

Clonagem, seqüenciamento e expressão de um bloqueador de cálcio da aranha *Phoneutria nigriventer*

Fernanda Bernardes Calvo e Patrick Jack Spencer
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PNV) é constituído por um vasto leque de substâncias biologicamente ativas. Por esta razão, suas propriedades bioquímicas e farmacológicas têm sido largamente estudadas. O PNV é constituído principalmente por uma mistura de polipeptídeos básicos de baixa massa molecular (3500-9000 Da) e uma pequena quantidade de histamina (0,06-1%) e serotonina (0,03-0,25%) (LeSueur, 2005). Recentemente, o interesse pela caracterização bioquímica e farmacológica do veneno da *Phoneutria nigriventer* tem aumentado, por ser uma ferramenta na investigação da função de canais de íons em nível molecular e celular (Kushmerick, 1999), uma vez que os polipeptídeos contidos neste veneno são ativadores de canais iônicos e receptores (Cardoso, 2003). Em especial, a porção ω -Phonetoxin IIA ou Tx3-4, cujo peso molecular é de 8362.7Da, apresenta 76 aminoácidos, com 14 cisteínas formando 7 pontes dissulfídicas. Esse peptídeo é um potente bloqueador de canais de cálcio do tipo N e L, apresentando homologia da estrutura primária com a toxina ω -agatoxin-III (Cassola, 1998), podendo tornar-se uma importante ferramenta para o estudo da farmacologia de canais. No entanto, devido à escassez e a dificuldade na obtenção do veneno, o uso da tecnologia do DNA recombinante representaria uma alternativa para a obtenção deste fármaco, possibilitando estudos mais detalhados.

OBJETIVO

O projeto tem como objetivo isolar o gene da ω -Phonetoxin IIA a partir do cDNA, obtendo a sua seqüência e, posteriormente realizar a expressão desse peptídeo em sistema bacteriano.

METODOLOGIA

Através da biblioteca de cDNA obtida através da glândula de veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, o gene de interesse foi isolado através de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando primers degenerados (Forward : 5' RTG RTT YTT RCA NCK YTT 3', Reverse: 5' ISI TGY ATH AAY GTN GGN GAY TTY 3'). Primeiramente um PCR com diferentes gradientes de temperatura foi feito para obter a temperatura ótima de anelamento do primer. O amplicon de interesse foi ligado ao plasmídeo pGem T easy e inserido em células competentes para a multiplicação do gene de interesse. A purificação dos plasmídeos foi realizada através de diversos métodos, sendo que aquele que apresentou melhor rendimento foi o Kit comercial Qiagen. A amostra foi concentrada com isopropanol e posteriormente analisada e quantificada através de gel de agarose 1,2%. Após a análise de restrição, confirmando a presença do inserto, o seqüenciamento da amostra foi realizado em seqüenciador automático com o kit Big Dye (applied biosystems).

RESULTADOS

Analisando o produto de PCR através de gel de poliacrilamida, observamos um melhor anelamento do primer ao gene á temperatura de 64,7°C. Através da purificação dos plasmídeos com kit e a concentração com isopropanol obtivemos cerca de 30 μ g/ μ L de plasmídeo. Para a análise e quantificação, o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição Nco I e Pst I, obtendo o plasmídeo de forma linear e o inserto, confirmando o sucesso da clonagem. A amostra foi então seqüenciada e está sendo analisada, visando determinar a melhor estratégia de subclonagem para posterior inserção em um vetor de expressão. Cabe ressaltar que a seqüência de nucleotídeos que codifica para esta toxina ainda não foi descrita.

CONCLUSÕES

O cDNA codificando para a ω -Phonetoxin IIA foi amplificado com sucesso. Após cuidadosa análise e repetições do seqüenciamento, este cDNA, terá a sua seqüência depositada nos bancos de dados (GeneBank e Swissprot), e iniciaremos a etapa de expressão em bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Cardoso, F.C.; Pacifico, L.G.; Carvalho, D.C.; Victoria, J.M.N.; Chávez-Olortegui, C.; Gómez, M.V.; Kalapothakis, E. Molecular cloning and characterization of Phoneutria nigriventer toxins active on calcium channels. *Toxicon*, v.41, p.755-763, Janeiro 2003.

[2] Cassola, A.C.; Jaffe, H.; Fales, H.M.; Castro, A.S.; Magnoli, F.; Cipolla-Neto, J. Omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider Phoneutria nigriventer. *Pflugers Arch*, v.436, p.545-552, Março 1998.

[3] Kushmerick, C.; Kalapothakis, E.; Beirão, P.S.; Penaforte, C.L.; Prado, V.F.; Cruz, J.S.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Gomez, M.V.; Romano-Silva, M.A.; Prado, M.A. Phoneutria nigriventer toxin 3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 72, p.1472-1481, 1999.

[4] Le Sueur, L.P.; Collares-Buzato, C.B.; Kalapothakis, E.; Cruz-Hofling, M.A. In vitro effect of the Phoneutria nigriventer spider venom on cell viability, paracellular barrier function and transcellular transport in cultured cell lines. *Toxicon*, v.46, p.130-141, Junho 2005.

APOIO FINANCEIRO

CNPq/PIBIC