) $N \approx 9$  - (Spacer, 28 residues long)

On X pot ser alanina, serina, valina o tirosina.

Glàndula secretora	Secuencia de aminoácidos	Estructura relacionada	Propiedad
Ampulácea mayor	(GA) $_n$ / A $_n$	lámina- $\beta$	Resistencia/Rigidez
Ampulácea mayor	(GPGQQ)	espiral- $\beta$	Elasticidad
Flageliforme	(GPGGX)	espiral- $\beta$	Elasticidad
Ampulácea mayor/Flageliforme	(GGX)	hélices-3 $_10$	Elasticidad
Flageliforme	Secuencias "espaciadoras"	sin estructura	Elasticidad/control higroscópico/ solubilidad

X = A, S o Y  
Las secuencias "espaciadoras" contienen aminoácidos cargados electricamente

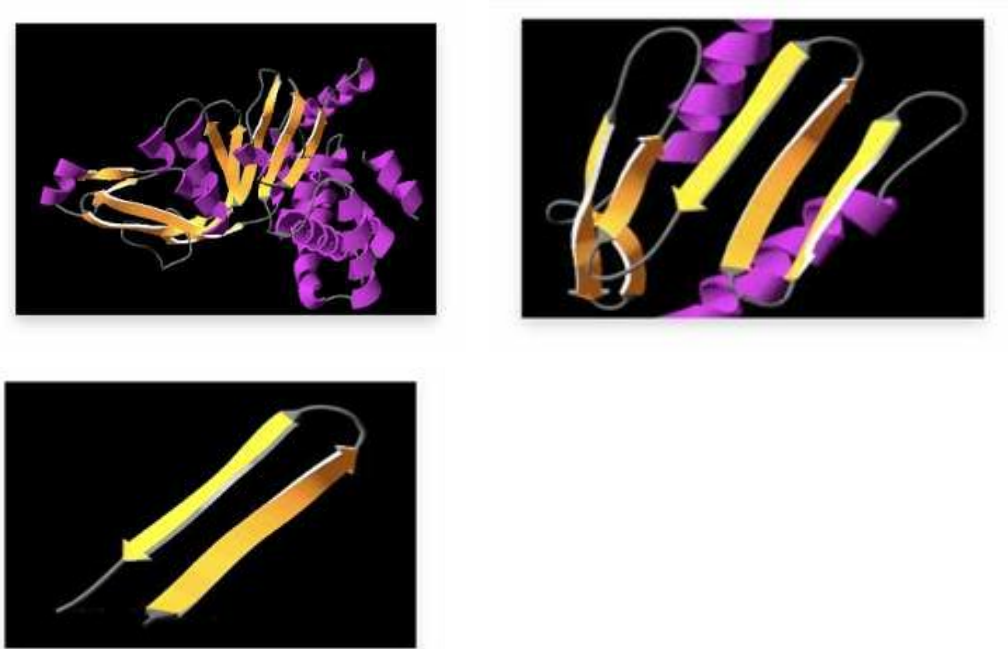
<sup>21</sup> Figura 8: glàndules secretores i la seva composició química.

En la seqüència GPGGX, l'estructura formada és una espiral- $\beta$  i  $\alpha$ -hèlix, cosa que el fa flexible, mentre que GA i A formen un estructura de  $\beta$ -fulla que fa que sigui resistent. A més, aquests aminoàcids X ocorren en patrons específics al llarg de les repeticions. Aquesta variació ordenada suggereix que amb la hidratació, els beta-espivals i hèlix formen xarxes amb enllaços d'hidrogen que augmenten l'elasticitat de la seda flabel·liforme.

Como es veu a la figura 8, hi ha dos tipus principals de cadenes: l'hèlix i la fulla. Que s'expliquen en els apèndixs.

<sup>21</sup> [http://es.wikipedia.org/wiki/Seda\\_de\\_ara%C3%B1a](http://es.wikipedia.org/wiki/Seda_de_ara%C3%B1a)

Però, en la làmina beta, els enllaços d'hidrogen no són entre els residus i no són mútuament adjacents. Els enllaços es formen entre dos cadenes, per tant, una xarxa d'enllaços d'hidrogen manté unides diferents  $\beta$ -cadenes i formen  $\beta$ -fulles. L'orientació de les fulles està involucrada en la manera com les cadenes estan connectades amb ponts d'hidrogen. Hi ha fulles paral·leles i antiparal·leles. En les següents fotografies ho mostro amb la direcció de la fletxa, que mostren la direcció de la  $\beta$ -fulla que és des de la N-terminal al C-Terminal. Quan les fletxes apunten en la mateixa direcció tenim una fulla paral·lela, i quan estan apuntant a direccions oposades la fulla és antiparal·lela.



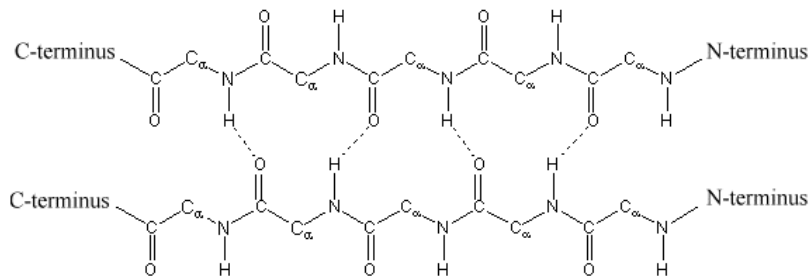
<sup>22</sup> *Figura 9: exemple de cadenes paral·leles y antiparal·leles.*

---

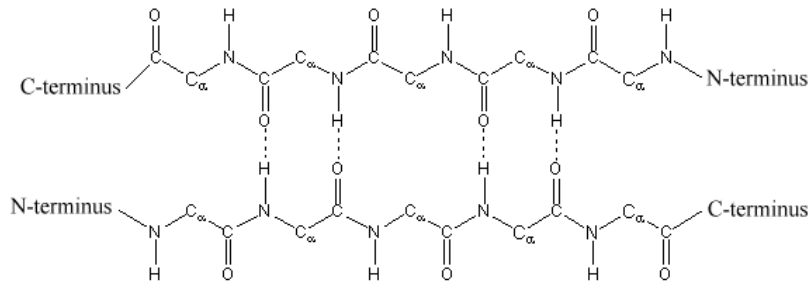
<sup>22</sup> <http://www.proteinstructures.com/>



## Parallel $\beta$ Sheet



## Antiparallel $\beta$ Sheet



<sup>23</sup> Figura 10: cadenes paral·leles y antiparal·leles.

Ja que el paral·lelisme afecta als enllaços d'hidrogen, això també afecta l'estabilitat i les propietats mecàniques de les  $\beta$ -fulles. En la disposició antiparal·lela, les cadenes alternen la direcció i els enllaços d'hidrogen són plans, que és l'orientació més comuna. En aquesta orientació els àtoms connectats formen dues columnes vertebrals de ponts d'hidrogen, i això produeix l'estabilitat més forta entre les cadenes. Per aquest motiu, la selecció natural ha fet que les làmines betes siguin antiparal·leles en la teranyina.

En la prestació paral·lela l'estabilitat és menor, perquè l'enllaç d'hidrogen no és pla. A més, és estrany trobar menys de cinc cadenes paral·leles, ja que un nombre més petit pot ser inestable. Per altre banda, les  $\beta$ -fulles paral·leles són més difícils de formar-se.

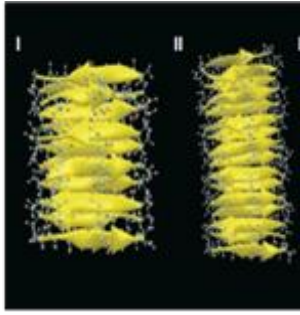
Quan només tenim cadenes beta antiparal·leles, anomenem aquesta estructura secundària beta forquilla. El parell de dues cadenes s'anomena bucle. Aquests connecten juntes cadenes beta,  $\beta$ -cadenes a  $\alpha$ -hèlix, o  $\alpha$ -hèlix entre elles, i per tant són una estructura secundària molt important.

Quan les fulles beta són empaquetades juntes costat a costat, formant una estructura, coneguda com cristalls  $\beta$ -laminars. En la següent imatge podem veure beta cristalls de diferents mides. Això representa el nivell terciari de la proteïna:

---

23

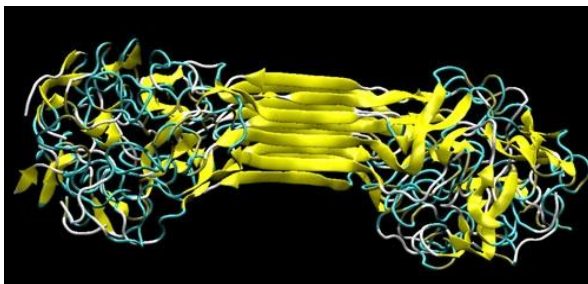
[http://wiki.chemprime.chemeddl.org/index.php/Secondary\\_Protein\\_Structure\\_with\\_Cultural\\_Connections](http://wiki.chemprime.chemeddl.org/index.php/Secondary_Protein_Structure_with_Cultural_Connections)



<sup>24</sup> *Figura 11: cristalls beta làmines.*

Si s'ordenen les repeticions en les cadenes, aquestes poden ser empaquetades molt estretament entre elles. La manera en què els àtoms en les  $\beta$ -fulles estan enllaçats ajuda la molècula a resistir el trencament, però a causa de les capes de fulles a beta apilades, poden lliscar una sobre l'altre, fent que la molècula proteica sigui flexible.

En la seda, aquests nano cristalls de  $\beta$ -fulles estan connectades en una fase semi amorfa. La fase semi amorfa està estructurada amb estructures beta menys ordenades, sobretot  $3_{10}$ -hèlixs, però també hèlixs beta i en una petita proporció alfa hèlix, mentre que els nano cristalls de  $\beta$ - fulles estan molt ordenats i, per tant, mantenen les principals propietats mecàniques. La fase semi amorfa representa la matriu que manté l'estructura junta:



<sup>25</sup> *Figura 12: matriu semi amorfa de la seda de aranya.*

Totes aquestes estructures juntes formen les fibres de la seda d'aranya, com es mostra a la figura 2. A més, la seda està recoberta amb proteïnes riques amb glicina per proporcionar rigidesa.

<sup>24</sup> <http://www.nature.com/nmat/journal/v9/n4/full/nmat2704.html>

<sup>25</sup> <http://www.proteinstructures.com/>

Però, com pot ser que els enllaços d'hidrogen, un dels enllaços més dèbils coneguts, dongui tanta resistència i duresa a la tela? Docs, a causa de que les cadenes estan ben ordenades i apretades l'enllaç es fa més fort. A més, quan la mida dels nano cristalls esta controlada per la velocitat de bobinatge, la resistència i la duresa també es modifiquen. Quan la mida dels cristalls és menor, la seda pot superar l'acer i altres materials com el kevlar en resistència. Però quan la mida dels cristalls és més gran, l'enllaç d'hidrogen és més feble.

Els científics han fet un model de com el nombre d'enllaços d'hidrogen afecta les propietats mecàniques de resistència i duresa. Llavors, es van adonar que els grups de tres o quatre enllaços que uneixen els apilaments de  $\beta$ -cadenes curtes, es trenquen simultàniament en lloc de seqüencialment quan està sotmès a l'estrès, mentre que en els metalls els enllaços es trenquen un a un. Si la proteïna tenia només un o dos enllaços, la proteïna no podia suportar tanta força. Al utilitzar tres o quatre enllaços condueix a una resistència que supera alguns metalls. Però utilitzant més de quatre enllaços la resistència es reduïa, perquè la resistència està maximitzada en 3 o 4 enllaços. Aquest fenomen es produeix per la unió termodinàmica.

A més, el cisallament longitudinal de  $n$  enllaços requereix un punt de ruptura equivalent a una mica menys de  $n$  vegades la força necessària per trencar aquest enllaç. Al modelar el tall longitudinal de dues cadenes antiparal·leles, els enllaços d'hidrogen eren capaços de suportar més càrrega que quan l'aplicació de la força era carregada ortogonalment a les cadenes. Aquest efecte és causat per la rotació dels enllaços d'hidrogen portant a la ruptura sota forces menors en el segon model.

Una altra estructura secundària, és la  $\beta$ -hèlix, que és present en la seda flagel·lar. Aquesta estructura es compon de l'associació de  $\beta$ -fulles paral·leles en un patró helicoidal amb dos o tres cares. Aquesta estructura està estabilitzat amb ponts d'hidrogen també i és el que dóna elasticitat a la seda flagel·lar:



<sup>26</sup> *Figura 13: exemple d'estructura beta hèlix.*

---

<sup>26</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Beta\\_helix](http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_helix)

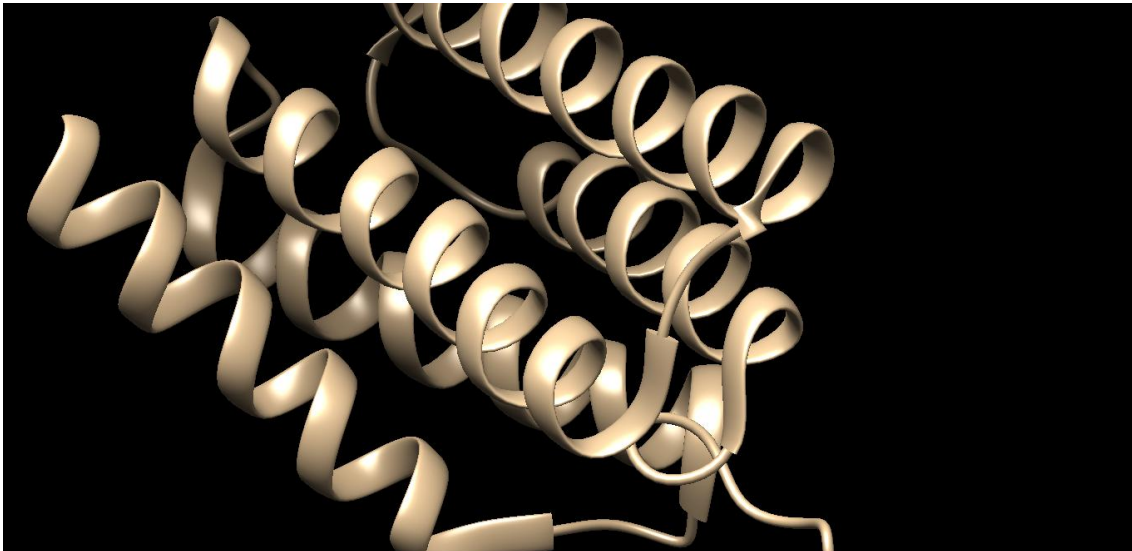
#### **4. DISENY VIRTUAL DE UNA ESTRUCTURA MOLECULAR DE MAJOR RESISTÈNCIA I FLEXIBILITAT QUE LA NATURAL DE LA TERANYINA MITJANÇANT QUÍMICA COMPUTACIONAL**

La informació exposada fins ara sobre la residència de les teranyines es basa en la geometria de les seves proteïnes i en els grups d'enllaços d'hidrogen, que treballen junts trencant-se al mateix temps i no seqüencialment, com hem vist abans, fent que la seda resisteixi la força i dissipï la energia. Per aquesta raó, si comparem l'enllaç d'hidrogen amb el metàl·lic veiem que l'enllaç d'hidrogen és de 100 a 1000 vegades més feble que l'enllaç metàl·lic. Però la seda d'aranya és tan forta com l'acer per la bona organització.

Amb aquest principi, m'he guiat per fer un model computacional encara més resistent que una teranyina. Ja que, si poso alguns pocs elements metàl·lics ben repartida per la tela això ajudaria a la resistència, perquè faria que els enllaços d'hidrogen estaquessin més proper un de l'altre, donant més resistència a la tela.

Per determinar la resistència de la seda d'aranya computacionalment (amb el Chimera 1.9) sense àtoms metàl·lics i uns altres amb àtoms metàl·lics ho he fet amb l'estabilitat de l'estructura que és d'una magnitud molt similar a la resistència. És a dir, en primer lloc he optimitzat la molècula, llavors he calculat l'energia potencial de la molècula i l'he dividit pel nombre d'àtoms. D'aquesta manera, he calculat la densitat d'energia atòmica que és com mesurar la resistència.

Però abans que res he descarregat la proteïna del PDB, que és la 3RL8 a la web de la PDB. Una vegada descarregada, vaig obrir-la amb el WordPad i he vist que tenia coordenades normals (ATOM) i alternatives (ANISOU), i he tret les coordenades ANISOU per evitar problemes. I, finalment he suprimit els àtoms repetits que em podrien provocar error i també he eliminat la cadena B perquè la proteïna és molt gran i amb una cadena es pot fer el mateix treball de càlcul millor.

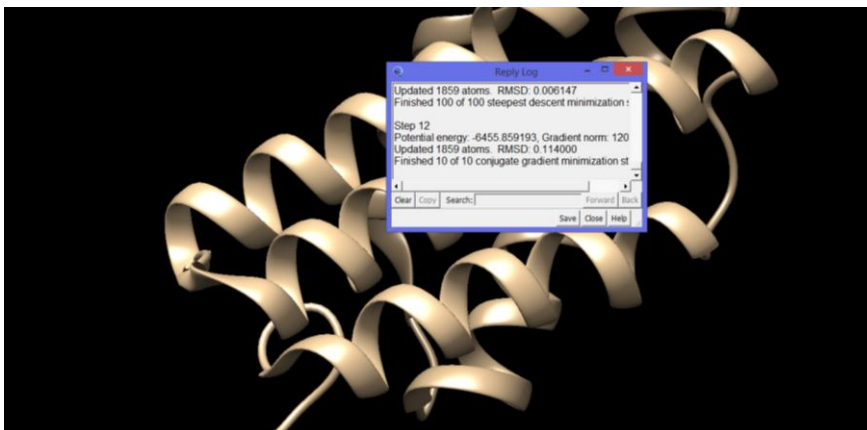


*Figura 14: proteïna MaSp1 visualitzada amb el Chimera.*

En aquesta foto es veu la cadena A de la proteïna amb el Chimera. Aquesta cadena A sense els àtoms metàl·lics ha sortit amb a minimització una energia de  $-6477.388818 \text{ kJ/mol}$  que la divideixo entre 1859, que és el nombre d'àtoms que hi ha, per conèixer la densitat d'energia que és proporcional a la resistència atòmica:

$$\text{densitat de energia atòmica} = \frac{-6477.388818 \text{ kJ}}{1859} = -3,4843 \text{ kJ/àtom. mol}$$

Aquesta imatge mostra com he fet la minimització anterior d'una cadena amb l'energia mínima que surt en el LOG, que es el registre d'activitats de programa i en el qual s'escriu el resultat de minimització d'energia de les nostres proteïnes d'interès, en aquest cas - 6477,3888818:



*Figura 15: minimització de la MaSp1 mitjançant el Chimera.*

Després he agregat metalls a la cadena A, per veure si es guanya resistència. El metall que he triat és el ferro (Fe) a l'estat d'oxidació de +2, perquè és estable en un pH neutre cosa que és molt important perquè 7,4 és el pH natural de la tela, i li dóna bones propietats a la teranyina de resistència i duresa. Per posar el metall he fet la mitjana dels eixos x, y i z de l'oxigen del grup  $\text{COO}^-$ , un aminoàcid i el nitrogen del grup amino del següent aminoàcid perquè els he enllaçat amb el ferro. Per obligar a formar l'enllaç he hagut de posar coordenades CONECT entre l'àtom de ferro, l'oxigen i nitrogen. D'aquesta manera, el ferro que és +2, ha fet dos enllaços iònics. Aquí és veu el procés que he seguit per inserir el metall a la pdb amb el WordPad:

Primer he afegit el metall i he calculat la densitat d'energia atòmica de la proteïna. Com que s'uneix el ferro entre el O de la Valina y el N de la serina, faig la mitjana de les seves coordenades x, y, z perquè seran les coordenades de l'àtom de ferro que jo inserta re:

```

13.75
ATOM 920 CA VAL A 124 -0.022 -37.836 0.699 1.00
14.64
C
ATOM 921 C VAL A 124 -0.300 -38.363 2.111 1.00
15.86
C
ATOM 922 O VAL A 124 -0.025 -37.682 3.092 1.00
15.96
O
ATOM 923 CB VAL A 124 -1.354 -37.386 0.025 1.00
13.56
C
ATOM 924 CG1 VAL A 124 -1.911 -36.160 0.725 1.00
13.29
C
ATOM 925 CG2 VAL A 124 -1.127 -37.072 -1.445 1.00
14.29
C
ATOM 926 N SER A 125 -0.831 -39.582 2.172 1.00
17.06
N
ATOM 927 CA SER A 125 -1.087 -40.307 2.422 1.00

```

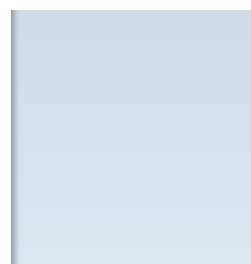


Figura 16: àtoms que he unit mitjançant un àtom de ferro.

$$x = \frac{(-0,025) + (-0,831)}{2} = -0,428$$

$$y = \frac{(-37,682) + (-39,582)}{2} = -38,632$$

$$z = \frac{(3,092) + (2,172)}{2} = 2,632$$

Havent calculat això insereixo l'àtom de ferro i també amb las coordenades conect obligo a fer enllaços entre el àtom 922 (el oxigen), el 926(el nitrogen) y el 974(el ferro):

```

31.06
ATOM 971 CA GLY A 131 3.264 -34.727 9.803 1.00
33.08
C
ATOM 972 C GLY A 131 2.708 -34.607 11.214 1.00
36.41
C
ATOM 973 O GLY A 131 2.884 -33.581 11.884 1.00
38.77
O
HETATM 974 Fe ALU M 991 -0.428 -38.632 2.632 1.00
16.23
Fe
CONNECT 1923 1924 1925
CONNECT 1924 1923
CONNECT 1925 1923 1926
CONNECT 1926 1925

```

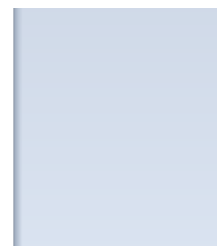


Figura 17: coordenades teòriques del àtom de ferro anclat.

```

CONNECT 1966 1965 1967
CONNECT 1967 1966 1968
CONNECT 1968 1967 1972
CONNECT 1969 1970
CONNECT 1970 1969 1971
CONNECT 1971 1970 1972
CONNECT 1972 1968 1971
CONNECT 974 922 926
MASTER 725 0 8 11 0 0 14 6 1997 2
50 22
END

```

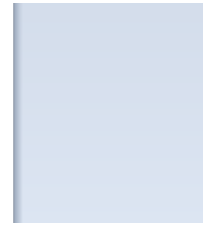


Figura 18: enllaç dels tres àtoms mitjançant coordenades CONECT.

Llavors, he fet la minimització de la proteïna amb aquest únic àtom de metall:

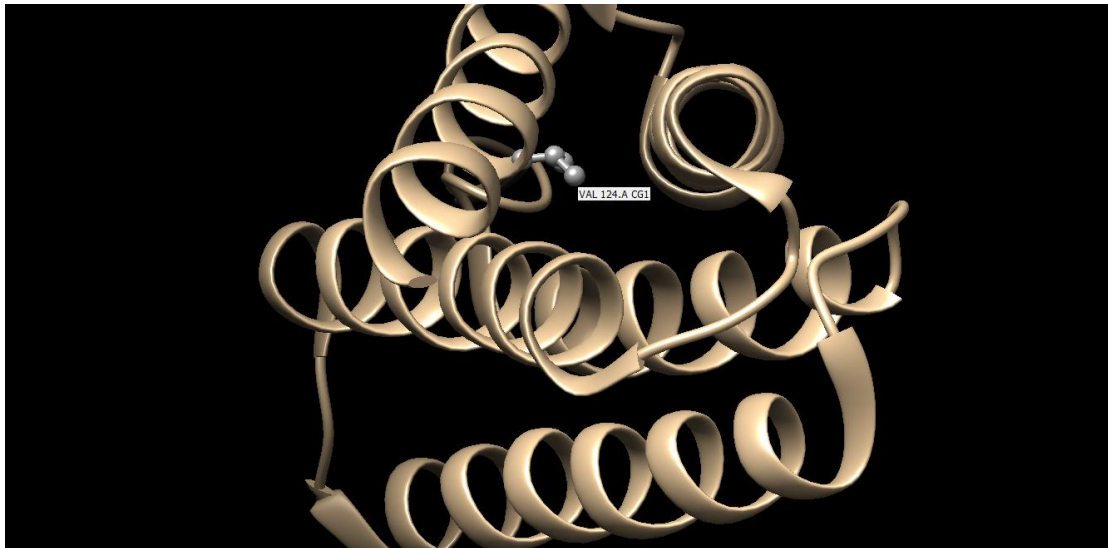


Figura 19: proteïna amb un àtom de ferro anclat visualitzada amb el Chimera.

$$\text{densitat d'energia atòmica} = \frac{-7610.729568}{1860} = -4.0918 \text{ kJ/àtom. mol}$$

Com que el valor disminueix respecte la proteïna sense àtoms metàl·lics, veiem que es més resistent.

Per trobar les coordenades teòriques del segon àtom he fet el mateix amb el O del y el N de diferents aminoàcids y després he minimitzat:

```

15.18      N
ATOM 253 CA ALA A 35 -6.212 -19.792 -2.806 1.00
15.60      C
ATOM 254 C ALA A 35 -4.706 -19.725 -2.548 1.00
15.58      C
ATOM 255 O ALA A 35 -3.885 -19.778 -3.474 1.00
14.85      O
ATOM 256 CB ALA A 35 -6.778 -18.362 -2.824 1.00
15.67      C
ATOM 257 N SER A 36 -4.385 -19.587 -1.265 1.00
15.78      N
ATOM 258 CA SER A 36 -3.041 -19.433 -0.750 1.00
16.11      C

```

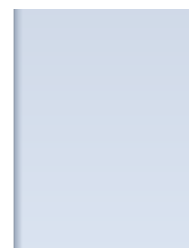


Figura 20: àtoms units per el segon àtom de metall.



$$x = \frac{(-3,885) + (-4,385)}{2} = -4,135$$

$$y = \frac{(-19,778) + (-19,587)}{2} = -19,6825$$

$$z = \frac{(-3,474) + (-1,265)}{2} = -2,3695$$

```

30.71      C
ATOM      973 O      GLY A 131      2.884 -33.581 11.884 1.00
38.77      O
HETATM    974 Fe     ALU M 991     -0.661 -38.112 1.273 1.00
16.23      Fe
HETATM    975 Fe     ALU M 992     -4.135 -19.683 -4.739 1.00
15.37      Fe
CONNECT 1923 1924 1925
CONNECT 1924 1923
CONNECT 1925 1923 1926
CONNECT 1926 1925

```

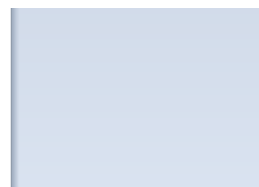


Figura 21: coordenades teòriques del segon àtom de metall.

```

CONNECT 1969 1970
CONNECT 1970 1969 1971
CONNECT 1971 1970 1972
CONNECT 1972 1968 1971
CONNECT 974 922 926
CONNECT 975 255 257
MASTER 725 0 8 11 0 0 14 6 1997 2
50 22
END

```

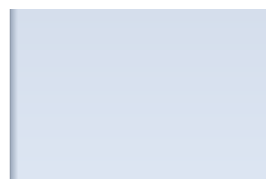


Figura 22: enllaços del N, el O y el Fe mitjançant coordenades CONECT.

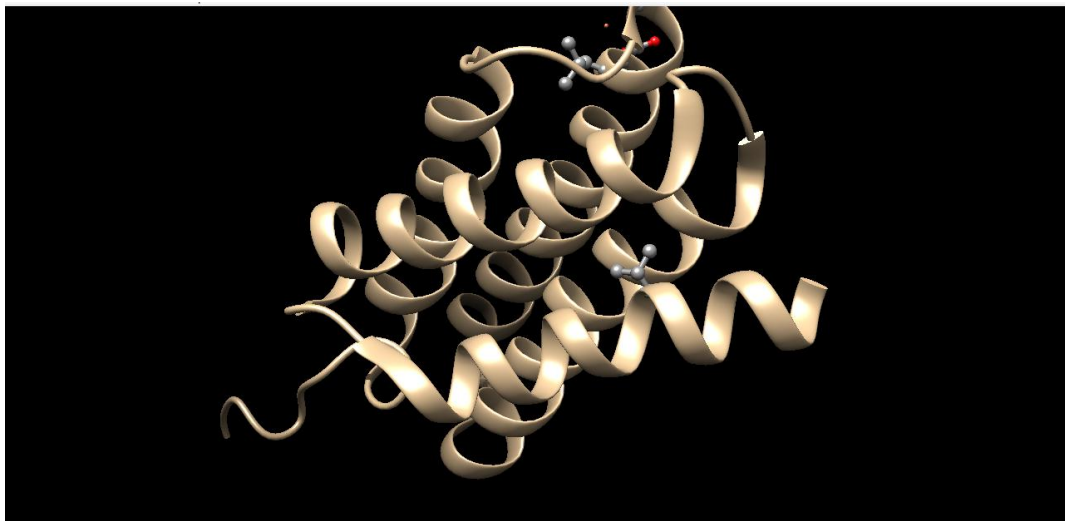


Figura 23: proteïna amb dos àtoms de metall anclats visualitzada amb el Chimera.

$$\text{densitat d'energia atòmica} = \frac{-9270.879051}{1861} = -4,9817 \text{ kJ/àtom. mol}$$

I el mateix amb el tercer àtom de metall entre el O i el N d'altres aminoàcids:

```

8.95      C
ATOM      98  C   GLY A 14      7.765 -30.999 -22.476  1.00
8.73      C
ATOM      99  O   GLY A 14      6.889 -30.301 -21.998  1.00
9.20      O
ATOM     100  N   LEU A 15      7.601 -32.304 -22.636  1.00
9.18      N
ATOM     101  CA  LEU A 15      6.395 -32.989 -22.152  1.00

```

Figura 24: àtoms units per l'àtom de metall.

$$x = \frac{(6,889) + (7,601)}{2} = 7,245$$

$$y = \frac{(-30,301) + (-32,304)}{2} = -31,3025$$

$$z = \frac{(-21,998) + (-22,636)}{2} = -22,317$$

```

HETATM  974 Fe   ALU M 991      -0.661 -38.112  1.273  1.00
16.23      Fe
HETATM  975 Fe   ALU M 992      -4.135 -19.683  -4.739  1.00
15.37      Fe
HETATM  976 Fe   ALU M 993      7.245 -31.303 -22.317  1.00
9.19      Fe
CONNECT 1923 1924 1925
CONNECT 1924 1923

```

Figura 25: coordenades teòriques del tercer àtom de metall.

```

-----
CONNECT 1970 1969 1971
CONNECT 1971 1970 1972
CONNECT 1972 1968 1971
CONNECT  974  922  926
CONNECT  975  255  257
CONNECT  976  99  100
MASTER      725  0  8  11  0  0  14  6 1997  2
50  22
END

```

Figura 26: enllaços del N,O y el Fe mitjançant coordenades CONECT.

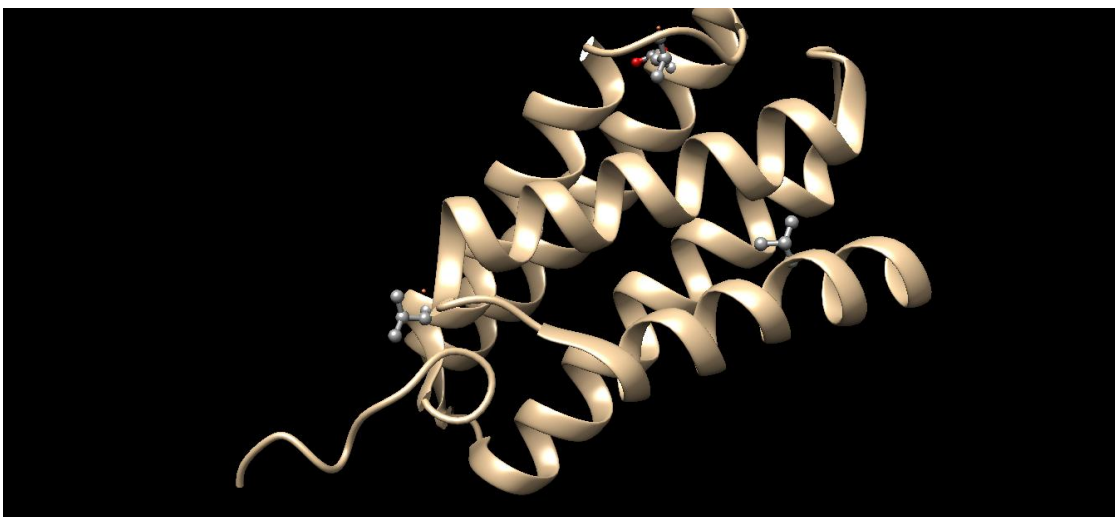


Figura 27: proteïna MaSp1amb tres àtoms de metall anclats visualitzada amb el Chimera.

$$\text{densitat d'energia atòmica} = \frac{-9809.020361}{1861} = -5,2708 \text{ kJ/àtom. mol}$$

Amb 4 àtoms de metall:

ATOM	967	C	ALA A 130	4.342	-36.914	10.051	1.00
	31.71		C				
ATOM	968	O	ALA A 130	4.936	-36.557	11.065	1.00
	33.71		O				
ATOM	969	CB	ALA A 130	5.631	-38.350	8.403	1.00
	28.65		C				
ATOM	970	N	GLY A 131	3.511	-36.111	9.381	1.00
	31.06		N				
ATOM	971	CA	GLY A 131	3.264	-34.727	9.803	1.00
	33.08		C				
ATOM	972	C	GLY A 131	2.708	-34.607	11.014	1.00

Figura 28: àtoms units pel ferro.

$$x = \frac{(4,936) + (3,511)}{2} = 4,2235$$

$$y = \frac{(-36,557) + (-36,111)}{2} = -36,334$$

$$z = \frac{(11,065) + (9,381)}{2} = 10,223$$

HETATM	975	Fe	ALU M 992	-4.135	-19.683	-4.739	1.00
	15.37		Fe				
HETATM	976	Fe	ALU M 993	7.245	-31.303	-22.317	1.00
	9.19		Fe				
HETATM	977	Fe	ALU M 994	4.224	-36.334	10.223	1.00
	32.19		Fe				
CONNECT	1923	1924	1925				
CONNECT	1924	1923					

Figura 29: coordenades teòriques del ferro.

CONNECT	974	922	926						
CONNECT	975	255	257						
CONNECT	976	99	100						
CONNECT	977	968	970						
MASTER	725	0	8	11	0	0	14	6	1997
	50	22							2

Figura 30: enllaços del N, el O y el Fe mitjançant coordenades CONECT.

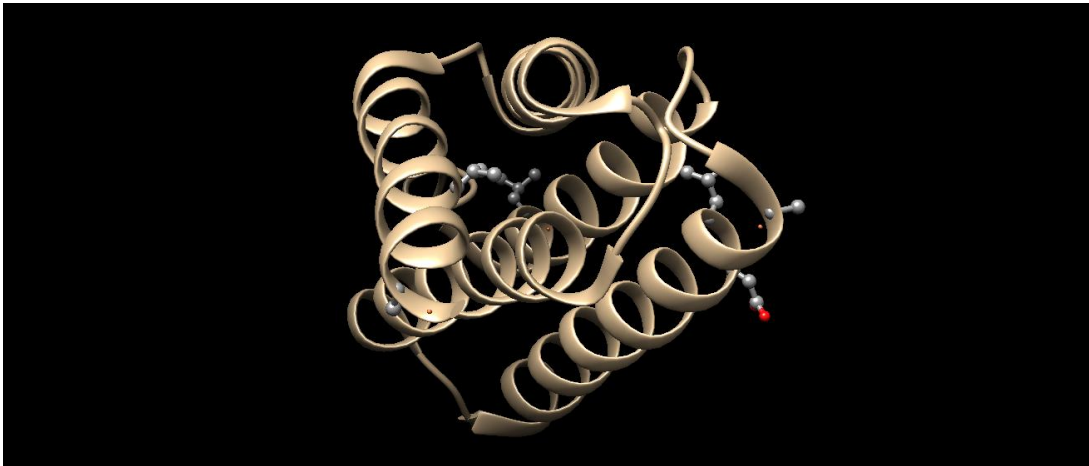


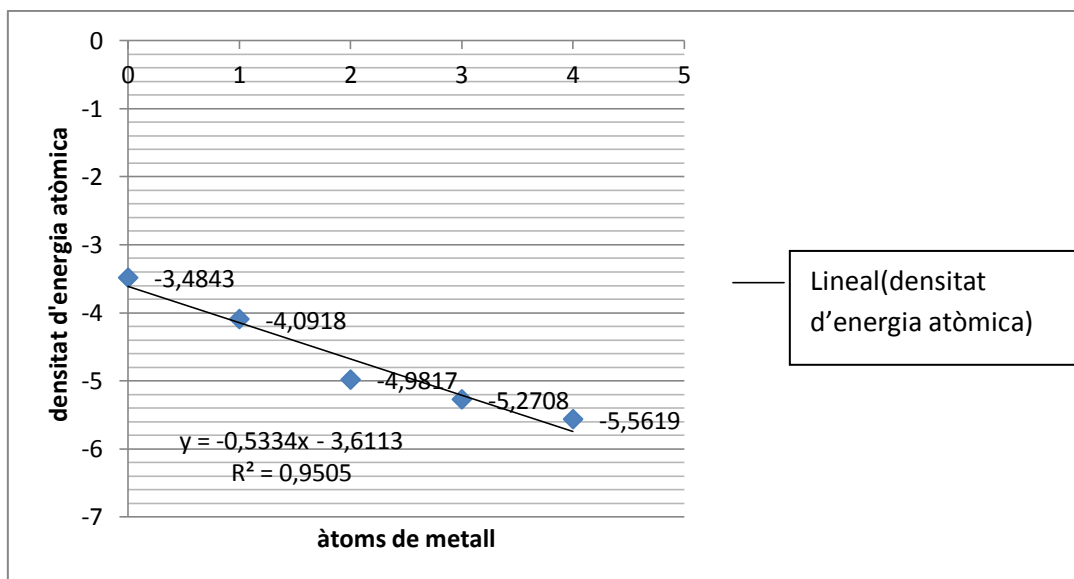
Figura 31: MaSp1 amb quatre àtoms de metall visualitzada amb el Chimera.

$$\text{densitat d'energia atòmica} = \frac{-10361.839854}{1861} = -5,5619 \text{ kJ/àtom. mol}$$

Llavors he fet una regressió lineal amb el numero d'àtoms de metall i la densitat atòmica d'energia:

àtoms de metall	0	1	2	3	4
densitat d'energia atòmica (kJ/àtom.mol)	-3,4843	-4,0918	-4,9817	-5,2708	-5,5619

Tabla 4: densitats atòmiques d'energia de cada proteïna.



Gràfica 1: regressió lineal de las proteïnes amb àtoms de metall i la seva densitat d'energia atòmica.

Aquesta regressió té una molt bona R, el que indica que la resistència i la estabilitat de la proteïna augmenten de forma lineal

## 5. CONCLUSIONS

En el desenvolupament dels processos d'optimització mitjançant el Chimera, ha trobat unes energies mínimes representatives per a la proteïna MaSp1 de l'aranya i aquesta mateixa proteïna amb metalls fixats. He de subratllar que els resultats són teòrics perquè el programa funciona a través d'uns càlculs d'aproximació a mínims. En segon lloc, els resultats obtinguts de l'energia dividit pel nombre d'àtoms, m'ha permès calcular la densitat d'energia atòmica, per mesurar l'estabilitat i per tant la resistència i comparar les dues proteïnes. Com que disminueix la densitat d'energia atòmica, augmentant el nombre d'àtoms metàl·lics, hom pot concloure que la proteïna seda de teranyines amb àtoms fixes és més resistent.

Encara que aquestes dades són preliminars i s'haurien de ser confirmades experimentalment. Un mètode experimental per obtenir seda amb ferro seria evaporar ferro sobre la teranyina en un temps determinat depenent de la quantitat de ferro fixat i llavors calcular totes les propietats mecàniques: resistència, duresa, flexibilitat i la rigidesa.

A més, el gràfic ens mostra que amb cada àtom de Fe que adjuntem, la densitat atòmica d'energia disminueix i per tant, l'estabilitat augmenta i la resistència també. I l'augment de l'estabilitat de l'estructura proteica és proporcional al nombre d'àtoms de fe que afegim a l'estructura, veient els resultats de densitats atòmics d'energia i el gràfic de la regressió lineal que té un molt bona R.

En conclusió, la teranyina és un excel·lent material natural i per produir-se artificialment requereix un bon coneixement de que està feta, com es connecten les seves parts i com podem augmentar aquestes qualitats per fer un material amb propietats millorades. Així, el desig de molts investigadors per produir aquest material deriva de les nombroses aplicacions, provinents de les seves propietats mecàniques i la biocompatibilitat:

- Armilla antibales
- Roba lleugera resistent al desgast
- Cordes, reds, cinturons de seguretat, paracaigudes
- Venes, fil quirúrgic
- Tendons o lligaments artificials, suport para vasos sanguinis dèbils
- Botelles biodegradables

Finalment, cal comentar que l'objectiu d'aquest treball era fer un treball aplicable, perquè he millorat l'estructura de la proteïna seda d'aranya. Encara que hi ha encara queda molt per arribar a entendre les seves notables propietats mecàniques. És a dir, poder fer un teixit amb una major flexibilitat, rigidesa, duresa i resistència que la teranyina encara no ha sigut possible per a la ciència, però per aquest motiu jo deixo el treball obert per tal que un altre pugui continuar-lo i sintetitzar-la.

## 6. APÈNDIX

### 6.1 Síntesi artificial de la teranyina:

A part de la composició de les proteïnes del filat, a l'hora d'intentar sintetitzar artificialment s'ha de tenir en compte que també la velocitat de bobinatge té influència en les propietats de la tela, com he dit en l'apartat de secreció. Per això, és una cosa molt difícil d'aconseguir. Tot i això, molts científics ho han intentat a través d'insectes, plantes transgèniques, bacteris ...

A través de bacteris, s'ha utilitzat sobretot l'*Escherichia coli* i el *Pichia pastoris*. Els investigadors Fahnestock i Bedzyk van utilitzar el llevat metilotròfic *Pichia pastoris* per sintetitzar polímers de seda. Els gens sintètics es van expressar en nivells alts sota el control d'un promotor induïble de metanol i per a la purificació es va utilitzar Ni-NTA Agarose. El sistema de llevat era compatible amb el gen i el gen era estable, ja que el gen va ser expressat amb èxit sense deleccions aparents. D'altra banda molt recentment uns científics de l'Institut Superior Coreà de Ciències i Tecnologia van produir mitjançant síntesi química el gen de la teranyina i després el van inserir en un vector d'expressió per al bacteri *Escherichia coli*. Al principi, el bacteri es va negar a produir la proteïna de la seda a causa de les característiques úniques de la proteïna, com la seva gran mida (285 kDa), la naturalesa repetitiva de l'estructura de la proteïna, i l'abundància parcial de l'aminoàcid glicina. Per superar aquestes dificultats van utilitzar els sistemes d'enginyeria metabòlica augmentant els components principals de la síntesi de proteïnes de la fibra. Mitjançant aquesta nova metodologia van aconseguir produir aquesta proteïna, la més gran que mai s'hagi expressat heteròlogament en aquest bacteri.

Però això era només el primer pas. L'equip va conrear bacteris en alta densitat per a la producció massiva de la proteïna aràcnida recombinant. Llavors, l'equip va desenvolupar una forma simple i fàcil de processar fins a la purificació de la proteïna recombinant. Aquesta proteïna un cop purificada pot ser filada fins a obtenir belles fibres. Aquestes van ser comparades amb fibres sintètiques en les seves propietats mecàniques en els tres paràmetres crítics que representen la força mecànica d'una fibra, l'extensibilitat i la rigidesa, però no va aconseguir les mateixes propietats de la teranyina original.

Però en general, en la purificació les proteïnes produïdes en microorganismes tendeixen a auto assemblar-se en microfibrils, causant la precipitació i produint la pèrdua de proteïna durant el procés. Per això, molts investigadors han optat per les plantes transgèniques. La producció de proteïnes recombinants d'aquestes, ofereixen alguns avantatges. La síntesi de proteïnes, la secreció i les modificacions després de la traducció són similars en cèl·lules animals i les cèl·lules de les plantes. Però, tenen una diferència en la glicosilació de proteïnes. Però aquesta lleu diferència pot ser compensada en l'ajust de seqüències de transgènics que els permet acoblar correctament les proteïnes d'animals.

Encara que les proteïnes de la seda d'aranya són molt grans (230-270 kDa) i tenen seqüències d'aminoàcids repetitives, la síntesi programada genèticament de polímers de la proteïna permet el control precís de la massa i composició molecular d'aminoàcids, i per tant podria conduir al disseny i síntesi de polímers on les diferents propietats funcionals i físiques són exactament controlades.

Sembla ser que les plantes transgèniques són potents fàbriques de proteïnes i que poden superar els problemes esmentats anteriorment. Heus aquí diversos exemples de plantes transformades de forma estable que expressen diversos gens de seda d'aranya en la següent taula:

<b>Protein</b>	<b>Promoter</b>	<b>Species</b>	<b>Remarks</b>	<b>Size of protein</b>	<b>Reference</b>
Synthetic spider silk proteins like MaSp1	35S CaMV	Tobacco, ER	2% (TSP)	14-120 kDa	Scheller et al. 2001
Synthetic spider silk proteins like MaSp1	$\beta$ -conglycinin $\alpha'$ subunit	Arabidopsis, Leaves	1.65%(TSP) 0.06%(TSP)	64 kDa 127 kDa	Barr et al. 2004
		Seeds  Soybean, Somatic embryos	1.4% (TSP) 1% (TSP)	64 kDa 127 kDa  64 kDa	
Native MaSp1 and Masp2	35S CaMV	Tobacco (field trials)	0.1% (TSP) 69 g per hectare	60.3 kDa and 58.6kDa	Menassa et al. 2004
Synthetic spider silk proteins like MaSp1(SO1-100xELP)	35S CaMV	Tobacco, Leaves	Up to 4%(TSP) 80mg per kg	94.4kDa	Scheller et al. 2004
		Potato		94.4kDa	

27

Scheller i els seus companys van fer plantes transgèniques de patata i tabac estables que expressaven diversos gens sintètics de la fibra que anaven des de 420 a 3600 parells de bases de

<sup>27</sup> <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/07/07H157/t2.pdf>

mida. Els gens van ser assemblats per aconseguir una homologia molt alta (més del 90%). En les fulles de tabac es va aconseguir l'acumulació de proteïnes de seda fins al 2% de la proteïna soluble total (TSP) en el reticle endoplasmàtic (ER), i aquesta producció va ser relativament independent amb la mida de la proteïna. Les fibres de seda d'aranya recombinant van mostrar una extrema estabilitat a la calor. Aquesta propietat amb la resistència contra l'acidificació i la precipitació de sulfat d'amoni fraccionat va ser usada per purificar les fibres produïdes amb un mètode simple i eficient. (Scheller et al. 2001)

Barr i els seus col·laboradors van mostrar l'expressió de proteïnes sintètiques de la seda de l'*Arabidopsis thaliana* dirigit pel promotor ubic CAMV i el promotor específic de llavor subunitat  $\alpha$  'de la  $\beta$ -conglucina. En les fulles transgèniques d'*Arabidopsis* la proteïna artificial de 64 kDa imitant la MaSp1 va ser acumulada al 1.65% TSP i la proteïna de 127 kDa al 0,06% (Barr et al. 2004).

Scheller, en experiments de 3 anys més tard, va fer una fusió de diverses proteïnes de 94 kDa feta de la proteïnes sintètiques SO1 (51.2 kDa) i el biopolímer sintètic elàstic 100xELP (100 repeticions del pentapéptid VPGZG (on X pot ser G, V o A) (Meyer and Chilkoti 1999). Les plantes van acumular un 4% de TSP. Aquest percentatge és degut a que la fusió d'aquestes proteïnes elàstiques si la temperatura és superior a la seva temperatura de transició es torna reversiblement insoluble, i quan la temperatura baixa , els poli pèptids es tornen de nou solubles.

En definitiva, les plantes transgèniques és un bon mètode per produir proteïnes artificials de la teranyina, tot i que encara no s'han aconseguit propietats mecàniques similars a la proteïna original. Amb bacteris, també és possible aconseguir-ho però és més difícil per la precipitació de trossos de proteïna durant la purificació.

## **6.2 Evolució de la teranyina:**

Per entendre l'origen de les propietats de la teranyina és necessari entendre l'evolució dels seus sistemes productors de seda. A més una forma d'explorar l'evolució de la teranyina és traçar la relació entre els diferents tipus de seda, la seva estructura molecular (seqüenciació d'aminoàcids), les glàndules secretores on es produeixen i la filogènia existent entre les diferents espècies productores de seda.

Hi ha cinc hipòtesis proposades per explicar la diversitat i evolució de les sedes filades per les aranyes orbitelars (aquelles que construeixen teranyines suspeses en l'aire):



- (1) Variacions genètiques a l'atzar.
- (2) Selecció cap a l'eficiència sintètica.
- (3) Selecció cap propietats mecàniques com ara resistència i elasticitat.
- (4) Selecció cap a una reducció en reflectància i visibilitat per part de les preses.
- (5) Selecció cap a l'aprofitament dels aminoàcids presents en la dieta de les aranyes.

Cap d'aquestes hipòtesis exclou les altres. Així és molt probable que la seqüència observada d'aminoàcids sigui el resultat de duplicacions o eliminacions errònies de l'ADN a l'atzar (hipòtesi 1) que, en alguns casos, han donat lloc a sedes amb bones propietats (hipòtesi 2, 3 i 4) i que aquestes hagin afectat a l'efectivitat de caça, l'abundància i qualitat de les preses i per tant en la varietat d'aminoàcids presents en les seves dietes (hipòtesi 5).

També, al meu entendre, podem proposar més hipòtesis relacionades amb la forma geomètrica, ja que les anteriors són només de la seda en si. Per exemple, la forma més resistent i que ajuda a caçar més farà que no es trenqui freqüentment i la quantitat d'energia requerida de reparació seria mínima i, a més atraparà moltes preses. O la forma geomètrica més optimitzada que no necessiti tanta seda i distribueixi l'energia de l'impacte uniformement sense trencar-se, etc. Això, li donaria també un avantatge evolutiu sobre les altres teranyines.

### **6.3 Efectes de l'aigua a la teranyina:**

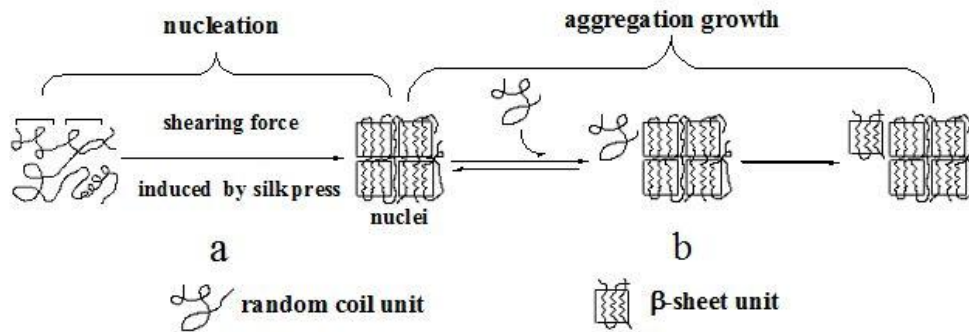
Com he dit anteriorment, el contacte de l'aigua amb la teranyina augmenta la flexibilitat, ja que els patrons X (on X = A, S o I) de la seda flagel·lar ocorren en patrons determinats. Aquest fenomen es diu supercontracció. Aquest terme vol dir que algunes sedes poden contreure fins a la meitat de la seva longitud inicial sota certes condicions d'humitat.

L'índex de supercontracció es defineix com  $\frac{(L_0 - L_c)}{L_0}$ , on  $L_0$  és la longitud inicial estesa de la seda i  $L_c$  és la longitud de la seda supercontreta, sotmesa a humitat. Es pensa que aquest fenomen serveix per tensar la teranyina, de manera que es reorganitza i es flexibilitza, amb la presència de la rosada de l'alba. Després de la supercontracció les fibres presenten propietats mecàniques similars als elastòmers, amb menor mòdul d'elasticitat i major extensibilitat.

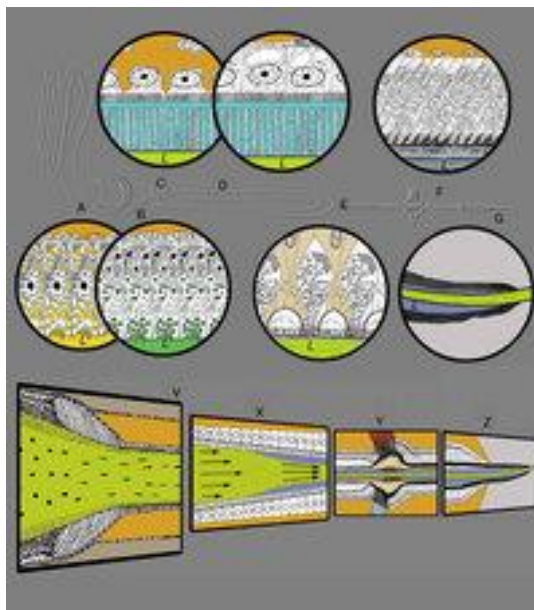
### **6.4 La secreció de la teranyina**

La secreció de la teranyina té dos passos: la formació de la làmina beta (nucleació) i la ràpida extensió de les agregacions de la làmina beta. La nucleació és la formació de  $\beta$ -làmines insolubles a partir d'espiral de manera aleatòria soluble. Al llarg d'aquest procés es creen també una sèrie d'associacions termodinàmicament desfavorables de  $\beta$ -làmines. Una vegada que el nucli es forma, un major creixement de la unitat  $\beta$ -làmina es converteix en termodinàmicament

favorable. El creixement de l'agregació segueix un procés cinètic de primer ordre pel que fa a la concentració de fibroïna d'espiral a l'atzar. El creixement del procés d'agregació també s'accelera amb l'augment de la temperatura.



<sup>28</sup> Figura 32: nucleació de la seda.



<sup>29</sup> Figura 33: secreció de la seda d'aranya.

A la figura 33 es descriu tot el procés de secreció de la teranyina. Aquest procés comença amb la "solució de filat", que és una solució concentrada (50% en massa) de les proteïnes en aigua i NaCl, que afavoreix l'estat soluble de les proteïnes. El domini C-terminal d'aquestes proteïnes és força hidrofòbic comparat amb les altres regions de les proteïnes, fent que a baixos pH (~ 2.0) la hidrofobicitat augmenti i els plegaments beta disminueixin. Llavors, el domini C-terminal és important per a l'emmagatzematge de les proteïnes de la seda dins del lumen, a altes concentracions però sense córrer el risc que s'agreguin i formin assemblatges no desitjats. El filat es produeix en dues zones. La zona A (marcada a la figura 33 amb les lletres) que ocupa la

<sup>28</sup> <http://www.intechopen.com/books/on-biomimetics/environment-induced-silk-fibroin-conformation-based-on-the-magnetic-resonance-spectroscopy>

<sup>29</sup> <http://www.readcube.com/articles/10.1038/35069000>

cua i la primera part del lumen. La solució de la zona A flueix al llarg del lumen i segreguen les proteïnes de la seda. L'altra zona, és la zona B, que s'estén des de la part més ampla del lumen fins a un "embut" i es compon d'un líquid viscos homogeni incolor que recobreix la secreció de la zona A. Per tant, la zona B segrega proteïnes per a la coberta, que són diferents en grandària i estructura, que a les proteïnes de la zona A.

Dins del primer i el segon bucle del conducte estret després del "embut", hi ha una fase de cristall líquid. Del lumen al conducte hi ha un intercanvi iònic de NaCl a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ja que, el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  afavoreix l'agregació i l'acoblament. El cristall en estar líquid, permet que la solució proteica flueixi a través del lumen i el conducte, mentre les molècules formen patrons complexos d'alineació. Aquests dos bucles estan representats com C i D a la figura 33. En aquests dos bucles, s'estan canviant la forma de les molècules.

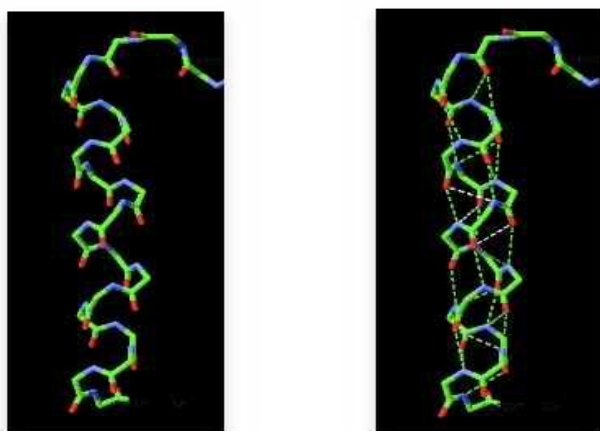
El domini N-terminal d'aquestes proteïnes, és el responsable de l'auto acoblament d'aquestes proteïnes per formar una fibra sòlida. Quan la solució de proteïnes arriba al conducte, el pH baixa des de 6.9 a 6.3 a causa de la presència de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i comencen a formar-se els plegaments betes característics de la teranyina, a més, el descens de pH ajuda a la solidificació dels cristalls.

Durant l'extensió ràpida de les agregacions de la làmina beta es genera un estrès superior, que es mostra a la lletra X. En el tercer bucle del conducte, el fil que s'està formant s'estreny, i en conseqüència s'estén i s'allunya de les parets. Es genera un estrès elevat, que alinea les molècules i estén la seva conformació. Després, les molècules s'uneixen entre elles amb ponts d'hidrogen de manera anti-paral·lela. A més, en l'inici d'aquest procés, el fil pot ser addicionalment recobert, i les cèl·lules que proporcionen aquesta capa addicional es mostren en el panell L.

Abans que el fil sigui empès a la vàlvula (lletra Y), la qual funció és com una pinça del fil, també s'utilitza com una bomba per reiniciar la filatura si es produeix el arravatament intern. Després de la vàlvula, les cèl·lules en aquesta part del conducte estan especialitzades per al bombament d'aigua. Per a això, les cèl·lules són altes i dissenyades per això (lletra F). Després, el fil és agafat per la filera, que despulla el fil de l'última fase aquosa per ajudar a l'aranya a retenir l'aigua, seguidament, tensa el fil i l'empeny al món exterior.

## 6.5 Estructures proteiques

La  $\alpha$ -hèlix és una estructura en espiral d'aminoàcids on cada aminoàcid suposa un gir de  $100^\circ$  en l'hèlix. També, tots els àtoms d'oxigen carbonil ( $C=O$ ) apunten en una direcció, cap a l'extrem C-terminal de l'hèlix. Apunten al grup NH dels aminoàcids que està quatre residus més enllà de la seqüència. I així es formen els ponts d'hidrogen, entre dos àtoms electronegatius - l'amida N i l'O carbonil. Aquest tipus de ponts d'hidrogen sosté l'estructura unida. No obstant això, aquesta estructura està considerada lleugerament més feble que les làmines beta, pel fet que l'enllaç d'hidrogen està dins de l'hèlix i també pot ser pertorbat amb molècules d'aigua a temperatura ambient. Per això en la seda d'aranya aquesta estructura està present en algunes poques regions riques en glicina que donen elasticitat. Així es mostra en les dues imatges de sota: a la primera imatge es veu com els àtoms d'oxigen carbonil (vermell) estan apuntant cap a les amides de nitrogen (blau); en la segona es veu com es formen els ponts d'hidrogen entre aquests àtoms cada 4 residus.



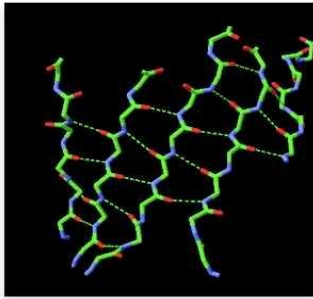
<sup>30</sup> *Figura 34: estructura de la alpha hèlix y els enllaços d' hidrogen.*

L'hèlix  $3_{10}$  i la  $\pi$ -hèlix són similars. L'única diferència és que la posició del pont d'hidrogen és cada 3 residus a l'hèlix  $3_{10}$  i cada 5 en les hèlixs  $\pi$ .

La  $\beta$ -làmina és una altra estructura secundària que és estabilitzada amb ponts d'hidrogen. En aquesta estructura els aminoàcids es troben en gairebé recta línia, segments curts de cadena que s'anomenen fibres beta. Aquestes fibres s'empaqueten costat a costat formant un full d'aminoàcids entrelaçats. Normalment abasten de 4 a 12 aminoàcids, que defineixen la longitud de la fibra  $h = 1-3\text{nm}$ .

---

<sup>30</sup> <http://www.proteinstructures.com/>



<sup>31</sup> *Figura 35: estructura beta laminar.*

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Franz Hagn, Lukas Eisoldt, John G. Hardy, et. al. A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly, *Nature* 465, 239–242 (13 May 2010)
- Ning Du, Xiang Yang Liu, Janaky Narayanan, et. al. Design of Superior Spider Silk: From Nanostructure to Mechanical Properties, *Biophys J.* 2006 Dec 15; 91(12): 4528–4535.
- Giovanna Cicognan, Montserrat Capellas. Silken, stretchy and stronger than steel!, *Science in School* Issue 4- 09/03/2007
- Brockwell, D. J., et al. Pulling geometry defines the mechanical resistance of  $\beta$ -sheet protein, *Nature Structural Biology* 10, 731-737 (2003).
- Ittah, S., Cohen, S., Garty, S., Cohn, D. & Gat, U. An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation, *Biomacromolecules* 7,1790–1795 (2006)
- Fritz Vollrath & David P. Knight, Liquid crystalline spinning of spider silk, *Nature* 410, 541-548 (29 March 2001)
- Sinan Keten, Zhiping Xu, Britni Ihle & Markus J. Buehler. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of  $\beta$ -sheet crystals in silk, *Nature Materials* 9, 359–367 (2010)
- Yang Hsia, Eric Gnesa et. al. Spider Silk Composites and Applications, University of the Pacific

---

<sup>31</sup> <http://www.proteinstructures.com/>

- Fritz Vollrath. Strength and structure of spiders' silks. *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 (2000) 67-83
- Massachusetts Institute of Technology, Department of Civil and Environmental Engineering. "Spider Silk: Protein's Strength Lies In H-bond Cooperation." *ScienceDaily*. *ScienceDaily*, 18 February 2008.
- Li, G., Zhou, P., Shao, Z., Xie, X., Chen, X., Wang, H., Chunyu, L. and Yu, T. (2001). The natural silk spinning process. *European Journal of Biochemistry*, 268: 6600–6606.
- Xiao-Xia Xia, Zhi-Gang Qian, Chang Seok Ki, Young Hwan Park, David L. Kaplan, and Sang Yup Lee. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010

<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/07/07H157/t2.pdf>

[http://es.wikipedia.org/wiki/Seda\\_de\\_ara%C3%B1a](http://es.wikipedia.org/wiki/Seda_de_ara%C3%B1a)