

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE NEUROTOXINAS DO VENENO DA ARANHA
Phoneutria nigriventer

Ivana Assis Souza

Belo Horizonte

2011

Ivana Assis Souza

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE NEUROTOXINAS DO VENENO DA ARANHA
Phoneutria nigriventer

Tese submetida ao programa de pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Vania Ferreira Prado

Belo Horizonte

2011

S729e Souza, Ivana Assis.
Expressão heteróloga de neurotoxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* [manuscrito]. / Ivana Assis Souza. - - Belo Horizonte: 2011.
157f.: il.
Orientadora: Vânia Ferreira Prado.
Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Venenos de Aranha/efeitos adversos. 2. Neurotoxinas. 3. Canais de Cálcio. 4. Bloqueadores dos Canais de Cálcio. 5. Ácido Glutâmico. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Prado, Vânia Ferreira. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QV 600



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Vânia Ferreira Prado, Marcus Vinícius Gomez, Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Marta do Nascimento Cordeiro e Michael Richardson, aprovou a defesa da tese intitulada: **“EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE NEUROTOXINAS DO VENENO DA ARANHA PHONEUTRIA NIGRIVENTER”**, apresentada pela doutoranda **IVANA ASSIS SOUZA**, estando a mesma apta à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 17 de junho de 2011.

Profa. Vânia Ferreira Prado
Orientadora

Prof. Marcus Vinícius Gomez

Profa. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca

Profa. Marta do Nascimento Cordeiro

Prof. Michael Richardson



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE **IVANA ASSIS SOUZA**, nº de registro 2007659977. No dia **dezessete de junho de dois mil e onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE NEUROTOXINAS DO VENENO DA ARANHA PHONEUTRIA NIGRIVENTER”**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Vânia Ferreira Prado, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Vânia Ferreira Prado/ Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Marcus Vinícius Gomez	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Marta do Nascimento Cordeiro	Instituição: FUNED	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Michael Richardson	Instituição: FUNED	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de junho de 2011.

Profa. Vânia Ferreira Prado/ Orientadora Vânia Ferreira Prado
Prof. Marcus Vinícius Gomez Marcus Vinícius Gomez
Profa. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca
Profa. Marta do Nascimento Cordeiro Marta do Nascimento Cordeiro
Prof. Michael Richardson Michael Richardson
Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador Luiz Armando Cunha De Marco

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador. **Prof. Luiz Armando De Mar**
Coordenador do Programa de Pós-Gradua
Farmacologia Bioquímica e Molecular - UF

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Instituto do Milênio
- Emerging leaders in the Americas Program – ELAP

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos;

Aos meus pais, Ivam e Virgínia, pelo apoio e amor incondicional;

À tia Graça, minha segunda mãe;

Às minhas irmãs, Fê e Rafa, pela amizade verdadeira;

Ao meu irmão legítimo Rick, pela boa disposição em me ajudar sempre, sem pedir nada em troca;

Ao meu irmão Flavinho, pelas boas lembranças. A saudade dói.;

À minha orientadora Vania Prado, pela oportunidade, incentivo e confiança. Obrigada pela amizade e por me ajudar a seguir sempre em frente após cada tropeço.

Ao professor Marco Prado, pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Marcus Vinícius Gomez, um grande exemplo de pesquisador, pela sua paixão contagiante pela ciência;

Aos meus grandes mestres e amigos, Dra. Marta, Mike e Márcia, por fazerem da minha iniciação científica um momento inesquecível, de crescimento profissional e pessoal. Vocês são brilhantes!

À minha querida amiga Flavinha, que você saiba da minha imensa gratidão. Muita saudade!

À minha eterna “roomie” do coração Iaci, pela amizade, companheirismo, cumplicidade. Vc já me entende sem precisar de palavras. Saiba que me considero sua quarta irmã. Amo vc!

À minha pequena GRANDE amiga Aninha, que me conquista mais a cada dia e mesmo sendo pequena, ocupa um grande espaço no meu coração. Ao meu querido amigo Alex, obrigada por dividir a Ana comigo!

À doce Fabizinha, sempre trazendo um sorriso para alegrar nosso dia. Obrigada pelos conselhos e força em todos os momentos;

À querida amiga Ritinha, por tudo! Sua amizade vale muito!

Às amigas Cristina, Cristiane e Dani, que fizeram deste Canadá um lugar melhor para se viver;

Aos amigos: Vavá (), pelas boas risadas; Xaxá, pela ajuda e por estar sempre torcendo pelas toxinas; Shebeel, pelo seu jeitinho brasileiro; André, pela agradável convivência; Raul, ou Juan? E.C., thanks man!! Peace!

Aos meus queridos colegas de laboratório no Canadá, Jue, Sanda, Mônica, Mandi, Val e Amro, o meu muito obrigada!

Aos meus queridos amigos de laboratório no Brasil, Dioguinho, Danuza, Andréa, Cíntia, Célio, Alessandra, Jomara e Nancy, que participaram do começo da minha jornada;

Aos queridos amigos Aline e Enéas (Parceria!). Vcs me fazem sorrir só de lembrar de vcs.

Às amigas Mari, Camila, Jô e Bá, pela amizade confortante;

Ao meu amor Chris, por fazer meu coração bater mais forte. Obrigada pelo companheirismo, incentivo e apoio. I love you!

E a todos aqueles que passaram pelo meu caminho durante estes anos de doutorado. Obrigada!

RESUMO

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* contém vários peptídeos que atuam em diferentes canais e receptores do sistema nervoso de insetos e mamíferos. As toxinas Tx3-6 e Tx3-4 são bloqueadoras de canais de cálcio sensíveis a voltagem e possuem um grande potencial farmacológico no tratamento da dor e na neuroproteção. Como apenas pequenas quantidades de cada toxina podem ser isoladas do veneno, testes farmacológicos e estruturais ficam restritos à obtenção destes peptídeos. Neste trabalho, nós testamos diferentes sistemas de expressão e purificação na tentativa de obtermos as toxinas Tx3-6 e Tx3-4 recombinantes funcionais e em grandes quantidades. A toxina Tx3-6 recombinante expressa no vetor pBADmycHis em *E. coli* teve efeito analgésico comparável à toxina nativa no teste da formalina em ratos, porém, o rendimento da expressão foi de apenas 0,3 mg/L de cultura. Cerca de 2 mg da mesma toxina foram obtidos no sistema pE-SUMO (*E. coli*), mas a toxina não teve nenhum efeito no bloqueio de glutamato em sinaptosomas corticais de camundongos. A Tx3-4 também foi expressa no sistema SUMO, de onde foram obtidos cerca de 800 µg/L da toxina recombinante solúvel e funcional e cerca de 3 mg/L da toxina insolúvel que foram renaturados *in vitro* e renderam 2 mg funcionais. Expressões nos sistemas pPICZ (leveduras), pET (*E. coli*) e pBADHis (*E. coli*) foram insatisfatórias devido a baixos rendimentos, expressão em corpos de inclusão e obtenção das toxinas de forma inativa. A caracterização da estrutura secundária da toxina Tx3-4 por dicroísmo circular revelou que a maior parte da sua estrutura apresenta um enovelamento aleatório, mas que a toxina contém também estruturas em α -hélice e, em menor quantidade, folhas β . Este arranjo é semelhante ao observado para oxytoxinas do veneno da aranha *Oxyopes lineatus*, que também são bloqueadoras de canais de cálcio sensíveis a voltagem. Apesar da disponibilidade de inúmeros sistemas de expressão, a produção de proteínas recombinantes funcionais ainda é uma tarefa difícil. A expressão funcional das toxinas recombinantes Tx3-6 e Tx3-4 criaram novas expectativas para futuros testes farmacológicos e análises estruturais e os resultados obtidos com a renaturação da toxina Tx3-4 abrem novos caminhos para a obtenção de toxinas em larga escala.

Palavras chave: *Phoneutria nigriventer*. Expressão heteróloga. Toxinas. Tx3-4. Tx3-6. Canais de cálcio. Glutamato.

ABSTRACT

The venom of the spider *Phoneutria nigriventer* contains several peptides that act on ion channels and receptors of the nervous system of insects and mammals. The toxins Tx3-6 and Tx3-4 are voltage-gated calcium channel blockers and have shown a pharmacological potential in the treatment of pain and in neuroprotection. Only small amounts of these toxins can be purified from the venom and pharmacological and structural tests depend on their availability. In this work, we tested different expression and purification systems in order to identify the best method of getting functional toxins Tx3-6 and Tx3-4 in large amounts. The recombinant toxin Tx3-6 expressed in the vector pBADmycHis in *E. coli* was functional, however, the expression yield was only 0,3 mg/L of culture. Two milligrams of Tx3-6 was obtained using the SUMO system (*E. coli*) but the recombinant toxin was not functional. The Tx3-4 was also expressed in the SUMO system and approximately 800 µg/L of a soluble functional recombinant toxin was produced. Three milligrams of insoluble Tx3-4 was also purified by the SUMO system and after refolding *in vitro*, we got 2 mg/L of a functional toxin. Expressions carried in the systems pPICZ (yeast), pET (*E. coli*) and pBADHis (*E. coli*) were unsuccessful due to low yield, expression as inclusion bodies and production of inactive toxins. The secondary structural characterization of the recombinant toxin Tx3-4 by circular dichroism revealed that the peptide is mainly arranged in random coil but it has some α -helices and, in a lower percentage, β -sheet structures are also present. This structure is similar to that described for the oxytoxins from the venom of the spider *Oxyopes lineatus*, which are also voltage-gated calcium channel blockers. Despite the availability of numerous gene fusion systems, recombinant protein expression in *Escherichia coli* remains difficult. The functional expression of the toxins Tx3-6 and Tx3-4 created new expectations for further pharmacological and structural analysis and the results obtained from the refolding of the Tx3-4 opened new pathways for the production of these toxins in large scale.

Key words: *Phoneutria nigriventer*. Heterologous expression. Toxins. Tx3-4. Tx3-6. Calcium channels. Glutamate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	22
Figura 2: Desenho esquemático das subunidades formadoras dos canais de cálcio	27
Figura 3: Sequência do cDNA que codifica a toxina Tx3-6	29
Figura 4: Comparação da sequência primária da toxina Tx3-6 com outros peptídeos purificados de veneno de aranhas	30
Figura 5: Sequência do cDNA que codifica a toxina Tx3-4	35
Figura 6: Comparação da sequência primária da toxina Tx3-4 com outros peptídeos purificados de veneno de aranhas	36
Figura 7: Esquema da reação de PCR que gerou o cDNA que codifica a toxina Tx3-4	46
Figura 8: Inserção do plasmídeo pPICZ ao DNA genômico da <i>Pichia</i> .	49
Figura 9: Etapas de clonagem do cDNA da toxina Tx3-6 no vetor pPICZC	65
Figura 10: Construção Tx3-6pPICZ	66
Figura 11: Análise da expressão e purificação da proteína Tx3-6 expressa em <i>Pichia pastoris</i>	70
Figura 12: Construção Tx3-4pET	72
Figura 13: Análise da solubilidade da toxina Tx3-4 expressa em <i>E. coli</i> utilizando-se o vetor pET	73
Figura 14: Construção Tx3-6pBADHis	75
Figura 15: Piloto da expressão da toxina Tx3-6PPHis em função da concentração de L-arabinose	78
Figura 16: Análise da expressão e purificação da toxina Tx3-6 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pBADHis B)	79
Figura 17: Construção Tx3-4pBADHis	82
Figura 18: Análise da purificação da toxina Tx3-4 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pBADHis)	83
Figura 19: Digestão da proteína de fusão	84
Figura 20: Ensaio biológico da toxina recombinante Tx3-4 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pBADHis)	85
Figura 21: Construção Tx3-6pBADmycHis	87

Figura 22: Análise da expressão e purificação da toxina Tx3-6 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pBADmycHis)	89
Figura 23: Efeito do tratamento com as toxinas Tx3-6 nativa e recombinante (vetor pBADmycHis) na fase inflamatória do teste da formalina em ratos.	91
Figura 24: Construção Tx3-6pESUMO	94
Figura 25: Análise da expressão e purificação da toxina Tx3-6 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pE-SUMO)	95
Figura 26: Digestão e purificação da toxina Tx3-6 recombinante	96
Figura 27: Espectros de dicroísmo circular das toxinas Tx3-6 nativa e recombinante	97
Figura 28: Ensaio biológico da toxina recombinante Tx3-6 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pE-SUMO)	98
Figura 29: Construção Tx3-4pESUMO	100
Figura 30: Solubilidade da toxina recombinante Tx3-4SUMO	101
Figura 31: Análise da expressão, purificação e digestão da toxina recombinante Tx3-4SUMO	105
Figura 32: Purificação da toxina Tx3-4 madura após digestão	106
Figura 33: Purificação da toxina recombinante Tx3-4	107
Figura 34: Efeito biológico da toxina recombinante Tx3-4 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pESUMO) no aumento da concentração de Ca^{2+} intrasinaptosomal	109
Figura 35: Efeito biológico da toxina recombinante Tx3-4 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pESUMO) na liberação de glutamato	110
Figura 36: Digestão e purificação da toxina recombinante Tx3-4SUMO obtida sob condições desnaturantes	111
Figura 37: Análise do teste piloto de renaturação	113
Figura 38: Renaturação da toxina recombinante Tx3-4 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pE-SUMO)	115
Figura 39: Efeito biológico da toxina recombinante renaturada Tx3-4 expressa em <i>E. coli</i> (vetor pESUMO) na liberação de glutamato	117
Figura 40: Espectro de dicroísmo circular da toxina Tx3-4 renaturada	119
Figura 41: Expressão da toxina Tx3-4SUMO em meio restritivo M9	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bactérias e leveduras utilizadas neste trabalho	39
Tabela 2: Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento nas clonagens da toxina Tx3-6	44
Tabela 3: Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento nas clonagens da toxina Tx3-4	45
Tabela 4: Programa utilizado na purificação em coluna Vydac C8 analítica	57
Tabela 5: Programa utilizado na purificação em coluna Vydac C8 preparativa	57
Tabela 6: Composição dos tampões de renaturação	60
Tabela 7: Triagem das condições de renaturação baseada na concentração do agente desnaturante e condições oxidantes	60
Tabela 8: Purificação da toxina Tx3-4 recombinante solúvel (vetor pE-SUMO)	108
Tabela 9: Purificação da toxina Tx3-4 recombinante dos corpos de inclusão (vetor pE-SUMO)	116
Tabela 10: Resumo das expressões e purificações das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 recombinantes	136

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: microgramas

µM: micromolar

°C: graus centígrado

ACN: acetonitrila

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

dNTPs: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO₆₀₀: densidade óptica medida à 600 nm

DRG: gânglio da raiz dorsal

DTT: ditionitrito

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

EGTA Etilenoglicol-bis-β-aminoetil éster

FURA -2AM: Fura-2-acetoximetiléster

GSH: glutathione reduzida

GSSG: glutathione oxidada

HPLC: *High pressure liquid chromatography*

IC₅₀: concentração do inibidor que exibe a metade do efeito inibitório máximo

i.c.: intra cérebro

IgG: imunoglobulina G

IP3: inositol trifosfato

IPTG: isopropil-tio-β-D-galactosídeo

kb: quilobase

kDa: kilodáltons

KCl: cloreto de potássio

KRH Krebs-Ringer-Hepes

LB: Lúria-Bertani

M: molar

mA: miliamper

MD: meio mínimo de glicose

MgCl₂: cloreto de magnésio

MGY: meio mínimo de glicerol

mL: mililitro

MM: meio mínimo de metanol

mM: milimolar

nM: nanomolar

nm: nanometros

NMDA: *N*-methyl *D*-aspartate

pb: pares de bases

PBS: tampão fosfato salina

PCR: reação em cadeia da polimerase

PhM: fração não tóxica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

PhTx1: fração tóxica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

PhTx2: fração tóxica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

PhTx3: fração tóxica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

PhTx4: fração insetotóxica do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TFA: ácido trifluorácetico

V: volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 As aranhas do gênero <i>Phoneutria</i>	19
1.1.2 O veneno da <i>Phoneutria</i>	20
1.3 Canais de cálcio sensíveis à voltagem	24
1.3.1 Canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo N e a dor	25
1.4 A toxina Tx3-6	28
1.4.1 A toxina Tx3-6 como agente antinociceptivo	31
1.5 Cálcio, glutamato e a morte neuronal	31
1.6 A toxina Tx3-4	32
1.6.1 A toxina Tx3-4 como agente neuroprotetor	33
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Hospedeiros e vetores	38
3.2 Meios de cultivo	38
3.3 Construção dos plasmídeos recombinantes	40
3.3.1 Clonagem do fragmento de cDNA que codifica a toxina Tx3-6 madura no vetor pPICZ	40
3.3.2 Clonagem do fragmento de cDNA que codifica a toxina Tx3-4 madura no vetor pET	41
3.3.3 Clonagem dos fragmentos de cDNA que codificam as toxinas Tx3-6 e Tx3-4 no vetor pBADHis	41
3.3.3.1 Tx3-6	41
3.3.3.2 Tx3-4	42
3.3.4 Clonagem do fragmento de cDNA que codifica a toxina Tx3-6	42

<i>madura no vetor pBADmycHis</i>	
3.3.5 Clonagem dos fragmentos de cDNA que codificam as toxinas Tx3-6 e Tx3-4 maduras no vetor pE-SUMO	43
3.4 Expressão e purificação das toxinas recombinantes	47
3.4.1 Expressão e purificação da toxina recombinante Tx3-6 em levedura <i>Pichia pastoris</i> (vetor pPICZ)	47
<u>3.4.1.1 Transformação em <i>Pichia</i> e confirmação do fenótipo</u>	47
<u>3.4.1.2 Expressão em larga escala e purificação</u>	50
3.4.2 Expressão e purificação da toxina Tx3-4 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (vetor pET)	51
3.4.3 Expressão e purificação das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 em <i>E. Coli</i> (TOP10) (vetores pBADHis e pBADmycHis)	51
<u>3.4.3.1 Tx3-6</u>	51
3.4.3.1.1 Purificação da toxina recombinante Tx36PPHis (vetor pBADHis)	52
3.4.3.1.2 Purificação da toxina recombinante Tx3-6mycHis (vetor pBADmycHis)	52
<u>3.4.3.2 Tx3-4</u>	53
3.4.4 Expressão e purificação das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 em <i>E. Coli</i> (ORIGAMI) (vetor pESUMO)	54
<u>3.4.4.1 Purificação sob condições nativas</u>	54
<u>3.4.4.2 Purificação sob condições desnaturantes</u>	55
3.5 Renaturação da toxina Tx3-4	58
3.6 Western blotting	58
3.7 Testes de atividade	59
3.7.1 Teste da formalina	59
3.7.2 Medida de cálcio e liberação de glutamato em sinaptosomas corticais de camundongos	61
<u>3.7.2.1 Medida da concentração de cálcio intrasinaptosomal</u>	61
<u>3.7.2.2 Liberação de glutamato</u>	62
3.8 Análise estatística	62
3.9 Dicroísmo circular	62

3.10 Expressão da toxina Tx3-4SUMO em meio restritivo M9 para análises estruturais	63
4 RESULTADOS	64
4.1 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-6 em <i>Pichia pastoris</i> (vetor pPICZ)	64
4.1.1 Clonagem	64
4.1.2 Expressão, purificação e análise da toxina Tx36 (vetor pPICZ)	67
4.2 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-4 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (vetor pET-45b (+))	71
4.2.1 Clonagem	71
4.2.2 Expressão da toxina Tx3-4 (vetor pET-45b (+))	71
4.3 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-6 em <i>E. coli</i> TOP10 (vetor pBADHis)	74
4.3.1 Clonagem	74
4.3.2 Expressão, purificação e análise da proteína Tx36PPHis (vetor pBADHis)	76
4.4 Clonagem, expressão, purificação e análise da toxina Tx3-4 em <i>E. coli</i> TOP10 (vetor pBADHis)	80
4.4.1 Clonagem	80
4.4.2 Expressão, purificação e análise da toxina Tx3-4 (vetor pBADHis)	80
4.4.2.1 Liberação de glutamato	81
4.5 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-6 em <i>E. coli</i> TOP10 (vetor pBADmycHis)	86
4.5.1 Clonagem	86
4.5.2 Expressão, purificação e análise da proteína Tx36mycHis (vetor pBADmycHis)	88
4.5.3 Teste de atividade da toxina Tx36 (vetor pBADmycHis)	90
4.6 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-6 em <i>E. coli</i> ORIGAMI (vetor pE-SUMO)	92

4.6.1 Clonagem	92
4.6.2 Expressão e purificação da toxina Tx3-6 (vetor pE-SUMO)	92
<u>4.6.2.1 Dicroísmo circular</u>	93
<u>4.6.2.2 Liberação de glutamato</u>	93
4.7 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-4 em E. coli ORIGAMI (vetor pE-SUMO)	99
4.7.1 Clonagem	99
4.7.2 Expressão, purificação e análise da toxina Tx3-4-SUMO	99
<u>4.7.2.1 Purificação sob condições nativas</u>	102
4.7.2.1.1 Medição de cálcio intrasinaptosomal	102
4.7.2.1.2 Liberação de glutamato	103
<u>4.7.2.2 Purificação sob condições desnaturantes</u>	103
<u>4.7.2.3 Renaturação e análise da toxina recombinante renaturada</u>	112
4.7.2.3.1 Experimento piloto de renaturação	112
4.7.2.3.2 Renaturação da toxina recombinante Tx3-4	114
4.7.2.3.3 Liberação de glutamato	114
4.7.2.3.4 Dicroísmo circular	118
4.8 Expressão da toxina Tx3-4SUMO em meio restritivo M9	120
 5 DISCUSSÃO	 122
 5.1 Expressão em <i>Pichia pastoris</i> (vetor pPICZ)	 123
5.2 Expressão em <i>Escherichia coli</i>	124
5.2.1 Vetor pET	124
5.2.2 Vetor pBADHis	126
<u>5.2.2.1 Tx3-6</u>	126
<u>5.2.2.2 Tx34</u>	127
5.2.3 Vetor pBADmycHis	128
5.2.4 Vetor pE-SUMO	129

<u>5.2.4.1 Tx3-6</u>	130
<u>5.2.4.2 Tx3-4</u>	131
5.3 Considerações gerais	134
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 137

1 INTRODUÇÃO

Animais venenosos produzem uma grande riqueza de peptídeos e proteínas tóxicas em seus venenos. Grande parte destas toxinas são potentes bloqueadores e moduladores de canais iônicos e, portanto, ferramentas farmacológicas valiosas. Toxinas animais são encontradas e isoladas predominantemente de caramujos marinhos, aranhas, escorpiões, cobras e alguns insetos (Norton and McDonough 2008).

As aranhas são o maior grupo de animais peçonhentos, contando com mais de 40.000 espécies já descritas. Inúmeras toxinas isoladas destes animais vêm sendo utilizadas no estudo de canais iônicos e receptores do sistema nervoso de insetos e mamíferos (Wood, Miljenovic et al. 2009). As principais aranhas de interesse médico no Brasil pertencem aos gêneros *Phoneutria*, *Loxosceles* e *Latrodectus* (Lucas 1988), responsáveis por casos de envenenamento severo (Escoubas, Diochot et al. 2000).

1.1 As aranhas do gênero *Phoneutria*

As aranhas do gênero *Phoneutria* são conhecidas popularmente como “aranhas da bananeira”, por serem encontradas frequentemente em cachos de bananas, ou “aranhas armadeiras”, devido à posição de ataque que assumem erguendo suas patas dianteiras (Lucas 1988). Podem alcançar de 3 a 4 cm de corpo e 15 cm de envergadura de pernas (Figura 1a e b) (Brasil 1998).

As aranhas do gênero *Phoneutria* apresentam hábitos noturnos, são solitárias, caçadoras, dominam suas presas pelo veneno e não constroem teias. Durante o dia, ficam escondidas e chegam a entrar em casas podendo causar acidentes (Lucas 1992). Os primeiros acidentes relatados para o gênero datam da década de 20, sendo atribuídos casos de envenenamento neurotóxico.

No quadro clínico causado pela picada da aranha predominam as manifestações locais. A dor é imediata e intensa podendo irradiar até a raiz do membro afetado. Crianças podem desenvolver um choque neurogênico caracterizado por sudorese, agitação, salivação, priapismo e morte (Lucas, 1988; Brasil, 1998). A espécie *P. nigriventer* (Keyserling 1891) ocorre em Minas Gerais,

Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e é considerada a principal espécie em termos epidemiológicos.

1.1.2 O veneno da *Phoneutria*

As aranhas usam o seu veneno para paralisar ou matar sua presa, atuar na pré-digestão do alimento e participar do mecanismo de defesa contra predadores (Rash and Hodgson 2002). O veneno das aranhas fornece uma gama de proteínas bioativas, como as neurotoxinas, que atuam nos canais iônicos e receptores do sistema neuromuscular de insetos e mamíferos. Os principais constituintes do veneno das aranhas são proteínas, polipeptídeos e poliaminas neurotóxicas, enzimas, ácidos nucleicos, aminoácidos livres, monoaminas e sais inorgânicos (Rash and Hodgson 2002).

Algumas toxinas peptídicas isoladas do veneno de aranhas podem bloquear a liberação de neurotransmissores afetando a exocitose de vesículas pré-sinápticas, resultando em paralisia flácida. Por outro lado, outras toxinas podem causar paralisia excitatória atuando na indução de uma despolarização celular excessiva através da inibição da inativação de canais (Escoubas, Diochot et al. 2000).

O veneno da *P. nigriventer* apresenta neurotoxinas potentes que quando injetadas via intracerebroventricular (i.c) em camundongos causam efeitos como salivação, lacrimejamento, priapismo, convulsões, paralisia flácida e espástica e, em alguns casos, a morte (Rezende Junior, Cordeiro et al. 1991).

Rezende e colaboradores (1991) purificaram do veneno de *P. nigriventer*, três frações de neurotoxinas PhTx1, PhTx2 e PhTx3 que atuam sobre canais de sódio neuronais, canais de sódio musculares e canais de cálcio, além de uma fração não neurotóxica (PhM) com atividade de contração em músculo liso. Um quarto grupo PhTx4 com atividade inseto-tóxica foi descrito posteriormente (Figueiredo, Garcia et al. 1995). Além de neurotoxinas previamente descritas, foram purificadas duas enzimas proteolíticas (PN 44 e PN 47) do tipo serinoproteases que aparentemente estão envolvidas no desenvolvimento de hiperalgesia e novas toxinas de massa molecular (3,5 kDa e 4,0 kDa) e ainda toxinas atracotoxinas-like (7,0-8,5 kDa) (Richardson, Pimenta et al. 2006).

Fração PhTx1

A fração PhTx1 contém apenas uma neurotoxina (Tx1), que foi isolada do veneno e teve toda a sua sequência primária determinada em 1990 (Diniz, Cordeiro et al. 1990). Esta toxina, injetada via intracerebroventricular (i.c.) em camundongos, causa elevação da cauda, comportamento excitatório e paralisia espástica dos membros posteriores (Rezende Junior, Cordeiro et al. 1991). Esta toxina age bloqueando canais de sódio sensíveis à voltagem, competindo pelos mesmos sítios que a μ conotoxina (Martin-Moutot, Mansuelle et al. 2006).

Fração PhTx2

Quatro toxinas foram inicialmente purificadas da fração PhTx2 (Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6 e Tx2-9) e tiveram suas sequências completas determinadas (Cordeiro, Diniz et al. 1992). Experimentos de *Patch clamp* mostraram que a fração PhTx2 prolonga a inativação de canais de sódio, o que foi comprovado por Romano-Silva e colaboradores (1993) (Araujo, Cordeiro et al. 1993). Eles mostraram que a fração PhTx2 atua em canais de sódio facilitando a entrada deste íon e, conseqüentemente, através da despolarização da célula, favorece o influxo de cálcio e a liberação do neurotransmissor glutamato. Além disso, foi mostrado que esta fração atua também na liberação do neurotransmissor acetilcolina (Moura, Prado et al. 1998). Deste grupo, a toxina Tx2-6 tem recebido atenção especial por causar priapismo e tem sido estudada como um novo agente farmacológico no tratamento de disfunção erétil (Nunes, Costa-Goncalves et al. 2008; Villanova, Andrade et al. 2009).

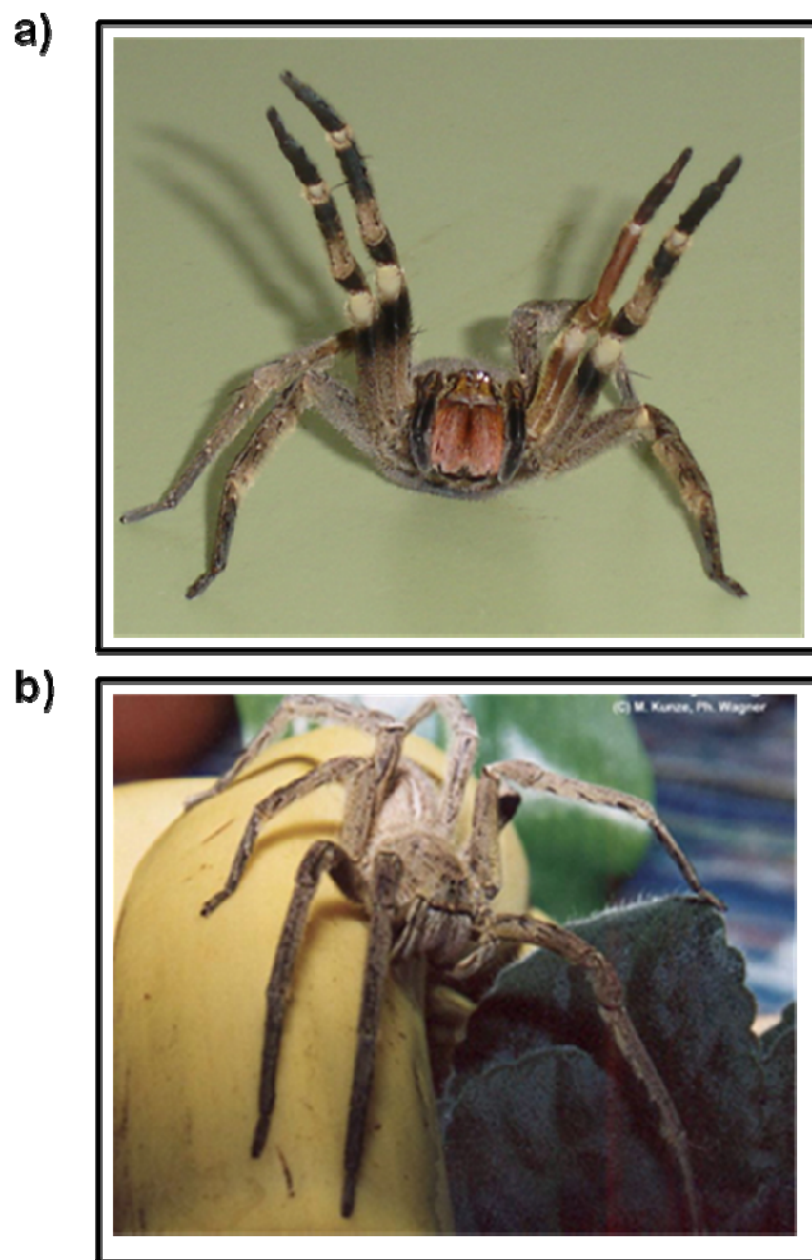


Figura 1: Aranha *Phoneutria nigriventer*. a) Aranha armadeira em posição de ataque. b) Aranha armadeira encontrada em bananas.

Fração PhTx3

A fração PhTx3 causa paralisia flácida em roedores devido à sua ação inibitória na liberação de neurotransmissores (Rezende Junior, Cordeiro et al. 1991; Gomez, Kalapothakis et al. 2002). Cordeiro e colaboradores (1993) separaram esta fração através de cromatografia de fase reversa (HPLC) e cromatografia de troca iônica (HPLC) em seis componentes polipeptídicos (Tx3-1 a Tx3-6) que apresentaram diferentes efeitos neurotóxicos em camundongos. Em uma dose de 5 µg/camundongo, injetada via i.c., os peptídeos Tx3-3 e Tx3-4 se mostraram os mais tóxicos, causando uma rápida paralisia flácida geral e morte em 10-30 minutos. A administração de Tx3-2 causou imediatamente o sintoma de giro no sentido horário e paralisia flácida após 6 horas. Tx3-1, Tx3-5 e Tx3-6 induziram paralisia apenas nos membros posteriores e perda gradual dos movimentos e agressão durante 24 horas.

Estudos mais detalhados mostraram que a toxina Tx3-1 (também chamada de PhKv) bloqueia correntes de potássio do tipo A, sendo recentemente demonstrado seu efeito antiarrítmico em corações isolados de ratos (Kushmerick, Kalapothakis et al. 1999; Almeida, Andrade et al. 2011).

A toxina Tx3-2, apesar de não interferir na liberação de glutamato (Prado et al., 1996), possui um efeito de inibição em canais de cálcio do tipo L, aparentemente em músculos cardíacos e esqueléticos (Kalapothakis et al., 1998 a,b).

As toxinas Tx3-3, Tx3-4 e Tx3-6 atuam bloqueando canais de cálcio sensíveis à voltagem inibindo o influxo de cálcio intracelular em sinaptossomas corticais de ratos despolarizados com KCl (Prado, Guatimosim et al. 1996; Miranda, Romano-Silva et al. 1998; Gomez, Kalapothakis et al. 2002; Vieira, Kushmerick et al. 2003).

Fração PhTx4

A fração PhTx4 apresentou efeito de inibição da captação de glutamato em sinaptossomas corticais de ratos de maneira dose-dependente (Mafra, Figueiredo et al. 1999).

A toxina Tx4(6-1) foi isolada e sequenciada a partir desta fração e não demonstrou toxicidade em camundongos apesar de se mostrar altamente tóxica para insetos (Figueiredo, Garcia et al. 1995). Mais tarde foi revelado que esta toxicidade inseto-específica é devida a uma ação em canais de sódio sensíveis à

voltagem de insetos, prolongando a ativação deste canais e aumentando a liberação de glutamato (de Lima, Stankiewicz et al. 2002). As toxinas PnTx4-3 e PnTx4 (5-5) também foram isoladas da fração PhTx4 e possuem a ação de inibir a captação de glutamato em sinaptosomas e inibir reversivelmente receptores NMDA, respectivamente (Figueiredo et al. 2001; Oliveira et al. 2003).

1.3 Canais de cálcio sensíveis à voltagem

Canais iônicos são proteínas da membrana plasmática que conectam o exterior das células e o citosol através da formação de poros de alta seletividade que abrem e fecham. São responsáveis pelo transporte de íons como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- que se difundem rapidamente de maneira passiva através da bicamada lipídica em função do gradiente eletroquímico (Alberts 2002).

Canais de cálcio sensíveis a voltagem respondem ao potencial elétrico ao longo da membrana em que se encontram, fazendo a conexão entre a sinalização elétrica e bioquímica da célula (Berg 2004; Norton and McDonough 2008). Eles controlam o influxo de cálcio e regulam processos intracelulares como contração, secreção, neurotransmissão e expressão gênica. O aumento da concentração de cálcio livre em terminais nervosos pré-sinápticos ativa a exocitose de vesículas contendo neurotransmissores (Heinke, Balzer et al. 2004; Sudhof 2004; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005; Evans and Zamponi 2006; Yaksh 2006; Hess, Jen et al. 2010).

Os canais de cálcio são proteínas complexas compostas por quatro ou cinco subunidades codificadas por múltiplos genes. A subunidade α_1 é a maior e, além de formar o poro condutor, acredita-se que sozinha, seja suficiente para o funcionamento do canal. Esta subunidade é organizada em quatro domínios homólogos (I-IV), sendo que cada domínio apresenta seis segmentos transmembranares (S1-S6). Os canais de cálcio sensíveis a voltagem são formados também pelas subunidades auxiliares β , $\alpha_2\delta$ e em alguns casos, γ (Figura 2) (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005; Hess, Jen et al. 2010).

Os canais de cálcio sensíveis à voltagem foram classificados nos tipos L, N, P, Q, R e T baseando-se nas propriedades biofísicas e farmacológicas das correntes de cálcio em diferentes tipos celulares. A principal diferença entre os canais é a natureza da subunidade formadora do poro α_1 . Existem três famílias de subunidade

α_1 : Ca_v1 (L), Ca_v2 (N, P/Q e R) e Ca_v3 (T) (Figura 2) (Evans and Zamponi 2006).

1.3.1 Canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo N e a dor

A família Ca_v2 ($Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ e $Ca_v2.3$) inclui canais contendo as subunidades α_{1A} , α_{1B} e α_{1E} relacionadas às correntes P/Q, N e R respectivamente. O canal que possui a subunidade α_1 do tipo $Ca_v2.2$ pode ser chamado de canal de cálcio sensível a voltagem α_{1B} ou do tipo N.

Estes canais (do tipo N) são encontrados em neurônios ganglionares da raiz dorsal (DRG), neurônios simpáticos e outras células do sistema nervoso central e periférico de mamíferos (Snutch 2005). Eles apresentam uma alta expressão no corno dorsal da medula espinhal nas lâminas I e II, onde ocorrem sinapses das fibras aferentes primárias nociceptivas (Yaksh 2006).

Canais do tipo N participam, portanto, do caminho ascendente da dor, sendo regulados na medula espinhal através da subunidade auxiliar $\alpha_2\delta$ em estágios de dor crônica (Lewis and Garcia 2003). Camundongos knockout para o gene que codifica a subunidade α_{1B} são menos sensíveis à dor neuropática e inflamatória (Altier and Zamponi 2004).

Estímulos mecânicos, elétricos, térmicos e químicos ativam nociceptores iniciando sinais que são transmitidos primeiramente pelas fibras aferentes C e A δ , passando pelos neurônios DRGs e sendo projetados até estruturas do Sistema Nervoso Central, como o tálamo, para serem processados. A transmissão sináptica através dos DRGs depende crucialmente de canais de cálcio que regulam a liberação de neurotransmissores (Altier and Zamponi 2004; Hess, Jen et al. 2010).

Bloqueadores de canais do tipo N inibem a liberação de neuropeptídeos relacionados com a dor como, por exemplo, a substância P e neurotransmissores excitatórios como o glutamato (Lee, Kim et al. 2010). Estes canais são inibidos por agonistas de receptores mu opióides como a morfina, um potente analgésico. Inibidores de canais de cálcio sensíveis à voltagem que interagem especificamente com subunidades auxiliares relacionadas à transmissão ascendente da dor podem produzir analgesia com poucos efeitos colaterais (Lewis and Garcia 2003). Estes canais são, portanto, possíveis alvos para terapias no tratamento da dor.

Farmacologicamente, os canais do tipo N são inibidos por uma classe de toxinas peptídicas isoladas de um caramujo marinho do gênero *Conus* chamadas de

ω -conotoxinas. A ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx) é um inibidor de canal N bastante específico, produzindo uma inibição completa e irreversível das correntes do tipo N em DRGs e neurônios simpáticos e sensoriais em concentrações de 100nM a 1 μ M (Snutch 2005).

A ω -conotoxina MVIIA é um bloqueador de canais de cálcio do tipo N e apresenta um grande efeito antinociceptivo e neuroprotetor. Sua versão sintética CTX MVIIA, Ziconotida (Prialt), foi aprovada nos Estados Unidos e Europa como agente terapêutico no tratamento da dor severa e crônica (Xia, Chen et al. 2006). A administração da Ziconotida é feita via intratecal e sua vantagem é que ela não causa dependência ou tolerância como no caso da morfina (Lee, Kim et al. 2010). Porém, sua administração é acompanhada de sérios efeitos adversos como tonturas, náuseas, confusão mental, sonolência, perda de memória, alucinações, dentre outros sintomas (Penn and Paice 2000; Thompson, Dunbar et al. 2006). A busca por novos bloqueadores de canais de cálcio do tipo N vem acontecendo nos últimos anos na tentativa de se encontrar um agente terapêutico potente com a mesma eficácia da Ziconotida, porém com menores ou nenhum efeito adverso.

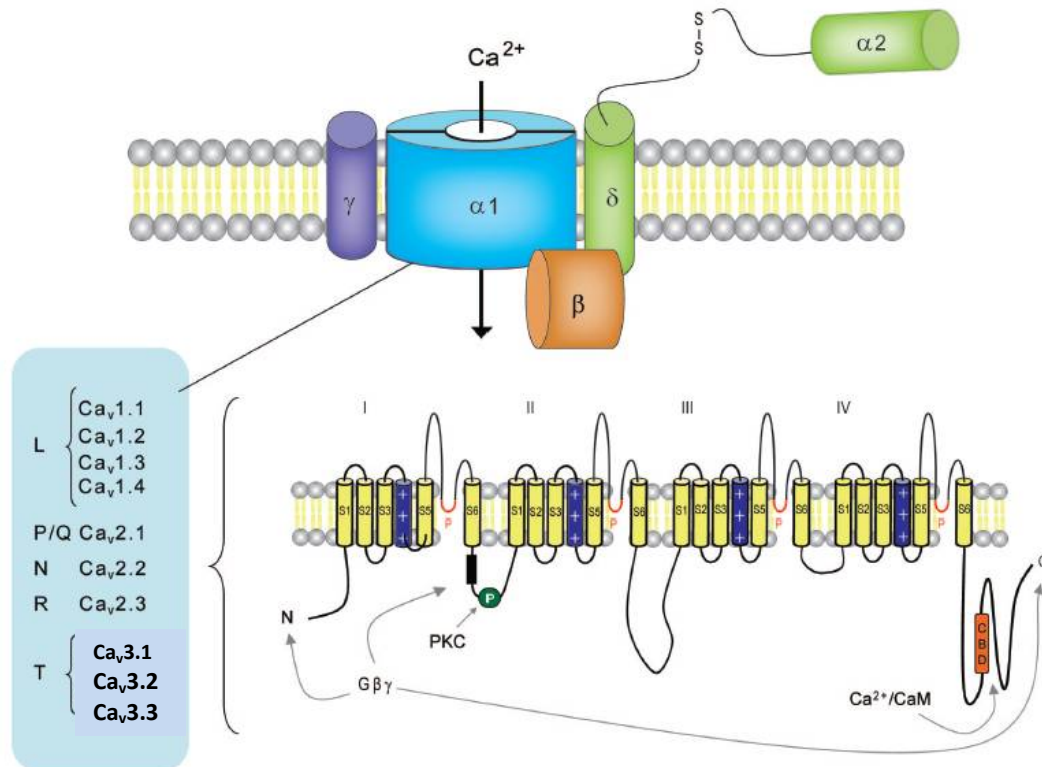


Figura 2: Desenho esquemático das subunidades formadoras dos canais de cálcio. Todos os canais de cálcio contém a subunidade formadora do poro $\alpha 1$, que determina suas principais características farmacológicas e biofísicas. Existem 3 famílias de subunidades $\alpha 1$: Ca_v1 , Ca_v2 e Ca_v3 , sendo que cada uma apresenta diferentes subtipos. A subunidade $\alpha 1$ contém 4 domínios homólogos (I-IV) e cada domínio consiste de 6 hélices transmembranares (Hess, Jen et al. 2010).

1.4 A toxina Tx3-6

O cDNA que codifica a toxina Tx3-6 foi obtido a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha e codifica um peptídeo precursor de 90 aminoácidos, sendo que 21 resíduos formam o peptídeo sinal, 14 formam o pré-peptídeo e 55 formam a toxina madura (Cardoso, Pacifico et al. 2003). Esta estrutura de peptídeo precursor é bastante comum entre toxinas de aranhas e é um indicativo de que as toxinas passam por modificações pós-traducionais que requerem no mínimo duas ou três clivagens proteolíticas (Santos, Imperial et al. 1992; Kalapothakis, Penaforte et al. 1998; Kalapothakis, Penaforte et al. 1998). A dedução da sequência primária da toxina madura foi obtida obtida por Cordeiro e colaboradores (1993) através de sequenciamento automático de peptídeos (Figura 3). Dos 55 aminoácidos que compõem a toxina Tx3-6, 12 são cisteínas, sugerindo um arranjo de 6 pontes dissulfeto. Seu peso molecular é de aproximadamente 6.045 dáltons e seu ponto isoelétrico 9,33. A estrutura primária da toxina Tx3-6 apresenta homologia com outros peptídeos isolados de aranhas, incluindo peptídeos bloqueadores de canais de cálcio dos tipos P/Q-, N- e L- (Figura 4).

O efeito da Tx3-6 foi testado em sinaptosomas corticais de ratos e a liberação de glutamato dependente de cálcio foi abolida com uma IC_{50} de 74,4 nM, mas não interferiu na liberação independente de Ca^{2+} (Vieira, Kushmerick et al. 2003).

Vieira e colaboradores (2005) demonstraram através da técnica de *Patch clamp* que a toxina Tx3-6 apresenta uma maior especificidade para canais de cálcio do tipo N, bloqueando cerca de 95% a entrada de cálcio em uma dose de 1 μ M em neuroblastomas N18. Foi observado ainda, que a toxina bloqueia parcialmente canais de cálcio dos tipos P/Q, L e R de maneira reversível e com menor intensidade, não afetando canais do tipo T nem em doses elevadas (Vieira, Kushmerick et al. 2005). Com base nestes estudos, pode-se concluir que a toxina Tx3-6 isolada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* possui uma ação semelhante às ω -conotoxinas que atuam bloqueando canais de cálcio sensíveis à voltagem, apresentando uma maior especificidade aos canais da família Ca_v2 dos tipos N, P/Q e R.

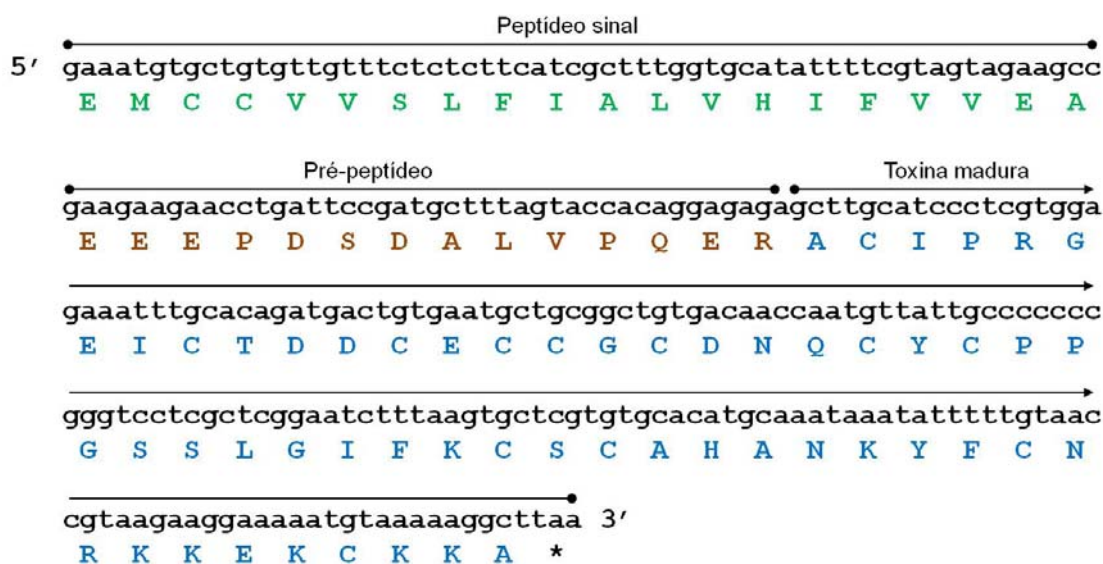


Figura 3: Sequência do cDNA que codifica o peptídeo precursor da toxina Tx3-6. cDNA (em preto) e os respectivos aminoácidos. Em verde, sequência do peptídeo sinal. Em marrom, sequência do pré-peptídeo. Em azul, sequência da toxina madura.

		REF	% SIM	% IDE
PNTx3-6	ACIPRGEICT...DDCECGCDNQCYCPPGSSL.GIFK..CSAHANKYF....CNRKKEKCKKA	P81792		
TOX1	DWECPLHSSCD...NDCVCK.NHHCHCPYSNVSKLEKWLPEWAKIPDALKRCSQQRNDKDG	P83288	66.7	41.7
TOX2	AWKCLPKDSTCG...DDDOCE.GLHCHCPLRNMLPAILR..CSQSKDDHINT..CPKYKKS	P84756	61.5	34.6
TOG3A	SCIDIIGDGDGEKDDCQCCRRNGYCS...YSLFGYLSGCKCVVGTSAEFQICRRKARQCYNSDPDKCESHNKPKRR	P33034	55.7	32.8
TOG3B	SCIDFGGDGDGEKDDCQCCRSNGYCS...YNLFGYLSGCKCEVGTSAEFRIARRAKQCYNSDPDKCVSVYKPKRR	P81744	54.1	31.1
45C1	ATCAGQDKPC...KVNDCGGERGECVC..GG.....PCICROGNVFI...AWSKLMTCK	P84028	50.0	28.8
TXF27	RACIELGEDCDGYKDDCQCCRDNAFCSCYEFFGE...KNGCGCAVGH	P85034	83.3	41.9
TXF28	SCIKHGDFCDGDKDDCQCCRDNGFCSC...SGIF.GLKW.NCRCDVGT	P85033	65.9	34.1

Figura 4: Comparação da sequência primária da toxina Tx3-6 com outros peptídeos purificados de veneno de aranhas. (...) gaps introduzidos para facilitar o alinhamento dos resíduos de cisteínas. REF: Código de acesso das sequências depositadas no banco de dados SWISS-PROT/TREMBL. % SIM: Porcentagem de similaridade. % IDE: Porcentagem de identidade. TOX1 e TOX2 são peptídeos isolados do veneno da aranha *Oxyopes lineatus* e são antagonistas de canais de cálcio dos tipos P/Q-, N- e L- (Villegas et al., 2008). TOG3A e TOG3B são omega-agatoxinas do veneno da aranha *Agelenopsis aperta* e também são bloqueadoras de canais de cálcio sensíveis à voltagem (Ertel et al., 1994; Venema et al., 1992). 45C1 é um peptídeo isolado do veneno da aranha pescadora *Ancylometes* sp. que tem similaridade com antagonistas de canais de sódio. TXF28 e TX27 são peptídeos isolados do veneno da aranha *Oligotenus ornatius* e apresentam similaridades com peptídeos da superfamília das omega-agatoxinas.

1.4.1 A toxina Tx3-6 como agente antinociceptivo

Como a toxina Tx3-6 é um potente bloqueador de canais de cálcio do tipo N existe a possibilidade deste peptídeo, semelhantemente à conotoxina MVIIA, ser usado como um agente antinociceptivo. Esta hipótese foi testada por Souza e colaboradores (2008), que mostraram que esta toxina é um potente analgésico em modelos de dor aguda e crônica, apresentando maior eficácia e duração na inibição da dor térmica em ratos quando comparada à Ziconotida (MVIIA). Além disso, a Tx3-6 mostrou-se mais potente que a Ziconotida tanto prevenindo quanto reparando a dor inflamatória induzida pela injeção de formalina na pata do animal. Em relação aos efeitos colaterais, Souza e colaboradores (2008) observaram que a Tx3-6 apresenta uma janela terapêutica bem mais ampla, causando efeitos adversos em doses bem mais altas que as necessárias para induzir a analgesia.

1.5 Cálcio, glutamato e a morte neuronal

Embora cálcio seja vital para vários mecanismos fisiológicos, o excesso deste íon dentro das células pode gerar uma cascata de eventos de citotoxicidade e morte celular (Choi 1988; Kristian and Siesjo 1998).

Glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso de mamíferos, tem também um poder neurotóxico (Szydlowska and Tymianski 2010). Acredita-se que após um processo isquêmico, a hipersensibilidade causada pelo grande acúmulo de cálcio intracelular e liberação de glutamato seja responsável pela morte neuronal (Szydlowska and Tymianski 2010). Glutamato pode potencializar a entrada de cálcio nos neurônios através de diferentes vias. Uma delas seria diretamente via canais iônicos sensíveis à ligantes, como os receptores NMDA que são altamente permeáveis a Ca^{2+} . Uma segunda via seria através de canais de cálcio sensíveis à voltagem ativados por uma despolarização da membrana causada por glutamato. Existe ainda a entrada de cálcio através da operação reversa da bomba de sódio-cálcio devido ao acúmulo de Na^{2+} celular. Ca^{2+} pode ainda entrar na célula através de um vazamento da membrana não-específico devido à um inchaço celular causado pela exposição tóxica a glutamato. Por fim, estoques intracelulares (como retículo endoplasmático) podem liberar cálcio no citoplasma após ativação de

IP₃ por receptores metabotrópicos ativados por glutamato (Choi 1988; Evans and Zamponi 2006; Hess, Jen et al. 2010).

O acúmulo de cálcio intracelular ativa a liberação de glutamato em terminais pré-sinápticos, que por sua vez, ativa receptores pós-sinápticos propagando a injúria e morte neuronal. Portanto, existe uma intensa procura por antagonistas de canais de cálcio e receptores de glutamato na tentativa de encontrar e desenvolver novas drogas neuroprotetoras (Kobayashi and Mori 1998; Duncan, Goad et al. 2010).

Algumas ω -conotoxinas, potentes bloqueadores de canais de cálcio sensíveis à voltagem, já foram testadas como agentes neuroprotetores. O peptídeo sintético SNX-111, que corresponde à conotoxina MVIIA, teve um grande efeito neuroprotetor em modelos animais de isquemia global em até 24 horas após o insulto (Valentino, Newcomb et al. 1993; Yenari, Palmer et al. 1996; Perez-Pinzon, Yenari et al. 1997). Este mesmo peptídeo demonstrou eficácia contra neurodegeneração após hipóxia em cultura organotípica de hipocampo (Pringle, Benham et al. 1996).

Um outro peptídeo proveniente dos caramujos do gênero *Conus*, CGX-1007, um antagonista de receptores NMDA, teve efeito neuroprotetor em um modelo de isquemia cerebral focal em ratos (Williams, Ling et al. 2002).

1.6 A toxina Tx3-4

Cardoso e colaboradores (2003) isolaram um clone da biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* com sequência quase idêntica à ω -Phonetoxina IIA descrita por Cassola e colaboradores (1998) e com 95% de identidade com a porção N-terminal da toxina Tx3-4 sequenciada previamente (Cordeiro, de Figueiredo et al. 1993). Este clone apresentou uma janela aberta de leitura codificando um peptídeo de 116 aminoácidos, sendo que 19 correspondem ao peptídeo sinal, 20 ao pré-peptídeo, 76 à toxina madura e 1 resíduo extra C-terminal. Dos 76 resíduos que correspondem à toxina madura, 14 são cisteínas e possivelmente formam 7 pontes dissulfeto (Figura 5). Seu peso molecular é de aproximadamente 8.376,6 daltons e seu PI é de 8,79.

A estrutura primária da toxina Tx3-4 apresenta homologia com outros peptídeos isolados de aranhas, incluindo peptídeos bloqueadores de canais de cálcio sensíveis à voltagem (Figura 6).

A Tx3-4 (ou ω -Phonetoxina IIA) bloqueou a liberação de glutamato dependente de Ca^{2+} em sinaptosomas corticais de ratos despolarizados por KCl (Prado, Guatimosim et al. 1996). Concentrações sub-nanomolares deste peptídeo tiveram efeito bloqueador em canais de cálcio do tipo N de neurônios ganglionares do corno dorsal de ratos e em canais de cálcio do tipo L, com menor afinidade (Cassola, Jaffe et al. 1998). Foi demonstrado através de *Patch clamp* que a Tx3-4 bloqueia quase que irreversivelmente correntes dos tipos N e P/Q e parcialmente correntes do tipo R, interagindo com sítios de ligação de ω -conotoxinas (Dos Santos, Van Renterghem et al. 2002). Além do efeito bloqueador na liberação de glutamato, foi demonstrado que esta toxina bloqueia também a captação deste neurotransmissor, sugerindo uma atividade não apenas em canais de cálcio, mas em transportadores de glutamato (Reis, Prado et al. 1999; Reis, Gomez et al. 2000).

Foi demonstrado recentemente o efeito da toxina Tx3-4 na captação de glutamato e na liberação de glutamato induzida por capsaicina em sinaptosomas de medula. A toxina Tx3-4 bloqueou a liberação de glutamato dependente e independente de cálcio, enquanto as ω -conotoxinas MVIIA e MVIIC tiveram efeito apenas na liberação de glutamato Ca^{2+} -dependente. Além disso, apenas a toxina Tx3-4 teve efeito na captação de glutamato, comprovando seu efeito em transportadores deste neurotransmissor (Goncaves, Ferreira et al. 2010).

1.6.1 A toxina Tx3-4 como agente neuroprotetor

Pinheiro e colaboradores (2006) investigaram o efeito neuroprotetor da fração PhTx3 em fatias de hipocampo de ratos e células SN56 submetidas à isquemia por privação de oxigênio e glicose e mostraram que a fração PhTx3 tem um efeito neuroprotetor maior do que as ω -conotoxinas GVIA e MVIIC, reduzindo a morte celular em até 80% (Pinheiro, Gomez et al. 2006).

Posteriormente, os peptídeos Tx3-3 e Tx3-4 reproduziram o efeito neuroprotetor observado com a fração PhTx3 no mesmo modelo de isquemia, sendo que a toxina Tx3-4 reduziu a morte celular em 86% mesmo no tratamento após 1 hora do insulto isquêmico (Pinheiro, da Silva et al. 2009). A Tx3-4 foi testada também em um modelo de isquemia *in vivo*. O modelo utilizado foi o de isquemia cerebral focal e transitória de oclusão da artéria cerebral média. Imagens obtidas por ressonância magnética mostraram o efeito neuroprotetor da toxina quando injetada

30 minutos e 2 horas após o início da lesão. A toxina Tx3-4 apresentou baixa toxicidade e promoveu a neuroproteção funcional e estrutural (Lima 2010).

Levando-se em consideração as características farmacológicas das toxinas Tx3-6 e Tx3-4, é interessante a continuidade de estudos que avaliam o potencial desses peptídeos como agentes terapêuticos. Para a realização destes estudos são necessárias grandes quantidades destas toxinas. A obtenção em larga escala através da extração do veneno de aranhas e purificação em sistemas HPLC e FPLC é um processo bastante caro, demorado e dependente da disponibilidade destes animais em aracnidários. A síntese química de peptídeos funcionais só seria possível após a análise de suas estruturas terciárias e confirmação da posição das suas pontes dissulfeto. Uma opção possível para a obtenção em larga escala de proteínas é a expressão heteróloga em bactérias ou leveduras.

Neste trabalho, nós propomos a clonagem e expressão das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 em diferentes sistemas, assim como o desenvolvimento de métodos de purificação, no intuito de obtermos grandes quantidades destas toxinas recombinantes funcionais.



Figura 5: Sequência do cDNA que codifica o peptídeo precursor da toxina Tx3-4. cDNA (em preto) e os respectivos aminoácidos. Em verde, sequência do peptídeo sinal. Em marrom, sequência do pré-peptídeo. Em azul, sequência da toxina madura. Em vermelho, resíduo extra C-terminal.

		REF	% SIM	% IDE
PNTx3-4	SCINVGDFCDGKKDD..CQCCRDNAFC CS SVIFGY.KTNCRCEVGTATSYGICMAKHKCGRQTTCTKPCLSKRCKKNH	P81790		
TXF28	SCIKHGDFCDGDKDD..CQCCRDNGFC CS SGIFGL.KWNCRC CD VGTT	P85033	88.6	81.8
TXF27	RACIELGEDCDGYKDD..CQCCRDNAFC CS YEFFGE.KNGCGCAVGH	P85034	83.3	66.7
TOG2A	GCIIEIGDCDGYQEKSYCQCCRNNGFC CS	P15971	81.5	59.3
TOG3A	SCIDIIGDCDGEKDD..CQCCRRNGYCSYSLFGYLKSGCKVVGTSAEFQGI CR RK...ARQCYNSDP...DKCESHNKPKRR	P33034	70.1	48.1
TOG3B	SCIDFGDCDGEKDD..CQCCRSNGYCSYNLFGYLKSGCKCEVGTSAEFRRIC RR KA...QCYN SD P...DKCVSVYKPKRR	P81744	69.4	52.8
TOG3C	NCIDFGDCDGEKDD..CQCCXRNGYCSYNLFGYLKSGCKXEVG	P81745	76.7	58.1
TOG3D	SCIKIIGEDCDGDKDD..CQCCRTNGYCSXYXLFGLKSG	P81746	81.8	63.6
ANC32C7	SDNEFPSCIEFGKECDLDKGN..CQCCRRNGYCS CA VN	P84027	75.0	57.1

Figura 6: Comparação da sequência primária da toxina Tx3-4 com outros peptídeos purificados de veneno de aranhas. (...) gaps introduzidos para facilitar o alinhamento dos resíduos de cisteínas. REF: Código de acesso das sequências depositadas no banco de dados SWISS-PROT/TREMBL. % SIM: Porcentagem de similaridade. % IDE: Porcentagem de identidade. TXF28 e TXF27 são peptídeos isolados do veneno da aranha *Oligotenus ornatus* e apresentam similaridades com peptídeos da superfamília das omega-agatoxinas. TOG2A, TOG3A, TOG3B, TOG3C e TOG3D são omega-agatoxinas do veneno da aranha *Ageneiopsis aperta* e são antagonistas de canais de cálcio sensíveis à voltagem (Adams, Bindokas et al. 1990; Venema, Swiderek et al. 1992; Ertel, Warren et al. 1994). ANC32C7 é um peptídeo isolado do veneno da aranha *Ancyloletes sp.* que apresenta similaridades com as omega-agatoxinas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter grandes quantidades das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 biologicamente ativas para realização de testes estruturais e testes biológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Optimizar a expressão das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 recombinantes de maneira a produzir quantidades suficientes de toxinas para estudos funcionais e estruturais.
- Testar a função das toxinas recombinantes em diferentes ensaios bioquímicos e farmacológicos.
- Analisar a estrutura secundária das toxinas através da técnica de dicroísmo circular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Hospedeiros e vetores

Os hospedeiros utilizados para clonagem e expressão neste trabalho estão listados na tabela 1.

Os vetores utilizados para clonagem e expressão das toxinas recombinantes foram: pBAD*mycHis* C, pBADHis B, pBADHis C e pPICZ C da Invitrogen, pET-45b (+) da Novagen e pE-SUMO da LifeSensors. O vetor que codifica as proteínas chaperonas GroEL e GroES co-expressas em alguns experimentos foi o pGro7 da TAKARA.

3.2 Meios de cultivo

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl) e em meio sólido LB (adiciona-se 1,5% ágar). As leveduras foram cultivadas em meio líquido YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose), meio sólido YPD (adiciona-se 2% ágar), Meio Mínimo de Glicerol -MGY (1,34% YNB, 1% glicerol, 4×10^{-5} biotina), Meio Mínimo de Glicose - MD (1,34% YNB, 2% D-glicose, 4×10^{-5} biotina) e Meio Mínimo de Metanol-MM (1,34% YNB, 0,5% metanol, 4×10^{-5} biotina). Os meios utilizados para o cultivo da linhagem GS115 tiveram adição de 0,004% de histidina (MGYH, MDH e MMH). O meio restritivo utilizado para a expressão foi o M9 (Na_2HPO_4 12,8 g/L; KH_2PO_4 3 g/L; NaCl 5 g/L; NH_4Cl 1 g/L; CaCl_2 0,1mM; Mg_2SO_4 2mM; Glicose 0,4%; Biotina 10 mg/L; Tiamina 10 mg/L)

Tabela 1: Bactérias e leveduras utilizadas neste trabalho.

Hospedeiro	Linhagem	Genótipo
<i>Escherichia coli</i>	DH5α (Invitrogen)	(φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrAB</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR</i> 17(<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE</i> 44, <i>relA</i> 1, <i>deoR</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>phoA</i>)
<i>Escherichia coli</i>	TOP10 (Invitrogen)	(F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>deoR recA1 araD</i> 139 Δ(<i>araA-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>)
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3) (Novagen)	(F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3))
<i>Escherichia coli</i>	ORIGAMI (Novagen)	(Δ(<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX</i> 74 Δ <i>phoA PvuII phoR</i> <i>araD</i> 139 <i>ahpC galE galK rpsL F'</i> [<i>lac</i> ⁺ <i>lacI</i> ^f <i>pro</i>] <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Kan ^R , Str ^R , Tet ^R))
<i>Pichia pastoris</i>	X-33 (Invitrogen)	Selvagem
<i>Pichia pastoris</i>	GS115 (Invitrogen)	(<i>his4</i> His ⁻)
<i>Pichia pastoris</i>	KM71H (Invitrogen)	(<i>arg4 aox1::ARG4</i>)

3.3 Construção dos plasmídeos recombinantes

3.3.1 Clonagem do fragmento de cDNA que codifica a toxina Tx3-6 madura no vetor pPICZ

O vetor pPICZ C foi o vetor utilizado para a expressão em leveduras. O cDNA que codifica a toxina Tx3-6 foi obtido através da técnica de PCR utilizando-se como molde, uma mistura de cDNAs preparados a partir da glândula de veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Os iniciadores YeastT36F e YeastT36R (Tabela 2) foram sintetizados apresentando uma parte da sequência codificadora para a toxina, sítios de restrição, sítio para clivagem por Fator Xa e parte da sequência consenso para expressão em leveduras (A/YAA/TAATGTCT). A reação de amplificação continha 50 ng de DNA molde, 1 μ M de cada iniciador, 250 μ M de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTPs), 10 mM MgCl₂, 2,5 μ L de tampão 10X e duas unidades da enzima *Taq.* polimerase (Promega). As condições de amplificação consistiram em um período de desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos seguido de quarenta ciclos. Cada ciclo apresentava um período de desnaturação do DNA a 94° C por 45 segundos, anelamento dos primers a 55° C por 45 segundos e extensão da nova molécula a 72° C por 45 segundos. Por fim, um período final de extensão a 72° C por 5 minutos e estoque a 4°C. O DNA amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mmol/L pH 8,0 e EDTA 1 mmol/L pH 8,0), corado com brometo de etídio e purificado do gel utilizando-se o kit de extração em gel QIAquick™ Gel Extraction kit (Qiagen). O DNA foi então digerido com as enzimas *Eco* RI e *Xho* I (Invitrogen) e clonado no vetor pPICZ C (Figura 11a).

Bactérias *E. coli* (TOP10) eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo Tx36pPICZ em eletroporador (BioRad) e plaqueadas em meio LB ágar contendo 25 μ g/mL do antibiótico zeocin. A fim de se confirmar a presença do inserto, foram realizados PCR de colônias (utilizando-se os primers YeastT36F e YeastT36R) e análise de restrição. Para a análise de restrição, o plasmídeo foi purificado através do kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) e digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xho* I. A presença do inserto foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%. Foi realizado o sequenciamento automático do

DNA utilizando-se o Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) para confirmação da sequência do inserto.

3.3.2 Clonagem do fragmento de cDNA que codifica a toxina Tx3-4 madura no vetor pET

Quatro oligonucleotídeos (TX34A53, TX34A35, TX34B53 e TX34B35) (Tabela 3) foram utilizados como molde na reação de PCR que produziu o cDNA codificador para a toxina Tx3-4 (Figura 7). Estes oligonucleotídeos foram construídos utilizando-se os códons preferenciais da bactéria *Escherichia coli* (Grantham, Gautier et al. 1981). Outros dois oligonucleotídeos (Tx34PSTIF e Tx34XHOIR) (Tabela 3) foram usados como iniciadores da reação e adicionaram à região N-terminal do cDNA, um sítio para a enzima de restrição *Pst* I e para clivagem por Fator Xa e à região C-terminal, um sítio para a enzima *Xho* I e um códon de parada.

A reação de amplificação continha 1 nM de cada oligonucleotídeo molde, 1 µM de cada iniciador, 250 µM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTPs), 10 mM MgCl₂, 2,5 µL de tampão 10X e duas unidades da enzima *Taq* polimerase (Promega). As condições de amplificação foram as mesmas especificadas no subitem 3.3.1.1. O DNA amplificado foi então purificado e digerido com as enzimas *Pst* I e *Xho* I (New England Biolabs) e clonado no vetor pET (Figura 12a). A presença do inserto no plasmídeo foi confirmada por PCR de colônias, análise de restrição e sequenciamento automático de DNA.

3.3.3 Clonagem dos fragmentos de cDNA que codificam as toxinas Tx3-6 e Tx3-4 no vetor pBADHis

3.3.3.1 Tx3-6

O cDNA que codifica a toxina Tx3-6 com o seu pré-peptídeo (Tx3-6PP) foi obtido através da técnica de PCR, utilizando-se como molde, uma mistura de cDNAs preparados a partir da glândula de veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Oligonucleotídeos (T36FPP e T36RPP) contendo a sequência do pré-peptídeo, sítios de restrição, sítio para clivagem por Fator Xa e códon de parada foram sintetizados a fim de servirem como iniciadores da reação (Tabela 2). A reação de

amplificação foi realizada como descrito no subitem 3.3.1.1. O DNA amplificado e purificado, foi digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III (Invitrogen) e clonado no vetor pBADHis B (Figura 14a). A presença do inserto foi confirmada por PCR de colônias, análise de restrição e sequenciamento automático de DNA.

3.3.3.2 Tx3-4

O cDNA que codifica a toxina Tx3-4 madura foi obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a construção Tx3-4pET como molde. Dois oligonucleotídeos (Tx34PSTIF e Tx34RBAD) (Tabela 3), foram utilizados como iniciadores, sendo adicionados os sítios para clivagem pelas enzimas de restrição *Pst* I e *Eco* RI às extremidades 5' e 3' respectivamente. A reação de amplificação continha 12,5 ng de DNA molde, 1 µM de cada iniciador, 250 µM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTPs), 10 mM MgCl₂, 2,5 µL de tampão 10X e duas unidades da enzima *Taq.* polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação foram as mesmas descritas no subitem 3.3.1.1.

O DNA amplificado foi purificado e digerido com as enzimas *Pst* I e *Eco* RI (ambas Fermentas) e clonado no vetor pBADHis C através da reação da enzima T4 DNA ligase.

A presença do inserto no plasmídeo foi confirmada por PCR de colônias, análise de restrição e sequenciamento automático de DNA.

3.3.4 Clonagem do fragmento de cDNA que codifica a toxina Tx3-6 madura no vetor pBADmycHis

O cDNA que codifica a toxina Tx3-6 foi obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se dois oligonucleotídeos sintéticos sobrepostos como moldes (Tx36F e Tx36R) (Tabela 2). Estes oligonucleotídeos foram construídos utilizando-se os códons preferenciais da bactéria *Escherichia coli* (Grantham, Gautier et al. 1981). Outros dois oligonucleotídeos (Tx36ECOF e Tx36PSTR) (Tabela 2), foram utilizados como iniciadores, contendo sítios para clivagem pelas enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III nas extremidades 5' e 3' respectivamente.

A reação de amplificação e a purificação do DNA foram realizadas assim como descrito no subitem 3.3.1.1.

O DNA foi então digerido com as enzimas *Eco* RI e *Hind* III (ambas Invitrogen) e clonado no vetor pBADmycHis C (Figura 22a). A presença do inserto foi confirmada por PCR de colônias, análise de restrição e sequenciamento automático de DNA.

3.3.5 Clonagem dos fragmentos de cDNA que codificam as toxinas Tx3-6 e Tx3-4 maduras no vetor pE-SUMO

O cDNA que codifica a toxina Tx3-6 foi obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a construção Tx3-6pBADmycHis como molde. Dois oligonucleotídeos (Tx36SUMOF e Tx36SUMOR) (Tabela 2) foram utilizados como iniciadores da reação e inseriram sítios para clivagem pelas enzimas de restrição *Bsa* I e *Xba* I e um códon de parada.

O cDNA que codifica a toxina Tx3-4 foi obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a construção Tx3-4pET como molde. Dois oligonucleotídeos (Tx34SUMOF e Tx34SUMOR) (Tabela 3), foram utilizados como iniciadores, sendo adicionados os sítios para clivagem pelas enzimas de restrição *Bsa* I e *Xba* I às extremidades 5' e 3' respectivamente e um códon de parada.

As reações de amplificação continham 12,5 ng de cada DNA molde e foram realizadas conforme especificado no subitem 3.3.1.1. Os DNAs foram purificados e digeridos com as enzimas *Bsa* I e *Xba* I (New England Biolabs) e clonados no vetor pE-SUMO (Figura 25a). Cada construção foi analisada por PCR de colônias, análise de restrição e sequenciamento automático de DNA.

Tabela 2: Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento nas clonagens da toxina Tx3-6.

Iniciador	Sequência
Tx36F	5'ATCCCGCGTGGTGAAATTTGCACCGATGACTGTGAATGCTGCGGCT GTGACAACCAATGTTATTGCCCGCCGGGTTCT 3'
Tx36R	5' TTTCTTTTTTACGGTTACAAAAATATTTATTTGCATGTGCACACG AGCATTTAAGATACCCAGCGAGGAACCCGGCGGG 3'
Tx36ECOF	5' AATTTGAATTCATCGAGGGAAGGGCTTGCATCCCGCGTGG 3'
Tx36PSTR	5' AATTCTGCAGTTAAGCTTTTTTACATTTTCTTTTTTAC 3'
T36FPP	5'AAATTGAATTCGAAGAAGAACCTGATTCCGATGCTTTAGTACCAAT AGAGGG GAGAGCTTGCATCCCT 3'
T36RPP	5' AATTAAGCTTTTAAGCCTTTTTTACATTTTTCCTT 3'
YEAST36F	5'ATTGAATTCAAAATGTCTATCGAGGGAAGGGCTTGCATCCCTCGT GG 3'
YEAST36R	5'AATTCTCGAGCCTTCCCTCGATAGCCTTTTTTACATTTTCTTTCTT3'
TX36SUMOF	5' AATTGGTCTCAAGGTGCTTGCATCCCGCGTGGTGA 3'
TX36SUMOR	5' AATTTCTAGATCAAGCTTTTTTACATTTTCTTTTTT 3'

Tabela 3: Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento nas clonagens da toxina Tx3-4.

Iniciador	Sequência
TX34A53	5'TCTTGTATTAACGTTGGTGATTTTTGTGATGGTAAAAAAGATGATTG TCAGTGTTCGTGATAACGCCTTTTGTTCCTTCTGTTATTTTTGGT TATAAAACCAACTGTCGTTGTGAAGTTGGT3'
TX34A35	5'ACCAACTTCACAACGACAGTTGGTTTTATAACCAAAAATAACAGAA CAAGAACAAAAGGCGTTATCAGACAACACTGACAATCATCTTTTT ACCATCACAAAATCACCAACGTTAATACAAGA3'
TX34B53	5'AACGTGTCGTTGTGAAGTTGGTACCACCGCCACCTCTTATGGTATTTG TATGGCCAAACATAAATGTGGTCGTCAGACCACCTGTACCAAACCAT GTCTGTCTAAACGTTGTAAAAAAAACCAT3'
TX34B35	5'ATGGTTTTTTTTACAACGTTTAGACAGACATGGTTTGGTACAGGTGG TCTGACGACCACATTTATGTTTGGCCATACAAATACCATAAGAGGTG GCGGTGGTACCAACTTCACAACGACAGTT3'
TX34P8TIF	5'AATTCTGCAGATCGAGGGAAGGTCTTGTATTAACGTTGGTGA3'
TX34XHOIR	5'AATTCTCGAGTTAATGGTTTTTTTTACAACGTT3'
TX34RBAD	5'AATTGAATTCTTAATGGTTTTTTTTACAACGTT3'
TX34SUMOF	5'AATTGGTCTCAAGGTTCTTGTATTAACGTTGGTGAT3'
TX34SUMOR	5'AATTTCTAGATCAATGGTTTTTTTTACAACGTTT3'

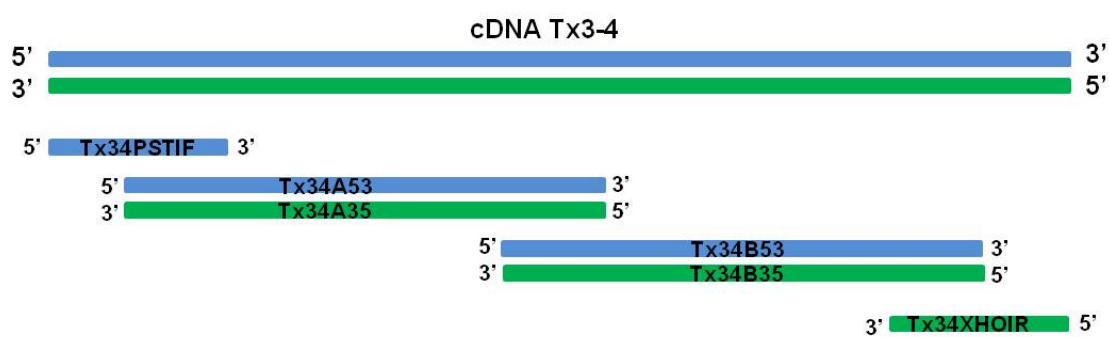


Figura 7: Esquema da reação de PCR que gerou o cDNA que codifica a toxina Tx3-4.

3.4 Expressão e purificação das toxinas recombinantes

3.4.1 Expressão e purificação da toxina recombinante Tx3-6 em levedura *Pichia pastoris* (vetor pPICZ)

3.4.1.1 Transformação em *Pichia* e confirmação do fenótipo

Uma vez confirmada a presença do inserto, o vetor foi amplificado na bactéria e purificado utilizando-se o Qiagen plasmid maxi kit (Qiagen).

Diferentes linhagens de leveduras competentes foram preparadas utilizando-se o kit EasyComp Transformation (Invitrogen) seguindo-se as recomendações do fabricante. Dez microgramas de DNA foram linearizados através da digestão com a enzima *Pme* I (New England Biolabs) e 3 µg de DNA linearizado foram utilizados em cada transformação. As transformações foram realizadas segundo as recomendações do kit EasyComp Transformation (Invitrogen).

A eficiência da recombinação foi avaliada através de PCR de colônias utilizando-se como molde o DNA genômico da levedura. A extração do DNA genômico foi realizada ressuspensando-se cada colônia em 30 µL de SDS 0,2%. As amostras foram então vortexadas por 15 segundos, aquecidas a 90° C por 4 minutos e centrifugadas a 16.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi armazenado a -20° C até sua utilização.

A transformação das linhagens X-33 e GS115 com a construção linearizada favorece uma recombinação simples (inserção) no locus *AOX1* genômico (Figura 8). As leveduras transformadas devem ser capazes de crescer em meio com metanol como única fonte de carbono (Mut^+), porém, com a presença da sequência *AOX1* no plasmídeo existe a possibilidade da recombinação ocorrer na região 3' *AOX1* interrompendo o gene *AOX1* selvagem e originando transformantes que utilizam metanol de forma lenta (Mut^S). As colônias positivas para o inserto foram então, analisadas em relação ao fenótipo Mut^+ e Mut^S .

A confirmação fenotípica (Mut^+ ou Mut^S) foi obtida estriando-se as colônias em placas MM (ou MMH para linhagem GS115) e MD (ou MDH para GS115) e incubando-as por 2 dias a 30° C. As colônias Mut^+ devem crescer bem nas duas placas, uma vez que são capazes de utilizar metanol ou dextrose como fonte de

carbono e as colônias Mut^S devem crescer bem na placa MD e crescer pouco ou nada em placas MM, já que não conseguem metabolizar metanol.

Confirmada a presença do inserto e o fenótipo das colônias, foi feito um experimento piloto de expressão das três linhagens de *Pichia*: X-33 (Mut⁺), GS115 (Mut⁺) e KM71H (Mut^S). Para as colônias Mut⁺, uma colônia de cada linhagem foi inoculada em 25 mL de meio MGY. A cultura foi crescida a 28-30° C sob agitação (250-300 rpm) até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 2 a 6. A cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado até uma DO₆₀₀=1 em meio MM para induzir a expressão. A cada 24 horas, foi adicionado metanol numa concentração final de 0,5% para repor o metanol evaporado e consumido pelas leveduras. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em diferentes intervalos de tempo. Elas foram centrifugadas a 16.000 x g por 3 minutos e os pellets foram guardados a -80° C. Para a linhagem GS115, foram adicionados 0,004% de histidina aos meios de cultura.

Para o teste das colônias Mut^S, uma colônia foi inoculada em 100 mL de meio MGY. A cultura foi crescida a 28-30° C sob agitação (250-300 rpm) até atingir uma DO₆₀₀=2-6. A cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1/5-1/10 do volume da cultura original de meio MM. A cultura foi incubada novamente nas mesmas condições. A cada 24 horas, foi adicionado metanol numa concentração final de 0,5% para repor o metanol evaporado e consumido pelas leveduras. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em diferentes intervalos de tempo. Elas foram centrifugadas a 16.000 x g por 3 minutos e os pellets foram guardados a -80° C.

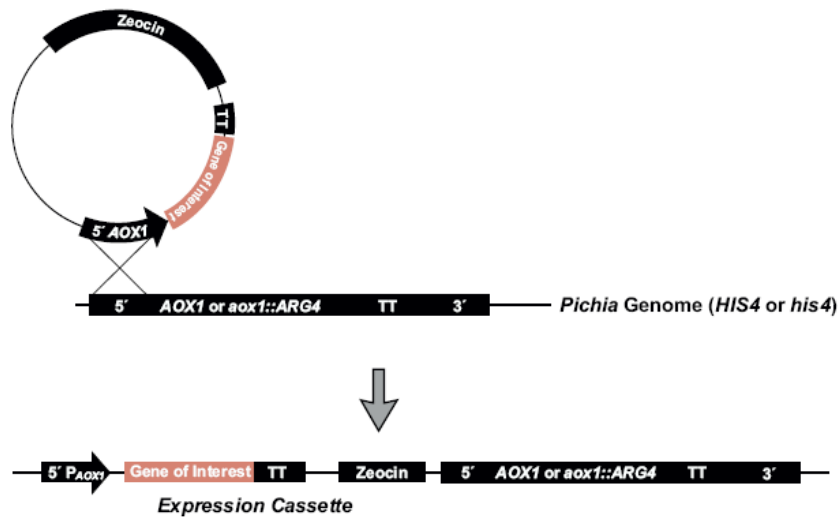


Figura 8: Inserção do plasmídeo pPICZ ao DNA genômico da *Pichia*. Desenho esquemático mostrando o resultado da inserção da região 5' do plasmídeo ao locus *AOX1* (Mut^+) e a incorporação do P_{AOX1} , do gene de interesse e do gene de resistência ao Zeocin (Invitrogen).

3.4.1.2 Expressão em larga escala e purificação

A expressão em larga escala só foi realizada utilizando-se a linhagem Mut⁺ X-33.

Uma colônia foi inoculada em 25 mL de meio MGY e a cultura foi incubada a 30° C sob agitação (250 rpm) até atingir DO₆₀₀=2-6 (aproximadamente 24 horas). Vinte e cinco mililitros de cultura foram utilizados para inocular 1 L de meio MGY e a cultura foi incubada a 30° C sob agitação até DO₆₀₀=2-6 (aproximadamente 18 horas).

As células foram centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Para induzir a expressão, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso até uma DO₆₀₀= 1 em 3 L de meio MM que continha metanol.

A cultura foi dividida em diferentes frascos a fim de se manter uma aeração adequada para as células. As alíquotas foram incubadas a 30° C sob agitação por 40 horas, sendo adicionado metanol 100% até uma concentração final de 0,5% na cultura após 24 horas de incubação.

As células foram centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a -80° C.

O pellet de cada alíquota da expressão foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, glicerol 5% e PMSF 1 mM) e centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos a 4° C. O novo pellet foi ressuspenso novamente em 10 mL de tampão de lise e foram adicionadas pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro até atingir aproximadamente metade do volume no tubo.

A mistura foi vortexada a 4° C em 15 ciclos de 1 minuto intercalados por incubação no gelo por 1-2 minutos. Após os ciclos, cada mistura foi centrifugada a 3.300 x g por 40 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi guardado e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford 1976).

Para cada mililitro de sobrenadante (lisado celular), foram adicionados 7 mL de Native Binding Buffer (Invitrogen) e a mistura foi filtrada no filtro Amicon Ultra-4. Para isso, as amostras eram adicionadas ao filtro e centrifugadas a 3.300 x g por 1 hora. O filtrado foi purificado através de cromatografia de afinidade em resina ligada a íons níquel de acordo com as especificações do kit Ni-NTA Purification System (Invitrogen).

3.4.2 Expressão e purificação da toxina Tx3-4 em *E. coli* BL21 (DE3) (vetor pET)

Bactérias BL21 (DE3) eletrocompetentes transformadas com a construção Tx3-4pET foram inoculadas em 2 mL de meio LB (contendo 100 µg/mL de ampicilina) e incubadas a 37° C por cerca de 16 horas (pré-inóculo). Duzentos mililitros de meio LB (100 µg/mL amp.) foram inoculados com o pré-inóculo e cultivados sob agitação a 37° C até $DO_{600}=0,5-1,0$. Foram então adicionados 0,6 mM de IPTG para indução da expressão e a cultura foi mantida a 37° C por mais 4 horas. Após 4 horas de expressão, a cultura foi centrifugada a 5.000 x *g* por 30 minutos a 4° C e o pellet foi armazenado a -80° C. A solubilidade da proteína recombinante foi analisada através de Western blot.

3.4.3 Expressão e purificação das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 em *E. Coli* (TOP10) (vetores pBADHis e pBADmycHis)

3.4.3.1 Tx3-6

Foi realizado um experimento piloto para verificar a melhor concentração de L-arabinose (Sigma) para indução da expressão (0,2%, 0,02%, 0,002%, 0,0002% ou 0,00002%). Uma colônia contendo o plasmídeo foi inoculada em 3 mL de meio LB (contendo 100 µg/mL de ampicilina) e crescida a 37° C por 16 horas. Cinco tubos contendo 10 mL de meio LB (amp.) foram inoculados com 100 µL do pré-inóculo e incubados a 37° C até atingirem $OD_{600}=0,5$. Neste momento, cada cultura recebeu uma concentração de L-arabinose, variando de 0,00002 até 0,2% e foram cultivadas por 4 horas. O resultado foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Estabelecida a melhor concentração, as expressões em larga escala foram realizadas como descrito abaixo.

Bactérias *E. coli* (TOP10) foram transformadas com 5 ng dos plasmídeos Tx36pBADmycHis ou Tx36PPpBADHis e plaqueadas em LB ágar contendo ampicilina (100 µg/mL). Após incubação a 37° C por 16 horas, uma colônia foi inoculada em 3 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubada a 37° C por mais 16 horas sob agitação (200 rpm).

Duzentos mililitros de meio LB contendo antibiótico foram inoculados com 2 mL da cultura anterior e incubados a 37° C sob agitação até $DO_{600}=0,5$. Neste ponto, a expressão foi induzida adicionando-se 2 mL de L-arabinose 20%, resultando em uma concentração final de 0,2% de L-arabinose. A cultura foi mantida a 37° C por 4 horas sob agitação.

Após 4 horas de expressão, a cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 20 minutos a 4° C e o pellet foi armazenado a -80° C para posterior purificação.

3.4.3.1.1 Purificação da toxina recombinante Tx36PPHis (vetor pBADHis)

O pellet de cada expressão foi ressuspendido em 10 mL de tampão de lise B-PER reagent (Pierce) e incubado por 10 minutos sob agitação para que ocorresse a lise química das células. Após este período, as proteínas solúveis foram separadas das insolúveis e debris celulares através de centrifugação a 32.000 x g por 20 minutos. Após confirmação da solubilidade da toxina recombinante através de SDS-PAGE, o sobrenadante foi submetido à purificação de acordo com as especificações do kit B-PER 6X His Protein Spin Purification (Pierce).

Para eliminar contaminantes de alto peso molecular (>30 kDa), amostras de aproximadamente 4 mL foram purificadas de cada vez utilizando-se o filtro Amicon Ultra-4 (Millipore). Cada purificação foi realizada centrifugando-se as amostras a 3.300 x g por uma hora. O filtrado foi analisado em relação à presença da proteína recombinante.

3.4.3.1.2 Purificação da toxina recombinante Tx3-6mycHis (vetor pBADmycHis)

O pellet de cada expressão foi ressuspendido em 8 mL de Native Binding Buffer (Invitrogen) e submetido à digestão por lisozima (1 mg por mL de expressão) por 30 minutos no gelo. Após a digestão, as células foram lisadas mecanicamente através de sonicação em 10 ciclos de 15 segundos com intervalos de 10 segundos no gelo a uma amplitude de 37%.

O lisado foi centrifugado a 32.000 x g por 20 minutos e amostras do sobrenadante e do pellet foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida de gradiente 4%-12% contendo SDS (Invitrogen) por 1 hora a 200 V. O gel foi corado em solução de Coomassie Blue composta de 0,25% Brilliant blue R-250

(Sigma), 45% metanol e 10% ácido acético e descorado em solução descorante (10% metanol, 10% ácido acético).

A proteína de interesse foi purificada do extrato bacteriano através de cromatografia de afinidade em resina ligada a íons níquel de acordo com as especificações do kit Ni-NTA Purification System (Invitrogen).

3.4.3.2 Tx3-4

As bactérias foram transformadas com o plasmídeo Tx3-4pBADHis por eletroporação e plaqueadas em meio LB ágar (contendo 100 µg/mL de ampicilina) para seleção.

Uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB (amp.) e crescida por 16 horas a 37° C. Um litro de meio LB foi inoculado com os 10 mL de cultura e incubado a 37° C até as bactérias atingirem uma $DO_{600}=0,5-1,0$. Foi adicionado 0,2% de L-arabinose para indução da expressão e a cultura foi mantida a 37° C por mais 4 horas. Ao final da expressão, a cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 20 minutos a 4° C e o pellet foi armazenado a -80° C.

As bactérias foram ressuspensas em 30 mL de tampão de lise (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) e lisadas sob alta pressão (10.000-20.000 psi) utilizando-se o equipamento French Press (Thermo Scientific). O lisado foi centrifugado a 32.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi incubado com 3 mL de resina Ni-NTA agarose (Qiagen) por 16 horas a 4° C. A resina foi então lavada com cerca de 250 mL de solução de lavagem (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 40 mM imidazol, pH 7,5) para remoção de proteínas contaminantes e a toxina recombinante foi eluída em 20 mL de tampão de eluição (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 M Imidazol, pH 7,5). Amostras de cada etapa de purificação foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 4-20%. As eluições foram reunidas e dialisadas contra 2 L de tampão de diálise (20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 2mM $CaCl_2$, pH 8,0), sendo feitas 4 trocas de tampão. A amostra dialisada foi incubada com Factor Xa (1:50) por 16 horas à temperatura ambiente para a clivagem da cauda de histidina. A digestão foi verificada por SDS-PAGE 4-20% e a identidade da proteína purificada foi analisada por Western Blot. Para a remoção do Factor Xa, a amostra foi incubada com a resina Xa removal (Qiagen) previamente equilibrada no mesmo tampão da

amostra a 4° C por 15 minutos sob agitação. A amostra foi centrifugada a 1.000 x g por 5 minutos e a toxina recombinante foi recuperada no sobrenadante.

3.4.4 Expressão e purificação das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 em *E. Coli* (ORIGAMI) (vetor pESUMO)

Bactérias ORIGAMI eletrocompetentes contendo o plasmídeo pGro7 (TAKARA) foram preparadas e aliquotadas a -80° C. O plasmídeo pGro7 possui resistência ao antibiótico cloranfenicol e, na presença de L-arabinose, codifica as proteínas chaperonas groEs-groEL, que auxiliam no enovelamento de outras proteínas recém-formadas. As bactérias foram transformadas com os plasmídeos Tx3-6pE-SUMO e Tx3-4pESUMO por eletroporação e plaqueadas em meio LB ágar (amp./ clo.) para seleção. Ambas as toxinas foram expressas utilizando-se o mesmo protocolo.

Uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB (amp./clo.) e incubada a 30° C por cerca de 16 horas (pré-inoculo). Um litro de meio LB (contendo 1 mg/mL de L-arabinose) foi inoculado com os 10 mL da cultura anterior e incubado a 30° C sob agitação até DO₆₀₀= 0,5-1,0. Neste ponto, a expressão foi induzida através da adição de 0,6 mM de IPTG e a cultura foi incubada a 18° C por 18 horas sob agitação. Ao final da expressão, a cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 20 minutos a 4° C e o pellet foi armazenado a -80° C para posterior purificação.

3.4.4.1 Purificação sob condições nativas

As bactérias foram ressuspensas em 30 mL de tampão de lise (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) e lisadas sob alta pressão (10.000-20.000 psi) utilizando-se o equipamento French Press (Thermo Scientific). O lisado foi centrifugado a 32.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi incubado com 3 mL de resina Ni-NTA agarose (Qiagen) por 16 horas a 4° C. A resina foi então lavada com cerca de 250 mL de solução de lavagem (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 40 mM imidazol, pH 7,5) para remoção de proteínas contaminantes e a toxina Tx3-6SUMO foi eluída em 20 mL de tampão de eluição (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 M Imidazol, pH 7,5). Amostras de cada etapa de purificação foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 4-20%. As eluições foram reunidas e dialisadas

contra 2 L de tampão de diálise (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM DTT) a 4° C por 24 horas, sendo feitas 4 trocas de tampão.

A concentração proteica foi obtida utilizando-se o kit D/C protein assay da Bio-Rad. Para a clivagem da cauda de fusão, foi adicionada SUMO protease I à amostra na proporção de 1 U por 100 µg de proteína. A reação foi incubada a 30° C por 1 hora e a 4° C por mais 18 horas. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Após a digestão, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 5 minutos para a remoção de precipitados e o sobrenadante foi submetido a uma coluna de fase reversa Vydac C8 analítica (250 x 4,6 mm; µm; 300 Å) ou preparativa (250 x 10 mm; 5 µm; 300 Å) previamente equilibrada em água/ 0,1% TFA. Os componentes foram eluídos em um gradiente de 0 a 70% de acetonitrila/0,1% TFA como descrito nas tabelas 4 e 5. A absorbância foi monitorada a 214 nm e as frações foram coletadas manualmente. Os picos obtidos nas purificações foram checados através de eletroforese em gel de poliacrilamida e aqueles correspondentes a toxina foram liofilizados para posterior utilização.

3.4.4.2 Purificação sob condições desnaturantes

Apenas a toxina Tx3-4SUMO foi purificada sob condições desnaturantes. O pellet obtido após a lise das bactérias foi ressuspenso em 30 mL de tampão de ressuspensão (6 M guanidina, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 20 mM imidazol, pH 7,9) e incubado por 1 hora sob agitação para solubilização completa. A amostra foi então centrifugada a 32.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante incubado com 3 mL de resina Ni-NTA agarose, previamente equilibrada, por 2 horas a temperatura ambiente. As proteínas contaminantes foram lavadas da resina com 250 mL de tampão de lavagem (6 M guanidina, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 30 mM Imidazol, pH 8,0) e a proteína de fusão foi eluída em 40 mL de tampão de eluição (tampão de lavagem adicionado de 2 M de Imidazol). A eluição foi dialisada primeiramente em tampão 1 M guanidina, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0 e posteriormente em 0,1 M guanidina, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM DTT pH 8,0. Foi adicionada à amostra SUMOprotease I na proporção 1 U para 100 µg de proteína e a digestão aconteceu a 30° C por 18 horas. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a digestão, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 5

minutos para a remoção de precipitados e o sobrenadante foi submetido a uma coluna de fase reversa Vydac C8 (analítica ou preparativa) previamente equilibrada em água/0,1% TFA. Os componentes foram eluídos em um gradiente de 0 a 70% de acetonitrila/0,1% TFA. A absorbância foi monitorada a 214 nm e as frações foram coletadas manualmente. Os picos obtidos nas purificações foram checados através de eletroforese em gel de poliacrilamida e aqueles correspondentes a toxina foram liofilizados para posterior utilização.

Como a toxina foi purificada sob condições desnaturantes, ela precisou ser renaturada para que sua conformação nativa fosse obtida.

Tabela 4: Programa utilizado na purificação em coluna Vydac C8 analítica.

Tempo (min)	%A (água/0,1%TFA)	%B (acetonitrila/0,1%TFA)	Fluxo (mL/min)
00	100	00	1
20	70	30	1
80	50	50	1
120	30	70	1

Tabela 5: Programa utilizado na purificação em coluna Vydac C8 preparativa.

Tempo (min)	%A (água/0,1%TFA)	%B (acetonitrila/0,1%TFA)	Fluxo (mL/min)
00	100	00	5
20	70	30	5
80	50	50	5
120	30	70	5

3.5 Renaturação da toxina Tx3-4

Uma vez que parte da toxina Tx3-4 foi purificada sob condições desnaturantes, ela precisou ser renaturada para a obtenção da sua conformação nativa. Experimentos piloto de renaturação foram conduzidos como uma triagem das melhores condições para o correto enovelamento da toxina. Foram testadas 9 condições diferentes de acordo com o kit de renaturação de proteínas da Thermo Scientific Pierce. Estas condições diferem basicamente na composição dos tampões e na proporção de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (Tabelas 6 e 7). Toxinas renaturadas no experimento piloto foram submetidas à cromatografia de fase reversa em coluna Vydac C18, liofilizadas e tiveram sua atividade biológica testada. Estabelecidas as melhores condições, os procedimentos de renaturação foram realizados da forma descrita abaixo.

A toxina Tx3-4 pura liofilizada foi ressuspensa em tampão desnaturante (6 M guanidina, 50 mM Tris, pH 8,0). Foram adicionados 10 mM de DTT para redução das pontes dissulfeto e a amostra foi incubada por 4 horas a temperatura ambiente. Antes da renaturação, o DTT foi removido através de filtração em VIVASPIN 6 (3 kDa MWCO) e a amostra foi quantificada medindo-se a absorbância a 280 nm e utilizando-se o coeficiente de extinção da toxina para correção. A amostra foi diluída aproximadamente 20 X em tampão de renaturação (550 mM guanidina, 440 mM L-arginina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0,88 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM GSH e 1 mM GSSG, pH 8,2) até uma concentração proteica máxima de 0,1-0,2 mg/mL. A toxina foi adicionada ao tampão de renaturação em 5 alíquotas com intervalos de 2 minutos entre cada para evitar a precipitação de enovelados intermediários. A renaturação ocorreu por 24 horas a 4° C. Após este período, a toxina foi submetida a cromatografia de fase reversa em HPLC para a troca de tampão e comparação do perfil cromatográfico com a toxina desnaturada e reduzida.

3.6 Western blotting

A caracterização das toxinas recombinantes por western blotting foi realizada para todas as construções. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore) por 1 hora a 250 mA. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em tampão TBST (0,5%

tween) contendo 5% de leite por 30 minutos sob agitação e incubada com anticorpos por 16 horas a 4°C. Os anticorpos utilizados neste trabalho foram o anti-His (1:1000) (Invitrogen), anti-myc peroxidase (1:1000) (Invitrogen) e o conjugado IgG anti-veneno total de *Phoneutria nigriventer*-peroxidase (1:1250) produzido e doado pelo Dr. Carlos Chavez-Olortégui. O anticorpo secundário utilizado com o anti-His foi o anti-mouse (1:10000) (Invitrogen). Após a incubação com os anticorpos, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBST e revelada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce).

3.7 Testes de atividade

3.7.1 Teste da formalina

A toxina recombinante utilizada neste teste foi a toxina Tx3-6 expressa utilizando-se o vetor pBADmycHis C (item 3.4.1.2).

O teste da formalina foi realizado de acordo com Dubuisson e Dennis (1977), utilizando-se ratos Wistar machos pesando de 180-250 g. Os ratos foram injetados com formalina no membro posterior direito e por 5 minutos (1ª fase) foi registrado o tempo de manifestação de nocicepção (lambida ou retirada da pata injetada do chão). Após os 5 minutos, os animais receberam 10 µL de PBS (veículo), 10 µL de PBS contendo 200 picomoles de Tx3-6 nativa (controle positivo) e 10 µL de PBS contendo 200 picomoles de Tx3-6 recombinante (teste) via intratecal.

Passados 15 minutos da administração da formalina, a manifestação de nocicepção foi cronometrada novamente por mais 15 minutos (2ª fase) (Dubuisson and Dennis 1977).

Tabela 6: Composição dos tampões de renaturação.

Base Refolding Buffer*	Factor 1 Guanidine** (M)	Factor 2 L-Arginine (M)
1	0	0
2	0	0.44
3	0	0.88
4	0.55	0
5	0.55	0.44
6	0.55	0.88
7	1.1	0
8	1.1	0.44
9	1.1	0.88

*Cada tampão contém 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0,88 mM KCl, pH 8,2.

**A adição da amostra desnaturada irá adicionar mais Guanidina.

Fonte: Thermo Scientific Pierce

Tabela 7: Triagem das condições de renaturação baseada na concentração do agente desnaturante e condições oxidantes.

Base Refolding Buffer (900 µl)	100 mM EDTA (µl)	200 mM GSH (µl)	100 mM GSSG (µl)	H ₂ O (µl)	Protein 1.0-2.0 mg/ml ^a (µl)
1	10	10	02	28	50
2	10	10	04	26	50
3	10	05	10	25	50
4	10	10	04	26	50
5	10	05	10	25	50
6	10	10	02	20	50
7	10	05	10	25	50
8	10	10	02	28	50
9	10	10	04	26	50

^aConcentração final de proteína de 50-100 µg/ml.

Fonte: Baseada na tabela do kit da Thermo Scientific Pierce.

3.7.2 Medida de cálcio e liberação de glutamato em sinaptosomas corticais de camundongos

Animais adultos C57BL/6 machos ou fêmeas foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas com alimentação e água livres. Para cada experimento, 4 animais foram decapitados e tiveram seus corteces cerebrais isolados. Os corteces foram reunidos em tubo Potter-Elvehjen contendo solução de sacarose 0,32 M adicionada de 1 mM EDTA e 0,25 mM DTT e homogeneizados em 10 ciclos com pistilo de teflon acoplado em um homogeneizador Wheaton. O homogenado foi centrifugado a $1.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi purificado através de centrifugação ($37.000 \times g$ por 15 min) em um gradiente descontínuo de Percoll (23, 15, 10 e 3% v/v em solução de sacarose) como descrito previamente (Dunkley, Jarvie et al. 2008). As frações P3 e P4 foram reunidas e submetidas a nova centrifugação de $37.000 \times g$, a 4°C por 20 minutos. O pellet foi ressuspensionado em tampão Krebs-Ringer-Hepes (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM MgSO_4 , 25 mM HEPES and 10 mM glucose pH 7,4) e os sinaptosomas aliqüotados até uma concentração final de 0,5-1,0 mg/mL de proteínas. As aliqüotas foram mantidas em gelo até a realização do experimento.

3.7.2.1 Medida da concentração de cálcio intrasinaptosomal

Sinaptosomas foram marcados com 5 μM de fura-2AM (solução estoque 1 mM em DMSO) para medição da concentração de cálcio intrasinaptosomal livre. O experimento foi realizado em um espectrofluorômetro (PTI Technologies Inc.) e a emissão de fluorescência foi registrada a 510 nm utilizando-se a razão 340/380 para excitação. Os sinaptosomas foram mantidos a 35°C sob agitação durante toda a medição. Toxinas Tx3-4 nativa e recombinante foram adicionadas à suspensão 6 minutos antes da despolarização da membrana com 33 mM de KCl. A calibração foi realizada adicionando-se SDS 10% e EGTA 10 mM para valores de máximo e mínimo de fluorescência. A concentração de cálcio foi calculada através da fórmula: $C = K_d * [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] * S_f^2 / S_b^2$ (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985).

3.7.2.2 Liberação de glutamato

A liberação de glutamato foi monitorada medindo-se o aumento de fluorescência causado pela produção de NADPH na presença de NADP^+ e glutamato desidrogenase em terminações nervosas isoladas do córtex cerebral de camundongos. No começo de cada teste, foram adicionados à suspensão sinaptosomal, CaCl_2 (1 mM), NADP^+ (1 mM) e glutamato desidrogenase (50 U). O comprimento de onda usado na excitação foi de 360 nm e o de emissão foi de 450 nm. Toxinas nativa e recombinante (Tx3-4), foram incubadas com os sinaptosomas por 30 minutos antes de cada medição. A liberação de glutamato independente de cálcio foi obtida através da remoção de CaCl_2 e adição de EGTA (2 mM) a suspensão.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ S.E.M. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newmann Keuls (teste da formalina) ou pelo teste de Tukey (testes da liberação de glutamato e influxo de cálcio). Kruskal-Wallis ANOVA em ranks seguido pelo teste de de comparação múltipla de Dunn foi utilizado no teste de glutamato do experimento piloto de renaturação. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.9 Dicroísmo circular

Para realizar a medição do espectro de dicroísmo circular, as toxinas recombinantes Tx3-6 e Tx3-4 expressas no vetor pE-SUMO liofilizadas, foram ressuspensas em H_2O . O espectro foi obtido em um espectropolarímetro Jasco-810 (Jasco Corp.) utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 mm de espessura. A temperatura foi mantida constante durante toda a medição (25°C) que foi realizada na faixa de 190-260 nm, em um mínimo de 5 varreduras consecutivas por amostra. As desconvoluções foram feitas pelo programa K2d a fim de estimar a predominância das estruturas secundárias (Andrade, Chacon et al. 1993).

3.10 Expressão da toxina Tx3-4SUMO em meio restritivo M9 para análises estruturais

Para a expressão em meio M9 foram utilizadas bactérias ORIGAMI e BL21 (DE3) transformadas com a construção Tx3-4SUMO. Foram inoculados 2 mL de meio LB e cultivados por 5-6 horas à 37°C. Duzentos mililitros de meio M9 contendo antibióticos (amp./ chlo.) foram inoculados com a cultura inicial e incubados à 37°C por 16 horas. A cultura foi então centrifugada à 5.000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente e ressuspensa em 1 L de meio M9 (amp./chlo.). A cultura foi cultivada à 37°C até $DO_{600} = 0,5-0,8$. A temperatura foi abaixada para 18°C e a expressão induzida com 1 mM IPTG por 18 horas. A expressão foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida e western blot.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-6 em *Pichia pastoris* (vetor pPICZ)

4.1.1 Clonagem

Utilizando-se os primers YEASTT36F e YEASTT36R, um fragmento de 219 pb foi obtido através da reação de PCR para amplificação do gene que codifica a toxina Tx3-6 (Figura 9a). O DNA purificado foi digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xho* I e clonado no vetor pPICZC através de ligação utilizando-se a enzima T4 ligase. Bactérias *E. coli* (TOP10) eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo Tx3-6pPICZmycHis e plaqueadas em meio LSLB ágar contendo 25 µg/mL de zeocin. Doze colônias foram submetidas à PCR para verificação da presença do inserto e todas se mostraram positivas (Figura 9b). Os plasmídeos de três destas colônias foram purificados e submetidos à análise de restrição e a presença do inserto pode ser visualizada na figura 9c. O sequenciamento de uma das colônias mostrou que o inserto estava corretamente inserido no vetor e não havia mutações em sua seqüência. Dez microgramas do plasmídeo recombinante Tx3-6pPICZmycHis foram linearizados através da digestão em sítio único pela enzima *Pme* I. Esta linearização foi necessária para que o plasmídeo incorporado pela levedura sofresse recombinação homóloga incorporando-se ao DNA genômico da célula. Após a digestão, a amostra foi corrida em gel de agarose para confirmação da linearização do DNA (Figura 9d). Confirmada a completa linearização, 3 µg do plasmídeo recombinante foram utilizados para cada transformação de leveduras competentes. O plasmídeo Tx3-6pPICZmycHis codifica uma proteína de 10,8 kDa com 6 aminoácidos extras na porção N-terminal (M S I E G R) e 35 aminoácidos na porção C-terminal, incluindo o epitopo c-myc e uma cauda de 6 histidinas (Figura 10).

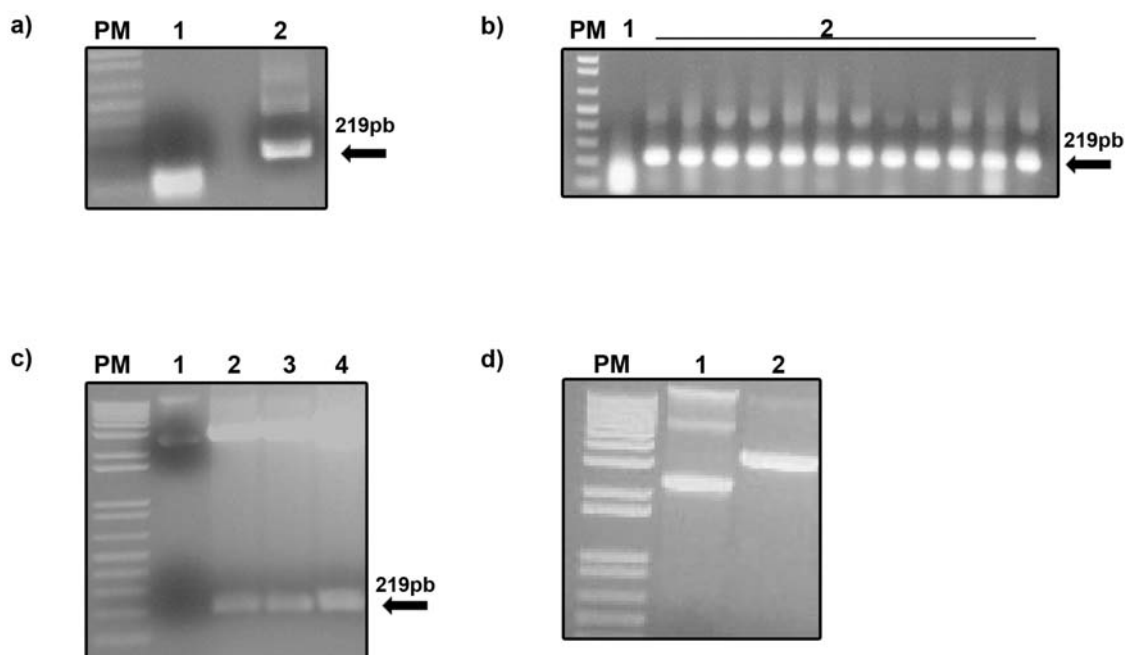


Figura 9: Etapas de clonagem do cDNA da toxina Tx3-6 no vetor pPICZC. a) Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR para a amplificação do DNA que codifica a toxina Tx3-6. PM: Marcador de peso molecular Kb plus. Coluna 1: Controle negativo da reação (sem DNA molde). Coluna 2: cDNA da toxina Tx3-6 de 219pb (seta) amplificado através de reação de PCR. **b) Gel de agarose 1% da PCR para varredura das colônias *E.coli* TOP10 que tiveram o DNA da toxina recombinante amplificado.** PM: Marcador de peso molecular Kb plus. Coluna 1: Controle negativo da reação. 2: Colônias positivas para a presença do inserto. Seta: Região de 219pb. **c) Análise de restrição dos plasmídeos isolados de colônias positivas.** PM: Marcador de peso molecular Kb plus. Coluna 1: Construção sem digestão. Colunas 2, 3 e 4: Construções submetidas à análise de restrição. Seta: Bandas correspondentes aos insertos. **d) Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da digestão da construção Tx3-6pPICZmycHis com enzima *Pme* I mostrando a linearização do DNA.** PM: Marcador de peso molecular Kb plus. Coluna 1: Construção não linearizada. Coluna 2: Construção linearizada.

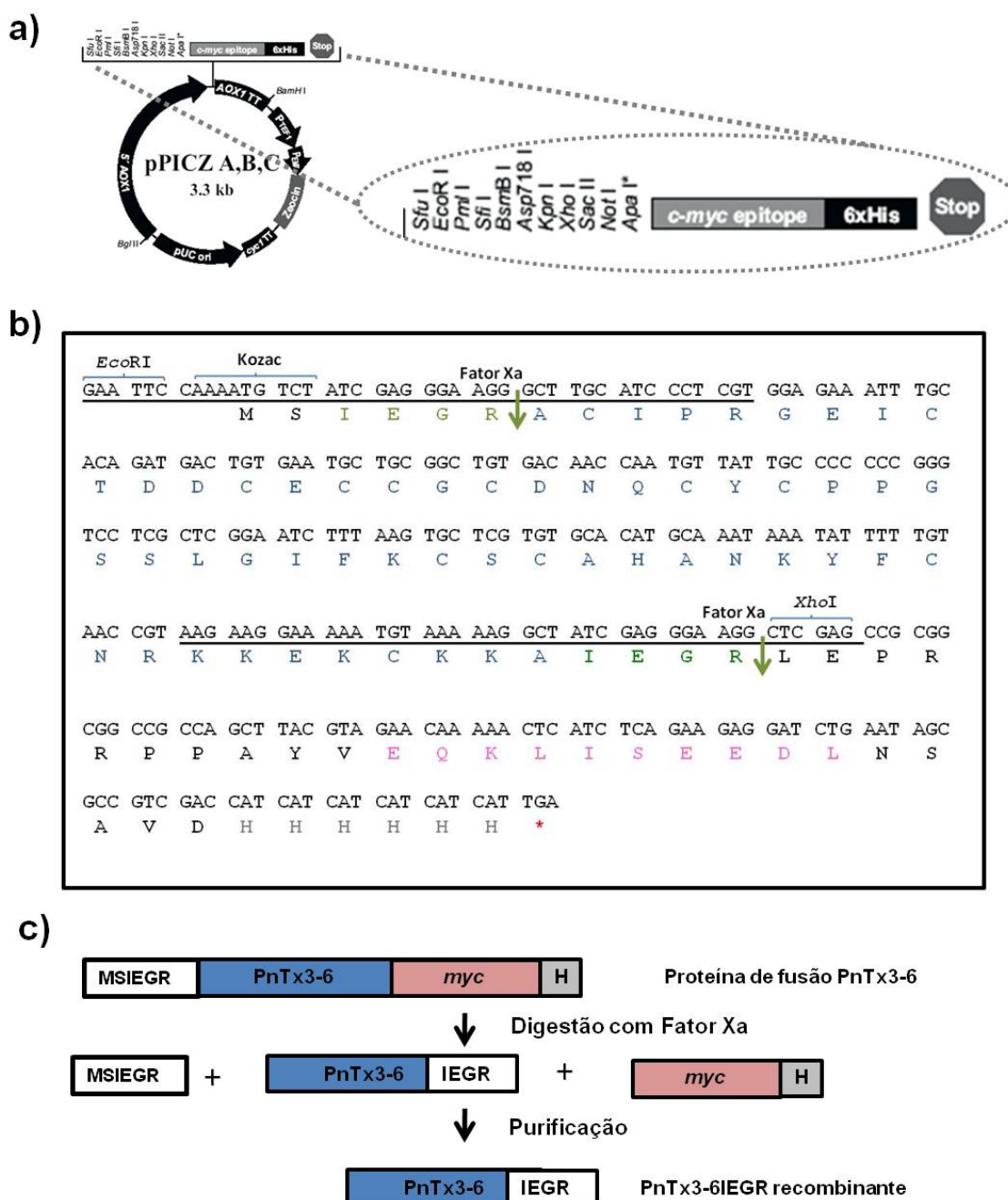


Figura 10: Construção Tx3-6pPICZ. a) Mapa do vetor pPICZ. b) Representação da sequência codificadora para a toxina Tx3-6 e sua sequência de aminoácidos expressa no vetor pPICZ. c) Esquema representando a proteína de fusão e o potencial produto final deste sistema de expressão. Em azul, sequência da toxina Tx3-6. Em cinza, cauda de histidina. Em rosa, epitopo *myc*. Em verde, sítio para clivagem pela protease fator Xa. A sequência sublinhada representa a região de anelamento dos primers YEASTT36F e YEASTT36R. Toda a sequência nucleotídica foi confirmada por sequenciamento.

4.1.2 Expressão, purificação e análise da toxina Tx3-6 (vetor pPICZ)

O vetor pPICZ possui o promotor P_{AOX1} , que regula a produção da enzima álcool oxidase, responsável por guiar a expressão da proteína heteróloga em *Pichia*. *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica, capaz de metabolizar metanol como única fonte de carbono. Dois genes codificam a álcool oxidase: AOX1 e AOX2, sendo que AOX1 é responsável pela maior parte da atividade desta enzima. O promotor P_{AOX1} é altamente induzível pela presença de metanol no meio de cultura. A perda ou interrupção do gene AOX1 causa uma diminuição significativa na capacidade de metabolizar o metanol, e a levedura passa de Mut⁺ (Methanol utílization) a Mut^S (Methanol utílization slow) que significa que ela passa a crescer lentamente em meio contendo metanol como única fonte de carbono. O vetor possui nucleotídeos que codificam o epitopo *myc* (E Q K L I S E N L) e uma cauda de seis aminoácidos histidina após o sítio múltiplo de clonagem, portanto, esses aminoácidos são incorporados à porção C-terminal da toxina recombinante (Figura 10c). Tanto o epitopo *myc*, quanto a cauda de histidina favorecem a identificação da proteína heteróloga através dos anticorpos anti-*myc* e anti-His. Além disso, a cauda de histidina se liga a cátions bivalentes como Ni^{2+} , possibilitando a purificação por afinidade através de resina quelada a níquel. Foram transformadas três linhagens diferentes: X-33, GS115 e KM71H. A linhagem X-33 é a linhagem selvagem de *Pichia*, eficaz no crescimento em larga escala. A linhagem GS115 possui uma mutação no gene histidinol desidrogenase (*his4*) que impede a síntese de histidina. Para crescer em meio mínimo, esta linhagem requer a adição deste aminoácido ao meio. A linhagem KM71H provém de uma linhagem parental que possui uma mutação no gene argininosuccinato liase (*arg4*) que a impede de crescer na ausência de arginina. Na criação da linhagem KM71H o gene *ARG4* selvagem foi utilizado para interromper o gene AOX1, portanto, a linhagem KM71H é Mut^S e Arg⁺. A transformação de *Pichia* com a construção linearizada favorece uma recombinação simples (inserção) no locus *AOX1*, inserindo a construção no DNA genômico da levedura.

A eficiência da transformação foi analisada através de PCR de colônias, que mostrou que todas as colônias testadas eram positivas para a presença do inserto no DNA genômico.

Após a transformação, as linhagens X-33 e GS115 permanecem Mut⁺, e a linhagem KM71H permanece Mut^S. Entretanto, as leveduras que incorporaram o plasmídeo em seu genoma se tornam resistentes ao antibiótico Zeocin. Para confirmar o fenótipo das linhagens, as colônias foram estriadas em placas contendo meio MM (ou MMH para GS115) e MD (ou MDH para GS115) e incubadas por 2 dias a 30° C. As linhagens X-33 e GS115 cresceram bem nas duas placas, confirmando o fenótipo Mut⁺, uma vez que são capazes de utilizar metanol ou dextrose como fonte de carbono. A linhagem KM71H cresceu muito pouco na placa contendo meio mínimo metanol (MM), confirmando que não apresenta o gene AOX1 e não consegue metabolizar metanol, sendo Mut^S. Portanto, as recombinações ocorreram nos sítios corretos.

Como cada proteína recombinante expressa em *Pichia* apresenta características específicas, não é possível prever qual a melhor linhagem para se expressar a toxina recombinante Tx3-6. Por isso, foi realizado um experimento piloto nas três linhagens de leveduras disponíveis para a escolha da linhagem com melhor expressão. Os níveis de expressão foram baixos nas três linhagens e em nenhuma delas conseguimos detectar a expressão da toxina por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue. A visualização da expressão só foi possível através da técnica de Western blotting (Figura 11a). As linhagens X-33 e GS115 apresentaram baixo nível de expressão de uma proteína com peso molecular esperado em torno de 11 kDa para a Tx3-6 recombinante (ver seta Figura 11a). Adicionalmente, essas linhagens também apresentaram bandas adicionais de peso molecular de aproximadamente 22 kDa e 33 kDa. O anticorpo anti-myc reconheceu as mesmas bandas de peso molecular 11 kDa, 22 kDa e 33 kDa na linhagem KM71H entretanto, a reação mais forte do anticorpo foi na faixa de alto peso molecular (aproximadamente 55 kDa e 88 kDa). Embora não possamos descartar a possibilidade de que as bandas acima de 11 kDa são derivadas de reação inespecífica do anticorpo, o fato de os pesos moleculares representarem múltiplos de 11 sugere que elas são agregados da proteína recombinante. Apesar do experimento piloto não ter sido muito animador, resolvemos testar a expressão em larga escala utilizando a linhagem Mut⁺ X-33. Também nesse caso, após a lise das células, a expressão teve que ser analisada através de western blotting uma vez que não foi possível diferenciar as bandas através da coloração do gel por Coomassie. (dado não mostrado). O sobrenadante foi purificado em filtro Amicon Ultra-4 para

diminuir a concentração de proteínas de alto peso molecular e o filtrado foi posteriormente submetido a cromatografia de afinidade em resina de níquel. As eluições foram dialisadas para retirada de imidazol. Como as frações estavam muito diluídas não foi possível detectar a banda da proteína recombinante purificada através de coloração por Coomassie blue, portanto, assim como no experimento piloto, foi realizado um western blot (Figura 11b).

Devido à baixa produtividade obtida com este sistema de expressão, foi decidido não dar continuidade ao processo e tentar novos sistemas utilizando a bactéria *Escherichia coli* como hospedeiro.

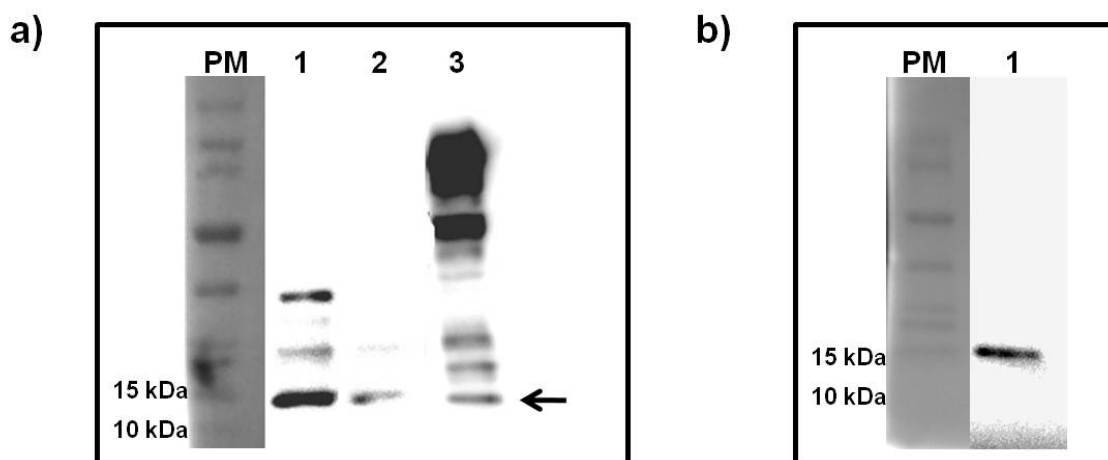


Figura 11: Análise da expressão e purificação da proteína Tx3-6 expressa em *Pichia pastoris*.

a) Identificação imunoquímica do piloto de expressão da toxina Tx3-6pPICZmycHis. Western blotting mostrando a toxina recombinante expressa em diferentes linhagens de *Pichia pastoris*. PM: Marcador de peso molecular Dual Color Precision Plus Protein. Coluna 1: Expressão em *P. pastoris* linhagem X-33 por 24 horas Coluna 2: Expressão em *P. pastoris* linhagem GS115 por 24 horas. Coluna 3: Expressão em *P. pastoris* linhagem KM71H por 48 horas. Anticorpo: anti-myc peroxidase (1:1000). A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce). Seta mostrando a região do tamanho aproximado da toxina recombinante.

b) Identificação imunoquímica da proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade. PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein. Coluna 1: Amostra eluída na cromatografia de afinidade. A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce). Anticorpo: anti-myc peroxidase (1:1000).

4.2 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-4 em *E. coli* BL21 (DE3) (vetor pET-45b (+))

4.2.1 Clonagem

Utilizando os primers Tx34PSTIF e Tx34XHOIR, foi obtido o cDNA de 256 pb que codifica a toxina Tx3-4 através de PCR. O cDNA foi digerido com as enzimas de restrição *Xho* I e *Pst* I e clonado no vetor pET-45b (+). PCR de colônias, análise de restrição e sequenciamento de DNA mostraram que a clonagem foi realizada com sucesso.

O plasmídeo Tx3-4pET codifica uma proteína de 12,7 kDa, composta pela toxina Tx3-4 ligada a uma cauda 6xHis na sua porção N-terminal (Figura 12b).

4.2.2 Expressão da toxina Tx3-4 (vetor pET-45b (+))

O sistema de expressão pET é um dos mais utilizados para a clonagem e expressão de proteínas em *E. coli*. O gene é comandado pelo promotor T7 (do bacteriófago T7) e sua expressão é controlada pelo promotor e operador *lac*.

O plasmídeo recombinante Tx3-4pET foi usado para transformar bactérias eletrocompetentes *E. coli* BL21 (DE3). A expressão foi induzida com 0,6 mM de IPTG por 4 horas a 37° C. Após a lise das bactérias, amostras do sobrenadante e pellet foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas com Comassie blue. Podemos observar uma banda mais forte de peso molecular esperado (13 kDa) na amostra do pellet, que indica uma expressão da toxina recombinante em corpos de inclusão. Para confirmarmos se a banda visualizada era mesmo a toxina recombinante, foi realizado um western blotting com as mesmas amostras utilizando-se anticorpos IgG anti-veneno total *P. nigriventer*-peroxidase. Pode-se observar na figura 13, que os anticorpos reagiram com a banda esperada, confirmando a expressão da toxina em forma de agregados. Uma banda de aproximadamente 26 kDa pode ser visualizada nas amostras sem indução e pellet, que podem representar uma reação inespecífica do anticorpo ou uma dimerização da toxina, uma vez que o tamanho é exatamente o dobro da toxina monomérica. Como estávamos procurando um sistema capaz de expressar a toxina de forma solúvel e funcional, não continuamos com o sistema pET.

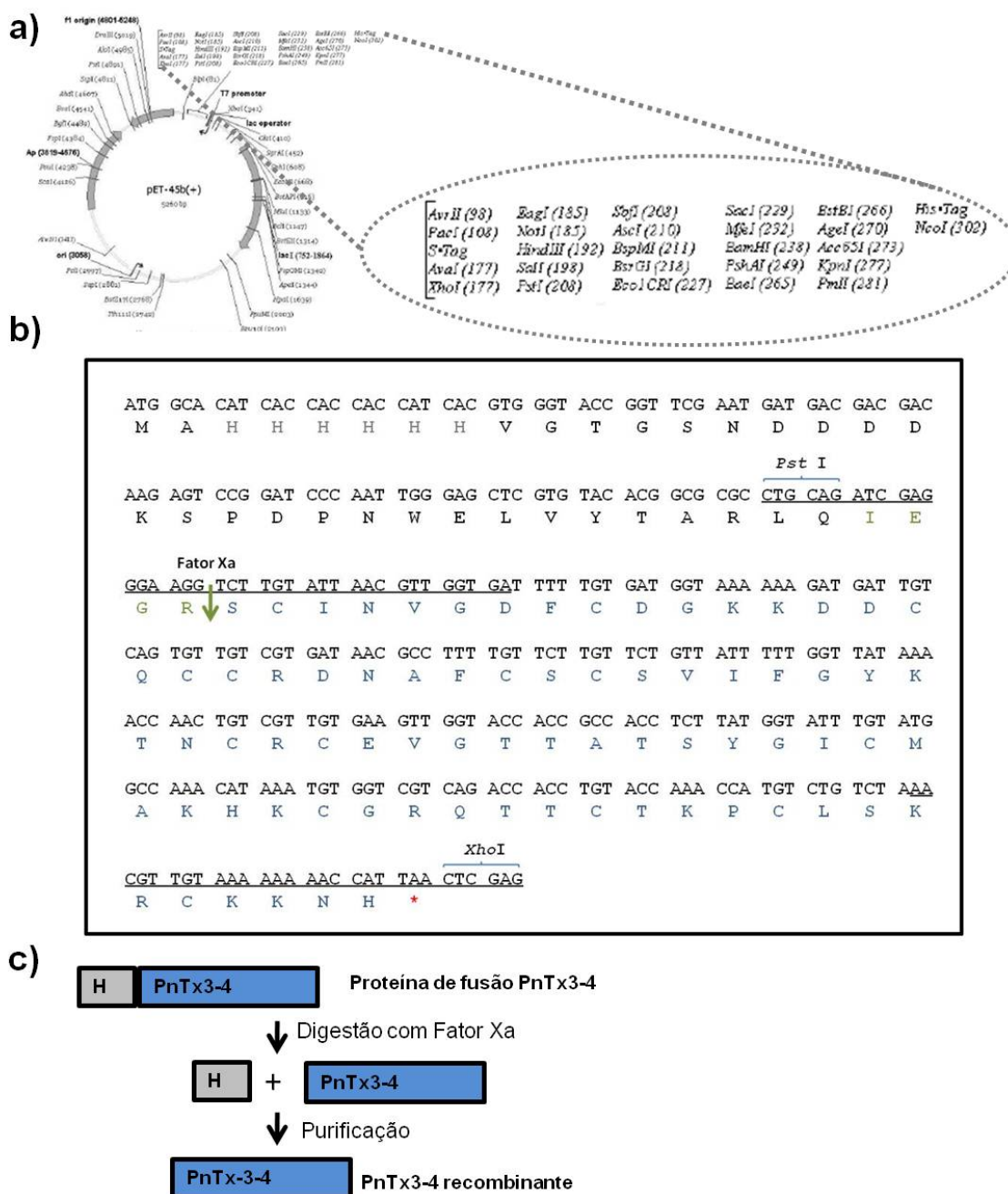


Figura 12: Construção Tx3-4pET. a) Mapa do vetor pET b) Representação da sequência codificadora para a toxina Tx3-4 e sua sequência de aminoácidos expressa no vetor pET. c) Esquema representando a proteína de fusão e o potencial produto final deste sistema de expressão. Em azul, sequência da toxina Tx3-4. Em cinza, cauda de histidina. Em verde, sítio para clivagem pela protease fator Xa. A sequência sublinhada representa a região de anelamento dos primers TX34PSTIF e Tx34XHOIR. Toda a sequência nucleotídica foi confirmada por sequenciamento.

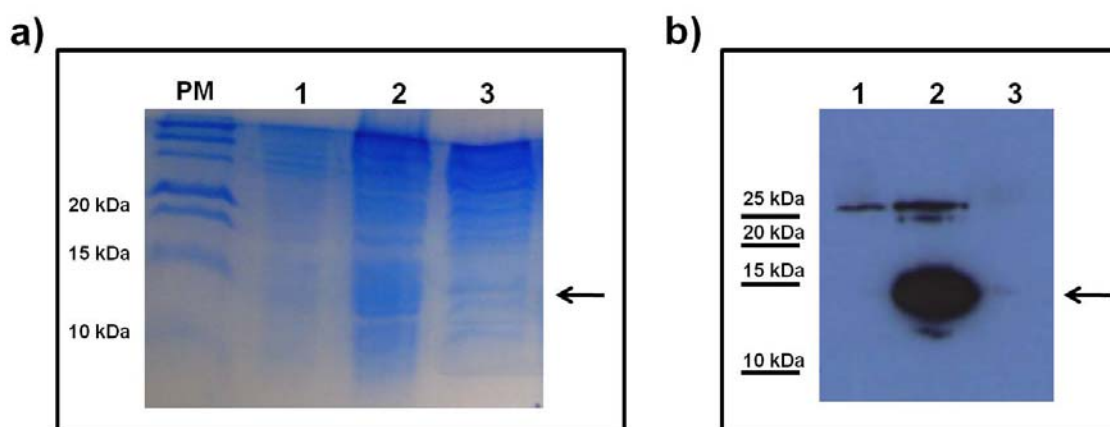


Figura 13: Análise da solubilidade da toxina Tx3-4 expressa em *E. coli* utilizando-se o vetor pET. a) SDS-PAGE 4-20% mostrando a solubilidade da toxina Tx3-4. PM: Marcador de peso molecular. Coluna 1: Controle sem indução. Coluna 2: Proteínas insolúveis presentes no pellet após lise e centrifugação. Coluna 3: Proteínas solúveis presentes no sobrenadante após lise e centrifugação. **b) Western blotting mostrando a solubilidade da toxina Tx3-4.** Coluna 1: Controle sem indução. Coluna 2: Proteínas insolúveis presentes no pellet após lise e centrifugação. Coluna 3: Proteínas solúveis presentes no sobrenadante após lise e centrifugação. Anticorpo: IgG anti-veneno total de *P. nigriventer* (1:1250). A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce). Seta: Toxina Tx3-4 recombinante expressa em corpos de inclusão.

4.3 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-6 em *E. coli* TOP10 (vetor pBADHis)

4.3.1 Clonagem

Utilizando os primers T36FPP e T36RPP, um fragmento de 225 pb que codifica a toxina Tx3-6 com o seu pré-peptídeo foi obtido através da técnica de PCR. A sequência do pré-peptídeo foi acrescentada na tentativa de melhorar o enovelamento da toxina e, conseqüentemente, favorecer sua expressão na forma funcional. Após a PCR, o DNA purificado foi digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III e clonado no vetor pBADHisB. Bactérias *E. coli* (TOP10) eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante Tx3-6PPpBADHis e as colônias que receberam o plasmídeo foram selecionadas através de PCR de colônias. As colônias positivas foram confirmadas posteriormente através de análise de restrição e sequenciamento.

O vetor pBADHis acrescenta o epitopo Xpress (N L Y N N N N K) juntamente com a cauda de histidina à porção N-terminal da proteína heteróloga. O epitopo Xpress também favorece a identificação da proteína recombinante através do anticorpo anti-Xpress. Portanto, o plasmídeo recombinante Tx3-6PPpBADHis codifica uma proteína de 12,6 kDa que contém a sequência da toxina Tx3-6 com o seu pré-peptídeo, uma cauda de 6 histidinas e um sítio para clivagem pela protease Fator Xa na sua porção N-terminal (Figura 14b e c).

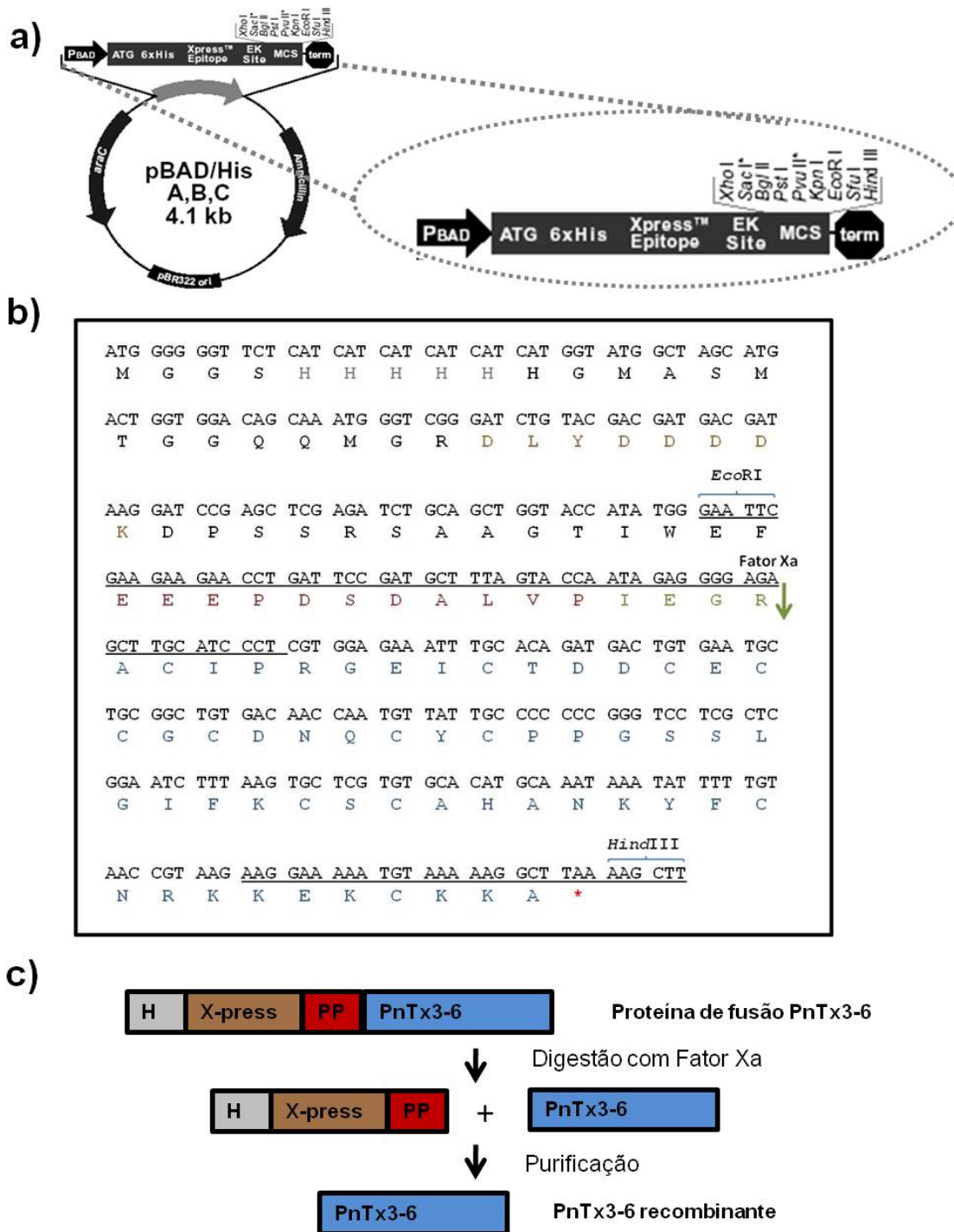


Figura 14: Construção Tx3-6pBADHis. a) Mapa do vetor pBADHis. b) Representação da sequência codificadora para a toxina Tx3-6 e sua sequência de aminoácidos expressa no vetor pBADHis. c) Esquema representando a proteína de fusão e o potencial produto final deste sistema de expressão. Em azul, sequência da toxina Tx3-6. Em cinza, cauda de histidina. Em marrom, epítopo X-press. Em vermelho, sequência do pré-peptídeo. Em verde, sítio para clivagem pela protease fator Xa. A sequência sublinhada representa a região de anelamento dos primers T36FPP e T36RPP. Toda a sequência nucleotídica foi confirmada por sequenciamento.

4.3.2 Expressão, purificação e análise da proteína Tx3-6PPHis (vetor pBADHis)

O teste piloto de expressão em pequena escala mediu a melhor concentração de L-arabinose para a indução da expressão da toxina Tx3-6PPHis. Diferentes culturas receberam uma concentração de L-arabinose que variou de 0,00002 até 0,2% e foram cultivadas por 4 horas. As amostras foram corridas em gel de poliacrilamida e coradas em solução de Coomassie Blue R-250. Como pode ser observado na Figura 15, a concentração de L-arabinose que melhor induziu a expressão da Tx3-6PPHis foi a de 0,2%. Interessantemente, além da banda de massa molecular aproximadamente de 12.6 kDa (ver seta Figura 15) outras bandas de maior massa molecular também mostraram aumento de expressão (ver asteriscos Figura 15). Usamos portanto a concentração de 0,2% de L-arabinose para os experimentos em larga escala. A escolha da linhagem de *E. coli* TOP10 para a expressão baseou-se no fato de que esta linhagem é capaz de transportar, mas não de metabolizar a L-arabinose. Assim, os níveis desta substância permanecem os mesmos no interior da célula induzindo o promotor durante o todo o processo.

Após a expressão, a cultura foi centrifugada e o pellet ressuspendido em solução de lise B-PER. O extrato foi centrifugado para que ocorresse a separação das proteínas solúveis (sobrenadante) das insolúveis (pellet). O sobrenadante foi purificado de acordo com as especificações do kit B-PER 6xHis Protein Spin Purification (Pierce). As frações purificadas foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 4 - 12% seguida de coloração por Coomassie blue (Figura 16a). Pode-se observar que todas as frações eluídas apresentam, além da banda que corresponde à toxina recombinante (12.6 kDa), uma banda forte de alto peso molecular (40 kDa - seta).

Na tentativa de eliminar essa banda de maior peso molecular, as eluições foram reunidas e purificadas utilizando-se o filtro de centrifugação Amicon Ultra-4 que retém proteínas acima de 30 kDa. Foram feitas três centrifugações a 3.320 x g por 1 hora cada e obtidos três filtrados desta purificação. Amostras de cada filtrado e da fração que ficou retida no filtro foram corridas em gel de poliacrilamida e coradas em solução de nitrato de prata (Figura 16b). Pelo perfil eletroforético, pôde-se constatar que a purificação em filtro Amicon foi eficiente na eliminação de contaminantes de alta massa molecular. Para testar se a proteína purificada era a Tx3-6PPHis, foi realizado um Western blotting, utilizando-se o conjugado IgG

anti-veneno total de *Phoneutria nigriventer*-peroxidase. Como pode ser observado na figura 16c, grande parte da proteína recombinante ficou retida no filtro, não sendo recuperada. A dificuldade em purificar a toxina recombinante Tx3-6PP e separá-la do contaminante de alta massa molecular, fez com que este sistema de expressão não fosse satisfatório.

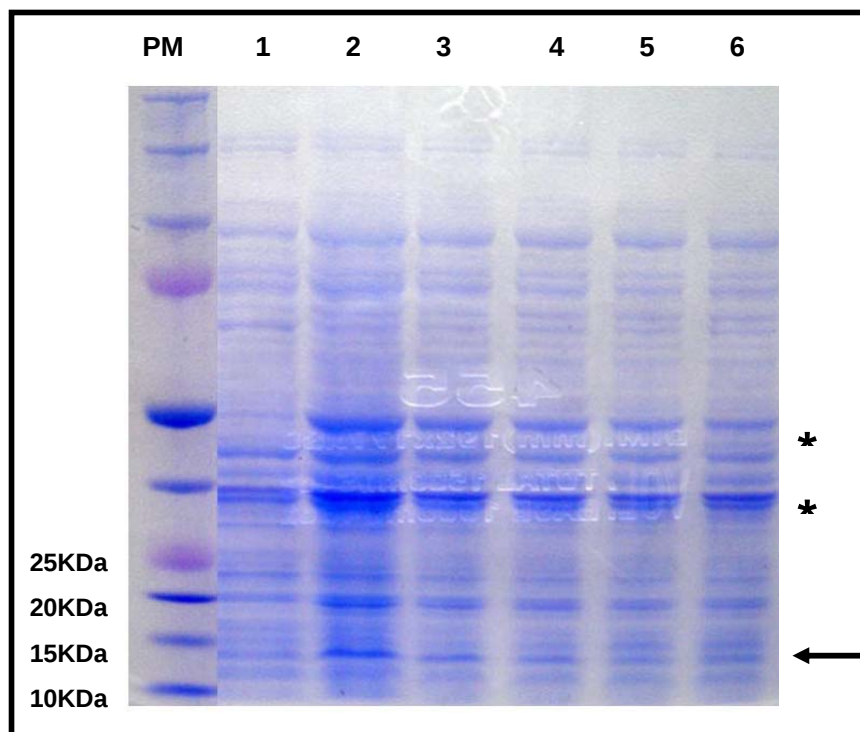


Figura 15: Piloto da expressão da toxina Tx3-6PPHis em função da concentração de L-arabinose. SDS-PAGE 4%-12% de amostras da expressão da toxina recombinante Tx3-6PPHis em diferentes concentrações de indutor do gene promotor. PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein. Coluna 1: Tempo 0 de indução com L-arabinose. Colunas 2-6: Quatro horas após indução com 0,2%, 0,02%, 0,002%, 0,0002% e 0,00002% respectivamente. As proteínas foram coradas em solução de Coomassie Blue R-250.

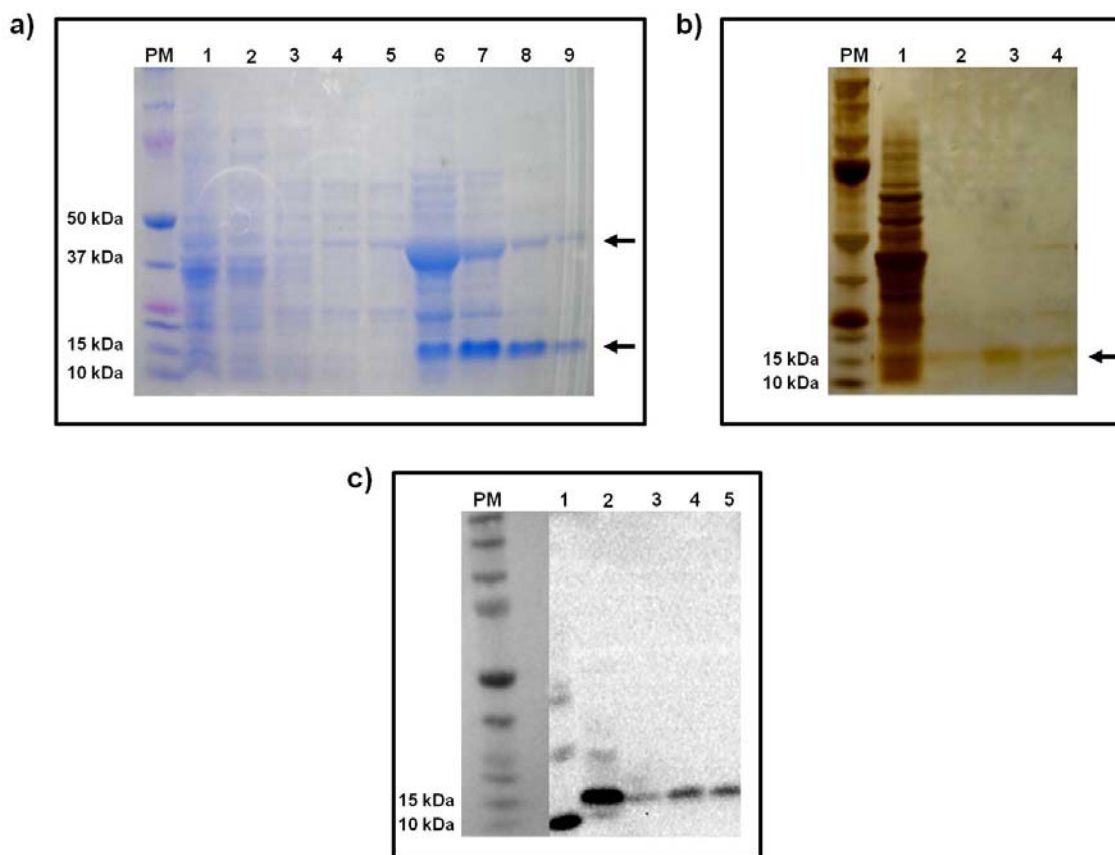


Figura 16: Análise da expressão e purificação da toxina Tx3-6 expressa em *E. coli* (vetor pBADHis B)

a) SDS-PAGE 4-12% mostrando as etapas de purificação da toxina recombinante Tx3-6PPHis por afinidade em coluna de níquel. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus Protein. Coluna 1: Proteínas que não ligaram à coluna. Colunas 2-5: Proteínas que saíram nas lavagens. Colunas 6-9: Proteínas que saíram nas eluições. As proteínas foram coradas em solução de Coomassie Blue R-250. **b) SDS-PAGE 4-12% mostrando a purificação da toxina recombinante Tx3-6PPHis no filtro Amicon Ultra-4.** PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein. Coluna 1: Proteínas retidas no Amicon. Coluna 2: Primeiro filtrado do Amicon. Coluna 3: Segundo filtrado do Amicon. Coluna 4: Terceiro filtrado do Amicon. As proteínas foram coradas em solução de nitrato de prata. **c) Identificação imunoquímica da toxina recombinante purificada.** PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein. Coluna 1: Veneno total da *Phoneutria nigriventer*. Coluna 2: Amostra que ficou retida no Amicon. Coluna 3: Primeiro filtrado que passou pelo Amicon. Coluna 4: Segundo filtrado. Coluna 5: Terceiro filtrado. Anticorpo: IgG anti-veneno total *P. nigriventer*-peroxidase (1:1250). A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce). As setas indicam a região de peso molecular correspondente à toxina recombinante e ao contaminante de alto peso molecular.

4.4 Clonagem, expressão, purificação e análise da toxina Tx3-4 em *E. coli* TOP10 (vetor pBADHis)

4.4.1 Clonagem

Usando os primers Tx34PSTFI e Tx34RBAD o fragmento de 255 pb que codifica a toxina Tx3-4 foi obtido através da técnica de PCR. O DNA purificado foi digerido com as enzimas de restrição *Pst* I e *Eco* RI e clonado no vetor pBADHis C através de ligação utilizando-se a enzima T4 ligase. PCR de colônias, análise de restrição e sequenciamento de DNA mostraram que a clonagem foi realizada com sucesso.

O plasmídeo Tx3-4pBADHis codifica uma proteína de aproximadamente 13,5 kDa que contém a sequência da toxina Tx3-4 ligada a uma cauda de 6 histidinas na sua porção N-terminal (Figura 17b e c).

4.4.2 Expressão, purificação e análise da toxina Tx3-4 (vetor pBADHis)

O plasmídeo recombinante Tx3-4pBADHis foi introduzido em bactérias TOP10 eletrocompetentes e a expressão foi realizada por 4 horas após a indução com 0,2% de L-arabinose. A toxina recombinante foi purificada do sobrenadante através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel, como pode ser observado na figura 18. O rendimento obtido foi de 1,32 mg por litro de cultura. As eluições foram dialisadas para a troca do tampão de eluição pelo tampão de digestão. Duas concentrações de Fator Xa (1:50 e 1:100) foram testadas, assim como a necessidade de SDS para completa digestão. Análise do piloto de digestão por western blotting utilizando-se anticorpos anti-His mostrou que ambas as concentrações de Fator Xa digeriram completamente a proteína de fusão e que na ausência de SDS, a digestão foi mais eficiente (dados não mostrados). Foi utilizado portanto a proporção de 1:100 de Fator Xa:Tx3-4His, sem adição de SDS. Após a digestão (Figura 19a), a toxina foi purificada utilizando-se a resina de purificação do Fator Xa e a toxina Tx3-4 madura foi recuperada no sobrenadante após centrifugação da resina. Porém, a toxina Tx3-4 madura se liga inespecificamente à resina, dificultando sua purificação e fazendo com que parte da toxina fosse perdida (Figura 19b). A identidade da toxina recombinante foi também analisada através de

western blot utilizando-se anticorpos anti-veneno total da *Phoneutria nigriventer* (Figura 19c), que reconheceram especificamente a toxina. A dificuldade de purificação da toxina madura após a digestão fez com que o rendimento final deste sistema fosse insatisfatório (0,2 mg/L). O pouco que foi recuperado da toxina Tx3-4 foi testado para verificarmos se a toxina foi expressa de forma funcional.

4.4.2.1 Liberação de glutamato

O teste utilizado para avaliar a atividade da toxina recombinante foi o teste de liberação de glutamato em sinaptosomas corticais de camundongos baseado no método de Nicholls et al. (1987). Este, é um método fluorimétrico que mede continuamente a liberação de glutamato de sinaptosomas e utiliza o aumento de fluorescência causado pela produção de NADPH na presença de NADP^+ e glutamato desidrogenase para medir esta liberação (Nicholls, Sihra et al. 1987).

A liberação controle de glutamato ativada pela despolarização dos sinaptosomas com 33 mM de KCl na presença de Ca^{2+} foi de cerca de $17,04 \pm 0,1$ nmol/mg de proteína. A liberação de glutamato independente de Ca^{2+} , medida na ausência de Ca^{2+} e na presença de 2 mM EGTA, foi de cerca de 10,3 nmol/mg de proteína. A toxina recombinante (1 μM) foi incubada por 30 minutos com a suspensão sinaptosomal e a liberação de glutamato foi de cerca de $17,64 \pm 0,8$ nmol/mg. O resultado do teste, representado na figura 20, nos mostra que a toxina recombinante não teve nenhum efeito bloqueador na liberação de glutamato. A obtenção da toxina inativa, somada ao baixo rendimento obtido, fez com que procurássemos um novo sistema de expressão.

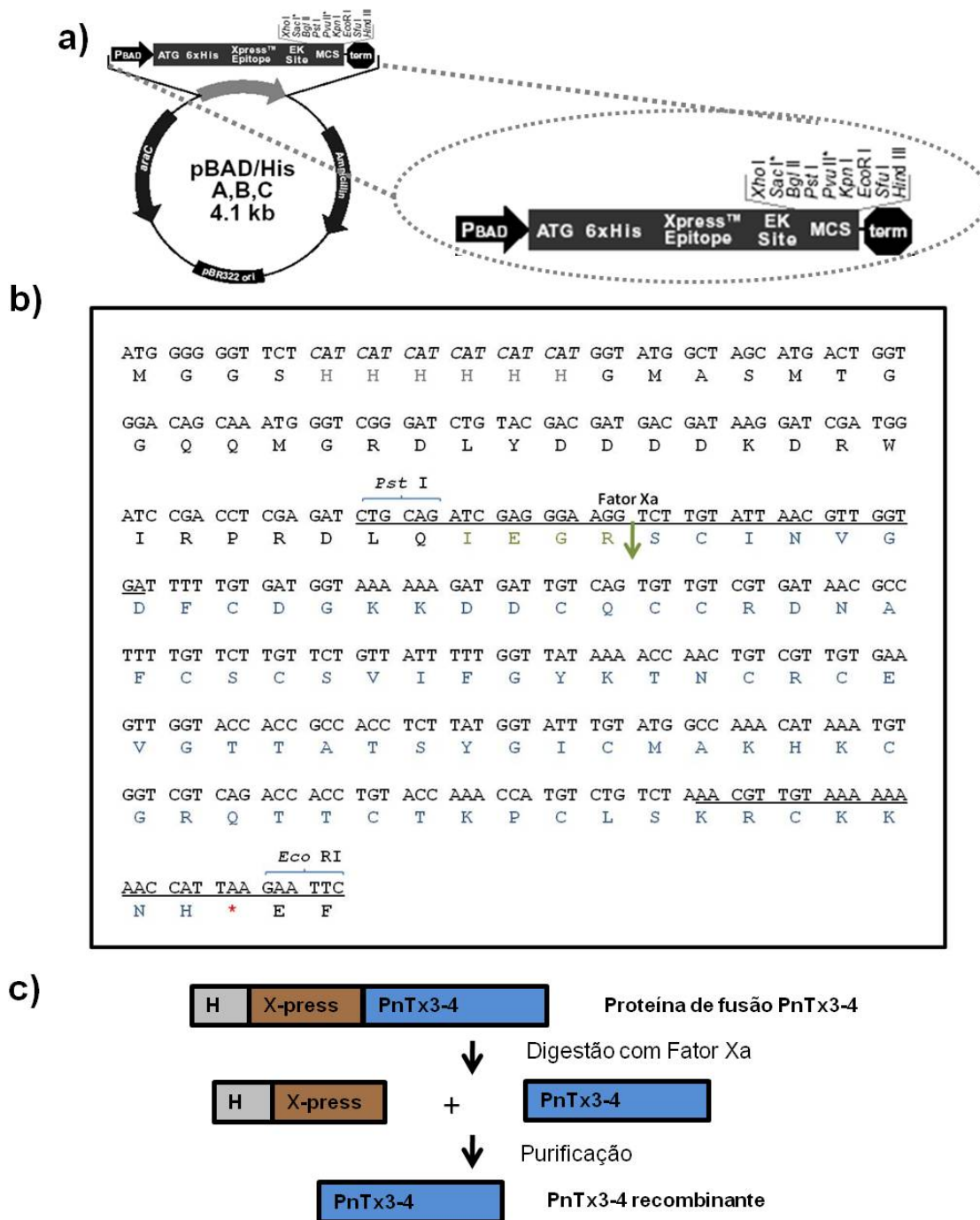


Figura 17: Construção Tx3-4pBADHis. a) Mapa do vetor pBAD b) Representação da sequência codificadora para a toxina Tx3-4 e sua sequência de aminoácidos expressa no vetor pBADHis. c) Esquema representando a proteína de fusão e o potencial produto final deste sistema de expressão. Em azul, sequência da toxina Tx3-4. Em cinza, cauda de histidina. Em marrom, epitopo X-press. Em verde, sítio para clivagem pela protease fator Xa. A sequência sublinhada representa a região de anelamento dos primers TX34PSTIF e Tx34RBAD. Toda a sequência nucleotídica foi confirmada por sequenciamento.

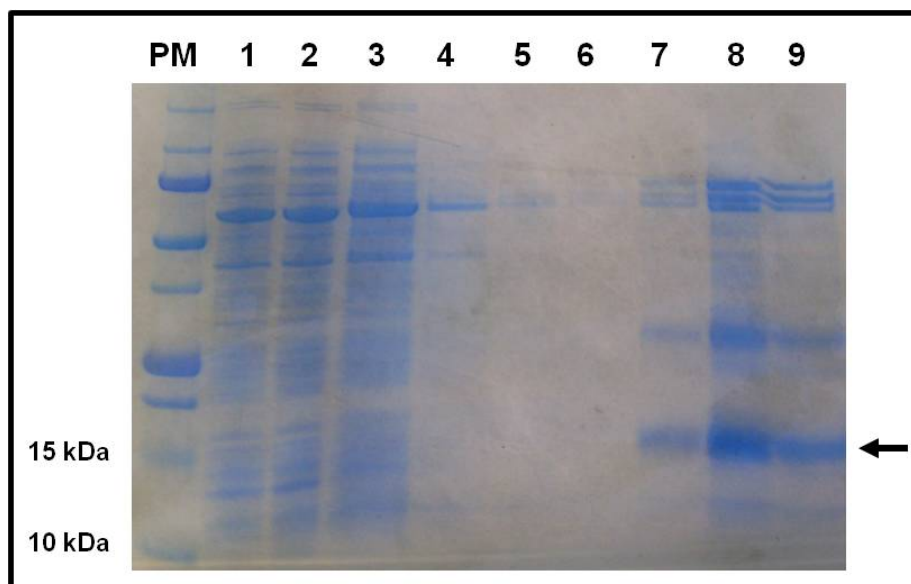


Figura 18: Análise da purificação da toxina Tx3-4 expressa em *E. coli* (vetor pBADHis). SDS-PAGE 4-20% mostrando a purificação da toxina recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. PM: Marcador de peso molecular Dual Color Precision Plus. Coluna 1: Proteínas solúveis. Coluna 2: Proteínas que não se ligaram à resina. Colunas 3, 4, 5 e 6: Lavagens. Colunas 7, 8 e 9: Eluições. A seta está apontando a toxina recombinante. As proteínas foram coradas em solução RAPIDStain (Novagen).

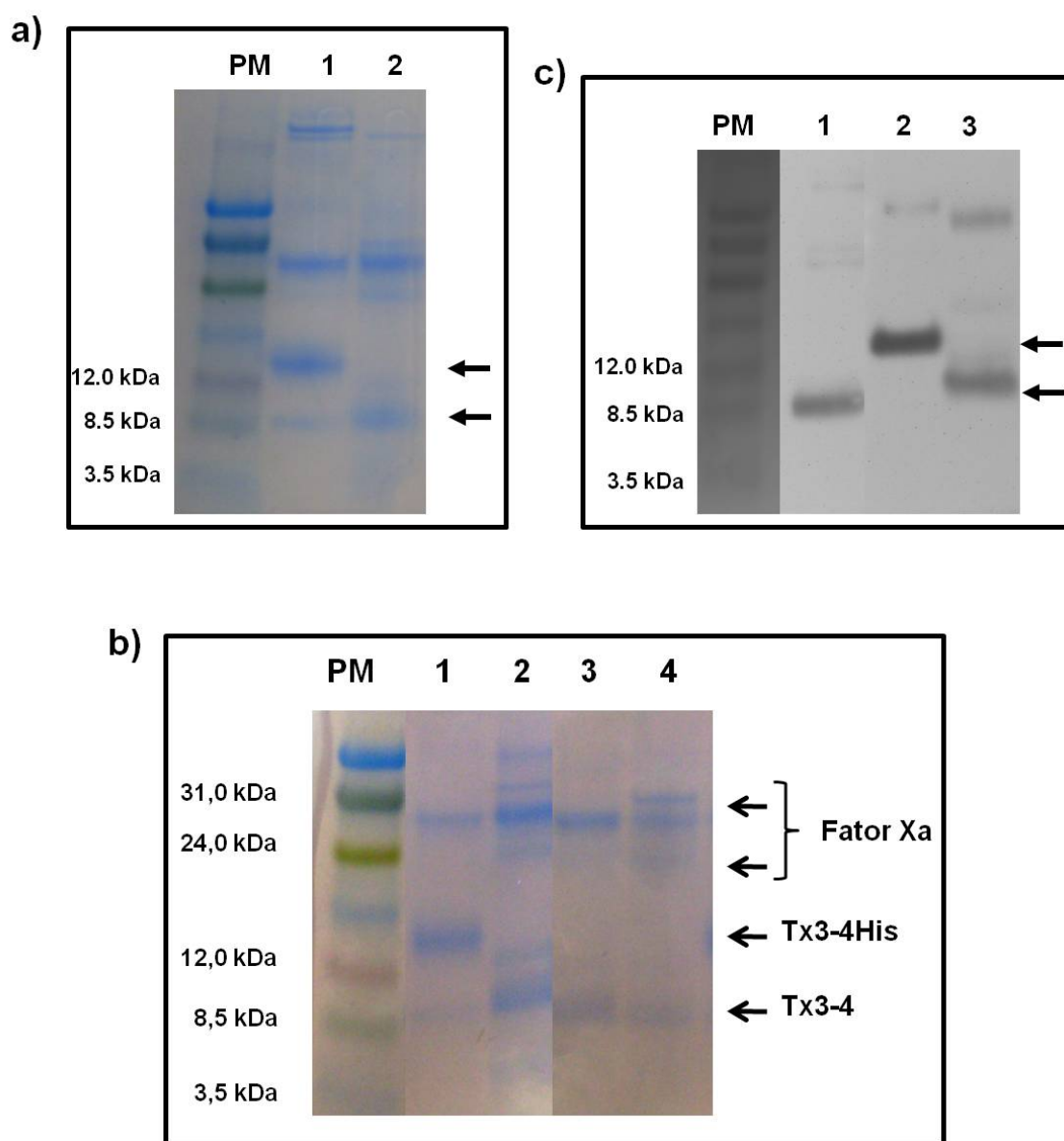


Figura 19: Digestão da proteína de fusão. a) SDS-PAGE 4-20% mostrando a digestão da toxina recombinante por Factor Xa. PM: Marcador de peso molecular Low Range Rainbow (Amersham). Coluna 1: Tx3-4His sem digestão. Coluna 2: Tx3-4His digerida. **b) Purificação da toxina Tx3-4 madura após digestão.** PM: Marcador de peso molecular Low Range Rainbow (Amersham). Coluna 1: Toxina Tx3-4His sem digestão. Coluna 2: proteína de fusão digerida com Fator Xa antes da purificação. Coluna 3: Toxina Tx3-4 madura purificada. Coluna 4: Resina de purificação de Fator Xa, mostrando que parte da toxina Tx3-4 ficou retida. **b) Identificação da toxina recombinante purificada por imunoblot.** PM: Marcador de peso molecular Low Range Rainbow (Amersham). Coluna 1: Veneno total de *Phoneutria nigriventer*. Coluna 2: Tx3-4His eluída após cromatografia de afinidade. Coluna 3: Tx3-4His após digestão por Factor Xa. Anticorpo: IgG anti-veneno total de *P. nigriventer* (1:1250). A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce).

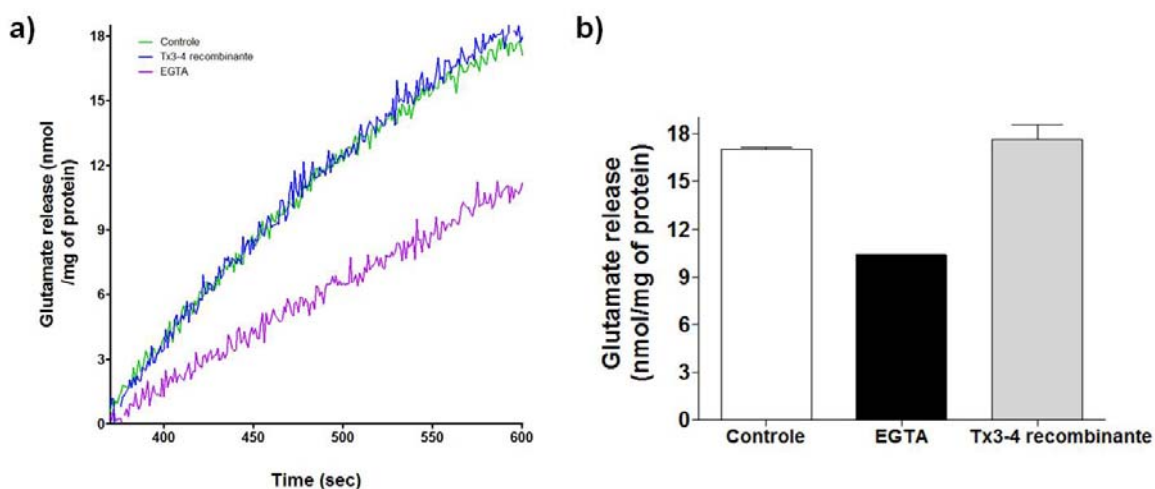


Figura 20: Ensaio biológico da toxina recombinante Tx3-4 expressa em *E. coli* (vetor pBADHis).

a) Os sinaptosomas foram incubados por 30 minutos com a toxina recombinante e despolarizados com 33 mM KCl. A liberação de glutamato independente de cálcio foi medida na ausência de Ca^{2+} e na presença de 2 mM EGTA. A toxina recombinante não apresentou nenhum efeito de inibição da liberação de glutamato. b) Representação em barra. Os resultados estão mostrados como média $\pm$ EPM.

4.5 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-6 em *E. coli* TOP10 (vetor pBADmycHis)

4.5.1 Clonagem

Utilizando os primers Tx36ECOF e Tx36PSTR, foi obtido o fragmento de 220 pb que codifica a toxina Tx3-6, através da técnica de PCR. Após a PCR, o DNA foi digerido com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind* III e clonado no vetor pBADmycHisC. Bactérias *E. coli* (TOP10) eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante Tx3-6pBADmycHis e as colônias que receberam o plasmídeo foram selecionadas através de PCR. Os plasmídeos destas colônias foram purificados e digeridos com as enzimas *Eco*RI e *Hind* III para confirmação da presença do inserto. O plasmídeo recombinante foi purificado e analisado através de sequenciamento automático, que mostrou que a sequência e o posicionamento do inserto no vetor estavam corretos. Na figura 21b, pode-se observar a sequência expressa após indução do gene promotor.

O plasmídeo Tx3-6pBADmycHis codifica uma proteína de 10,8 kDa que contém a sequência da toxina Tx3-6 ligada a um epitopo *myc* e a uma cauda de 6 histidinas na sua porção C-terminal. Além disso, possui uma sequência extra de aminoácidos na região N-terminal (M D P S S R S A A G T I W E F I E G R) (Figura 21c)

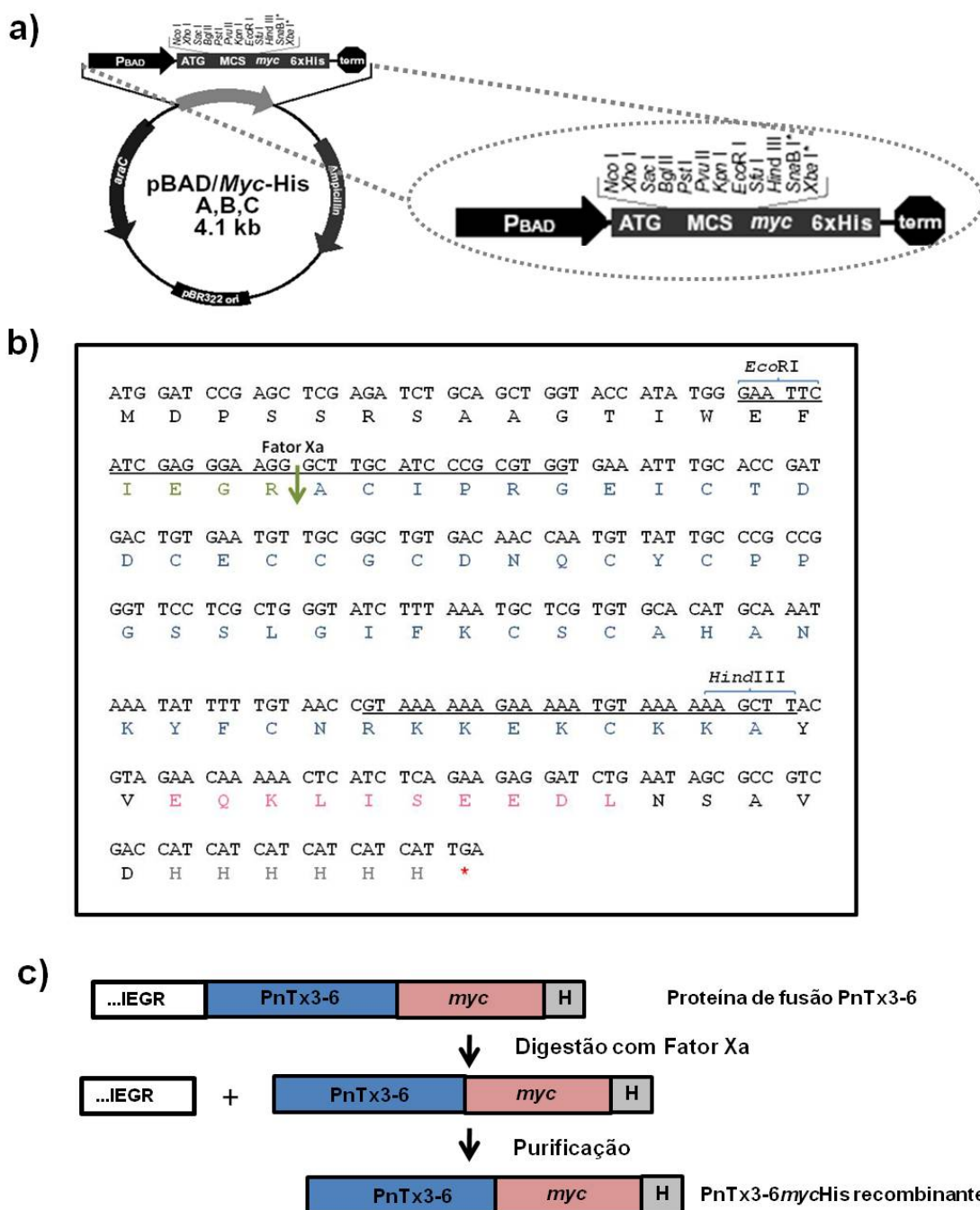


Figura 21: Construção Tx3-6pBADmycHis. a) Mapa do vetor pBADmycHis. b) Representação da sequência codificadora para a toxina Tx3-6 e sua sequência de aminoácidos expressa no vetor pBADmycHis. c) Esquema representando a proteína de fusão e o potencial produto final deste sistema de expressão. Em azul, sequência da toxina Tx3-6. Em cinza, cauda de histidina. Em rosa, epítipo *myc*. Em verde, sítio para clivagem pela protease fator Xa. A sequência sublinhada representa a região de anelamento dos primers TX36ECOF e Tx36PSTR. Toda a sequência nucleotídica foi confirmada por sequenciamento.

4.5.2 Expressão, purificação e análise da proteína Tx3-6mycHis (vetor pBADmycHis)

O vetor pBADmycHis contém o promotor P_{BAD} , que controla a transcrição dos genes araBAD, responsáveis pelo metabolismo da L-arabinose. O vetor apresenta ainda nucleotídeos que codificam o epitopo *myc* seguido de uma cauda de seis aminoácidos histidina após o sítio múltiplo de clonagem que foram inseridos na porção C-terminal da toxina recombinante. Tanto o epitopo *myc*, quanto a cauda de histidina favorecem a identificação da proteína heteróloga através dos anticorpos anti-*myc* e anti-His. Além disso, a cauda de histidina proporciona a possibilidade de purificação por afinidade.

O plasmídeo recombinante Tx3-6pBADmycHis foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* TOP10 eletrocompetentes. A expressão foi realizada por 4 horas após indução com 0,2% de L-arabinose. Após a expressão, a cultura foi centrifugada e ressuspenso em solução para lise das células (do kit Ni-NTA Purification System - Invitrogen). As células foram incubadas com 1 mg/mL de lisozima e submetidas à sonicação para rompimento da membrana celular e liberação das proteínas. Após o processo de lise, o extrato foi centrifugado novamente para que ocorresse a separação das proteínas solúveis (sobrenadante) das insolúveis (pellet) com os debris celulares. Amostras de cada uma das frações foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e o gel foi corado com solução de Coomassie Blue R-250. Pode-se observar que a toxina recombinante estava presente principalmente no sobrenadante (Figura 22a). A purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. As amostras da purificação foram corridas em gel de poliacrilamida e, após coloração por Coomassie Blue R-250, pôde-se observar que apenas uma parte da toxina recombinante se ligou à resina e foi purificada (Figura 22b).

As amostras eluídas da coluna de afinidade foram submetidas à diálise para a retirada do imidazol presente no tampão de eluição. As amostras dialisadas, foram liofilizadas e ressuspendidas em PBS. Ao final do processo de preparação, foi obtido 0,3 mg de proteína por litro de cultura.

Para testar a identidade da proteína purificada foi realizado um Western blotting utilizando-se anticorpos anti-*myc*-peroxidase. Pode-se observar na figura 22c que a banda de 12,6 kDa foi reconhecida pelo anticorpo.

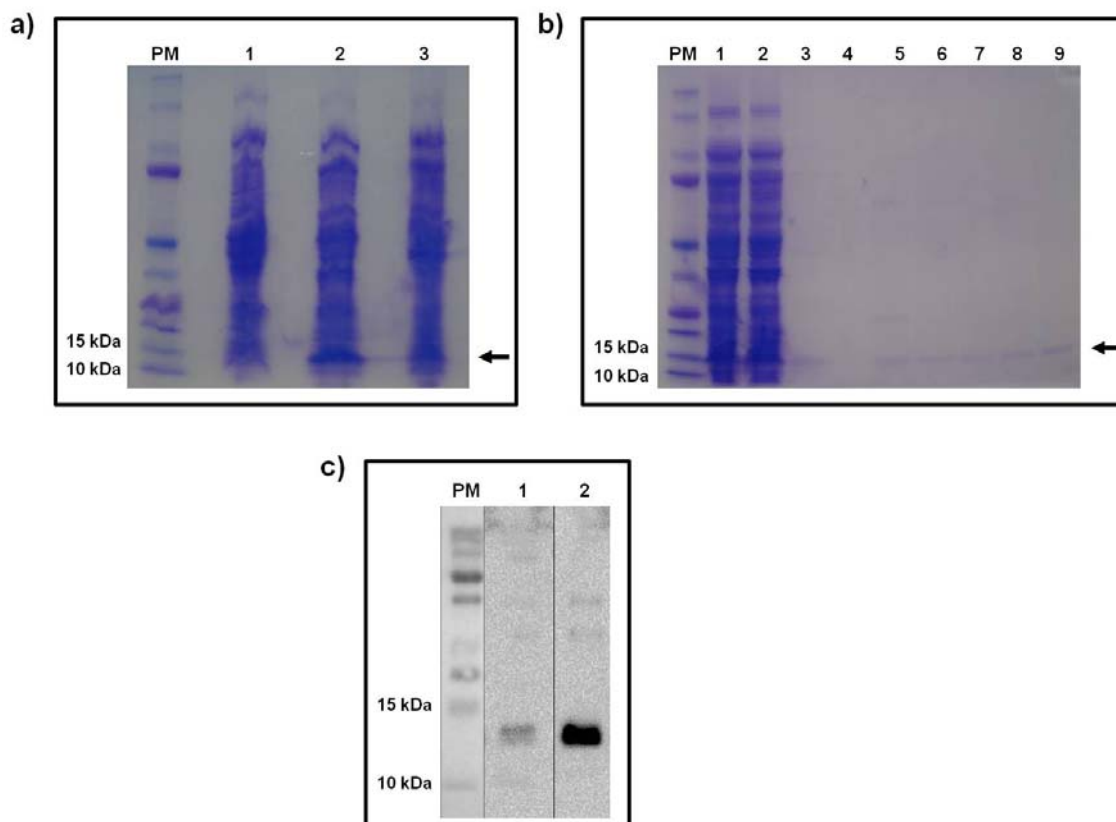


Figura 22: Análise da expressão e purificação da toxina Tx3-6 expressa em *E. coli* (vetor pBADmycHis)

a) SDS-PAGE 4-12% mostrando a solubilidade da toxina recombinante Tx3-6. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus Protein. Coluna 1: Proteínas obtidas no tempo 0 de indução. Coluna 2: Proteínas presentes no sobrenadante após sonicação e centrifugação. Coluna 3: Proteínas presentes no pellet após sonicação e centrifugação. Seta: Proteína de aproximadamente 10,9 kDa expressa. As proteínas foram coradas em solução de Coomassie Blue R-250. **b) SDS-PAGE 4-12% mostrando as etapas de purificação da toxina recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.** PM: Marcador de peso molecular. Coluna 1: Proteínas solúveis. Coluna 2: Proteínas que não se ligaram à resina. Coluna 3: Primeira lavagem da resina. Coluna 4: Segunda lavagem da resina. Colunas 5-9: Eluições 1 a 5 da toxina recombinante (de um total de 10 eluições). Seta: Região de peso molecular aproximado ao da toxina recombinante. As proteínas foram coradas em solução de Coomassie Blue R-250. **c) Identificação da toxina recombinante purificada por cromatografia de afinidade por imunoblot..** PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein. Coluna 1: Extrato bacteriano antes da purificação. Coluna 2: Amostra eluída na purificação por afinidade (após diálise e liofilização). Anticorpo: anti-myc peroxidase (1:1000). A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce).

4.5.3 Teste de atividade da toxina Tx3-6 (vetor pBADmycHis)

A atividade da toxina recombinante Tx3-6 foi avaliada *in vivo* utilizando-se um modelo de dor neurogênica e inflamatória em ratos. Este método, baseado nos procedimentos descritos por Dubuisson e Dennis (1977), é capaz de averiguar a reversão de um processo nociceptivo já instalado.

Para a sua realização, grupos de animais receberam uma injeção intraplantar de formalina no membro posterior direito e foram observados durante 5 minutos. As manifestações de dor tais como: erguer, lambar e sacudir o membro foram cronometradas. Esta primeira fase corresponde à fase neurogênica que ocorre através da estimulação direta de terminações nervosas.

Nove minutos após a injeção de formalina, os grupos foram tratados via intratecal com PBS (veículo), 200 picomoles da toxina Tx3-6 nativa (controle positivo) e 200 picomoles da toxina Tx36mycHis recombinante (teste). Quinze minutos após a injeção da formalina, os animais, já na fase inflamatória da dor, foram observados por mais 15 minutos e as manifestações dolorosas foram cronometradas novamente. Esta corresponde à segunda fase do teste, onde a dor é produzida pela liberação de mediadores inflamatórios. O período de dor foi calculado e o resultado do teste está mostrado na figura 23.

O resultado obtido no teste da formalina mostra que a toxina recombinante apresenta um efeito antinociceptivo semelhante ao da toxina nativa.

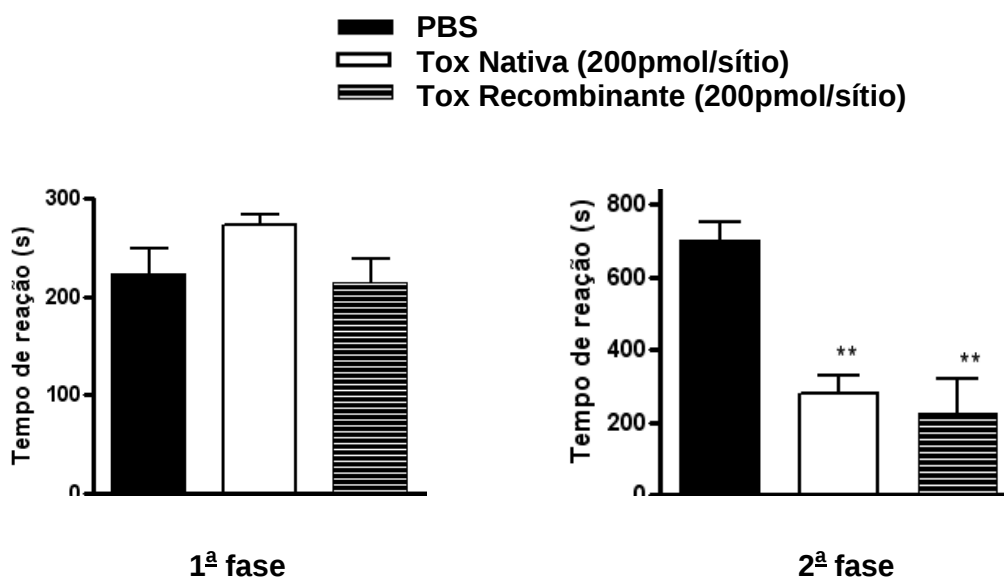


Figura 23: Efeito do tratamento com as toxinas Tx3-6 nativa e recombinante (vetor pBADmycHis) na fase inflamatória do teste da formalina em ratos. O tempo de reação corresponde em segundos ao período de manifestação de dor. N=3-5 por grupo; * $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo Student-Newman-Keuls test). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 3.0.

4.6 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-6 em *E. coli* ORIGAMI (vetor pE-SUMO)

4.6.1 Clonagem

Utilizando os primers TX36SUMOF e TX36SUMOR, foi obtido o fragmento de 187 pb que codifica a toxina Tx3-6 através da técnica de PCR. Após a PCR, o DNA purificado foi digerido com as enzimas de restrição *Bsa* I e *Xba* I e clonado no vetor pE-SUMO através de ligação utilizando-se a enzima T4 ligase. Bactérias DH5 α eletrocompetentes foram transformadas com 5 ng do plasmídeo recombinante Tx3-6pE-SUMO e as colônias que receberam o plasmídeo foram selecionadas através de PCR de colônias.

O sequenciamento do plasmídeo recombinante mostrou que a sequência e o posicionamento do inserto no vetor estavam corretos. O plasmídeo Tx3-6pE-SUMO codifica uma proteína de aproximadamente 24 kDa que contém a sequência da toxina Tx3-6 ligada a proteína Smt3 de levedura e a uma cauda de 6 histidinas na sua porção N-terminal (Figura 24b).

4.6.2 Expressão e purificação da toxina Tx3-6 (vetor pE-SUMO)

O plasmídeo recombinante Tx3-6pE-SUMO foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* ORIGAMI pGro7 eletrocompetentes e a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,6 mM de IPTG a 18° C por 18 horas (Figura 25a). A cultura foi centrifugada e mantida a -80° C para posterior purificação.

Após a lise das bactérias no French Press, o lisado foi centrifugado e o sobrenadante purificado através de cromatografia de afinidade em resina de níquel (Figura 25b). O rendimento nessa etapa foi de 6 mg de proteína por litro de cultura. As proteínas eluídas foram dialisadas e digeridas pela enzima SUMO protease I para clivagem da cauda. A digestão foi analisada por SDS-PAGE como pode ser observado na figura 26a. Na amostra digerida, foram observadas 3 bandas que correspondem à protease (26 kDa), à cauda de fusão (18 kDa) e à toxina Tx3-6 madura (10 kDa). Após a digestão, a protease e a cauda His-SUMO foram separadas da toxina recombinante por fase reversa em coluna Vydac C8 (Figura 26b), de onde foram eluídos 2 picos. O primeiro pico, foi eluído após 33 minutos de

retenção e o segundo, após 38 minutos. As eluições foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida seguida por coloração por Comassie blue (Figura 26c). Pode-se observar no gel que o primeiro pico apresentou uma banda de cerca de 10 kDa que corresponde à toxina Tx3-6 madura e o segundo pico apresentou uma banda de 18 kDa que corresponde à cauda 6xHis-SUMO. A toxina Tx3-6 recombinante foi liofilizada para utilização posterior. O rendimento final foi de 2 mg de proteína por litro de cultura.

4.6.2.1 Dicroísmo circular

A estrutura secundária da toxina Tx3-6 recombinante foi comparada com a estrutura da toxina nativa através de espectroscopia de dicroísmo circular (DC) na região espectral distante do ultravioleta (190-260 nm). Na figura 27 podemos observar o espectro obtido das duas toxinas.

Análises feitas utilizando-se o software K2d indicaram a presença predominante de enovelamento randômico seguido de folhas- β para ambas, porém, a toxina recombinante visivelmente não está enovelada da forma correta, apresentando um espectro totalmente diferente da toxina nativa.

4.6.2.2 Liberação de glutamato

Para testarmos se a toxina recombinante apresentava alguma atividade, utilizamos o teste do glutamato. O resultado do teste comprovou que a toxina recombinante foi expressa apresentando um enovelamento incorreto. Duas concentrações da toxina Tx3-6 recombinante foram testadas e nenhuma apresentou efeito bloqueador na liberação de glutamato em sinaptosomas corticais de camundongos despolarizados com 33 mM de KCl (Figura 28).

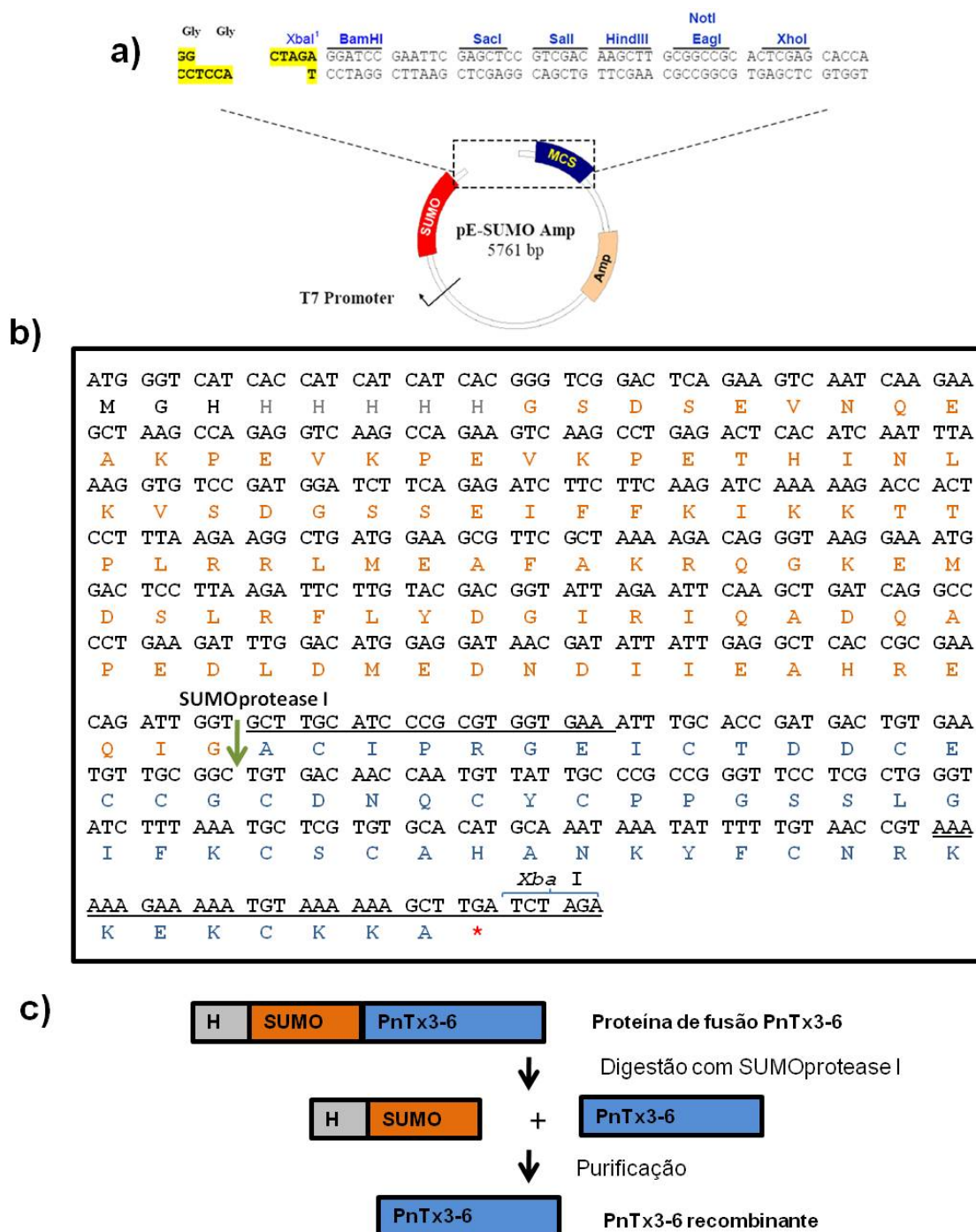


Figura 24: Construção Tx3-6pESUMO. a) Mapa do vetor pESUMO. b) Representação da sequência codificadora para a toxina Tx3-6 e sua sequência de aminoácidos expressa no vetor pESUMO. c) Esquema representando a proteína de fusão e o potencial produto final deste sistema de expressão. Em azul, sequência da toxina Tx3-6. Em cinza, cauda de histidina. Em alaranjado, sequência da proteína SUMO (Smt3). Seta verde, sítio para clivagem pela protease SUMOprotease I. A sequência sublinhada representa a região de anelamento dos primers TX36SUMOF e Tx36SUMOR. Toda a sequência nucleotídica foi confirmada por sequenciamento.

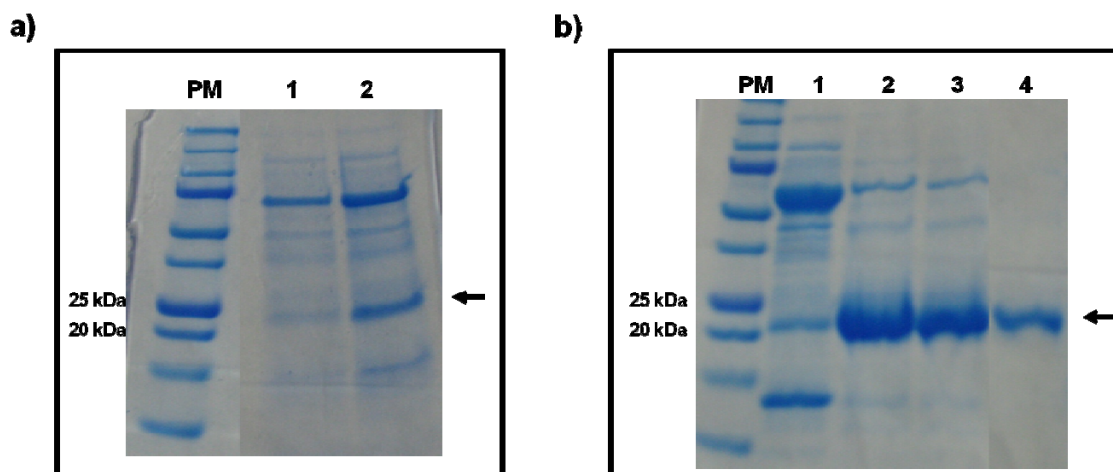


Figura 25: Análise da expressão e purificação da toxina Tx3-6 expressa em *E. coli* (vetor pE-SUMO)

a) SDS-PAGE 4-12% mostrando a expressão da toxina recombinante Tx3-6SUMO. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus Protein. Coluna 1: Extrato bacteriano antes da indução com 0,6 mM IPTG. Coluna 2: Extrato bacteriano após indução com 0,6 mM IPTG. Seta: Proteína de 24 kDa expressa. **b) SDS-PAGE 4-12% mostrando a purificação da toxina recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.** PM: Marcador de peso molecular. Coluna 1: Proteínas que não se ligaram à resina. Colunas 2, 3 e 4: Eluições. Seta: toxina recombinante. As proteínas foram coradas em solução RAPIDStain (Novagen).

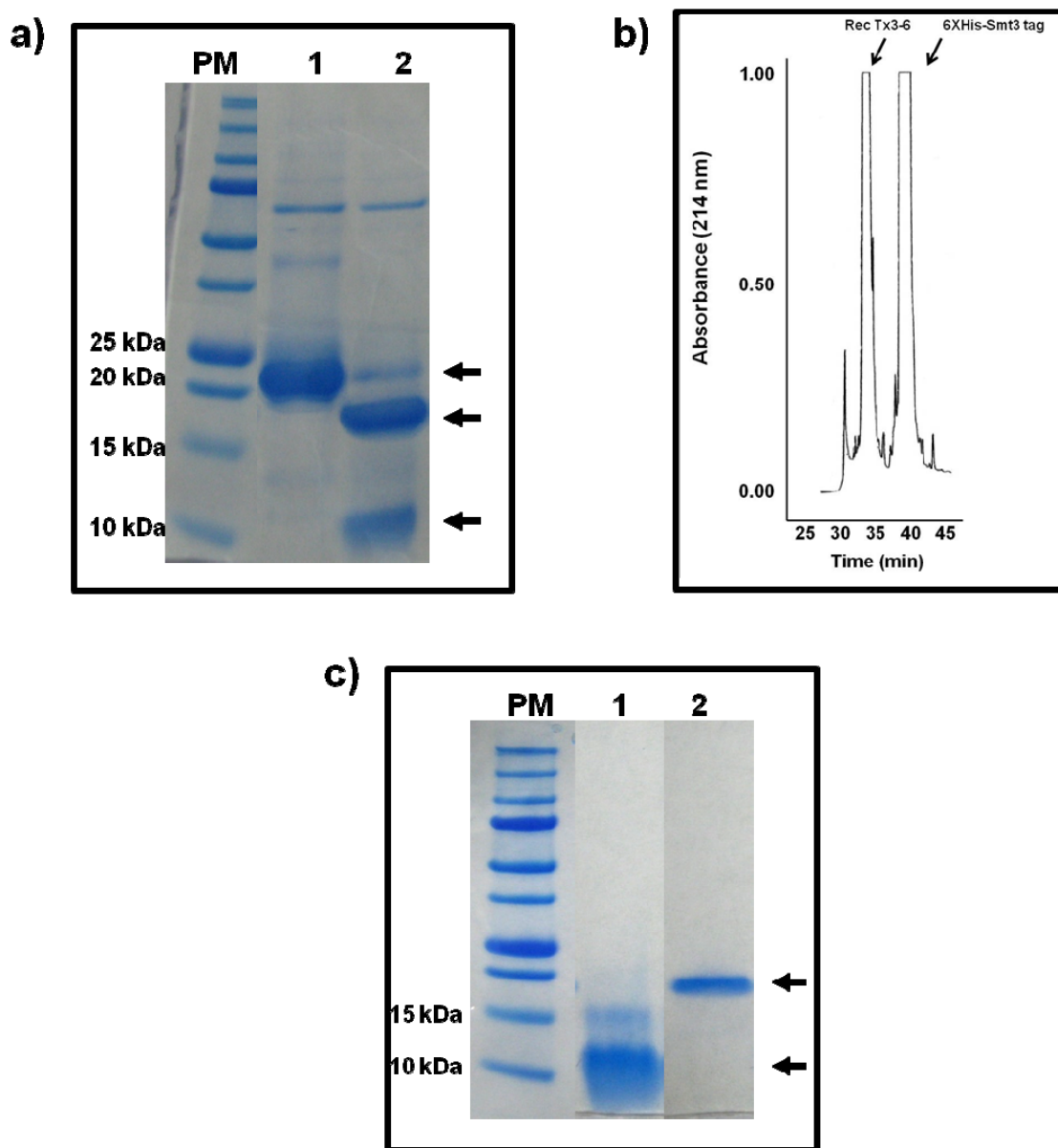


Figura 26: Digestão e purificação da toxina Tx3-6 recombinante. a) **SDS-PAGE 4-12%** mostrando a digestão da toxina recombinante Tx3-6SUMO. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus. Coluna 1: Tx3-6SUMO sem digestão. Coluna 2: Tx3-6SUMO digerida. b) **Purificação da toxina recombinante Tx3-6.** Após a digestão com a SUMOprotease I (1:100), a toxina recombinante foi purificada por fase reversa em coluna Vydac C8 em um gradiente de 0,1% TFA em acetonitrila. c) **SDS-PAGE 4-20%** dos dois picos eluídos na fase reversa. PM: Marcador de peso molecular. Coluna 1: Toxina Tx3-6 recombinante. Coluna 2: cauda 6xHis-Smt3. O gel foi corado por com o reagente RAPIDStain (Novagen). As setas indicam as bandas que correspondem à proteína de fusão, à cauda SUMOHis e à toxina madura.

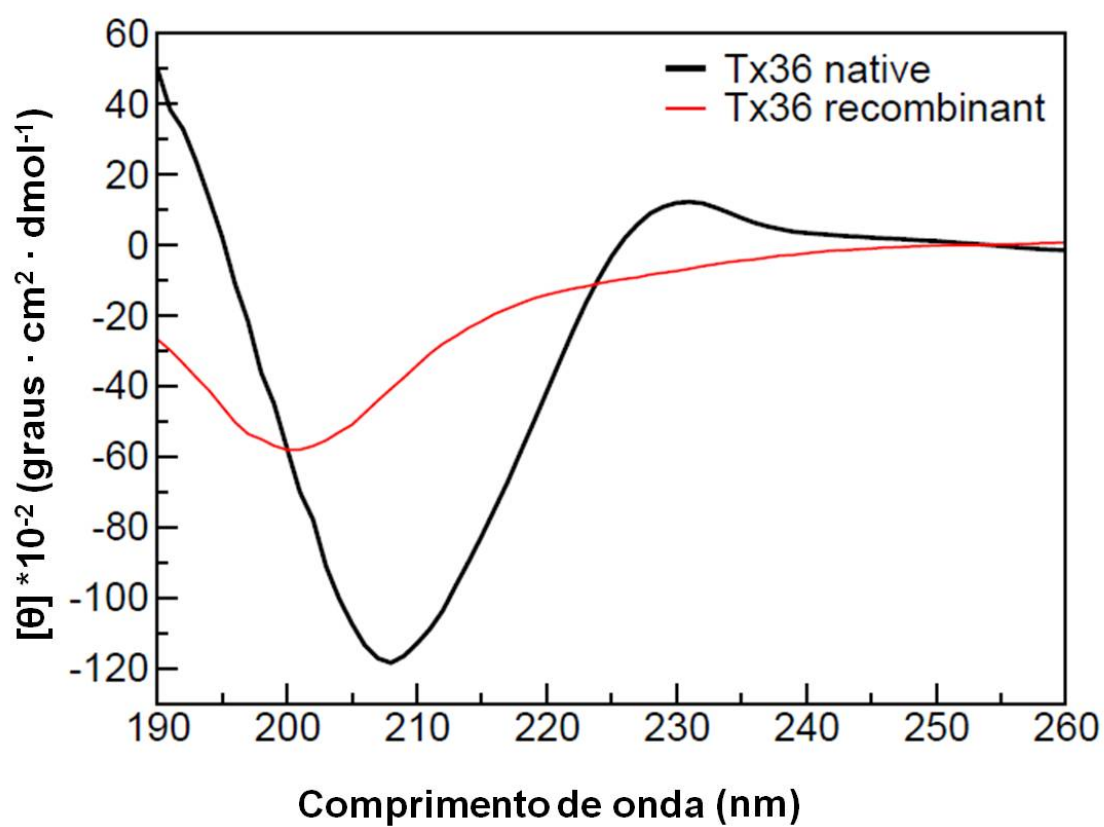


Figura 27: Espectros de dicroísmo circular das toxinas Tx3-6 nativa e recombinante. Os espectros foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco-810. A medição foi realizada na faixa de 195 - 260 nm, a 25°C.

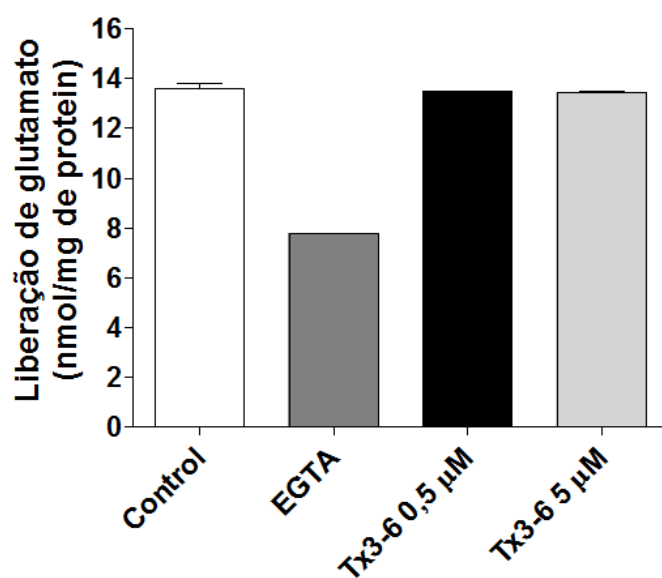


Figura 28: Ensaio biológico da toxina recombinante Tx3-6 expressa em *E. coli* (vetor pE-SUMO). Os sinaptosomas foram incubados por 30 minutos com a toxina recombinante e despolarizados com 33 mM KCl. A liberação de glutamato independente de cálcio foi medida na ausência de Ca^{2+} e na presença de 2 mM EGTA. A toxina recombinante não apresentou efeito de inibição da liberação de glutamato. Os resultados estão mostrados como média $\pm$ EPM.

4.7 Clonagem, expressão e purificação da toxina Tx3-4 em *E. coli* ORIGAMI (vetor pE-SUMO)

4.7.1 Clonagem

Utilizando os primers Tx34SUMOF e Tx34SUMOR, o fragmento de 256 pb que codifica a toxina Tx3-4 foi obtido através da técnica de PCR. Após a PCR, o DNA purificado foi digerido com as enzimas de restrição *Bsa* I e *Xba* I e clonado no vetor pE-SUMO através de ligação utilizando-se a enzima T4 ligase. Bactérias DH5 α eletrocompetentes foram transformadas com 5ng do plasmídeo recombinante Tx3-4pE-SUMO e as colônias que receberam o plasmídeo foram selecionadas através de PCR de colônias.

O sequenciamento do plasmídeo recombinante mostrou que a sequência e o posicionamento do inserto no vetor estavam corretos. O plasmídeo Tx3-4pESUMO codifica uma proteína de aproximadamente 26 kDa que contém a sequência da toxina Tx3-4 ligada à proteína Smt3 de levedura e a uma cauda de 6 histidinas na sua porção N-terminal (Figura 29b e c).

4.7.2 Expressão, purificação e análise da toxina Tx3-4-SUMO

O plasmídeo recombinante Tx3-4pE-SUMO foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* ORIGAMI pGro7 eletrocompetentes e a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,6 mM de IPTG a 18° C por 18 horas. Após a lise das bactérias, o extrato foi centrifugado para separação das proteínas solúveis das insolúveis e amostras de cada fração foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. Foi observado que a toxina recombinante Tx3-4SUMO estava presente nas duas frações (Figura 30) e resolvemos então, purificá-la a partir de ambas.

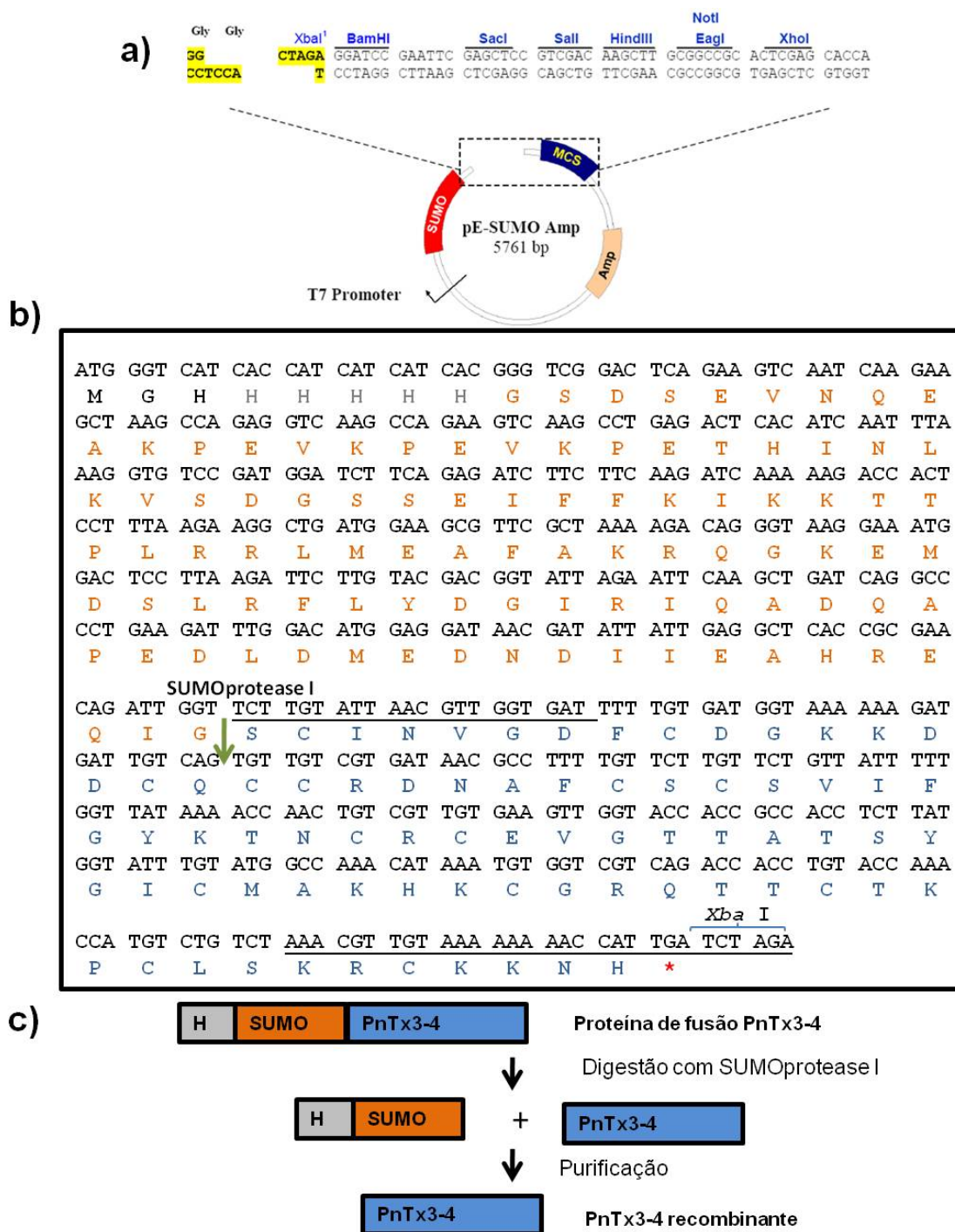


Figura 29: Construção Tx3-4pESUMO. a) Mapa do vetor pESUMO b) Representação da sequência codificadora para a toxina Tx3-4 e sua sequência de aminoácidos expressa no vetor pESUMO. c) Esquema representando a proteína de fusão e o potencial produto final deste sistema de expressão. Em azul, sequência da toxina Tx3-4. Em cinza, cauda de histidina. Em alaranjado, sequência da proteína SUMO (Smt3). Seta verde, sítio para clivagem pela protease SUMOprotease I. A sequência sublinhada representa a região de anelamento dos primers TX34SUMOF e Tx34SUMOR. Toda a sequência nucleotídica foi confirmada por sequenciamento.

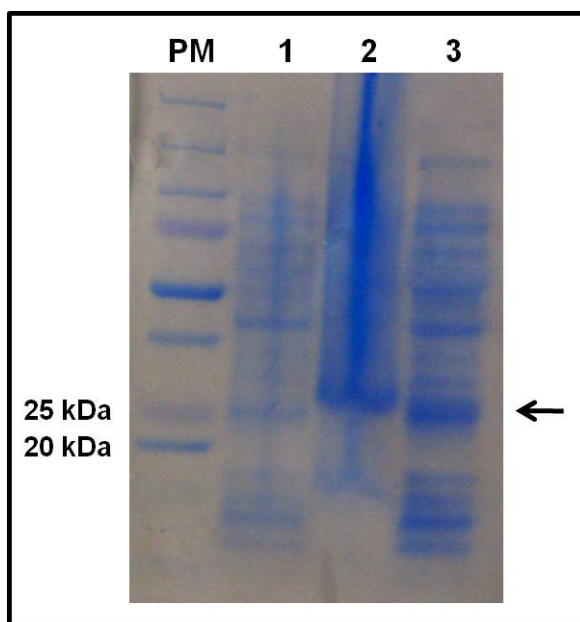


Figura 30: Solubilidade da toxina recombinante Tx3-4SUMO. SDS-PAGE 4-20% mostrando que a toxina foi expressa parcialmente solúvel e parcialmente insolúvel. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus Protein. Coluna 1: Proteínas obtidas no tempo 0 de indução. Coluna 2: Proteínas presentes no pellet após lise das bactérias. Coluna 3: Proteínas presentes no sobrenadante após lise. Seta: Proteína de fusão Tx3-4SUMO. As proteínas foram coradas com o reagente RAPIDstain (Novagen).

4.7.2.1 Purificação sob condições nativas

Após a lise das bactérias no French Press, o lisado foi centrifugado e o sobrenadante purificado através de cromatografia de afinidade em resina de níquel, de onde foram obtidos cerca de 5 mg de proteína de fusão (Figura 31a). As proteínas eluídas foram dialisadas e digeridas pela enzima SUMO protease I para clivagem da cauda N-terminal. A digestão foi analisada por western blot utilizando-se anticorpos anti-veneno total da *P. nigriventer*, que mostraram que a proteína foi expressa na fase de leitura correta (Figura 31b).

Tanto a proteína SUMO (parte da proteína recombinante; ver figura 29), quanto a SUMOprotease I (enzima utilizada para separar a cauda (His-SUMO) da proteína expressa (Tx3-4), contém uma cauda de histidina para facilitar sua separação da toxina recombinante após a clivagem da cauda. Esperava-se que, uma vez realizada a digestão, a cauda e a protease possam ser purificadas usando-se a resina de níquel e que a proteína Tx3-4 seja eluída. Entretanto, quando tentamos esse processo de purificação após a digestão, a toxina Tx3-4 madura permaneceu ligada à resina mesmo após uma lavagem com imidazol, sugerindo uma forte ligação inespecífica com a resina (Figura 32).

Portanto, para conseguir purificar a toxina Tx3-4 madura tivemos que utilizar separação em fase reversa em coluna Vydac C8 (Figura 33a). As eluições foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida seguida por coloração por prata (Figura 33b) que nos mostrou que a toxina Tx3-4 recombinante foi totalmente purificada, eluindo após 30 minutos de retenção. O rendimento de toxina Tx3-4 solúvel expressa neste sistema foi de cerca de 0,8 mg de proteína (Tabela 8). Após a obtenção da toxina pura, sua atividade biológica foi testada.

4.7.2.1.1 Medição de cálcio intrasinaptosomal

A medida de cálcio intrasinaptosomal é feita utilizando-se o marcador fluorescente de cálcio Fura2-AM. O Fura2-AM atravessa membranas celulares e, uma vez dentro das células, o grupamento acetoximetil é removido por esterases celulares, deixando o Fura2 livre. Na presença de Fura2, o aumento de cálcio no citoplasma devido à despolarização da membrana, causa um aumento na fluorescência (Romano-Silva, Ribeiro-Santos et al. 1993). Neste teste, sinaptosomas

corticais de camundongos foram marcados com Fura2-AM por 1 hora e despolarizados com 33 mM KCl.

A concentração de cálcio no interior de terminais nervosos aumentou para 77.6 ± 1.9 nM após despolarização com 33 mM de KCl. Toxinas Tx3-4 nativa e recombinante (16 nM) foram incubadas por 6 minutos antes da despolarização dos sinaptossomas e diminuíram o aumento de cálcio para 53.4 ± 1.3 nM e 63.5 ± 1.2 nM, respectivamente. Análise estatística mostrou que ambas as toxinas apresentam um efeito significativo comparadas com o controle ($p < 0.001$) e que o efeito da toxina recombinante foi menor que o da nativa ($p < 0.004$) (Figura 34).

4.7.2.1.2 Liberação de glutamato

A liberação de glutamato ativada pela despolarização de sinaptossomas por 33 mM KCl na presença de Ca^{2+} foi de 12.3 ± 0.3 nmol/mg de proteína. A liberação de glutamato independente de Ca^{2+} foi medida na ausência de Ca^{2+} e presença de 2 mM EGTA e foi de 8.1 ± 0.5 nmol/mg. Toxinas Tx3-4 nativa e recombinante foram adicionadas à suspensão sinaptossomal 30 minutos antes do teste. A liberação de glutamato foi diminuída para 7.9 ± 0.3 nmol/mg pela toxina nativa (16 nM) e para 8.8 ± 0.4 nmol/mg pela toxina recombinante (16 nM) apresentando uma diferença estatística significativa de ambas em relação ao controle ($p < 0.001$) (Figura 35). Apesar da diferença entre as toxinas nativa e recombinante no bloqueio de cálcio, não houve diferença entre ambas no bloqueio da liberação de glutamato ($p < 0.49$). Estes resultados mostram que as toxinas não apresentaram efeito na liberação de glutamato independente de cálcio quando comparadas com o controle EGTA ($p = 0.995$ para a nativa e $p = 0.721$ para a recombinante).

4.7.2.2 Purificação sob condições desnaturantes

A maior parte da toxina recombinante Tx3-4SUMO foi expressa de forma insolúvel e agregou em corpos de inclusão. Os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão contendo 6 M Guanidina-HCl (Figura 36a) e a toxina recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel sob condições desnaturantes, de onde foram obtidos cerca de 20 mg de proteína de fusão (Figura 36b). Após a diálise para troca de tampão, a proteína de fusão foi

digerida pela SUMOprotease I como podemos observar na figura 36b, e separada da cauda através de nova purificação em coluna Vydac C8 - HPLC (Figura 36c). A toxina Tx3-4 eluída foi liofilizada e armazenada a - 20° C para posterior renaturação.

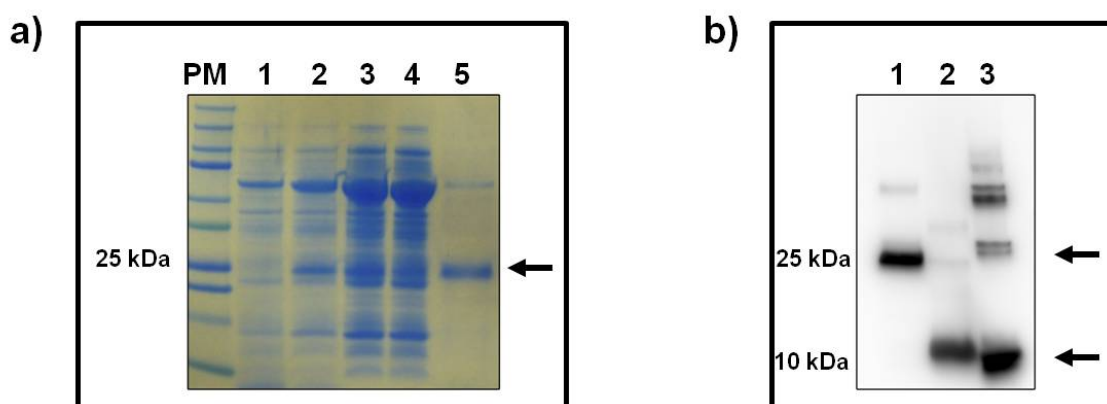


Figura 31: Análise da expressão, purificação e digestão da toxina recombinante Tx3-4SUMO.

a) SDS-PAGE 4-20% mostrando a expressão e os passos de purificação da toxina Tx3-4SUMO por cromatografia de afinidade. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus. Coluna 1: Controle antes da indução com 0,6 mM IPTG. Coluna 2: Após indução com 0,6 mM IPTG. Coluna 3: Proteína solúveis obtidas após lise celular. Coluna 4: Proteínas que não se ligaram à coluna. Coluna 5: Eluição. **b) Análise da digestão e indentificação imunoquímica da proteína Tx3-4SUMO.** Coluna 1: Proteína recombinante Tx3-4SUMO. Coluna 2: Proteína Tx3-4SUMO digerida com a SUMOprotease I. Coluna 3: Veneno total da *P. nigriventer*. Anticorpo: anti-veneno total de *P. nigriventer* (1:1250). A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce).

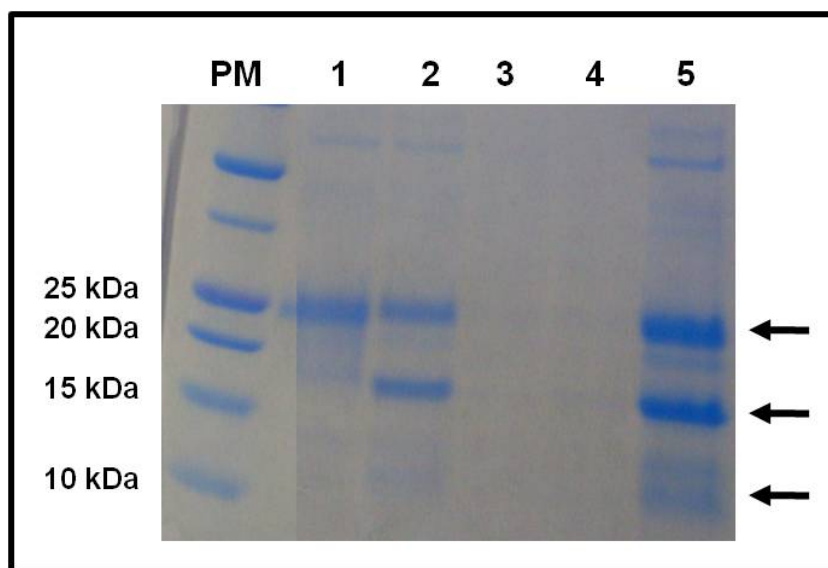


Figura 32: Purificação da toxina Tx3-4 madura após digestão. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus. Coluna 1: Proteína de fusão Tx3-4SUMO. Coluna 2: Digestão da proteína de fusão pela SUMOprotease I. Coluna 3: Sobrenadante após incubação com a resina Ni-NTA agarose. Coluna 4: Sobrenadante após lavagem da resina. Coluna 5: Resina Ni-NTA agarose mostrando que a toxina Tx3-4 digerida se ligou à resina de níquel inespecificamente. Setas indicam as posições das bandas que representam a proteína de fusão, a cauda 6HisSUMO e a toxina Tx3-4 madura. O gel foi corado com a solução RAPIDStain (Novagen).

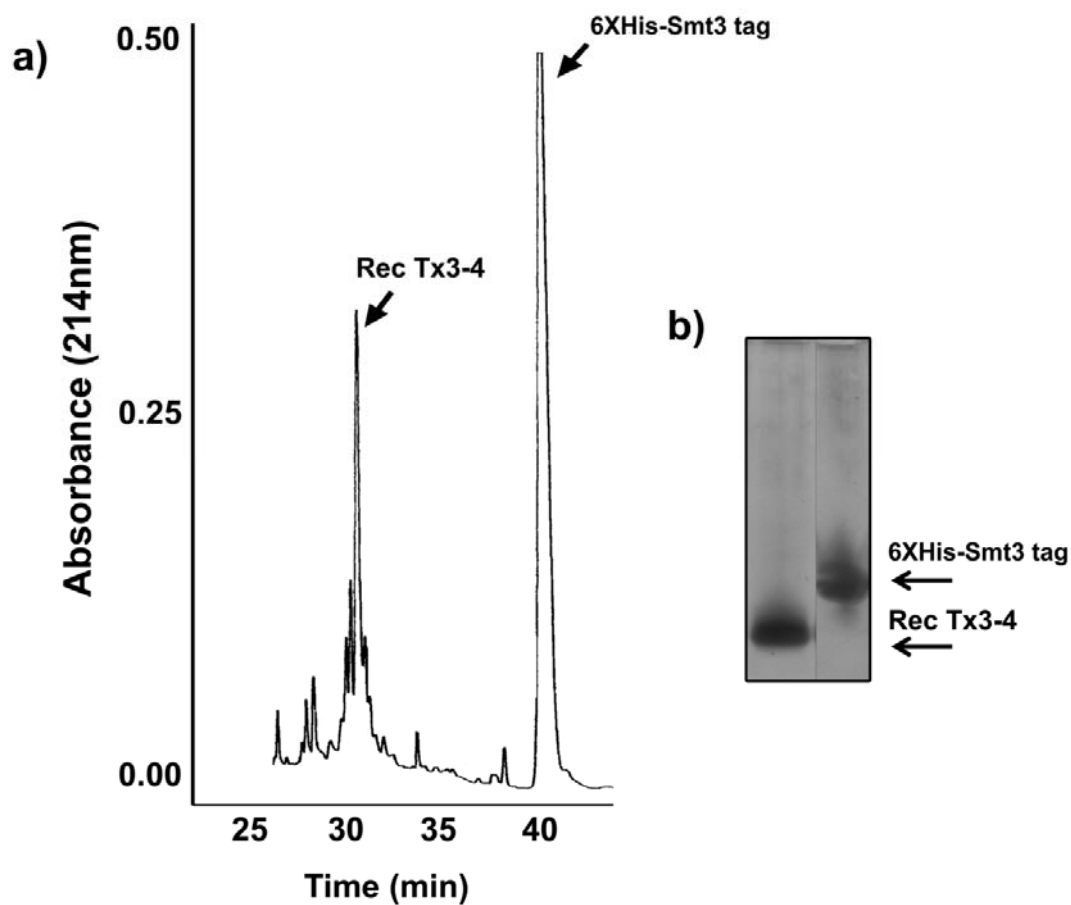


Figura 33: Purificação da toxina recombinante Tx3-4. Após a digestão com a SUMOprotease I (1:100), a toxina recombinante foi purificada por fase reversa em coluna Vydac C8 em um gradiente de 0,1% TFA em acetonitrila. a) Cromatograma obtido na purificação. b) SDS-PAGE 4-20% dos dois picos eluídos na fase reversa. O gel foi corado por prata através do kit Silver Stain Plus (Bio-Rad).

Tabela 8: Purificação da toxina Tx3-4 recombinante solúvel

Fração	Proteína total (por L de cultura)
Extrato solúvel^a	350 mg
Proteína de fusão (Purificação por afinidade)^a	5.3 mg
Digerida e purificada (HPLC)^b	0.5 - 0.8 mg

^a Dosado com o kit D_c Protein assay da Bio-Rad

^b Dosado por absorbância A_{280nm}

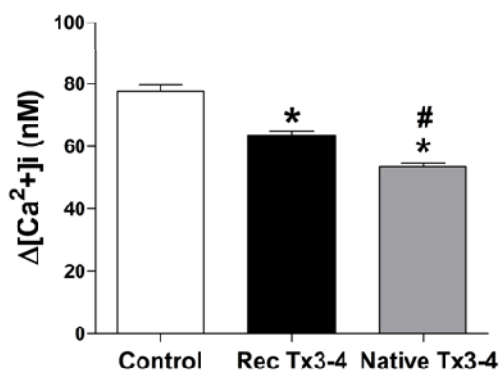


Figura 34: Efeito biológico da toxina recombinante Tx3-4 expressa em *E. coli* (vetor pESUMO) no aumento da concentração de Ca^{2+} intrasinaptosomal. Sinaptosomas foram marcados com fura-2AM e despolarizados com 33 mM KCl após 6 minutos de incubação com as toxinas Tx3-4 nativa e recombinante. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi calculada através de método fluorimétrico e os resultados estão mostrados como média $\pm$ EPM da concentração intrasinaptosomal de cálcio (nM). Ambas as toxinas apresentaram um efeito bloqueador comparadas ao controle e a toxina recombinante apresentou uma inibição menor do que a toxina nativa. ANOVA seguido pelo teste de Tukey foram usados para determinar diferença estatisticamente significativa. * $P < 0.001$, # $P < 0.004$.

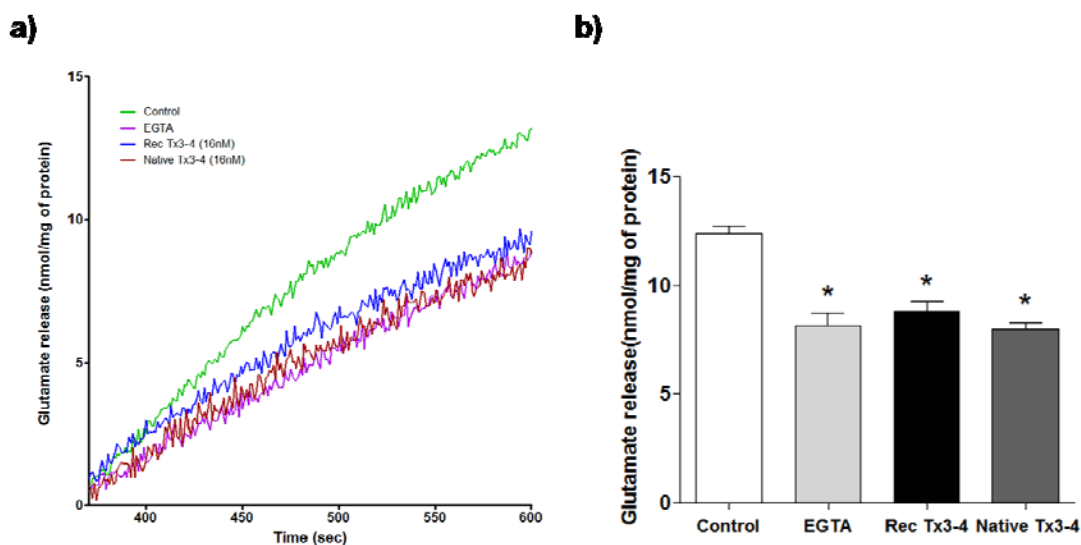


Figura 35: Efeito biológico da toxina recombinante Tx3-4 expressa em *E. coli* (vetor pESUMO) na liberação de glutamato.

a) Os sinaptosomas foram incubados por 30 minutos com as toxinas Tx3-4 nativa e recombinante e despolarizados com 33 mM KCl. A liberação de glutamato independente de cálcio foi medida na ausência de Ca^{2+} e na presença de 2 mM EGTA. A toxina recombinante apresentou o mesmo efeito de inibição da liberação de glutamato que a toxina nativa. b) Representação em barra. Os resultados estão mostrados como média $\pm$ EPM de liberação de glutamato (nmol/mg de proteína). ANOVA seguido pelo teste de Tukey foram usados para determinar diferença estatisticamente significativa.

* $P < 0.001$.

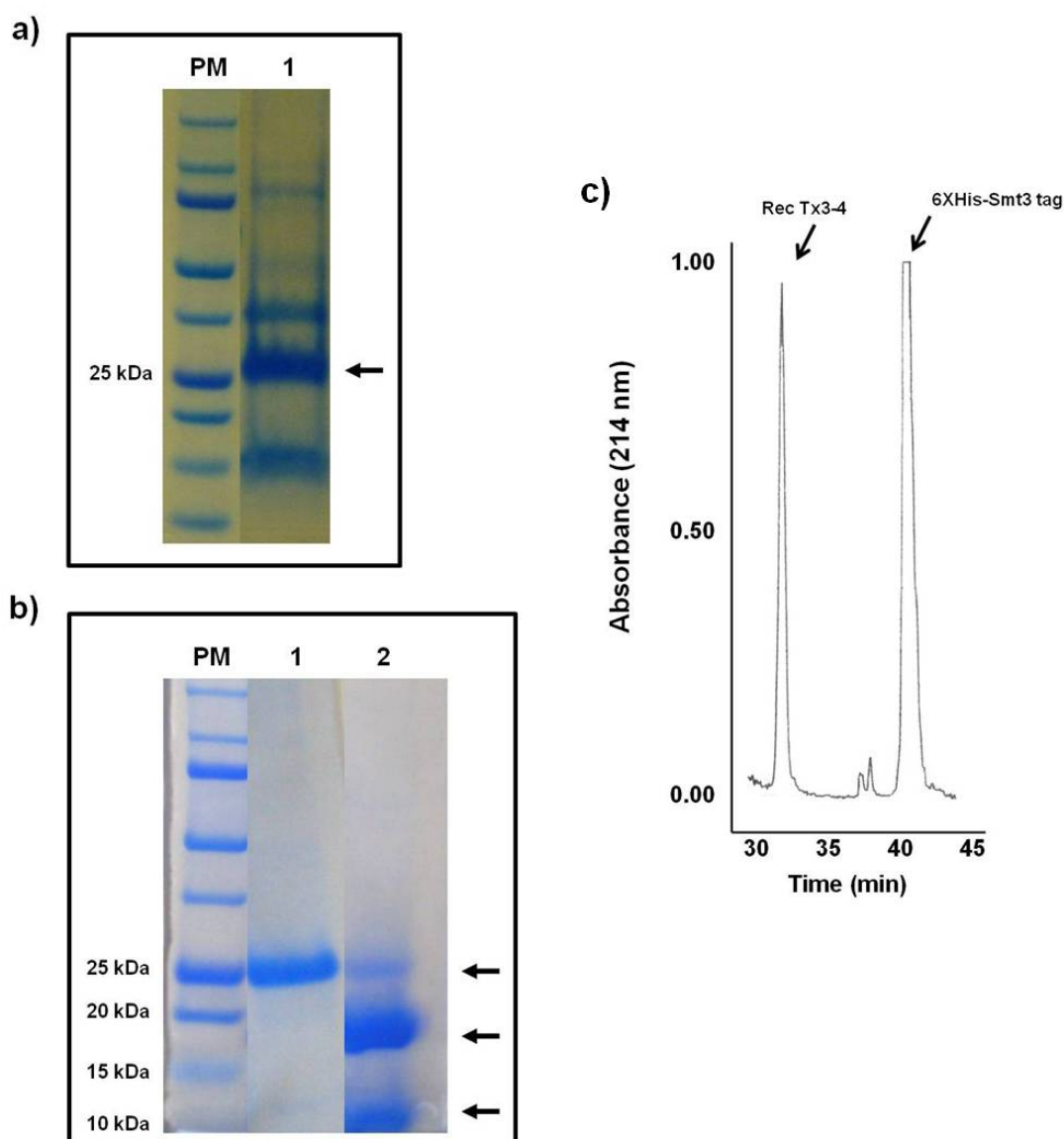


Figura 36: Digestão e purificação da toxina recombinante Tx3-4SUMO obtida sob condições desnaturantes. a) **SDS-PAGE 4-20%** mostrando a solubilização dos corpos de inclusão. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus. Coluna 1: Corpos de inclusão solubilizados em 6 M Guanidina-HCl (seta). b) **SDS-PAGE 4-20%** mostrando a digestão da proteína de fusão **Tx3-4SUMO**. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus. Coluna 1: Tx3-4SUMO eluída na purificação por afinidade. Coluna 2: Tx3-4SUMO digerida pela enzima SUMOprotease I. c) **Purificação da toxina recombinante PnTx3-4.** Após a digestão com a SUMOprotease I (1:100), a toxina recombinante foi purificada por fase reversa em coluna Vydac C8 em um gradiente de 0,1% TFA em acetonitrila.

4.7.2.3 Renaturação e análise da toxina recombinante renaturada

4.7.2.3.1 Experimento piloto de renaturação

A toxina purificada sob condições desnaturantes precisou ser renaturada para assumir a conformação correta da toxina Tx3-4. Primeiramente, foi feito um experimento piloto de renaturação baseando-se no kit de renaturação de proteínas da Thermo Scientific Pierce. O teste piloto testou 9 condições diferentes, que apresentavam uma mudança na concentração de agentes desnaturantes variando de 0-1,4 M de guanidina e 0-0,8 M de L-arginina. Além disso, como o enovelamento de proteínas contendo pontes dissulfeto é dependente do ambiente redox, diferentes níveis e proporções de glutathiona reduzida e oxidada ([GSH]:[GSSG]) foram testados (Tabelas 4 e 5). As reações de renaturação foram realizadas a 4°C por 24 horas. As amostras renaturadas foram submetidas à fase reversa em coluna Vydac C18 para dessalinização, purificação de possíveis agregados e análise do perfil cromatográfico. Os picos obtidos na fase reversa para cada uma das condições testadas foram comparados com o pico da toxina recombinante Tx3-4 purificada de forma solúvel (Figura 37a). Escolhemos testar a atividade biológica das toxinas renaturadas que apresentaram perfis cromatográficos mais semelhantes ao da toxina recombinante funcional, (condições #5-9 Figura 37a). O teste de liberação de glutamato foi utilizado para testar a atividade biológica.

Na figura 37b, pode-se observar o resultado do teste de liberação de glutamato que mostra que apenas uma das condições testadas propiciou o correto enovelamento da toxina Tx3-4. Cerca de 100 nM de toxina recombinante renaturada em cada condição foi testado e apenas a correspondente à condição #5 (Tabelas 6 e 7) bloqueou a liberação de glutamato em cerca de 30%.

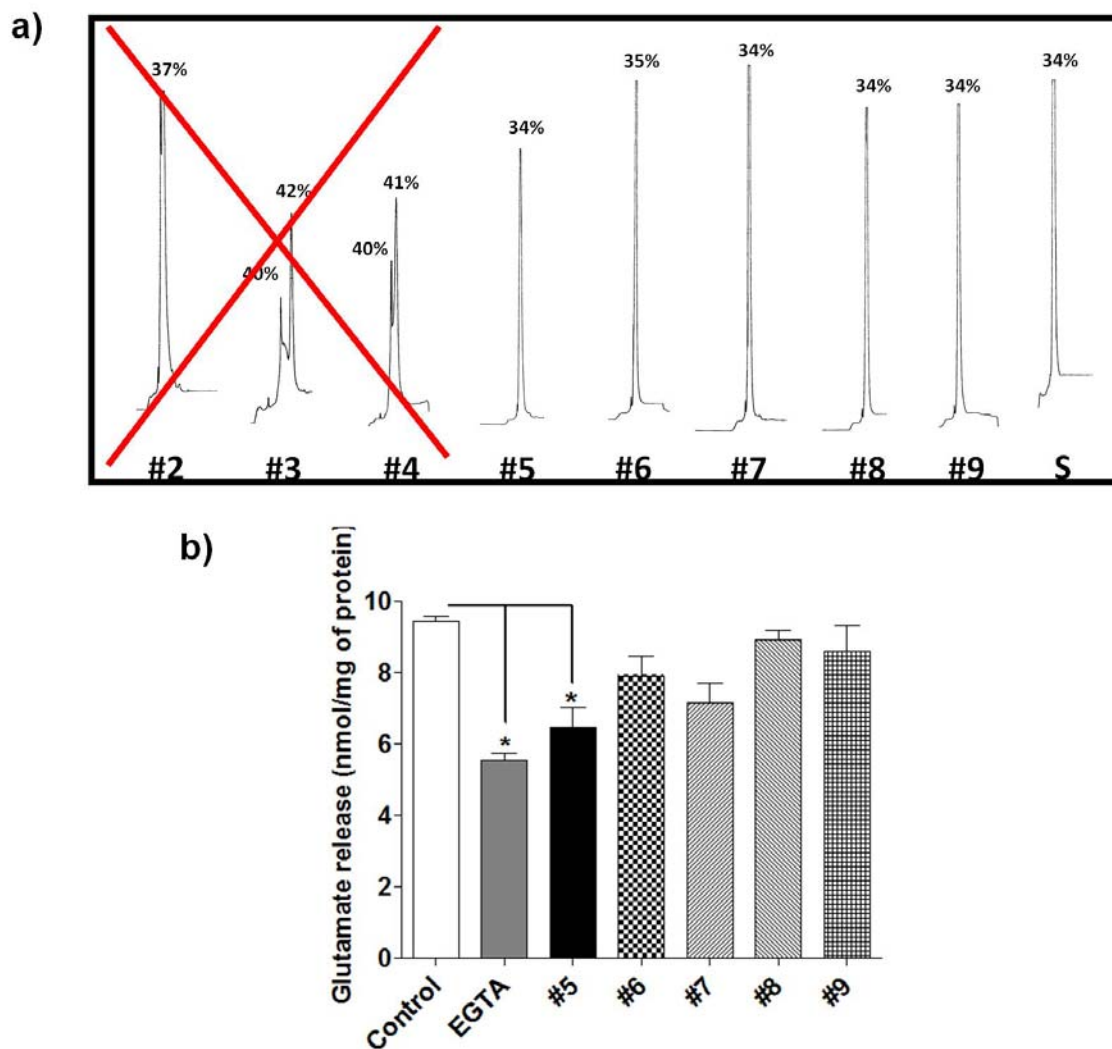


Figura 37: Análise do teste piloto de renaturação. a) Comparação dos picos obtidos na fase reversa das amostras renaturadas. As condições #2, #3 e #4 foram eliminadas por terem eluído em concentrações diferentes de ACN quando comparadas com a toxina solúvel (S). **b) Teste de liberação de glutamato das amostras renaturadas.** Apenas a toxina renaturada sob a condição #5 bloqueou 30% da liberação de glutamato. Os resultados estão mostrados como média $\pm$ EPM de liberação de glutamato (nmol/mg de proteína). Kruskal-Wallis ANOVA em ranks seguido pelo teste de de comparação múltipla de Dunn foram usados para determinar diferença estatística significativa. * $P < 0,05$.

4.7.2.3.2 Renaturação da toxina recombinante Tx3-4

O teste piloto mostrou que a condição #5 foi a melhor para a renaturação da toxina Tx3-4 recombinante. Nesta condição, a toxina desnaturada e reduzida foi renaturada através de diluição em tampão contendo 0,55 M guanidina e 0,44 M L-arginina e um ambiente redox formado pela proporção de 1 mM GSH : 1 mM GSSG. Os experimentos em maior escala foram, portanto, realizados nas mesmas condições.

A toxina Tx3-4 pura e liofilizada foi ressuspensa em tampão desnaturante contendo 6 M guanidina e teve suas pontes dissulfeto reduzidas com 10 mM DTT. Após a remoção do DTT, a toxina foi diluída no tampão de renaturação #5 em pequenas alíquotas de cada vez, afim de se minimizar a formação de agregados. A reação de renaturação foi conduzida a 4°C, por 24 horas. A diferença dos perfis cromatográficos entre a toxina desnaturada e reduzida e a toxina renaturada foi analisada através de fase reversa em coluna Vydac C18 como podemos observar na figura 38. A toxina desnaturada e reduzida, por apresentar uma conformação aberta e sem pontes dissulfeto, se liga mais fortemente à coluna e foi eluída em 40% de 0,1%TFA em acetonitrila, enquanto a toxina renaturada eluiu em 34% de 0,1%TFA em acetonitrila, indicando uma mudança na conformação. Após todos os processos de purificação e renaturação, foram obtidos cerca de 2 mg de toxina recombinante por litro de cultura (Tabela 9).

A atividade biológica da proteína renaturada foi testada em sinaptosomas corticais de camungos através da medição da liberação de glutamato.

4.7.2.3.3 Liberação de glutamato

A liberação controle de glutamato em sinaptosomas despolarizados com 33 mM KCl foi de $14,8 \pm 0,7$ nmol/mg de proteína. A liberação de glutamato independente de Ca^{2+} foi de $8,4 \pm 0,5$ nmol/mg. A toxina Tx3-4 renaturada nas concentrações de 0.036, 0.36 and 1.44 μM diminuiu essa liberação para $13,1 \pm 1,2$, $10,7 \pm 0,4$ and $9,3 \pm 1,0$ nmol/mg, respectivamente, mostrando uma inibição de 11,4, 27,7 and 37,1% (Figura 39).

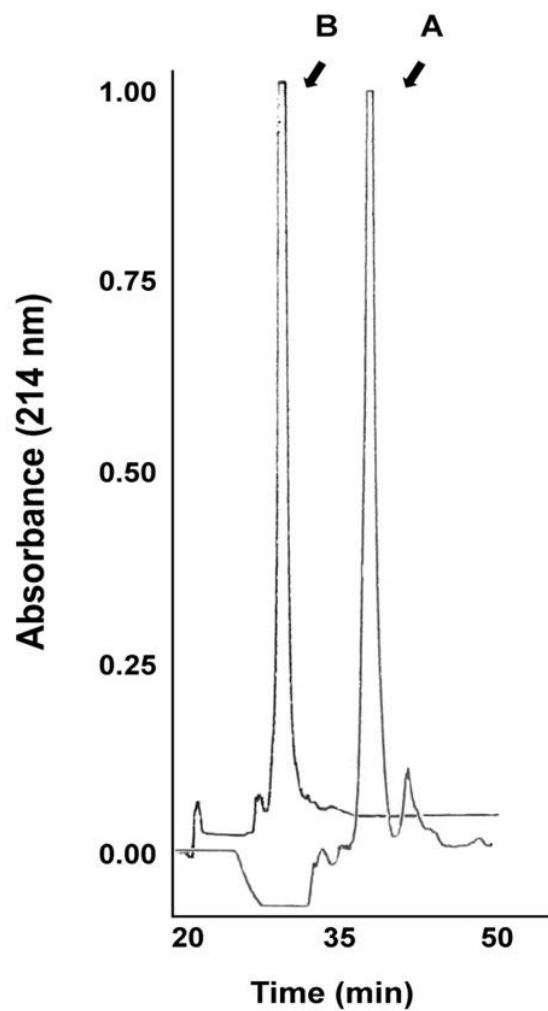


Figura 38: Renaturação da toxina recombinante Tx3-4 expressa em *E. coli* (vetor pE-SUMO).

A toxina Tx3-4 reduzida foi renaturada por diluição na presença de 1 mM de glutathione reduzida (GSH) e 1 mM de glutathione oxidada (GSSG). Os perfis cromatográficos da toxina antes e depois da renaturação foram obtidos por fase reversa em coluna Vydac C18. A: Tx3-4 desnaturada e reduzida. B: Tx3-4 renaturada.

Tabela 9: Purificação da toxina Tx3-4 recombinante dos corpos de inclusão

Fração	Proteína total (por L de cultura)
Massa do extrato de Gnd-HCl^a	580 mg
Proteína de fusão (Purificação por afinidade)^b	19.5 mg
Digerida e purificada (HPLC)^c	3.0 mg
Renaturada^c	1.5 - 2.0 mg

^a Calculado pela diferença entre o pellet obtido após lise e o pellet após extração com 6 M Guanidina-HCl

^b Dosado com o kit D_c Protein assay da Bio-Rad

^c Dosado por absorbância A_{280nm}

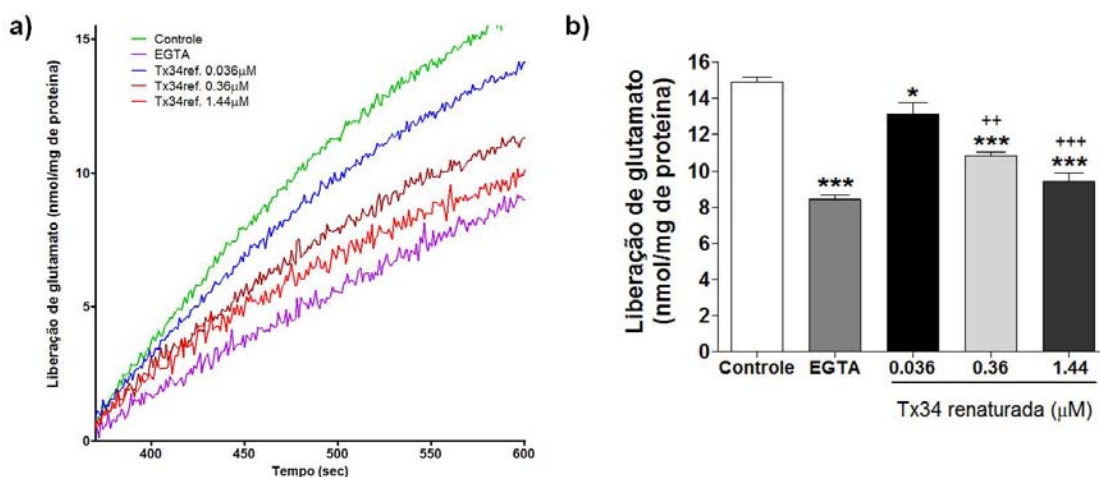


Figura 39: Efeito biológico da toxina recombinante renaturada Tx3-4 expressa em *E. coli* (vetor pESUMO) na liberação de glutamato.

a) Os sinaptosomas foram incubados por 30 minutos com diferentes concentrações da toxina Tx3-4 renaturada e despolarizados com 33 mM KCl. A liberação de glutamato independente de cálcio foi medida na ausência de Ca^{2+} e na presença de 2 mM EGTA. A toxina renaturada apresentou efeito inibitório dose-dependente, chegando a bloquear cerca de 37% a liberação de glutamato na concentração de 1,44 μM . **b) Representação em barra.** Os resultados estão mostrados como média $\pm$ EPM de liberação de glutamato (nmol/mg de proteína). ANOVA seguido pelo teste de Tukey foram usados para determinar diferença estatística significativa. * $P < 0,05$, ++ $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, * representa nível de significância quando comparado ao controle. + representa nível de significância quando comparado a 0,036 μM da toxina renaturada.

4.7.2.3.4 Dicroísmo circular

A estrutura secundária da toxina Tx3-4 renaturada foi investigada por espectroscopia de dicroísmo circular (DC) na região espectral do ultravioleta (195-260 nm). Na figura 40 podemos observar o espectro obtido da toxina recombinante Tx3-4 renaturada.

Análise feita pelo software K2d indicou que a estrutura predominante na molécula é de enovelamento randômico, mas indicou a presença de estruturas de α -hélice e, em menor quantidade, folhas- β .

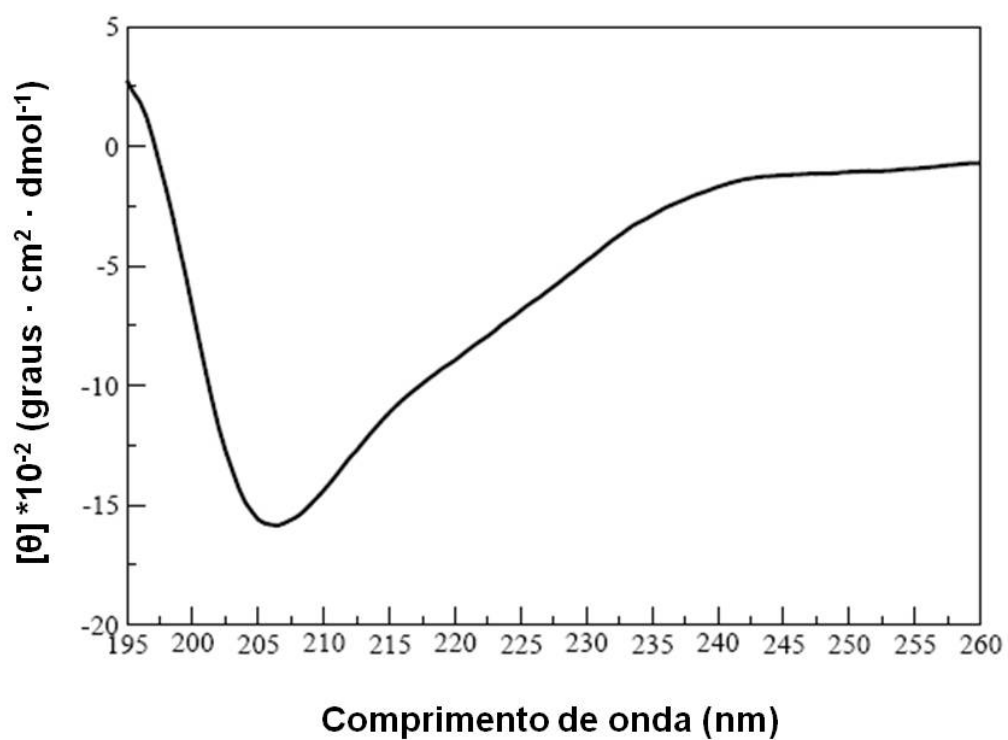


Figura 40: Espectro de dicroísmo circular da toxina Tx3-4 renaturada. O espectro foi obtido em um espectropolarímetro Jasco-810. A medição foi realizada na faixa de 195 - 260 nm, a 25°C.

4.8 Expressão da toxina Tx3-4SUMO em meio restritivo M9

Na tentativa de obtermos a toxina Tx3-4 marcada isotopicamente para análises estruturais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, nós tentamos padronizar a expressão da toxina Tx3-4 no vetor pE-SUMO em bactéria *E. coli* ORIGAMI. A expressão foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida seguida por coloração pelo reagente RAPIDstain. A figura 41a corresponde ao gel da expressão e não foi possível visualizar a banda da proteína recombinante na faixa de massa molecular esperada (26 kDa). Para termos certeza se a toxina estava sendo expressa nós fizemos um western blot e utilizamos como controle a expressão da Tx3-4SUMO em ORIGAMI em meio LB (Figura 41b). Nós podemos observar que anticorpos anti-veneno total da *P. nigriventer* reconheceram a banda de expressão apenas na amostra de expressão em LB indicando que a toxina não estava sendo expressa em meio restritivo M9. Nós tentamos diferentes condições de expressão alterando a temperatura, DO de indução, troca de meio gradual e concentração de IPTG e em nenhuma tentativa nós conseguimos expressar a Tx3-4SUMO em ORIGAMI em meio M9 (dados não mostrados). Nós resolvemos testar ao mesmo tempo a expressão da Tx3-4SUMO em *E. coli* BL21 (DE3) em meio M9 e meio LB e fizemos um western blot comparando com a expressão em ambos os meios utilizando a bactéria ORIGAMI. Na figura 41c, nós podemos observar que a toxina não foi expressa apenas na bactéria ORIGAMI em meio M9, mostrando uma incompatibilidade na expressão da toxina Tx3-4SUMO utilizando-se esta bactéria e o meio restritivo M9. Apesar de a toxina ter sido expressa em M9 utilizando-se a bactéria BL21 (DE3), nós não pudemos utilizá-la para análises estruturais porque a toxina expressa nesta linhagem de bactéria não é funcional e melhores condições de renaturação devem ser obtidas para a obtenção de quantidades suficientes de toxina para RMN.

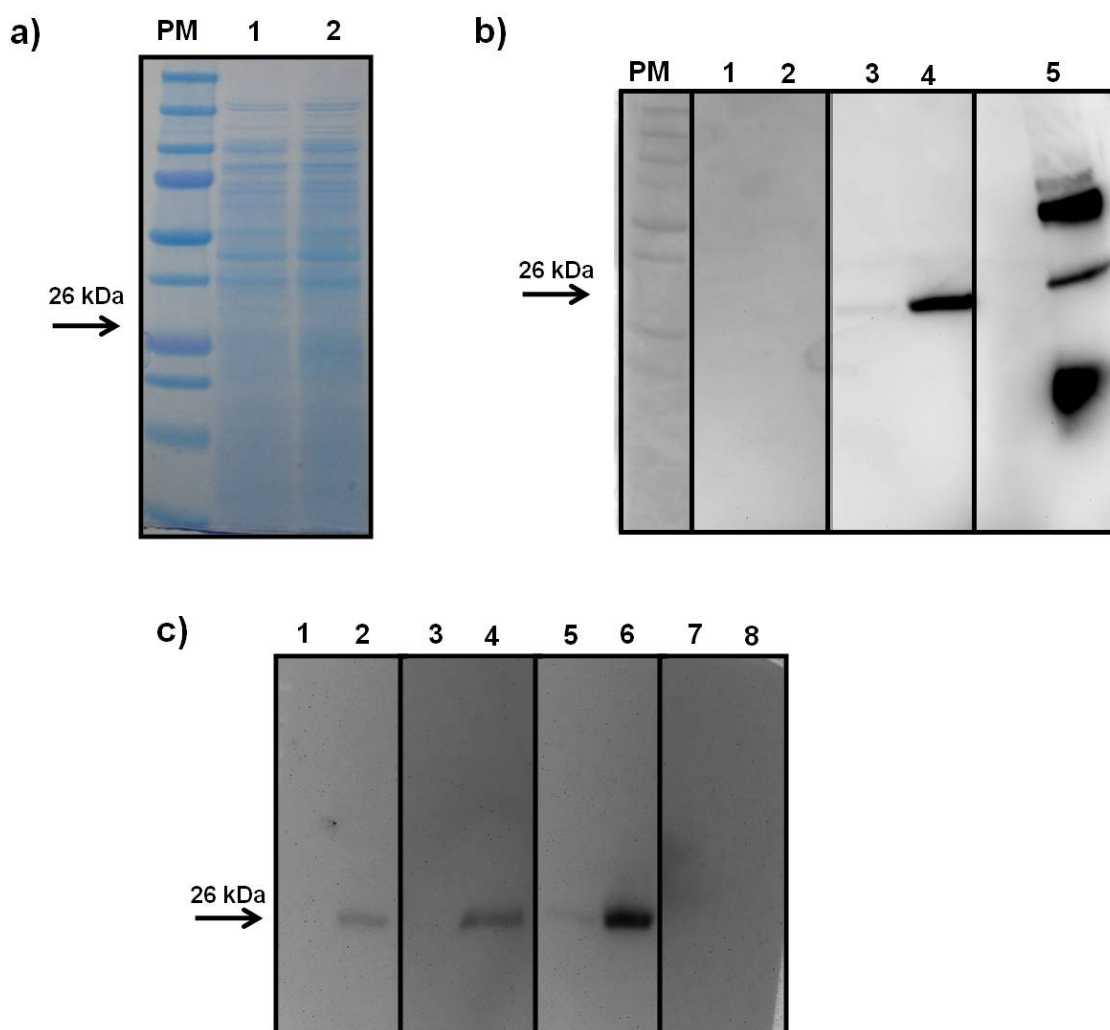


Figura 41: Expressão da toxina Tx3-4SUMO em meio restritivo M9. a) SDS-PAGE 4-20% da expressão da toxina Tx3-4SUMO em ORIGAMI em M9. PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus. Coluna 1: Controle antes da indução da expressão com IPTG. Coluna 2: Após indução com IPTG. **b) Imunoblot comparando a expressão da toxina Tx3-4SUMO (ORIGAMI) em meio M9 e LB.** PM: Marcador de peso molecular Dual color Precision Plus. Coluna 1: Pré-indução em meio M9. Coluna 2: pós-indução em meio M9. Coluna 3: Pré-indução em meio LB. Coluna 4: pós-indução em meio LB. Coluna 5: Veneno total. **c) Imunoblot comparando a expressão da toxina Tx3-4SUMO em bactérias ORIGAMI e BL21 (DE3) e em meios M9 e LB.** Coluna 1: Pré-indução em BL21 (DE3) / LB. Coluna 2: Pós-indução em BL21 (DE3) / LB. Coluna 3: Pré-indução em BL21 (DE3) / M9. Coluna 4: Pós-indução em BL21 (DE3) / M9. Coluna 5: Pré-indução em ORIGAMI / LB. Coluna 6: Pós-indução em ORIGAMI / LB. Coluna 7: Pré-indução em ORIGAMI / M9. Coluna 8: Pós-indução em ORIGAMI / M9. Anticorpo: anti-veneno total de *P. nigriventer* (1:1250). A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL Western Blotting Substrate (Pierce).

5 DISCUSSÃO

Toxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* despertaram um grande interesse científico nas últimas décadas devido ao seu potencial farmacológico. As toxinas Tx3-6 e Tx3-4, isoladas da fração PhTx3, são potentes bloqueadoras de canais de cálcio sensíveis a voltagem, principalmente dos tipos N, P/Q e R (Prado, Guatimosim et al. 1996; Guatimosim, Romano-Silva et al. 1997; Vieira, Kushmerick et al. 2005). Devido a sua ação de inibição do influxo de cálcio e bloqueio da liberação do neurotransmissor glutamato, estas toxinas foram testadas como potenciais agentes terapêuticos no tratamento da dor e na neuroproteção. A Tx3-6 apresentou um efeito analgésico em modelos de dor aguda e persistente, enquanto a Tx3-4 se mostrou eficaz prevenindo a morte celular após lesão isquêmica em fatias de hipocampo (Souza, Ferreira et al. 2008; Pinheiro, da Silva et al. 2009).

A obtenção destes peptídeos diretamente do veneno é um processo caro, dispendioso e pouco produtivo. Segundo Cordeiro e colaboradores (1993), partindo-se de 678 mg de veneno, o rendimento de purificação das toxinas após fase reversa e troca iônica (HPLC) foi de 683 µg para a Tx3-6 e de 665 µg para a Tx3-4. Como cada aranha produz em torno de 1,25 mg de veneno por extração (Lucas 1988), para a obtenção de 1 mg de cada uma das toxinas, seria necessário extrair o veneno de mais de 1.000 aranhas.

Essa dificuldade em se obter grandes quantidades destes peptídeos é um grande obstáculo na continuidade de testes farmacológicos e estruturais que levariam ao desenvolvimento de novas drogas. O avanço da tecnologia do DNA recombinante nas últimas décadas tornou possível a produção de proteínas em grandes quantidades. A clonagem gênica em vetores de expressão possibilita a inserção de genes exógenos em células de bactérias, leveduras, insetos e mamíferos, fazendo com que estes organismos produzam proteínas de interesse em quantidades praticamente ilimitadas (Alberts 2002; Brown 2003).

Este trabalho teve, portanto, o objetivo de estabelecer as melhores condições para obtenção de grandes quantidades das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 funcionais através da expressão destas toxinas recombinantes em sistemas heterólogos.

5.1 Expressão em *Pichia pastoris* (vetor pPICZ)

O primeiro hospedeiro utilizado na tentativa de obtermos a toxina Tx3-6 funcional foi a levedura *Pichia pastoris*. A nossa escolha se deveu ao fato de a *Pichia*, por se tratar de um organismo eucarioto, apresentar algumas vantagens em relação à utilização de bactérias como hospedeiro como, por exemplo, a disponibilidade de um ambiente mais propício a modificações pós-traducionais, que incluem enovelamento, glicosilação e metilação (Li, Anumanthan et al. 2007). O vetor pPICZ possui o promotor P_{AOX1} , que regula a produção da enzima álcool oxidase, responsável por guiar a expressão da proteína heteróloga em *Pichia*. Este vetor havia sido utilizado com sucesso na superexpressão de algumas toxinas de aranha, como a toxina GsMTx4 da tarântula *Grammostola spatulata* (Park, Kim et al. 2008) e a Huwentoxina 1 da aranha *Selenocosmia huwena* (Nie, Li et al. 2002). Estas toxinas, quando expressas em *Pichia* usando o vetor pPICZ, mostraram-se funcionais e tiveram um alto rendimento (>80 mg/L). Uma grande vantagem do vetor pPICZ é a expressão da proteína recombinante em fusão com uma cauda de aminoácidos histidina, que favorece a purificação da proteína produzida por afinidade em resina de Ni^{2+} .

O rendimento obtido para a expressão da toxina Tx3-6 recombinante em *Pichia* foi muito baixo, sendo que a quantidade de toxina obtida após a expressão em 3 litros de cultura foi tão pequena que só pôde ser detectada através de western blot. Uma das possíveis razões para a baixa expressão da toxina Tx3-6 é o fato de não termos utilizado os códons preferenciais da *P. pastoris* durante a clonagem do cDNA. A expressão do domínio F2 do antígeno ligador de eritrócitos (EBA-175) de *P. falciparum* em *Pichia* não foi detectada quando utilizaram os códons nativos da proteína e a alteração para os códons preferenciais de *Pichia* rendeu uma expressão de 250 mg/L de cultura (Yadava and Ockenhouse 2003). Uma outra possibilidade para o baixo rendimento seria a presença de proteases ativas que degradam proteínas estranhas em leveduras, sendo esta, uma grande desvantagem deste sistema (Daly and Hearn 2005). Algumas linhagens de leveduras livres de proteases já estão disponíveis comercialmente, porém, são menos viáveis, crescem mais devagar e são mais difíceis de se transformar (Cereghino and Cregg 2000).

Apesar do citoplasma de hospedeiros procariotos não apresentarem as melhores condições para modificações pós-traducionais, inúmeras proteínas

eucarióticas apresentando pontes dissulfeto foram expressas com sucesso em *Escherichia coli*, incluindo várias toxinas isoladas do veneno de aranhas (Diniz, Theakston et al. 2006; Xia, Chen et al. 2006; Pi, Liu et al. 2007; Pluzhnikov, Vassilevski et al. 2007; Che, Wang et al. 2009). Devido ao baixo rendimento da expressão de Tx3-6 em leveduras e o fato de bactérias serem hospedeiros mais fáceis de se manipular, nós resolvemos tentar a expressão das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 recombinantes em *E. coli*.

5.2 Expressão em *Escherichia coli*

As bactérias *Escherichia coli* são os hospedeiros mais utilizados para a expressão de proteínas recombinantes. Uma das razões é o fato de serem organismos muito bem conhecidos e de genética bem caracterizada. Além disso, são fáceis de se manipular em laboratório, crescem rapidamente e seu cultivo é relativamente barato (Terpe 2006). Entretanto, as bactérias em geral, não apresentam a maquinaria necessária para modificações do DNA eucariótico (como a retirada dos íntrons na transcrição do mRNA) e nem para as modificações pós-traducionais da proteína codificada (Glick 1994), gerando muitas vezes proteínas inativas ou insolúveis que se agregam em estruturas que chamamos de corpos de inclusão. Algumas estratégias podem ser tomadas para minimizar a formação destes agregados e aumentar a solubilidade da proteína recombinante como, por exemplo, o cultivo a baixas temperaturas, co-expressão de proteínas chaperonas, proteína de fusão hidrofílica, mudança da linhagem do hospedeiro, dentre outras (Terpe 2006). No entanto, a formação de corpos de inclusão em alguns casos pode ser vantajosa, pois os agregados ficam protegidos da degradação proteolítica e não há o risco de a proteína recombinante ser tóxica para o hospedeiro (Misawa and Kumagai 1999).

5.2.1 Vetor pET

O vetor pET é um dos vetores de expressão comerciais mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas e utiliza o sistema da RNA polimerase do bacteriófago T7, sendo seu promotor induzido na presença de IPTG. Este sistema já foi utilizado com sucesso na expressão de diversas proteínas incluindo toxinas de aranhas como a LTx2 da aranha *Lasiodora sp.*, uma toxina dermonecrótica da

aranha *Loxosceles intermedia* e a toxina Tx1 da aranha *Phoneutria nigriventer* (Diniz, Theakston et al. 2006; Appel, da Silveira et al. 2008; Dutra, Sousa et al. 2008).

A variação do “codon usage” entre espécies pode ser a principal causa do baixo rendimento ou falha de expressão de uma proteína recombinante e este problema pode ser resolvido substituindo-se os códons do cDNA a ser clonado pelos códons preferenciais utilizados pelo hospedeiro, aumentando consideravelmente a expressão (Jana and Deb 2005; Menzella 2011). Como exemplo, podemos citar a exotoxina A da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* que teve sua expressão aumentada em 70% com a utilização dos códons preferenciais de *E. coli*. Além disso, interleucinas humanas (IL-2, IL-6 e IL-18) tiveram suas expressões consideravelmente aumentadas com a otimização dos códons (Gustafsson, Govindarajan et al. 2004; Wang, Li et al. 2010). Portanto, na clonagem do cDNA que codifica a toxina Tx3-4 no vetor pET, nós resolvemos utilizar os códons preferenciais da bactéria *Escherichia coli* na tentativa de obtermos uma alta expressão. Outro fator importante para a diminuição do rendimento da proteína recombinante é a degradação por proteases bacterianas (Grodberg and Dunn 1988). Portanto nós utilizamos a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3), deficiente em algumas proteases.

A toxina Tx3-4 recombinante foi expressa no vetor pET em fusão com uma cauda de histidina N-terminal para facilitar sua purificação por afinidade. Após a expressão, amostras do sobrenadante e pellet foram analisadas e mostraram que toda a toxina expressa estava presente no pellet em forma de agregados. Foram relatados alguns casos em que a otimização dos códons acarretou a agregação da proteína recombinante, uma vez que são expressas em grandes quantidades e de forma rápida, não dando tempo para a proteína enovelar corretamente (Angov, Legler et al. 2011). Como a purificação de proteínas a partir de corpos de inclusão requer condições desnaturantes e estratégias de renaturação que podem ser demoradas e trabalhosas, ao invés de tentarmos a renaturação desta toxina, nós resolvemos testar outros sistemas na tentativa de obtenção da toxina Tx3-4 de forma solúvel e funcional.

5.2.2 Vetor *pBADHis*

5.2.2.1 Tx3-6

Os plasmídeos *pBADHis* e *pBADmycHis* são derivados do vetor de expressão *pBR322*, desenhados para uma expressão regulada e dose-dependente de proteínas recombinantes. Eles possuem o promotor *araBAD* (P_{BAD}) que é altamente regulável pelo gene *ARAC*. Na presença de L-arabinose a expressão do promotor *araBAD* é ativada a altos níveis e na sua ausência, baixos níveis de transcrição ocorrem, podendo ser reduzidos a quase zero na presença de glicose. (Guzman, Belin et al. 1995; Terpe 2006). A expressão regulada de proteínas é um fator muito importante quando o produto de expressão é potencialmente tóxico para o hospedeiro. Além disso, tem sido demonstrado que a utilização do sistema *pBAD* alivia a formação de corpos de inclusão, gerando proteínas solúveis na maioria das vezes (Guzman, Belin et al. 1995). Este sistema foi utilizado com sucesso para a expressão de grandes quantidades de diferentes proteínas, como a proteína recombinante Fabs humana, a streptolisina O de streptococos e a lipase Lip2 de um basídeoomiceto (Clark, Hammond et al. 1997; Kimoto, Fujii et al. 2005; Zelena, Krugener et al. 2009).

Como nas expressões anteriores a toxina expressa havia sido expressa em corpos de inclusão, nessa clonagem nós tentamos a expressão da toxina Tx3-6 com o seu pré-peptídeo. A função dos pré-peptídeos de proteínas ainda é controversa, mas alguns autores acreditam que eles funcionam como chaperonas intramoleculares, necessários para o enovelamento da proteína madura, enquanto outros acreditam que o pré-peptídeo apenas acelera o processo de enovelamento (Buczek, Buczek et al. 2005; Tanaka, Takeuchi et al. 2008; Jia, Liu et al. 2010).

A proteína expressa neste vetor continha, além do pré-peptídeo, uma cauda de histina N-terminal, para a purificação por afinidade em resina de níquel. Durante a purificação por afinidade, nós percebemos a co-purificação de uma proteína em torno de 37 kDa. Para tentarmos separar a toxina recombinante da proteína de 37 kDa, nós utilizamos filtros Amicon Ultra-4, que retém proteínas maiores que 30 kDa. Apesar de obtermos a toxina Tx3-6PP relativamente pura, a maior parte do que foi expresso ficou retida no filtro e não pudemos utilizar.

A possibilidade de agregação de proteínas recombinantes contendo uma cauda de 6 histidinas consecutivas na presença de imidazol foi relatada anteriormente (Vosters, Evans et al. 1992). Uma possível explicação para a co-purificação desta banda de 37 kDa que observamos, seria a agregação da proteína recombinante devido à sua cauda de histidina N-terminal. Levando-se em consideração a dificuldade em purificar a toxina Tx3-4PP e o baixo rendimento final obtido, nós resolvemos não continuar com este sistema.

5.2.2.2 Tx3-4

A toxina Tx3-4 também foi clonada e expressa com uma cauda N-terminal de 6 histidinas utilizando-se o vetor pBADHis. Neste caso, como utilizamos a construção Tx3-4pET como molde para a clonagem, a toxina foi expressa utilizando-se os códons preferências para a *E. Coli* e sem o pré-peptídeo. A toxina foi obtida de forma solúvel e purificada por afinidade em resina de níquel gerando cerca de 1,3 mg de proteína de fusão por litro de cultura.

Uma vez purificada, é importante fazer a digestão da proteína de fusão para separar a toxina recombinante da cauda (ver figura 17c). A toxina recombinante foi então dialisada para a troca de tampão e digerida com Fator Xa. O Fator Xa é uma protease que reconhece a sequência de aminoácidos I-E-G-R, clivando após o resíduo arginina. Esta sequência foi inserida imediatamente antes do primeiro aminoácido da toxina Tx3-4 durante a clonagem.

A digestão de proteínas de fusão por proteases pode ser complicada devido à dificuldade de acesso ao sítio de clivagem, o que, muitas vezes, requer a adição de detergentes ou outros agentes desnaturantes. Em muitos casos, a adição de baixas concentrações de SDS promove um relaxamento na estrutura da proteína que facilita a digestão (Legros, Feyfant et al. 1997; Jenny, Mann et al. 2003). Para a digestão da toxina Tx3-4, a melhor condição de digestão foi na ausência de SDS. A dificuldade em purificar a toxina recombinante após a digestão fez com que o rendimento final desse sistema fosse baixo.

Vários autores descreveram a atividade da toxina Tx3-4 nativa no bloqueio do influxo de cálcio e liberação de glutamato em sinaptosomas (Prado, Guatimosim et al. 1996; de Castro Junior, Pinheiro et al. 2008; Goncaves, Ferreira et al. 2010). O preparo de sinaptosomas é um procedimento relativamente rápido e os resultados

podem ser obtidos em apenas um dia. Portanto, uma maneira prática de testar a atividade da toxina recombinante é fazendo o teste de glutamato em sinaptosomas.

Nós testamos a toxina Tx3-4 em alta concentração (1 μ M) e vimos que a toxina não teve nenhum efeito bloqueador que, somado ao baixo rendimento, nos fez desistir deste sistema.

5.2.3 Vetor *pBADmycHis*

Como a posição da cauda pode influenciar o enovelamento da proteína recombinante, nós resolvemos tentar a expressão da toxina Tx3-6 com a cauda de histidina na sua porção C-terminal. Para isso, nós utilizamos o vetor *pBADmycHis*. Além da cauda C-terminal, a toxina foi expressa com uma porção extra N-terminal que poderia ser removida através da digestão com o Fator Xa. Para a clonagem da Tx3-6 neste vetor, nós construímos o cDNA da toxina utilizando os códons preferenciais da *E. coli*.

A toxina foi expressa de forma solúvel e purificada por cromatografia de afinidade, porém, apenas uma pequena parte da proteína recombinante se ligou à resina de níquel. Algumas estratégias para melhorar a afinidade da proteína à resina foram testadas como, por exemplo, a purificação à temperatura ambiente, troca de kit de purificação, redução da concentração de imidazol no tampão de ligação e mudança de pH. Apesar de todas as mudanças, a maior parte da proteína expressa era sempre perdida por não se ligar à resina ou sair nas lavagens, gerando apenas cerca de 0,3 mg por litro de cultura. Como o rendimento obtido era muito baixo nós decidimos testar se a toxina era funcional antes da remoção da porção extra N-terminal.

Para o teste, nós utilizamos um modelo de dor aguda e persistente *in vivo* chamado de teste da formalina. As toxinas Tx3-6 nativa e recombinante foram testadas na segunda fase do teste, representando a fase de dor persistente. Tanto a toxina nativa quanto a recombinante foram capazes de reduzir o tempo de manifestação de dor em mais de 50%, mostrando que a toxina recombinante foi expressa de forma funcional. Portanto, consideramos que a expressão nesse sistema é promissora e pretendemos no futuro tentar novas condições de purificação para melhorar o rendimento; por exemplo, poderíamos tentar gel filtração, fase reversa, ou uma combinação dos dois.

5.2.4 Vetor pE-SUMO

Um outro sistema que utilizamos para a expressão das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 foi o vetor pE-SUMO. O vetor pE-SUMO é uma ferramenta relativamente nova e vem sendo reconhecido nos últimos anos como uma boa estratégia para a produção de “proteínas difíceis de se expressar”. Quando clonada corretamente no sítio múltiplo de clonagem do vetor, a proteína de interesse é expressa com uma cauda de polihistidina (6xHis) seguida de uma proteína de fusão em sua porção N-terminal que corresponde à proteína Smt3 de levedura. A Smt3 é uma *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO) que exerce um efeito de chaperonina em proteínas de fusão produzidas em bactérias e leveduras aumentando consideravelmente sua expressão e solubilidade (Butt, Edavettal et al. 2005; Marblestone, Edavettal et al. 2006).

Como exemplos de proteínas eficientemente expressas neste sistema, podemos citar o fator de crescimento de fibroblasto 21 que anteriormente era obtido apenas em corpos de inclusão e foi expresso de forma solúvel e em grandes quantidades (Wang, Xiao et al. 2010); o peptídeo analgésico antitumor do veneno do escorpião *Mesobuthus martensii* que foi expresso de forma funcional e com rendimento final de 23 mg de proteína por litro de cultura (Cao, Yu et al. 2010); e o peptídeo antibacteriano CM4 que também foi obtido de forma funcional e em grandes quantidades (24 mg/L) (Li, Zhang et al. 2009).

Uma outra grande vantagem deste sistema é o fato de a proteína de fusão ser facilmente clivada pela SUMO protease I. A digestão de proteínas de fusão geralmente é bastante trabalhosa e muitas vezes está associada a clivagem inespecífica da proteína de interesse, a uma demorada padronização das condições ideais, a uma dificuldade de separação da cauda e protease da proteína alvo, além de frequentemente liberar a toxina de interesse com aminoácidos extras N-terminais (Butt, Edavettal et al. 2005). A SUMOprotease I reconhece a estrutura terciária da proteína SUMO, clivando logo após seu último aminoácido e liberando a proteína de interesse com seu N-terminal nativo. Além de não haver o risco de a protease clivar a proteína de interesse, ela atua em diferentes temperaturas e tampões, minimizando o tempo de padronização.

Na tentativa de criar um ambiente mais apropriado para o enovelamento das toxinas, nós utilizamos uma linhagem de *E. coli* própria para a expressão de proteínas com pontes dissulfeto chamada ORIGAMI. A linhagem ORIGAMI

apresenta mutações nos genes da tireodoxina redutase e glutathione redutase, o que faz com que seu citoplasma seja oxidante, favorecendo a formação de pontes dissulfeto (Stewart, Aslund et al. 1998). Além disso, nós co-transformamos o plasmídeo pGro7 que codifica as proteínas chaperonas GroEL e GroES. As chaperonas moleculares mais bem caracterizadas no citoplasma de *E. coli* são os sistemas dependentes de ATP DnaK-DnaJ-GrpE e GroEL-GroES. Elas auxiliam o enovelamento correto de proteínas recém formadas ligando-se aos enovelados intermediários, mantendo-os solúveis e impedindo assim, a formação de agregados. Assim sendo, espera-se que a superexpressão de chaperonas moleculares influenciem o enovelamento das proteínas recombinantes e diminuam a formação de corpos de inclusão (Thomas, Ayling et al. 1997; Nishihara, Kanemori et al. 1998). As expressões foram induzidas a 18°C, uma vez que baixas temperaturas favorecem o correto enovelamento de proteínas (Vasina and Baneyx 1996).

5.2.4.1 Tx3-6

Para a clonagem da toxina Tx3-6 no vetor pE-SUMO, nós utilizamos a construção Tx3-6pBADmycHis como molde para a amplificação do cDNA e, portanto, a proteína foi expressa utilizando-se os códons preferenciais da *E. coli*. Nós obtivemos cerca de 6 mg da proteína de fusão que foi expressa de forma totalmente solúvel. Após a digestão da cauda N-terminal e purificação por fase reversa, o rendimento foi de cerca de 2 mg de proteína pura por litro de cultura.

Este rendimento é um pouco baixo se compararmos com outras proteínas expressas neste sistema como a scFv, cujo rendimento final após digestão foi de 16,53 mg/L (Ye, Lin et al. 2008), porém, foi o melhor rendimento final que obtivemos para a toxina Tx3-6.

Quando comparamos o espectro de dicroísmo circular da toxina Tx3-6 recombinante com o espectro da toxina nativa, vemos que suas estruturas secundárias são diferentes, indicando um enovelamento incorreto da toxina recombinante. Isso foi confirmado com o teste em sinaptosomas, que mostrou que a toxina recombinante não bloqueou a liberação de glutamato nem na concentração de 5 μ M. Apesar do sistema SUMO ter sido o mais vantajoso em termos de produção, a toxina não foi expressa de forma funcional. Uma possibilidade para a obtenção da Tx3-6 funcional seria sua renaturação *in vitro* como foi feito para a

toxina Tx3-4. Outra possibilidade seria trabalhar as condições de expressão, como meio, temperatura e concentração de IPTG, que podem contribuir para a obtenção da toxina funcional.

5.2.4.2 Tx3-4

A toxina Tx3-4 também foi expressa no sistema SUMO. Parte da proteína recombinante foi expressa de forma solúvel e parte em corpos de inclusão. A parte solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel, dialisada e facilmente digerida pela SUMO protease I. A SUMOprotease I contém uma cauda de polihistidina para facilitar a purificação da enzima e da cauda digerida da proteína de interesse através de uma nova purificação por afinidade. Entretanto, tivemos dificuldade em recuperar a Tx3-4 pura, uma vez que ela se ligava inespecificamente à resina de níquel. Mudanças de pH e solução tampão foram testadas, mas a toxina continuava se ligando à resina de Ni^{2+} após a digestão. A alternativa que escolhemos para a purificação da Tx3-4 foi a cromatografia de fase reversa em um sistema de HPLC, através da qual conseguimos a toxina Tx3-4 totalmente separada da cauda e da protease. A purificação da toxina Tx3-4 da fração solúvel gerou cerca de 0,5-0,8 mg de proteína por litro de cultura. Este rendimento foi menor do que o da toxina Tx3-6, possivelmente devido ao fato de parte da Tx3-4 ter sido expressa em corpos de inclusão.

A toxina recombinante Tx3-4 eluiu na fase reversa em diferentes picos, que provavelmente correspondem a diferentes enovelados intermediários. Nós testamos a atividade de alguns destes picos e vimos que o maior deles representava a toxina funcional. Para testarmos a atividade da toxina recombinante Tx3-4, nós nos baseamos em testes biológicos previamente utilizados com a Tx3-4 nativa. Nós utilizamos os testes de liberação de glutamato e influxo de cálcio em sinaptosomas corticais de camundongos. Tanto a Tx3-4 nativa quanto a recombinante bloquearam a liberação de glutamato em cerca de 28% em uma concentração de 16 nM. Entretanto, a toxina nativa bloqueou cerca de 30% o influxo de cálcio, enquanto a mesma concentração da recombinante bloqueou apenas 20% ($p < 0,004$). Uma possível explicação para esta diferença de atividade entre a recombinante e a nativa, poderia ser a contaminação da amostra da toxina recombinante com enovelados intermediários, resultando em uma menor concentração da toxina

recombinante funcional sendo testada. Além disso, Carneiro (2000) e Pires (2008) reportaram uma dificuldade na dosagem da toxina Tx3-1 recombinante por absorbância a 280 nm que superestimava a concentração desta toxina quando comparada a nativa. Nós também observamos erros na dosagem a 280 nm, o que também poderia explicar o fato de a toxina recombinante aparentemente apresentar uma atividade mais baixa.

Como a maior parte da Tx3-4 recombinante foi expressa de forma insolúvel, nós resolvemos solubilizar os corpos de inclusão e tentar renaturar a toxina Tx3-4. De uma maneira em geral, a renaturação de proteínas expressas em corpos de inclusão, consiste na solubilização dos agregados por um agente desnaturante, redução da pontes dissulfeto (se for o caso) por um agente redutor e a transferência desta proteína para um ambiente que irá favorecer a formação de sua estrutura nativa. Este ambiente deve ter uma baixa concentração de agente desnaturante e condições redox apropriadas (Tresaugues, Collinet et al. 2004). O método mais utilizado para promover a formação de pontes dissulfeto é favorecer a reação de troca tiol-dissulfeto com tióis de baixa massa molecular em seu estado reduzido e oxidado (Fahnert, Lilie et al. 2004).

Para solubilizar os corpos de inclusão, nós optamos por usar uma solução contendo 6 M de Guanidina. A Guanidina foi escolhida no lugar da urea por se tratar de um agente caotrópico mais forte, capaz de solubilizar agregados extremos e resistentes à urea (Vallejo and Rinas 2004). Além disso, como a Tx3-4 possui várias cisteínas, os agregados muito provavelmente contém pontes dissulfeto não-nativas intra e intermoleculares que precisam ser desfeitas (Misawa and Kumagai 1999) e, para isto, escolhemos utilizar 10 mM de DTT, que foi removido da amostra logo antes da renaturação. Como não existe um protocolo único e cada proteína se comporta de uma maneira diferente, nós fizemos uma triagem em pequena escala utilizando um kit de renaturação de proteínas que oferece diferentes condições, tais como composição variada de tampões e, principalmente, diferentes proporções dos agentes redox glutathiona reduzida e oxidada (GSH-GSSG).

A toxina pura liofilizada foi ressuspensa em tampão desnaturante contendo 6 M de guanidina e 10 mM de DTT. A troca de tampão para renaturação de proteínas pode ser feita de diferentes maneiras, como por exemplo, diálise, diluição e métodos cromatográficos (Vallejo and Rinas 2004). Nós optamos pela diluição por ser uma técnica simples e que permite a adição da proteína desnaturada em

pequenas alíquotas de cada vez, diminuindo a possibilidade de agregação dos enovelados intermediários. A concentração proteica final é um importante fator a ser considerado para a renaturação de proteínas uma vez que baixas concentrações podem reduzir a formação de agregados. Nós utilizamos a concentração máxima de 0,2 mg/mL.

Após a renaturação, a troca de tampão foi feita através de fase reversa em coluna Vydac C18, o que nos permitiu também, comparar os perfis cromatográficos da toxina desnaturada / reduzida da toxina renaturada. A toxina reduzida apresenta uma conformação aberta, sem pontes de dissulfeto e se liga mais fortemente à coluna quando comparada à toxina enovelada, sendo eluída em uma concentração mais alta de solvente orgânico. O perfil cromatográfico da toxina renaturada sugeriu, portanto, uma mudança de conformação estrutural. Para averiguarmos se a toxina Tx3-4 foi enovelada de forma correta, nós testamos sua atividade na liberação de glutamato em sinaptosomas corticais de camundongo.

Enquanto 16 nM da toxina Tx3-4 purificada da fração solúvel bloqueou cerca de 28% a liberação de glutamato, 36 nM da toxina renaturada bloqueou apenas 11%. Quando aumentamos a concentração da toxina renaturada para 360 nM, obtivemos o mesmo efeito da toxina solúvel, de 28% de bloqueio. Uma inibição ainda maior, de 37%, foi detectada quando utilizamos 1,44 μ M da toxina renaturada. O fato de precisarmos utilizar mais toxina renaturada para obtermos o efeito da toxina solúvel pode ser explicado mais uma vez pela contaminação de enovelados intermediários, que acabaram eluindo em um mesmo pico na fase reversa.

A renaturação de proteínas é, em geral, um processo ineficiente, que requer muitos passos e que muitas vezes recupera em torno de 15-25% da proteína total (Singh and Panda 2005). Como os enovelados intermediários foram eluídos em um único pico, não conseguimos calcular a porcentagem de proteína que foi corretamente enovelada, mas obtivemos um total de 2 mg de proteína ao final da renaturação partindo de 19,5 mg de proteína de fusão purificada.

Como a toxina Tx3-4 renaturada mostrou-se funcional, ela foi analisada por dicroísmo circular para termos dados iniciais de sua estrutura.. A espectroscopia de dicroísmo circular é uma excelente ferramenta para a rápida determinação de estruturas secundárias e propriedades de enovelamento de proteínas. Além disso, podem ser feitas análises de estabilidade em diferentes tampões e temperaturas, assim como estudos de interações entre moléculas (Greenfield 2006; Ranjbar and

Gill 2009). A análise do espectro obtido para a toxina Tx3-4 foi feita pelo software K2d que sugeriu uma conformação de enovelamento aleatório (57%), com algumas estruturas de α -hélice (32%) e em menor quantidade, folhas- β (11%). Como estas análises são feitas baseando-se em estruturas de proteínas globulares conhecidas, que são bastante diferentes de toxinas, as porcentagens de cada estrutura obtida podem não ser representativas e não devem utilizadas (Greenfield 2006). Portanto, assumimos apenas que a toxina Tx3-4 recombinante possui uma conformação predominantemente aleatória, seguida por estruturas em α -hélice com poucas estruturas em folhas- β . Nossos dados são comparáveis com os dados obtidos para as oxytoxinas 1 e 2 isoladas da aranha *Oxyopes lineatus* que também são bloqueadores de canais de cálcio sensíveis à voltagem. A oxytoxina 1, que possui 21% de identidade com a toxina Tx3-4 também apresenta uma estrutura secundária predominantemente randômica (58%), 10,5% α -hélice e apenas 7,1% em folhas β (Villegas, Adachi-Akahane et al. 2008). Por outro lado, a ω -agatoxina IVA possui 24,6% de sua estrutura com enovelamento randômico, 17,9% em α -hélice, e uma predominância em folhas- β (32,4%), uma estrutura mais parecida com as ω -conotoxinas MVIIA e MVIIC (Kim, Ohtake et al. 1997; Sasaki, Feng et al. 1999). Uma outra conotoxina, a conantokina RI-A, um bloqueador de receptores NMDA, apresentou mais de 50% de sua estrutura em α -hélice (Gowd, Watkins et al. 2010), assim como a conotoxina flf14a, um bloqueador de canais de K^+ (Moller, Rahmankhah et al. 2005).

5.3 Considerações gerais

A expressão heteróloga de toxinas do veneno da *Phoneutria* não é um procedimento simples. Vários sistemas foram testados nesse trabalho e em trabalhos anteriores. Por exemplo, a toxina Tx2-6 foi expressa parcialmente funcional com um rendimento final de 240-360 μ g por litro de cultura (Penaforte 2000). Recentemente, esta toxina foi novamente expressa apresentando atividade de causar priapismo semelhante à nativa (Torres, Silva et al. 2010). A Tx3-1 foi primeiramente expressa com baixa atividade e um rendimento de apenas 560 μ g/L (Carneiro 2000) e, posteriormente, cerca de 2 mg/L de Tx3-1 foram obtidos e a toxina se mostrou funcional apresentando um efeito antiarritmogênico em corações isolados de ratos (Pires 2008; Almeida, Andrade et al. 2011). A Tx1, uma toxina que

como a Tx3-4 contém 7 pontes dissulfeto, foi expressa em *E. coli* com atividade farmacológica semelhante à nativa, porém, seu rendimento não foi relatado (Diniz, Theakston et al. 2006).

A complexidade na formação do correto enovelamento de toxinas muitas vezes faz com que estes peptídeos sejam expressos de forma inativa, necessitando estratégias de renaturação, como por exemplo, a omega-conotoxina MVIIA que foi expressa de forma solúvel em *E. coli* e só apresentou efeito analgésico após suas pontes dissulfeto terem se formado *in vitro* (Xia, Chen et al. 2006). Outro exemplo é a huwentoxina HWTX-I, da aranha *Selenocosmia huwena* que apresentou baixa atividade antes de ser reduzida e renaturada (Li, Li et al. 2000). Apesar da disponibilidade de inúmeros sistemas de expressão, a produção de proteínas recombinantes ainda é uma tarefa difícil, principalmente para proteínas complexas e com modificações pós-traducionais. As expressões e rendimento das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 realizadas neste trabalho estão resumidas na tabela 10. Com o sistema SUMO conseguimos obter um bom rendimento para ambas as toxinas e também conseguimos padronizar as condições necessárias para conseguir a toxina Tx3-4 funcional. Conseguimos também gerar os primeiros dados estruturais de dicroísmo circular, tanto para a Tx3-6 quanto para a Tx3-4. A nossa perspectiva futura é otimizar o sistema de expressão SUMO para a produção de proteínas marcadas para estudos de ressonância magnética. Para isso, deveremos padronizar as condições de expressão das toxinas em meio restritivo M9 para marcação isotópica da proteína expressa. Uma vez determinada a estrutura tridimensional dessas proteínas, teremos a opção de fazer a síntese química destas toxinas. Pretendemos também otimizar as condições necessárias para conseguir a Tx3-6 funcional.

A expressão funcional das toxinas recombinantes Tx3-6 e Tx3-4 criaram novas expectativas para futuros testes farmacológicos e análises estruturais e os resultados obtidos com a renaturação da toxina Tx3-4 abrem novos caminhos para a obtenção de toxinas da *Phoneutria* em larga escala.

Tabela 10: Resumo das expressões e purificações das toxinas Tx3-6 e Tx3-4 recombinantes.

Construção	Hospedeiro	Rendimento	Comentários
Tx36pPICZ	<i>Pichia pastoris</i> X-33	X	Baixa produtividade; expressão apenas detectada por Western blot
Tx36PPPpBADHis	<i>Escherichia coli</i> TOP10	X	Baixa produtividade; Dificuldade em separar a toxina recombinante de contaminantes de alto peso molecular
Tx36pBADmycHis	<i>Escherichia coli</i> TOP10	0.3 mg/L	Baixa produtividade; Dificuldade na purificação por afinidade; Toxina funcional
Tx36pE-SUMO	<i>Escherichia coli</i> ORIGAMI	2.0 mg/L	Rendimento razoável; Toxina recombinante com estrutura secundária diferente da nativa
Tx34pET	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	X	Toxina recombinante expressa totalmente em corpos de inclusão
Tx34pBAD	<i>Escherichia coli</i> TOP10	0.2 mg/L	Baixa produtividade; Dificuldade na purificação da toxina após clivagem da cauda; Toxina inativa
Tx34pE-SUMO	<i>Escherichia coli</i> ORIGAMI	0.5 - 0.8 mg/L (Solúvel) 1.5 - 2.0 mg/L (Renaturada)	Rendimento razoável; Toxina solúvel funcional; Toxina renaturada funcional; Resultados inconsistentes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., V. Bindokas, et al. (1990). "Omega-agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agenelopsis aperta*) venom. ." J Biol Chem 265(2): 861-867.
- Alberts, B. J., A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.
- Almeida, A. P., A. B. Andrade, et al. (2011). "Antiarrhythmogenic effects of a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*." Toxicon 57(2): 217-224.
- Altier, C. and G. W. Zamponi (2004). "Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type." Trends Pharmacol Sci 25(9): 465-470.
- Andrade, M. A., P. Chacon, et al. (1993). "Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network." Protein Eng 6(4): 383-390.
- Angov, E., P. M. Legler, et al. (2011). "Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding." Methods Mol Biol 705: 1-13.
- Appel, M. H., R. B. da Silveira, et al. (2008). "Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom." Biochim Biophys Acta 1780(2): 167-178.
- Araujo, D. A., M. N. Cordeiro, et al. (1993). "Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 347(2): 205-208.
- Berg, J. M. T., J. L.; Stryer, L. (2004). Bioquímica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
- Brasil, M. d. S. (1998). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília.
- Brown, T. A. (2003). A clonagem genica e analise de DNA: uma introducao. Porto Alegre, Artmed.

- Buczek, P., O. Buczek, et al. (2005). "Total chemical synthesis and oxidative folding of delta-conotoxin PVIA containing an N-terminal propeptide." Biopolymers 80(1): 50-57.
- Butt, T. R., S. C. Edavettal, et al. (2005). "SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins." Protein Expr Purif 43(1): 1-9.
- Cao, P., J. Yu, et al. (2010). "Expression and purification of an antitumor-analgesic peptide from the venom of *Mesobuthus martensii* Karsch by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*." Biotechnol Prog 26(5): 1240-1244.
- Cardoso, F. C., L. G. Pacifico, et al. (2003). "Molecular cloning and characterization of *Phoneutria nigriventer* toxins active on calcium channels." Toxicon 41(7): 755-763.
- Carneiro, A. M. D. (2000). Toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer*: Caracterizacao da toxina recombinante Tx3-1. Departamento de Bioquimica e Imunologia. Belo Horizonte, UFMG. Dissertacao de mestrado: 97.
- Cassola, A. C., H. Jaffe, et al. (1998). "omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *phoneutria nigriventer*." Pflugers Arch 436(4): 545-552.
- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." Pharmacol Rev 57(4): 411-425.
- Cereghino, J. L. and J. M. Cregg (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." FEMS Microbiol Rev 24(1): 45-66.
- Che, N., L. Wang, et al. (2009). "Soluble expression and one-step purification of a neurotoxin Huwentoxin-I in *Escherichia coli*." Protein Expr Purif 65(2): 154-159.
- Choi, D. W. (1988). "Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage." Trends Neurosci 11(10): 465-469.
- Clark, M. A., F. R. Hammond, et al. (1997). "Regulation and expression of human Fabs under the control of the *Escherichia coli* arabinose promoter, PBAD." Immunotechnology 3(3): 217-226.

- Cordeiro, M. N., S. G. de Figueiredo, et al. (1993). "Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys)." Toxicon 31(1): 35-42.
- Cordeiro, M. N., C. R. Diniz, et al. (1992). "The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys)." FEBS Lett 310(2): 153-156.
- Daly, R. and M. T. Hearn (2005). "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production." J Mol Recognit 18(2): 119-138.
- de Castro Junior, C. J., A. C. Pinheiro, et al. (2008). "Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis." Neurosci Lett 439(2): 170-172.
- de Lima, M. E., M. Stankiewicz, et al. (2002). "The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na(+) current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3." J Insect Physiol 48(1): 53-61.
- Diniz, C. R., M. N. Cordeiro, et al. (1990). "The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*." FEBS Lett 263(2): 251-253.
- Diniz, M. R., R. D. Theakston, et al. (2006). "Functional expression and purification of recombinant Tx1, a sodium channel blocker neurotoxin from the venom of the Brazilian "armed" spider, *Phoneutria nigriventer*." Protein Expr Purif 50(1): 18-24.
- Dos Santos, R. G., C. Van Renterghem, et al. (2002). "*Phoneutria nigriventer* omega-phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites." J Biol Chem 277(16): 13856-13862.
- Dubuisson, D. and S. G. Dennis (1977). "The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats." Pain 4(2): 161-174.
- Duncan, R. S., D. L. Goad, et al. (2010). "Control of intracellular calcium signaling as a neuroprotective strategy." Molecules 15(3): 1168-1195.
- Dunkley, P., P. Jarvie, et al. (2008). "A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes." Nature Protocols 3(11): 1718-1728.
- Dutra, A. A., L. O. Sousa, et al. (2008). "Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels." Peptides 29(9): 1505-1513.

- Ertel, E., V. Warren, et al. (1994). "Type III omega-agatoxins: a family of probes for similar binding sites on L- and N-type calcium channels. ." Biochemistry 33(17): 5098-5108.
- Escoubas, P., S. Diochot, et al. (2000). "Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins." Biochimie 82(9-10): 893-907.
- Evans, R. M. and G. W. Zamponi (2006). "Presynaptic Ca²⁺ channels-- integration centers for neuronal signaling pathways." Trends Neurosci 29(11): 617-624.
- Fahnert, B., H. Lilie, et al. (2004). "Inclusion bodies: formation and utilisation." Adv Biochem Eng Biotechnol 89: 93-142.
- Figueiredo, S. G., M. E. Garcia, et al. (1995). "Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys)." Toxicon 33(1): 83-93.
- Glick, B. R. P., Jack J. (1994). Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA. Washington, ASM press.
- Gomez, M. V., E. Kalapothakis, et al. (2002). "Phoneutria nigriventer venom: a cocktail of toxins that affect ion channels." Cell Mol Neurobiol 22(5-6): 579-588.
- Goncaves, J. M., J. Ferreira, et al. (2010). "The Effect of Spider Toxin PhTx3-4, omega-Conotoxins MVIIA and MVIIIC on Glutamate Uptake and on Capsaicin-Induced Glutamate Release and [Ca²⁺] (i) in Spinal cord Synaptosomes." Cell Mol Neurobiol.
- Gowd, K. H., M. Watkins, et al. (2010). "Characterization of conantokin RI-A: molecular phylogeny as structure/function study." J Pept Sci 16(8): 375-382.
- Grantham, R., C. Gautier, et al. (1981). "Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity." Nucleic Acids Res 9(1): r43-74.
- Greenfield, N. J. (2006). "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure." Nat Protoc 1(6): 2876-2890.
- Grodberg, J. and J. J. Dunn (1988). "ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification." J Bacteriol 170(3): 1245-1253.

- Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem 260(6): 3440-3450.
- Guatimosim, C., M. A. Romano-Silva, et al. (1997). "A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis." Br J Pharmacol 122(3): 591-597.
- Gustafsson, C., S. Govindarajan, et al. (2004). "Codon bias and heterologous protein expression." Trends Biotechnol 22(7): 346-353.
- Guzman, L. M., D. Belin, et al. (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." J Bacteriol 177(14): 4121-4130.
- Heinke, B., E. Balzer, et al. (2004). "Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons." Eur J Neurosci 19(1): 103-111.
- Hess, E. J., J. C. Jen, et al. (2010). "Neuronal voltage-gated calcium channels: brief overview of their function and clinical implications in neurology." Neurology 75(10): 937; author reply 937-938.
- Jana, S. and J. K. Deb (2005). "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol 67(3): 289-298.
- Jenny, R. J., K. G. Mann, et al. (2003). "A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa." Protein Expr Purif 31(1): 1-11.
- Jia, Y., H. Liu, et al. (2010). "Functional analysis of propeptide as an intramolecular chaperone for in vivo folding of subtilisin nattoxinase." FEBS Lett 584(23): 4789-4796.
- Kalapothis, E., C. L. Penaforte, et al. (1998). "Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*." Toxicon 36(12): 1843-1850.
- Kalapothis, E., C. L. Penaforte, et al. (1998). "Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*)." Toxicon 36(12): 1971-1980.
- Keyserling, E. (1891). Die Spinnen Amerikas. III. Brasilianische Spinnen. Nürnberg.

- Kim, J. I., A. Ohtake, et al. (1997). "Circular dichroism spectra of calcium channel antagonist omega-conotoxins." Biochem Biophys Res Commun 230(1): 133-135.
- Kimoto, H., Y. Fujii, et al. (2005). "Expression of recombinant Streptolysin O and specific antibody production." J Mol Microbiol Biotechnol 10(1): 64-68.
- Kobayashi, T. and Y. Mori (1998). "Ca²⁺ channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia." Eur J Pharmacol 363(1): 1-15.
- Kristian, T. and B. K. Siesjo (1998). "Calcium in ischemic cell death." Stroke 29(3): 705-718.
- Kushmerick, C., E. Kalapothakis, et al. (1999). "Phoneutria nigriventer toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells." J Neurochem 72(4): 1472-1481.
- Lee, S., Y. Kim, et al. (2010). "Analgesic effect of highly reversible omega-conotoxin FVIA on N type Ca²⁺ channels." Mol Pain 6: 97.
- Legros, C., E. Feyfant, et al. (1997). "Influence of a NH₂-terminal extension on the activity of KTX2, a K⁺ channel blocker purified from *Androctonus australis* scorpion venom." FEBS Lett 417(1): 123-129.
- Lewis, R. J. and M. L. Garcia (2003). "Therapeutic potential of venom peptides." Nat Rev Drug Discov 2(10): 790-802.
- Li, J. F., J. Zhang, et al. (2009). "Production of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner." Appl Microbiol Biotechnol 84(2): 383-388.
- Li, M., L. Y. Li, et al. (2000). "Cloning and functional expression of a synthetic gene encoding huwentoxin-I, a neurotoxin from the Chinese bird spider (*Selenocosmia huwena*)." Toxicon 38(2): 153-162.
- Li, P., A. Anumanthan, et al. (2007). "Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*." Appl Biochem Biotechnol 142(2): 105-124.
- Lima, M. C. (2010). INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA TOXINA TX3-4 DA ARANHA PHONEUTRIA NIGRIVENTER NA ISQUEMIA CEREBRAL EM RATOS. Belo Horizonte, UFMG. Tese de Doutorado: 95p.
- Lucas, S. (1988). "Spiders in Brazil." Toxicon 26(9): 759-772.

- Lucas, S. M. e. J., P. I. S. (1992). Acidentes por aranhas (araneísmo): Aranhas de interesse médico no Brasil. Sao Paulo, Saraiva.
- Mafra, R. A., S. G. Figueiredo, et al. (1999). "PhTx4, a new class of toxins from Phoneutria nigriventer spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes." Brain Res 831(1-2): 297-300.
- Marblestone, J. G., S. C. Edavettal, et al. (2006). "Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO." Protein Sci 15(1): 182-189.
- Martin-Moutot, N., P. Mansuelle, et al. (2006). "Phoneutria nigriventer toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with micro conotoxin binding sites." Mol Pharmacol 69(6): 1931-1937.
- Menzella, H. G. (2011). "Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in Escherichia coli." Microb Cell Fact 10: 15.
- Miranda, D. M., M. A. Romano-Silva, et al. (1998). "Phoneutria nigriventer toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes." Neuroreport 9(7): 1371-1373.
- Misawa, S. and I. Kumagai (1999). "Refolding of therapeutic proteins produced in Escherichia coli as inclusion bodies." Biopolymers 51(4): 297-307.
- Moller, C., S. Rahmankhah, et al. (2005). "A novel conotoxin framework with a helix-loop-helix (Cs alpha/alpha) fold." Biochemistry 44(49): 15986-15996.
- Moura, J. R., M. A. Prado, et al. (1998). "Investigation of the effect of PhTx2, from the venom of the spider Phoneutria nigriventer, on the release of [3H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes." Toxicon 36(8): 1189-1192.
- Nicholls, D. G., T. S. Sihra, et al. (1987). "Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry." J Neurochem 49(1): 50-57.
- Nie, D. S., M. Li, et al. (2002). "[Expression and purification of recombinant huwentoxin-I in Pichia pastoris]." Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 18(2): 172-177.
- Nishihara, K., M. Kanemori, et al. (1998). "Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in Escherichia coli." Appl Environ Microbiol 64(5): 1694-1699.

- Norton, R. S. and S. I. McDonough (2008). "Peptides targeting voltage-gated calcium channels." Curr Pharm Des 14(24): 2480-2491.
- Nunes, K. P., A. Costa-Goncalves, et al. (2008). "Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function." Toxicon 51(7): 1197-1206.
- Park, S. P., B. M. Kim, et al. (2008). "A tarantula spider toxin, GsMTx4, reduces mechanical and neuropathic pain." Pain 137(1): 208-217.
- Penaforte, C. L. (2000). Clonagem de toxinas do veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* e expressao da isoforma Tx2-6. Departamento de Bioquimica e Imunologia. Belo Horizonte, UFMG. tese de doutorado: 130p.
- Penn, R. D. and J. A. Paice (2000). "Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide." Pain 85(1-2): 291-296.
- Perez-Pinzon, M. A., M. A. Yenari, et al. (1997). "SNX-111, a novel, presynaptic N-type calcium channel antagonist, is neuroprotective against focal cerebral ischemia in rabbits." J Neurol Sci 153(1): 25-31.
- Pi, C., J. Liu, et al. (2007). "Soluble expression, purification and functional identification of a disulfide-rich conotoxin derived from *Conus litteratus*." J Biotechnol 128(1): 184-193.
- Pinheiro, A. C., A. J. da Silva, et al. (2009). "Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus." Hippocampus 19(11): 1123-1129.
- Pinheiro, A. C., R. S. Gomez, et al. (2006). "Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*." Neurochem Int 49(5): 543-547.
- Pires, A. C. (2008). Clonagem e expressao da toxina Tx3-1 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Departamento de Bioquimica e Imunologia. Belo Horizonte, UFMG. Dissertacao de mestrado: 117p.
- Pluzhnikov, K., A. Vassilevski, et al. (2007). "omega-Lsp-1A, a novel modulator of P-type Ca²⁺ channels." Toxicon 50(7): 993-1004.
- Prado, M. A., C. Guatimosim, et al. (1996). "A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*." Biochem J 314 (Pt 1): 145-150.

- Pringle, A. K., C. D. Benham, et al. (1996). "Selective N-type calcium channel antagonist omega conotoxin MVIIA is neuroprotective against hypoxic neurodegeneration in organotypic hippocampal-slice cultures." Stroke 27(11): 2124-2130.
- Ranjbar, B. and P. Gill (2009). "Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review." Chem Biol Drug Des 74(2): 101-120.
- Rash, L. D. and W. C. Hodgson (2002). "Pharmacology and biochemistry of spider venoms." Toxicon 40(3): 225-254.
- Reis, H. J., M. V. Gomez, et al. (2000). "Inhibition of glutamate uptake by Tx3-4 is dependent on the redox state of cysteine residues." Neuroreport 11(10): 2191-2194.
- Reis, H. J., M. A. Prado, et al. (1999). "Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider Phoneutria nigriventer." Biochem J 343 Pt 2: 413-418.
- Rezende Junior, L., M. N. Cordeiro, et al. (1991). "Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider Phoneutria nigriventer." Toxicon 29(10): 1225-1233.
- Richardson, M., A. M. Pimenta, et al. (2006). "Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus Phoneutria." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 142(3-4): 173-187.
- Romano-Silva, M. A., R. Ribeiro-Santos, et al. (1993). "Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization." Biochem J 296 (Pt 2): 313-319.
- Santos, A. D., J. S. Imperial, et al. (1992). "Heterodimeric structure of the spider toxin omega-agatoxin IA revealed by precursor analysis and mass spectrometry." J Biol Chem 267(29): 20701-20705.
- Sasaki, T., Z. P. Feng, et al. (1999). "Synthesis, bioactivity, and cloning of the L-type calcium channel blocker omega-conotoxin TxVII." Biochemistry 38(39): 12876-12884.
- Singh, S. M. and A. K. Panda (2005). "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins." J Biosci Bioeng 99(4): 303-310.
- Snutch, T. P. (2005). "Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age." NeuroRx 2(4): 662-670.

- Souza, A. H., J. Ferreira, et al. (2008). "Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom." Pain 140(1): 115-126.
- Stewart, E. J., F. Aslund, et al. (1998). "Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins." EMBO J 17(19): 5543-5550.
- Sudhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." Annu Rev Neurosci 27: 509-547.
- Szydłowska, K. and M. Tymianski (2010). "Calcium, ischemia and excitotoxicity." Cell Calcium 47(2): 122-129.
- Tanaka, S., Y. Takeuchi, et al. (2008). "Crystal structure of Tk-subtilisin folded without propeptide: requirement of propeptide for acceleration of folding." FEBS Lett 582(28): 3875-3878.
- Terpe, K. (2006). "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol 72(2): 211-222.
- Thomas, J. G., A. Ayling, et al. (1997). "Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold." Appl Biochem Biotechnol 66(3): 197-238.
- Thompson, J. C., E. Dunbar, et al. (2006). "Treatment challenges and complications with ziconotide monotherapy in established pump patients." Pain Physician 9(2): 147-152.
- Torres, F. S., C. N. Silva, et al. (2010). "Functional expression of a recombinant toxin - rPnTx2-6 - active in erectile function in rat." Toxicon 56(7): 1172-1180.
- Tresaugues, L., B. Collinet, et al. (2004). "Refolding strategies from inclusion bodies in a structural genomics project." J Struct Funct Genomics 5(3): 195-204.
- Valentino, K., R. Newcomb, et al. (1993). "A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A 90(16): 7894-7897.
- Vallejo, L. F. and U. Rinas (2004). "Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins." Microb Cell Fact 3(1): 11.

- Vasina, J. A. and F. Baneyx (1996). "Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major *Escherichia coli* cold shock promoter *cspA*." Appl Environ Microbiol 62(4): 1444-1447.
- Venema, V., K. Swiderek, et al. (1992). "Antagonism of synaptosomal calcium channels by subtypes of omega-agatoxins." J Biol Chem 267(4): 2610-2615.
- Vieira, L. B., C. Kushmerick, et al. (2005). "Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6." J Pharmacol Exp Ther 314(3): 1370-1377.
- Vieira, L. B., C. Kushmerick, et al. (2003). "PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes." Neurochem Int 42(4): 277-282.
- Villanova, F. E., E. Andrade, et al. (2009). "Erection induced by Tx2-6 toxin of *Phoneutria nigriventer* spider: expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice." Toxicon 54(6): 793-801.
- Villegas, E., S. Adachi-Akahane, et al. (2008). "Biochemical characterization of cysteine-rich peptides from *Oxyopes* sp. venom that block calcium ion channels." Toxicon 52(2): 228-236.
- Vosters, A. F., D. B. Evans, et al. (1992). "On the engineering of rDNA proteins for purification by immobilized metal affinity chromatography: applications to alternating histidine-containing chimeric proteins from recombinant *Escherichia coli*." Protein Expr Purif 3(1): 18-26.
- Wang, H., Y. Xiao, et al. (2010). "High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*." BMC Biotechnol 10: 14.
- Wang, X., X. Li, et al. (2010). "Codon optimization enhances secretory expression of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in *E. coli*." Protein Expr Purif 72(1): 101-106.
- Williams, A. J., G. Ling, et al. (2002). "Intrathecal CGX-1007 is neuroprotective in a rat model of focal cerebral ischemia." Neuroreport 13(6): 821-824.
- Wood, D. L., T. Miljenovic, et al. (2009). "ArachnoServer: a database of protein toxins from spiders." BMC Genomics 10: 375.
- Xia, Z., Y. Chen, et al. (2006). "Recombinant omega-conotoxin MVIIA possesses strong analgesic activity." BioDrugs 20(5): 275-281.

- Yadava, A. and C. F. Ockenhouse (2003). "Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems." Infect Immun 71(9): 4961-4969.
- Yaksh, T. L. (2006). "Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain." J Pain 7(1 Suppl 1): S13-30.
- Ye, T., Z. Lin, et al. (2008). "High-level expression and characterization of an anti-VEGF165 single-chain variable fragment (scFv) by small ubiquitin-related modifier fusion in Escherichia coli." Appl Microbiol Biotechnol 81(2): 311-317.
- Yenari, M. A., J. T. Palmer, et al. (1996). "Time-course and treatment response with SNX-111, an N-type calcium channel blocker, in a rodent model of focal cerebral ischemia using diffusion-weighted MRI." Brain Res 739(1-2): 36-45.
- Zelena, K., S. Krugener, et al. (2009). "Functional expression of the lipase gene Lip2 of Pleurotus sapidus in Escherichia coli." Biotechnol Lett 31(3): 395-401.

Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph α 1 β toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom

Alessandra H. Souza^a, Juliano Ferreira^b, Marta do Nascimento Cordeiro^c,
Luciene Bruno Vieira^a, Celio J. De Castro^a, Gabriela Trevisan^b, Helton Reis^a,
Ivana Assis Souza^a, Michael Richardson^c, Marco A.M. Prado^{a,f}, Vânia F. Prado^{d,f},
Marcus Vinicius Gomez^{e,g,*}

^a Departamento de Farmacologia, ICB, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Química UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Núcleo Pós Graduação, Santa Casa de Belo Horizonte, Brazil

^f Robarts Research Institute, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

^g Laboratório de Neurociência, Faculdade de Medicina, UFMG, 30130-100, Brazil

Received 16 April 2008; received in revised form 10 June 2008; accepted 14 July 2008

Abstract

Calcium influx through neuronal voltage-sensitive calcium channels (VSCCs) mediates nociceptive information in the spinal dorsal horn. In fact, spinally administered VSCCs blockers, such as ω -conotoxin MVIIA, have analgesic effect apart of their low therapeutic index and many side effects. Here we study the analgesic potential of Ph α 1 β , a calcium channel blocker, in rodent models of acute and persistent pain. Spinally administered Ph α 1 β showed higher efficacy and long-lasting analgesia in a thermal model of pain, when compared with ω -conotoxin MVIIA. Moreover, Ph α 1 β was more effective and potent than ω -conotoxin MVIIA not only to prevent, but especially to reverse, previously installed persistent chemical and neuropathic pain. Furthermore, the analgesic action of both toxins are related with the inhibition of Ca²⁺-evoked release of pro-nociceptive neurotransmitter, glutamate, from rat spinal cord synaptosomes and decrease of glutamate overflow in cerebrospinal fluid. When side effects were assessed, we found that Ph α 1 β had a therapeutic index wider than ω -conotoxin MVIIA. Finally, recombinant Ph α 1 β expressed in *Escherichia coli* showed marked analgesic activity similar to the native toxin. Taken together, the present study demonstrates that native and recombinant Ph α 1 β have analgesic effects in rodent models of pain, suggesting that this toxin may have potential to be used as a drug in the control of persistent pathological pain.

© 2008 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phoneutria toxin; ω -Conotoxin MVIIA; Analgesic action; Recombinant toxin; Side effects

1. Introduction

Neuronal VSCCs (voltage-sensitive calcium channels) are found in presynaptic nerve terminals where they allow calcium influx and depolarization-induced transmitter release from both central and peripheral

* Corresponding author. Address: Departamento de Farmacologia, ICB, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 31 3409 2720; fax: +55 31 3409 2983.

E-mail address: gomez@icb.ufmg.br (M.V. Gomez).

nerves [23]. The calcium channels in spinal cord have an important role modulating the release of key pro-nociceptive neurotransmitters, such as glutamate and neuropeptides. Thus, considerable research in the last decade has focused on N-type calcium channel inhibitors for development of novel analgesic drugs [2]. The ω -conotoxin MVIIA is a selective, reversible and potent blocker of N-type VSCC_s [15,35] and inhibits both neuronal excitability and neurotransmission [3,23]. ω -Conotoxin MVIIA was originally isolated from the cone snail *Conus magnus* and was subsequently synthesized and called ziconotide. Ziconotide produces antinociception in animal models of acute [3,19,20] and persistent pain. Due to its peptide nature, ziconotide is not orally available and it must be delivered directly into the CNS via intrathecal administration [31]. Moreover, intrathecal infusion of ziconotide (Prialt®) has analgesic effect in humans and was recently approved by several government regulatory bodies worldwide for the treatment of severe chronic pain. However, ziconotide has a narrow therapeutic window and produces some serious side effects in analgesic doses [25,32]. Thus, there is need to investigate new VSCC_s blockers with analgesic properties and that may warrant less adverse side effects.

Toxins obtained from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, popularly known as armed spider, have been extensively investigated by our group [9]. These toxins have a broad range of actions, including activation of Na⁺ channels, blockade of K⁺ and Ca²⁺ channels, the latter with consequent decrease in calcium-dependent glutamate release in synaptosomes [12,26,27]. One purified fraction of the *Phoneutria* venom, called PhTx3, contains six neurotoxic peptides isoforms, PnTx3-1 to 6 [6]. The neurotoxin PnTx3-6, here called as Ph α 1 β , reversibly and non-specifically inhibited high-voltage-activated Ca²⁺ channels, namely L-(Ca_v1.2), N-(Ca_v2.2), P/Q-(Ca_v2.1), and R-(Ca_v2.3) type, with varying potency (N > R > P/Q > L) in heterologous and native systems [34]. Here we demonstrate, for the first time, that Ph α 1 β has analgesic action in rodent models of pain, with a therapeutic window 4 times larger than ziconotide. Moreover, we generate a recombinant form of Ph α 1 β that shares the analgesic properties of the native toxin.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Native Ph α 1 β was purified by a combination of gel filtration, reverse phase FPLC/FPLC and ion exchange HPLC, as previously described [6]. ω -Conotoxin MVIIA was purchased from Latoxan (Valence, France). The stock solutions of the drugs were prepared in PBS in siliconised plastic tubes, maintained at –18 °C and diluted to the desired concentration just before use. Glutamate

dehydrogenase type II (EC 1.4.1.3), NADP⁺, glutamic acid and fura-2 acetoxymethylester (AM) were obtained from Sigma (MO, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Animals

Male adult Swiss mice (30–40 g) or Wistar rats (180–250 g) were acclimatized in the laboratory for at least 2 h before testing and they were used only once throughout the experiments. While in the home cage environment, the animals were allowed free access to water and food. Room temperature was maintained at 22 ± 1 °C and room illumination was on a 12/12 h light/dark cycle. The experiments were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for investigations of experiments in conscious animals [41] and were authorized by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais.

2.3. Intrathecal (i.t.) injections

The i.t. injections were performed in accordance with the method previously described [13,22]. Briefly, a volume of 5 μ L for mice and 10 μ L for rats was administered with a 28-gauge needle connected to a 10 μ L Hamilton micro syringe, while the animal was lightly restrained to maintain the position of the needle. Puncture of the dura was indicated behaviorally by a slight flick of the tail. Behavioral evaluation was performed blindly with respect to drug administration.

2.4. Hot-plate test

The hot-plate test was used to measure acute thermal nociception according to the previously described method [39], with minor modifications. Mice were placed into a glass cylinder of 24 cm diameter on the heated surface (55 ± 0.1 °C), and the time between placement and the licking of the paws, or jumping, was recorded as index of response latency. The cut-off time was 45 s to avoid tissue damage. Each animal was tested before administration of the drugs in order to obtain the baseline. Animals were administered with 5 μ L of vehicle (phosphate-buffered saline, PBS), Ph α 1 β (30–300 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (0.1–10 pmol/site) from 0.5 to 48 h before the hot-plate test.

2.5. Formalin test

Acute neurogenic and persistent inflammatory nociception were evaluated using the formalin test [8] with minor modifications. Sixty microliters of saline containing 2.5% formalin was injected subcutaneously into the right dorsal hind paw. The rat was immediately placed

in a polycarbonate box positioned in front of a mirror for behavior observations. Nociceptive behavior was quantified by counting the time of licking, flinching and lifting of the injected hind paw. The measurements were taken in two phases: on the first phase (neurogenic) were evaluated during the period from 0 to 5 min and on the second phase (inflammatory) from 15 to 30 min after formalin injection. Intrathecal administration of the test agents was performed using a 10 μ L micro syringe containing vehicle (PBS), Ph α 1 β (30–200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (10–200 pmol/site). To assess the preventive or the curative antinociceptive action, drugs were administered 0.16–24 h before or 0.16 h (10 min) after formalin injection.

2.6. Measurements of cerebrospinal fluid (CSF) glutamate levels

Formalin-induced nociception is related with increased levels of excitatory amino acids, as glutamate, in cerebrospinal fluid, CSF [20]. To address this possibility, we examined the effect the Ph α 1 β and ω -conotoxin MVIIA on glutamate levels of CSF after formalin injection. Rats received Ph α 1 β (200 pmol/site) and ω -conotoxin MVIIA (100 pmol/site) 3 h before or 9 min after formalin injection (post-treatment). The rats were killed with halothane 15 min after formalin injection and the CSF was extracted using cistern magna puncture technique. Glutamate measurement was performed enzymatically following the increase in the fluorescence due to the production of NADPH in the presence of glutamate dehydrogenase and NADP⁺ [24]. To start the assay, NADP⁺ (1.0 mM) and glutamate dehydrogenase (50 U) were added to the CSF samples 10 min after the emitted fluorescence was measured [28]. The excitation wavelength was set at 360 nm and the emission wavelength to 450 nm using a PTI spectrofluorimeter.

2.7. Synaptosomal preparation

Synaptosomes were prepared from spinal cord of rats. Male Wistar rats (180–250 g) were decapitated and spinal cord were quickly removed and placed in aerated (with 95% O₂/5% CO₂) ice-cold modified Krebs–Ringer buffer with minor modifications. The spinal cord was dissected from two rats and homogenized in 14 mL of ice-cold 0.32 M sucrose, and the crude synaptosomal pellet (P₂) was prepared by differential centrifugation with 1000g for 5 min followed by 15,000g for 20 min as previously described [17]. Protein was assayed by Bradford method [4].

2.8. Glutamate release in spinal cord synaptosomes

In all synaptosomal experiments, the P₂ pellet was resuspended in 4.5 mL of Krebs–Ringer buffer, aerated with 95% O₂/5% CO₂. For the test, 500 μ L of the synap-

tosomal suspension was diluted with 1500 μ L of Krebs buffer containing 5 μ L containing NADP⁺ (1 mM), glutamate dehydrogenase (50 U) and Ph α 1 β (1.25–7.5 μ M) or ω -conotoxin MVIIA (1.25–7.5 μ M). Toxins were added 100 s before stimulation with 100 μ M capsaicin. This assay relies on generation of NADPH by glutamate dehydrogenase in the presence of glutamate, with NADPH being measured fluorometrically [24]. The excitation wavelength was set at 360 nm and emission wavelength to 450 nm in a PTI spectrofluorimeter.

2.9. Measurement of [Ca²⁺]_i

Synaptosomes were loaded with 5 μ M fura-2 AM (stock solution 1 mM in DMSO) for measurements of intrasynaptosomal free calcium concentration [Ca²⁺]_i in synaptosomes. The assays were performed in a PTI spectrofluorimeter according to Grynkiewicz et al. [11] with minor modifications as previously described [28]. CaCl₂ was added to synaptosomal suspension at the beginning of each fluorimetric assay (1.0 mM final concentration). Synaptosomes were stirred throughout the experiment in a cuvette maintained at 35 °C. Toxins were added to the synaptosomal suspension 100 s prior to stimulation with 100 μ M capsaicin. The [Ca²⁺]_i increase induced by membrane depolarization is strictly dependent on the presence of extracellular Ca²⁺ in these conditions [28].

2.10. Quantification of side effects

The side effects were quantified as previously described [30]. Rats received PBS, Ph α 1 β (200–1000 pmol/site), recombinant Ph α 1 β (200–1000 pmol/site) and ω -conotoxin MVIIA (10–600 pmol/site) by i.t. route and side effects were measured immediately after injection. Rats were placed in an open field 15 min for behavioral observations. A seven-point scale was used to quantify side effects with a maximum of three points for serpentine tail movements and whole body shaking and one point for the presence of allodynia (assessed via a light brushstroke to the flank). For an unrestrained rat, the absence of serpentine tail movements and discernible body shaking resulted in respective score of zero points. Mild serpentine tail movement or slight shaking or trembling of the body was each scored as one point. Moderate serpentine tail movement and whole body shaking with or without splaying of the hind limbs resulted in respective scores of two points. Continuous serpentine tail movement and severe body shaking were given the respective maximum scores of three points.

2.11. Neuropathic pain model

For induction of chronic mononeuropathy, male mice were first anesthetized by intraperitoneal injection

of 90 mg/kg of ketamine plus 3 mg/kg of xylazine hydrochloride. Then, a partial ligation of the right sciatic nerve was made by tying one-third to one-half of the dorsal portion of the sciatic nerve, using a similar procedure to that described by Malmberg and Basbaum [18]. In sham-operated mice, the nerve was exposed without ligation. Seven days after surgical procedure the mechanical sensitivity was measured to confirm the development of allodynia.

The measurement of mechanical paw withdrawal threshold was carried out using the up–down paradigm as described previously by Chaplan et al. [5]. Briefly, mice were first acclimatized (1–2 h) in individual clear Plexiglas boxes (9 × 7 × 11 cm) on an elevated wire mesh platform to allow the access to the plantar surface of the hind paws. von Frey filaments of increasing stiffness (0.02–10 g) were applied to the mice hind paw plantar surface with a pressure causing the filament to bend. Absence of a paw lifting after 5 s led to the use of the next filament with increasing weight, and paw lifting indicated a positive response and led to the use of next weaker filament. This paradigm continued until a total of six measurements or until four consecutive positive or four consecutive negative responses had occurred. The 50% mechanical paw withdraw threshold (PWT) response was then calculated from the resulting scores as described previously by Dixon [7]. The 50% PWT was expressed in grams (g), and was evaluated several times after intrathecal injection of Ph α 1 β .

2.12. Recombinant toxin

2.12.1. Plasmid construction

The coding region for the toxin was produced by PCR. Two overlapping oligonucleotides, T $\times$ 36F (5'-CAT CCC GCG TGG TGA AAT TTG CAC CGA TGA CTG TGA ATG CTG CGG CTG TGA CAA CCA ATG TTA TTG CCC GCC GGG TTC CT-3') and T $\times$ 36R (5'-TTT CTT TTT TAC GGT TAC AAA AAT ATT TAT TTG CAT GTG CAC ACG AGC ATT TAA AGA TAC CCA GCG AGG AAC CCG GCG GG-3'), were used as template for the PCR and two other oligonucleotides PnT $\times$ 36ECOF (5'-AAT TGA ATT CAT CGA GGG AAG GGC TTG CAT CCC GCG TGG-3') and PnT $\times$ 36PSTR (5'-AAT TCT GCA GTT AAG CTT TTT TAC ATT TTT CTT TTT TAC-3') were used as primers of the PCR. Primers were designed using the *Escherichia coli* codon preference and were synthesized by IDT – Integrated DNA Technologies. Amplification reaction contained the template oligonucleotides in a 0.1 μ M concentration, the amplification primers in a 1 μ M concentration, 250 μ M of each deoxynucleotide triphosphate and 2 U of the thermostable recombinant *Taq* polymerase. Each cycle consisted of denaturing the DNA at 94 °C for 1 min, annealing the primers for 1 min at 55 °C, and then

extending the primers at 72 °C for 1 min. This cycle was repeated 40 times. After the final cycle samples were chilled at 4 °C.

The amplification product was purified using the QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen, USA), digested with EcoRI and PstI and cloned into pBADmycHis-C (Invitrogen, Carlsbad, CA 92006, USA). The plasmid obtained (PnT $\times$ 36MycHis) encodes a 10.9 kDa Ph α 1 β recombinant protein which is tagged at the N-terminus with the peptide sequence M D P S S R S A A G T I W E F I E G R and at the C-terminus with the Myc epitope and six histidine residues (Y V E Q K L I S E E D L N S A V D H H H H H H) (Fig. 7). The plasmid was purified using the Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, USA). To ensure that no mutation had been introduced by the polymerase, clones had their sequence determined by automatic sequencing using the dideoxynucleotide chain-termination reaction [33].

2.12.2. Expression and purification of the fusion protein

Escherichia coli (BL21 strain) cells were transformed with PnT $\times$ 36MycHis. Expression of the fusion protein was induced by 0.2% L-arabinose at 37 °C. After 4 h of growth in the presence of L-arabinose, cells were harvested by centrifugation at 4000g for 20 min, suspended in 10 mL of Lysis buffer B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL 61105, USA) and cell debris were removed by centrifugation. The soluble fusion protein was initially affinity-purified from the bacterial lysates using the B-PER 6 $\times$ His Fusion Protein Spin Purification Kit (Pierce, Rockford, IL 61105, USA) and further purified using the Amicon Ultra-4 centrifugal filter device (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

2.13. Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ SEM, ID $_{50}$ values (i.e. the dose of compounds that reduces nociceptive responses to the order of 50% relative to the control value) are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Data were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni, Dunnett or Student–Newman–Keuls when appropriate. Dose–response curves in the hot-plate and formalin tests were analyzed by one-way ANOVA with time treated as a within-subject factor. Post-hoc tests (Dunnett) were carried out when appropriate. The level of significance was set at $P < 0.05$. The percent of antinociception (i.e. % increase latency time to licking their paws or jumping from hot-plate test) was determined for each experimental group using the following formula: (%) antinociception = $100 \times [(\text{experiment} - \text{control}) / \text{control}]$. The percent of maximal inhibition in the formalin test was determined for each experimental group using the following formula (%)

inhibition = $100 \times [(\text{control} - \text{experiment})/\text{control}]$. The ID_{50} and DT_{50} values were determined by non-linear regression analysis using sigmoidal dose–response equation from individual experiments using GraphPad Software 4.0 (GraphPad, USA).

For the *in vitro* experiments, the results were expressed as mean $\pm$ SEM. The data were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls test and the statistical significance criterion was $P < 0.05$.

3. Results

3.1. $Ph\alpha 1\beta$ has antinociceptive effect in rodent models of pain

Initially, we tested $Ph\alpha 1\beta$, and compared its effect with that of ω -conotoxin MVIIA, in an acute model of thermal pain, the hot-plate test. The intrathecal (i.t.) administration of $Ph\alpha 1\beta$ (200 pmol/site) in mice produced a delayed, but long-lasting, antinociceptive action in the hot-plate test, from 3 to 24 h after injection (Fig. 1A and C). The maximum antinociceptive effect ($I_{\max}$) was $81 \pm 6\%$ and the effective dose to produce 50% effect (ED_{50}) was 120 (70–205) pmol/site, 5 h after $Ph\alpha 1\beta$ administration. Comparatively, i.t. administration of ω -conotoxin MVIIA (10 pmol/site) induced

more short-lasting antinociception (from 2 to 5 h), with an $I_{\max}$ of $70 \pm 28\%$ and ED_{50} value of 0.17 (0.013–2.26) pmol/site, 5 h after its injection (Fig. 1B and D). Thus, $Ph\alpha 1\beta$ was less potent than ω -conotoxin MVIIA to induce antinociception in an acute pain model in mice, but its effect was persisted longer than ω -conotoxin MVIIA.

Next, we assessed the effect of $Ph\alpha 1\beta$ in a model of persistent inflammatory pain in rat, the formalin model. The pre-treatment with $Ph\alpha 1\beta$ (200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (100 pmol/site) from 0.16 to 24 h produced antinociception in both neurogenic and inflammatory phases of the formalin test (Fig. 2). Similar to the thermal model, the antinociceptive action of $Ph\alpha 1\beta$ was longer than that of ω -conotoxin MVIIA in the formalin test (lasting 3 and 24 h in the neurogenic and inflammatory phase, respectively, Fig. 2A and B). The antinociceptive action of ω -conotoxin MVIIA in this test lasts only 3 h in both neurogenic and inflammatory pain (Fig. 2C and D). Moreover, $Ph\alpha 1\beta$ was also capable of reducing the second phase of formalin-induced nociception as early as 10 min before formalin administration (Fig. 2B).

When administered before formalin injection (pre-treatment), $Ph\alpha 1\beta$ was as effective and potent as ω -conotoxin MVIIA to produce antinociception (Fig. 3A–D). In the neurogenic phase, the $I_{\max}$ values were

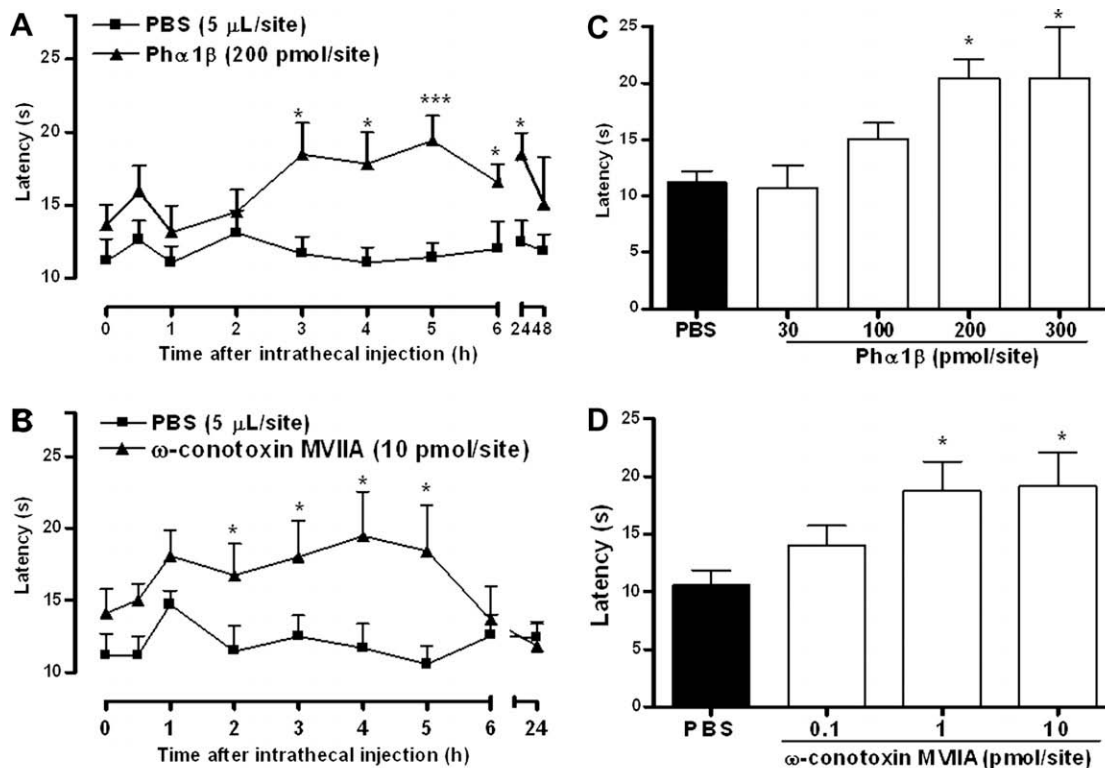


Fig. 1. Time-course (A and B) and dose–response (C and D) curves for the antinociceptive effect produced by intrathecal administration of $Ph\alpha 1\beta$ (A and C) (30–300 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (B) (0.1–10 pmol/site) in the hot-plate test in mice. For dose–response curves, drugs were injected 5 h prior of the test. Data are reported as mean $\pm$ SEM for $n = 12$ –16 per group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to PBS, one- (C and D) or two-way (A and B) ANOVA followed by Student–Newman–Keuls and Bonferroni tests, respectively.

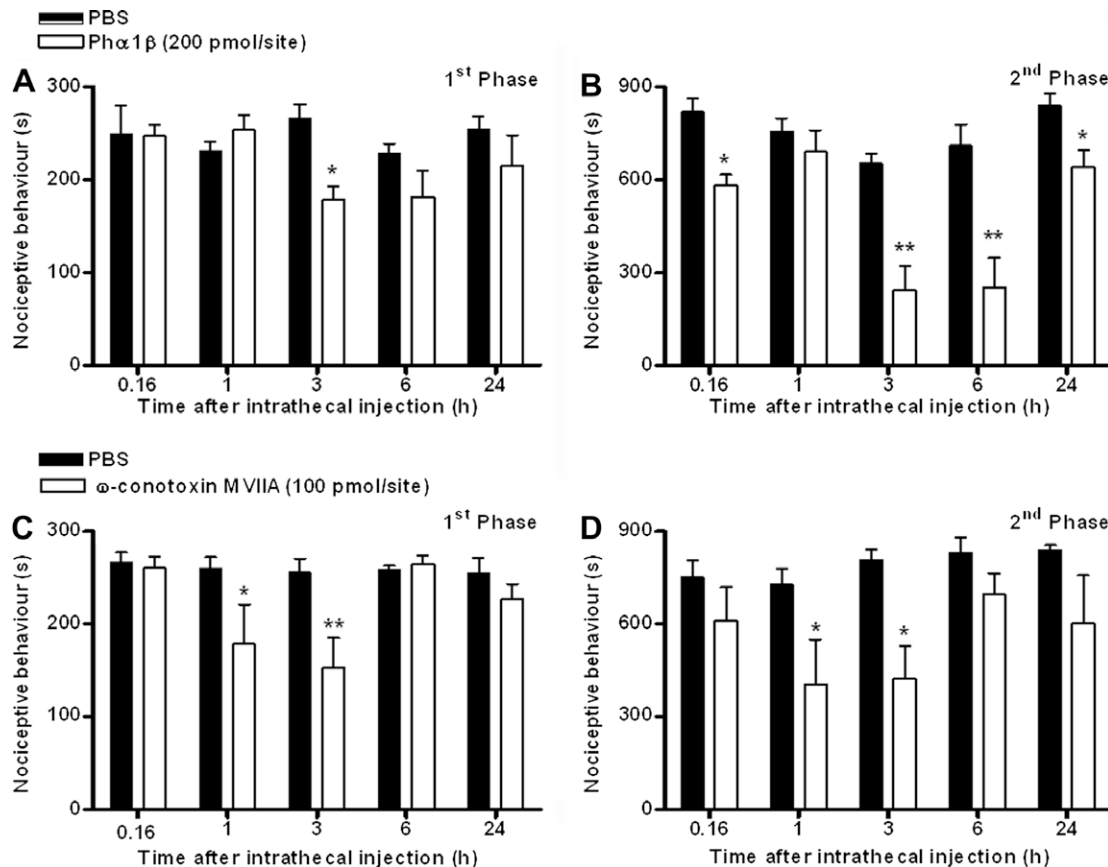


Fig. 2. Time-course curve for the antinociceptive effect produced by intrathecal pre-treatment of Phx1β (200 pmol/site) or ω-conotoxin MVIIA (100 pmol/site) administered from 0.16 to 24 h before formalin injection on neurogenic (A and C) and inflammatory (B and D) phases of the test in rats. Data are reported as mean $\pm$ SEM for $n = 5-8$ per group. * $P < 0.05$, compared to PBS group, two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

55 $\pm$ 15% and 76 $\pm$ 9% for Phx1β (67 pmol/site) and ω-conotoxin MVIIA (200 pmol/site), respectively. In the inflammatory phase of formalin-induced nociception, the $I_{\max}$ values were 67 $\pm$ 9% and 73 $\pm$ 11% and the ID₅₀ values were 48 (25–92) and 63 (27–145) pmol/site for Phx1β and ω-conotoxin MVIIA, respectively. Of note, the post-treatment (administered 9 min after formalin injection) with Phx1β was more effective than and as potent as its pre-treatment, with $I_{\max}$ of 87 $\pm$ 5% and ID₅₀ of 50 (25–75) pmol/site (Fig. 3E). Nevertheless, the efficacy of ω-conotoxin MVIIA was reduced when it was administered after formalin injection with an $I_{\max}$ value of 37 $\pm$ 14% (Fig. 3F). Thus, different from ω-conotoxin MVIIA, Phx1β was more effective to reverse an established nociceptive process.

3.2. The analgesic effect of Phx1β is related to the reduction of glutamate release in spinal cord

In the spinal cord the neurotransmitter glutamate is an important mediator of pain, including that induced by formalin. As previously described [20], formalin injection increases glutamate levels in CSF animals. Both the intrathecal pre and post-treatment with Phx1β (200 pmol/site) almost blocked the increase in CSF glu-

tamate levels induced by formalin in rats, with inhibitions of 78 $\pm$ 6% and 80 $\pm$ 13%, respectively (Fig. 4A and B). Pre-treatment with ω-conotoxin MVIIA was also able to reduce formalin-induced increase CSF glutamate levels, with an inhibition of 74 $\pm$ 17% (Fig. 4C).

We further explored the mechanism of Phx1β action using a spinal cord synaptosomal preparation *in vitro*. When spinal cord synaptosomes were stimulated with capsaicin (100 μ M, to specifically activate the spinal terminals of nociceptors) they release glutamate (Fig. 5A and B). Similar to observed *in vivo*, both Phx1β or ω-conotoxin MVIIA almost abolished capsaicin-evoked glutamate release in a concentration-dependent manner, with a IC₅₀ value of 2.1 (0.8–5.4) and 4.8 (3.0–7.8) μ M, respectively. Moreover, both Phx1β and ω-conotoxin MVIIA partially, but significantly, reduced capsaicin-induced increase of [Ca²⁺]_i in spinal cord synaptosomes (Fig. 5C and D), with observed $I_{\max}$ values of 45 $\pm$ 10% and 51 $\pm$ 4%, respectively.

3.3. Phx1β has antinociceptive effect in a neuropathic pain model

Directed by the analgesic effects in different types of pain measurement observed for Phx1β, we were inter-

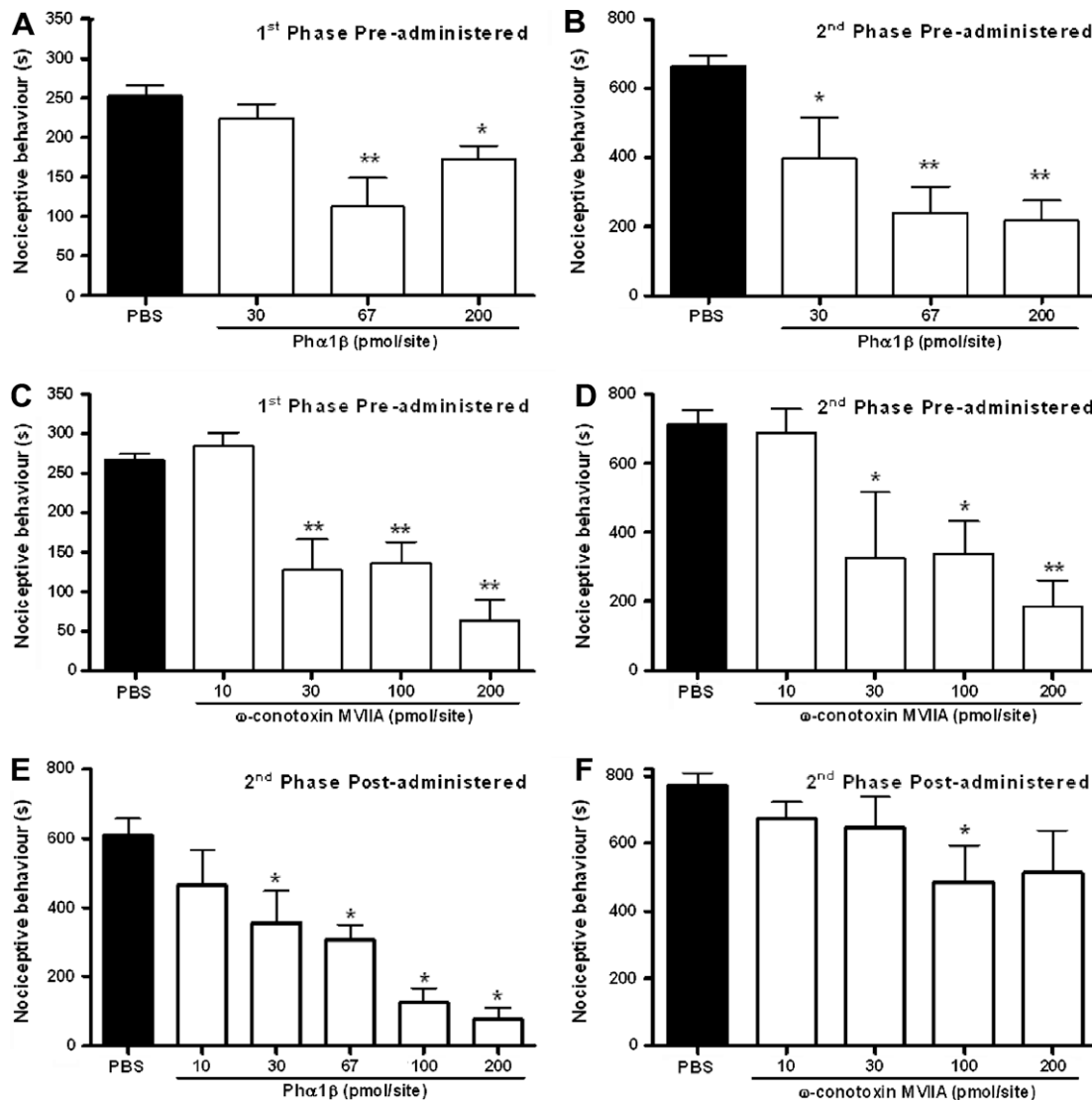


Fig. 3. (A–C) Effect of pre-treatment of Phα1β (30–200 pmol/site) or ω-conotoxin MVIIA (10–200 pmol/site) 3 h prior formalin test on the dose-response during the neurogenic (A and C) and inflammatory (B and D) phases of the formalin test in rat. (D and E) Effect post-treatment of Phα1β (10–200 pmol/site) or ω-conotoxin MVIIA (10–200 pmol/site) 9 min after formalin intraplantar injection in the dose-response curve during inflammatory phase (E and F) of the formalin test in rat. Data are reported as mean ± SEM for $n = 4$ –12 per group. * $P < 0.05$, compared to PBS group, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

ested to learn whether this novel toxin would control neuropathic pain as well. The partial sciatic nerve lesion caused a decrease on paw withdrawal from von Frey filaments measured 7 days after de surgical procedure (the value of 50% PWT diminished from 1.59 ± 0.36 g at baseline to 0.24 ± 0.08 g after lesion in operated group), whereas sham-operated group did not demonstrated tactile allodynia (the value of 50% PWT were 2.17 ± 0.43 and 2.32 ± 0.35 g before and after sham procedure, respectively). The i.t. administration of 30 pmol/site of Phα1β caused a statistically significant anti-allodynic effect from 1 to 4 h after injection (Fig. 6A). Moreover, the i.t. administration of 30 pmol/site of Phα1β did not alter normal mechanical sensitivity of the animals (Fig. 6B).

3.4. Phα1β presents reduced side effects in rodents

We next assessed the possible side effects induced by intrathecal administration of Phα1β in rodents. With doses capable of producing intense antinociceptive effects in mice, Phα1β (200 pmol/site) and ω-conotoxin MVIIA (10 pmol/site) did not alter any parameter in rota-rod, open field and grip force tests in mice (data not shown). We did not detect any alteration in gross behaviors of mice treated with Phα1β (200 pmol/site), but observed that some mice treated with ω-conotoxin MVIIA (10 pmol/site) developed serpentine tail movements. As previously described [19] intrathecal administration with ω-conotoxin MVIIA (10–200 pmol/site) induced dose-related side effects (including serpentine

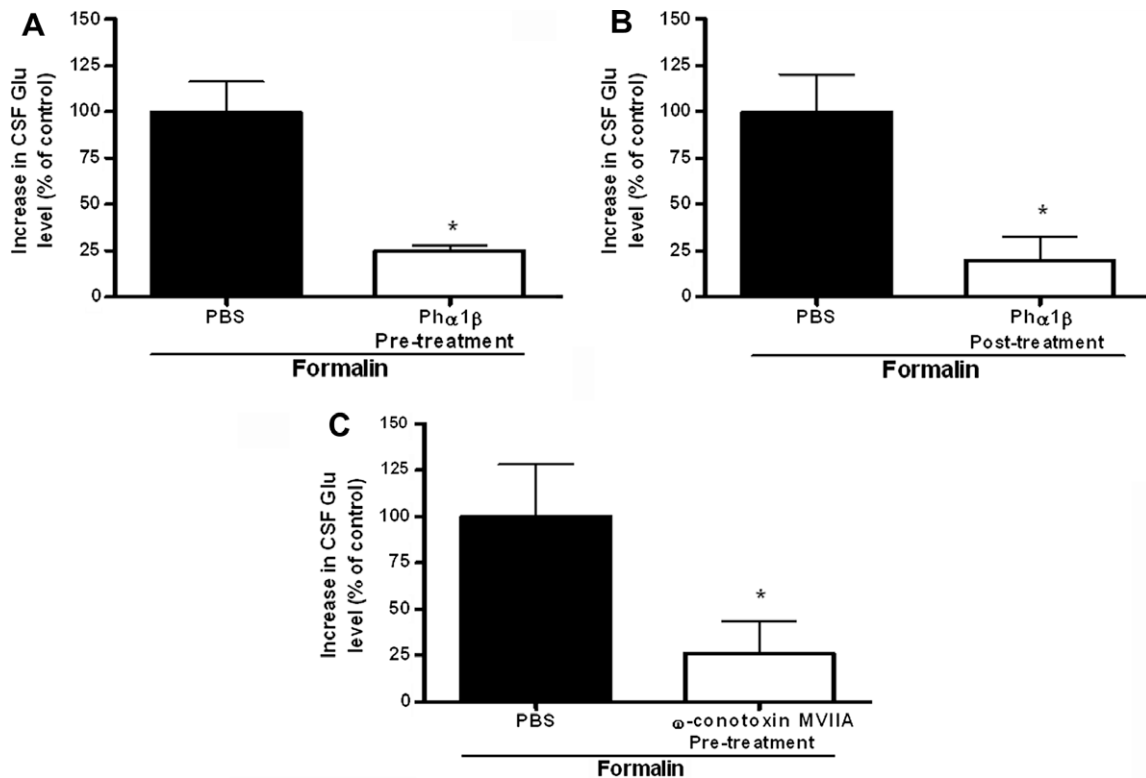


Fig. 4. Glutamate levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of rats pre (A and C) or post-treated (B) with Ph α 1 β (200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (200 pmol/site) in the formalin test. Data are reported as mean $\pm$ SEM for $n = 3$ –4 per group. * $P < 0.05$, compared to PBS group.

tail movements and intermittent mild body shakes) in rats (Fig. 7). These side effects were observed with doses as low as those necessary to induce antinociception in rats (≥ 10 pmol/site), with a DT_{50} value of 287 (147–562) pmol/site. We observed that i.t. treatment with Ph α 1 β also induced side effects in rats, but only with doses higher than that necessary to induce maximal antinociceptive effect (≥ 300 pmol/site) and with DT_{50} value of 788 (485–1278) pmol/site (Fig. 7). When compared with their potencies to reduce the inflammatory phase of formalin-induced nociception in rats, the calculated therapeutic window (DT_{50}/DI_{50}) of Ph α 1 β and ω -conotoxin MVIIA were 16 and 4, respectively.

The intrathecal (i.t.) administration of Ph α 1 β (200 pmol/site) or ω -conotoxin MVIIA (100 pmol/site) in rats caused mild hypotension with recovery to normal values after 3 h (data not shown).

3.5. Recombinant Ph α 1 β possess analgesic effect similar to native toxin

In order to become effective as a therapeutic agent it is necessary to obtain a less limited source for obtaining the toxin. In order to do that, we cloned the cDNA fragment that encodes the mature peptide of the Ph α 1 β into the vector pBADmycHisC (Invitrogen, USA) and used this construct to produce a recombinant Ph α 1 β in the bacteria *E. coli*. The recombinant Ph α 1 β , a 10,894 kDa

peptide, is tagged at the N-terminus with a peptide 19 amino acid residues long and at the C-terminus with a peptide 23 amino acid residues long, which include the Myc epitope and six histidine residues (Fig. 8A). Immunoblot analysis shows that recombinant Ph α 1 β can be specifically recognized by horse polyclonal antibodies against *P. nigriventer* total venom (Fig. 8B).

We used the formalin test for the initial evaluation of whether the recombinant toxin would be functional. As can be observed in Fig. 8C, recombinant Ph α 1 β (200 pmol/site) was as effective as native toxin to produce analgesic effect in the inflammatory phase of formalin-induced pain.

4. Discussion

Here we introduce a novel pharmacological agent for the control of pain, the Ph α 1 β toxin, previously shown to be reversibly blocker of high-voltage VSCCs. Although the toxin seems to show some preference N-type channels among the HVA Ca^{2+} channel subtypes tested, higher concentrations do interfere with other subtypes [34]. Our results show that in animal models Ph α 1 β presents a number of advantages when compared to the clinically used ω -conotoxin MVIIA.

Insults in peripheral tissues, such as skin, joints and viscera, release several algogenic mediators that in turn activate nociceptors and sensitize them for other painful

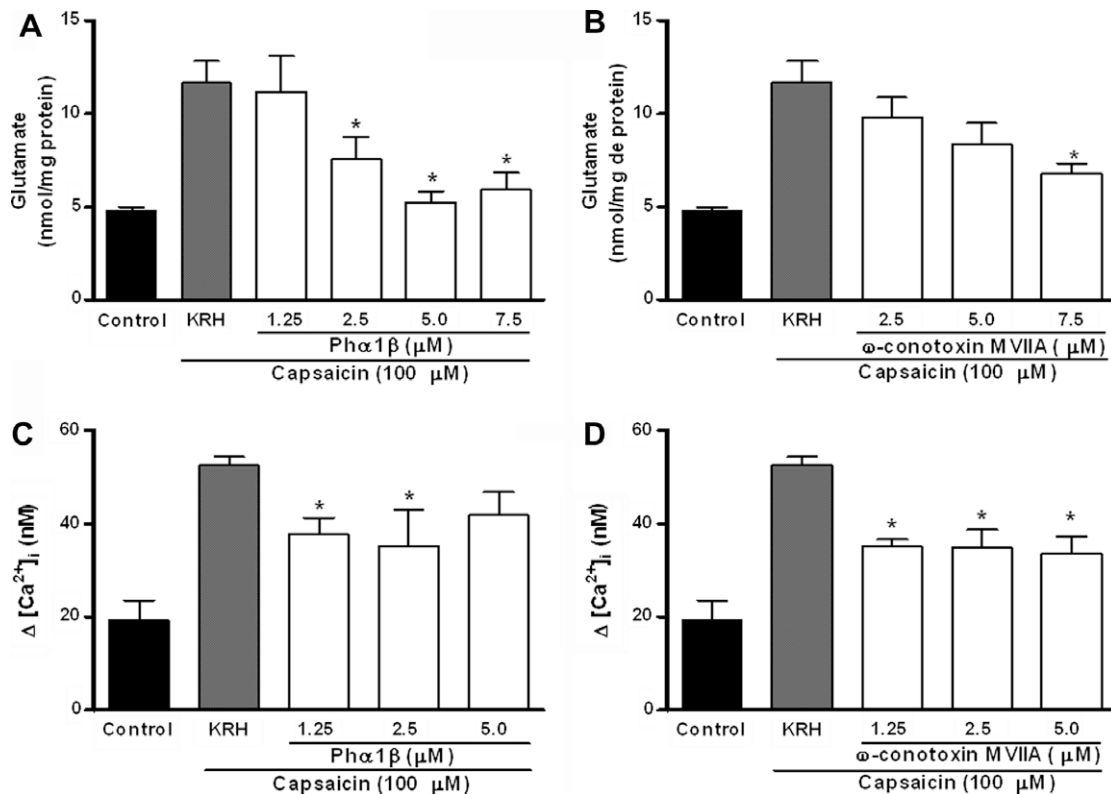


Fig. 5. The effect of Phα1β and ω-conotoxin MVIIA (1.25–7.5 μM) in capsaicin-stimulated glutamate release (A and B) or [Ca²⁺]_i increases (B and D) rat spinal cord synaptosomes. Data are reported as mean ± SEM for *n* = 3–6 per group. **P* < 0.05, compared to KRH group, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

stimulus. Activation of nociceptors in the periphery produces messages which converge in the dorsal horn of the spinal cord which process the nociceptive information and project it to the cerebral cortex via a relay in the thalamus, eliciting pain [38]. There is convincing evidence by pharmacological, electrophysiological and molecular biology studies indicating that VSCC, especially from the N-type, exert a critical role in controlling nociceptive processes in the spinal cord [2,29,31].

The present study shows that a novel antagonist of high threshold VSCCs administered into lumbar intrathecal space was capable to induce potent antinociceptive effect on the classical tests for measuring acute and persistent pain. The formalin test is useful for examining possible effects on acute nociception versus persistent pain, because it produces a biphasic behavioral response with a well-resolved transition from acute pain to a more persistent pain state. The first phase of which is a measure of the direct activation of nociceptors and the second phase reflects ongoing peripheral input acting on dorsal horn neurons sensitized by the input arising in the first phase [14]. Hence, Phα1β is capable of reducing pain in both normal and early sensitized spinal nociceptive transmission with a long-lasting course for its antinociceptive effect. Of particular interest from a clinical point of view is the observation that Phα1β not only pre-

vented phase-2 behavior when administered before formalin injection, but it also reversed phase-2 behavior when it was administered after formalin injection. These observations raise the possibility that, with respect to persistent clinical pain states, Phα1β might be useful not only for pre-emptive analgesia (when pain can be anticipated, in example postsurgical pain), but also for the more common situation in which treatment is sought long after the pain state has been established [21]. ω-Conotoxin can also reverse an established pain, but it is less potent and efficacious than Phα1β to produce such effect. Further studies are needed to assess possible antinociceptive effects of Phα1β in other clinically relevant models of pain.

Phα1β or ω-conotoxin MVIIA also produce a potent analgesic effect in the hot-plate, a test that represents a model of acute thermal pain where tissue injury does not occur. The low potency of Phα1β compared with ω-conotoxin MVIIA to produce analgesia in the hot-plate test could be an interesting characteristic, since acute thermal pain has an important physiological protective function in the preservation of living organisms and its block in some circumstances should be avoided.

N-type VSCCs in the spinal cord have an important role modulating the release of key pro-nociceptive neurotransmitters, such as glutamate. In agreement with

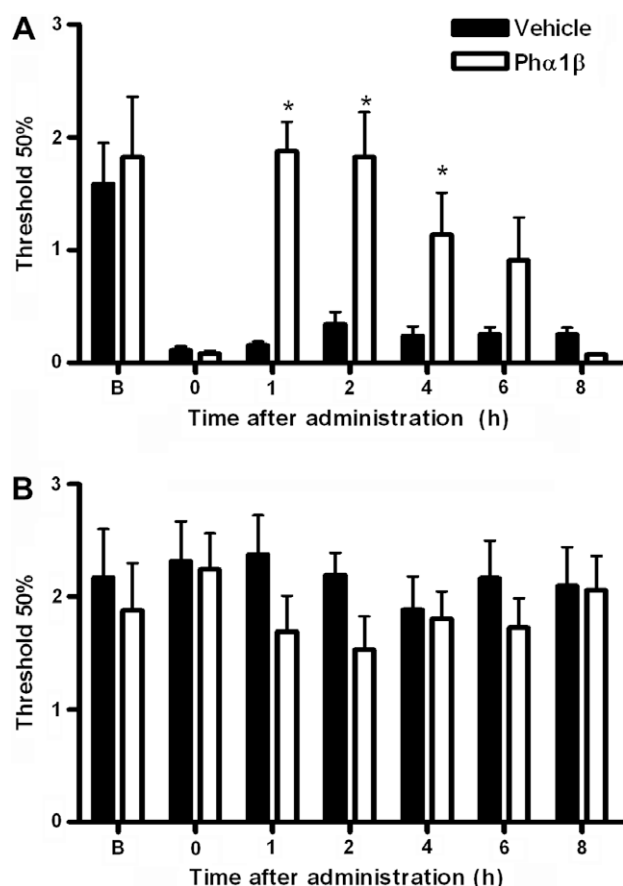


Fig. 6. (A) Effect intrathecal (i.t.) administration of Ph α 1 β (30 pmol/site) on the mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve injury in mice. The effects of Ph α 1 β are expressed as 50% paw withdraw threshold. (B) Effect of i.t. administration of Ph α 1 β (30 pmol/site) normal mechanical sensitivity in mice. Each point represents the mean of 6–7 animals and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with PBS-treated group. Statistical analysis was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, * $P < 0.05$.

the behavioral data, both toxins were able to reduce glutamate overspill in CFS in response to formalin treatment, an effect likely caused by the efficient inhibition

of evoked glutamate release from nerve terminal due to inhibition of calcium influx. Moreover, in isolated nerve terminals obtained from the spinal cord, both toxins blocked glutamate release evoked by capsaicin. The stimuli used for these *in vitro* investigations, capsaicin, activates nociceptors, strongly suggesting that the effect of the toxins is related to their ability to inhibit glutamatergic release. Interestingly, Ph α 1 β presented potency about 3 times higher than ω -conotoxin MVIIA to block the evoked release of glutamate. Furthermore, our results agree with previous findings demonstrating that N-type calcium channels could be preferentially coupled to the release of glutamate in the enhanced nociceptive transmission at the spinal level following formalin inflammation [10]. Thus, the decrease in neurotransmitter release from the presynaptic terminals by the reduction of calcium influx would reduce the activity of the dorsal horn neurons and thereby increase the threshold for nociceptive response.

Injury to peripheral nerves often results in a persistent neuropathic pain condition that is characterized by spontaneous pain, hyperalgesia and allodynia [18,37]. Injury to the nerve can produce changes in dorsal horn function and pain. This facilitated processing may be mediated in part by voltage-sensitive calcium channels (see [40] for review). Convergent observations obtained in a variety of pre-clinical models have emphasized the anti-hyperalgesic and anti-allodynic effects resulting from the block of the high-voltage-activated N-type and low-voltage-activated T-type voltage-sensitive channels at the spinal level. Studies with antagonists for the P/Q- and the L-type channels have shown low efficacy. Accordingly, we have found that intrathecal injection of Ph α 1 β was capable of reversing nerve injury-induced mechanical allodynia. This is an important finding since the available analgesic drugs often have limited therapeutic value in the management of neuropathic pain and they may, in fact, represent a risk to the patient due to their common side effects [37].

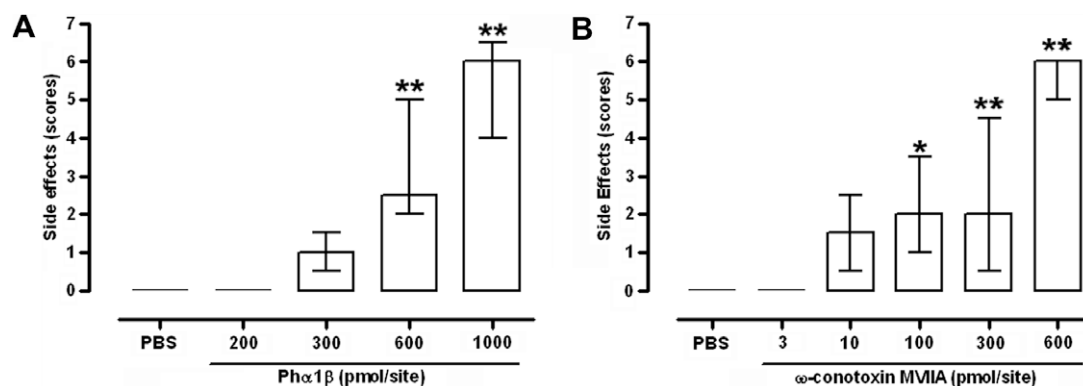


Fig. 7. Side effects produced by intrathecal administration of Ph α 1 β (200–1000 pmol/site, (A) or ω -conotoxin MVIIA (3–600 pmol/site, (B) in rats. Data are reported as median $\pm$ quartiles for $n = 3$ –6 per group. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared to PBS, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

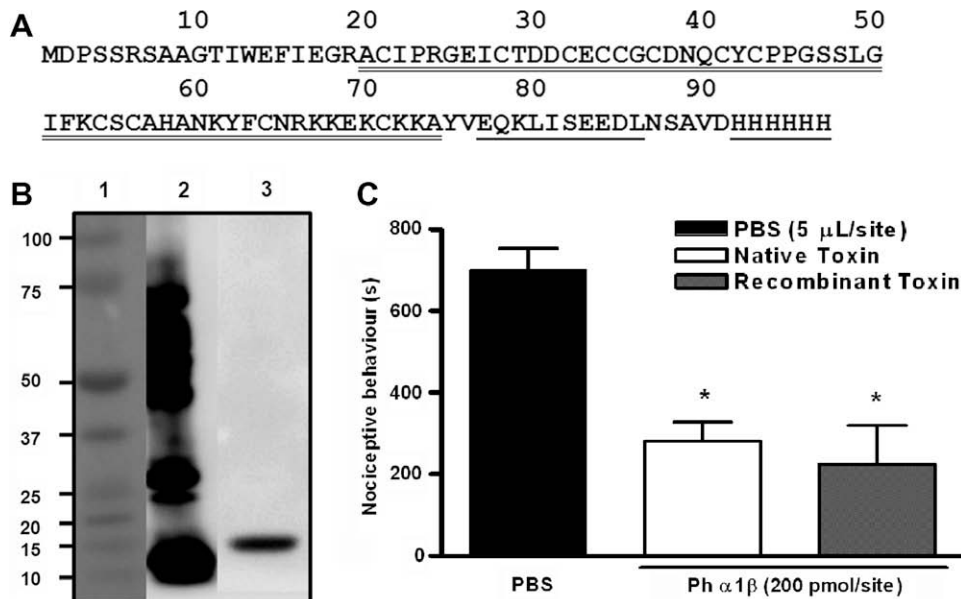


Fig. 8. Recombinant Ph α 1 β also produces analgesic effects in the formalin test. (A) Amino acid residues sequence of recombinant Ph α 1 β purified from bacterial extracts. The 55 amino acid residues long peptide that corresponds to the mature toxin purified from the spider venom is double underlined. The myc epitope sequence and the six histidine residues at the C-terminal end of the peptide were underlined. (B) Immunoblot analysis of purified fraction of recombinant Ph α 1 β . Lane 1: molecular weight marker, size of the bands is indicated on the left. Lane 2: 1.5 μ g of *P. nigriventer* total venom. Lane 3: sample of purified recombinant Ph α 1 β . (C) Effect of post-treatment with native or recombinant Ph α 1 β (200 pmol/site) during inflammatory phase of the formalin test in rat. Data are reported as mean $\pm$ SEM for $n = 3$ –5 per group. * $P < 0.05$, compared to PBS group, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

It has been shown that intrathecal injection of ω -conotoxins in rats consistently caused serpentine tail movements and whole body shaking, suggestive of cerebellar-related motor alterations [19,30,31]. Furthermore, serpentine tail movements and whole body shaking could be rarely detected in mice, a result that we have reproduced (not shown). As ziconotide can produce side effects in human, these results suggest that rats are more sensitive and perhaps more predictive to detect side effects of VSCC blockers injected intrathecally.

It is noteworthy that Ph α 1 β is capable of producing maximal analgesia with doses in which it did not induce potential side effects. In contrast, the maximal analgesia induced by ω -conotoxin MVIIA could only be observed in doses that caused severe side effects. These findings suggest that, different from ω -conotoxin MVIIA, dose-titration with Ph α 1 β in a clinical setting could be possible. Thus, Ph α 1 β has a higher therapeutic index and may have superior efficacy for the relief of pain that could enable its use in a clinical setting. However, more pre-clinical and toxicological tests must be conducted prior to the use of Ph α 1 β in humans. In this respect, the fact that we were able to obtain a functional recombinant Ph α 1 β that produces a response similar to that of the native toxin may facilitate future pre-clinical and clinical studies.

The better analgesic profile of Ph α 1 β compared with ω -conotoxin MVIIA (i.e. lower potency in acute physio-

logical pain, greater potency in persistent pathological pain and larger therapeutic window) can be explained by several factors, including different affinities of toxins for the activated states or splice variants of N-type VSCCs and binding in other types of VSCCs [1,16,36]. In fact, different from ω -conotoxin MVIIA, Ph α 1 β also can act on other types of VSCCs that are involved in pain transmission in the spinal cord, such as P/Q, R and L, that could improve its analgesic action [34]. Since our previous electrophysiological study was only focused in VSCCs, we cannot exclude a role for other ion channels, such as TRP or ionotropic glutamate receptors, in the antinociceptive response caused by Ph α 1 β . Further, studies must be carried out to elucidate this point. The present study demonstrates that both native as well as the recombinant Ph α 1 β have analgesic effect in rodent models of pain, suggesting that this toxin has the potential to be used as a drug in the control of persistent pathological pain.

Acknowledgements

Supported by Instituto do Milenio MCT/CNPq, Capes, Pronex and Fapemig. The authors A.H.S., J.F., M.N.C., L.B.V., M.R., M.A.M.P., V.F.P. and M.V.G. declare they have deposited a patent covering the use of Ph α 1 β for pain management.

References

- [1] Altier C, Dale CS, Kisilevsky AE, Chapman K, Castiglioni AJ, Matthews EA, et al. Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *J Neurosci* 2007;27:6363–73.
- [2] Altier C, Zamponi GW. Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:465–70.
- [3] Bowersox SS, Gadbois T, Singh T, Pettus M, Wang YX, Luther RR. Selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, SNX-111, produces spinal antinociception in rat models of acute, persistent and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:1243–9.
- [4] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [5] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55–63.
- [6] Cordeiro Mdo N, de sueiredo SG, Valentim Ado C, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J, et al. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon* 1993;31:35–42.
- [7] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980;20:441–62.
- [8] Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161–74.
- [9] Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:579–88.
- [10] Gruner W, Silva LR. Omega-conotoxin sensitivity and presynaptic inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. *J Neurosci* 1994;14:2800–8.
- [11] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440–50.
- [12] Guatimosim C, Romano-Silva MA, Cruz JS, Beirao PS, Kalapothakis E, Moraes-Santos T, et al. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol* 1997;122:591–7.
- [13] Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 1980;67:313–6.
- [14] Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 2001;8:1–10.
- [15] Kristipati R, Nadasdi L, Tarczy-Hornoch K, Lau K, Miljanich GP, Ramachandran J, et al. Characterization of the binding of omega-conopeptides to different classes of non-L-type neuronal calcium channels. *Mol Cell Neurosci* 1994;5:219–28.
- [16] Lewis RJ, Nielsen KJ, Craik DJ, Loughnan ML, Adams DA, Sharpe IA, et al. Novel omega-conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J Biol Chem* 2000;275:35335–44.
- [17] Li X, Eisenach JC. Alpha2A-adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:939–44.
- [18] Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 1998;76:215–22.
- [19] Malmberg AB, Yaksh TL. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J Neurosci* 1994;14:4882–90.
- [20] Malmberg AB, Yaksh TL. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 1995;15:2768–76.
- [21] Mathur SV. Ziconotide: a new pharmacological class of drug for the management of pain. *Semin Anesth* 2000;19:67–75.
- [22] Mestre C, Pelissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschaliere A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994;32:197–200.
- [23] Miljanich GP, Ramachandran J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:707–34.
- [24] Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 1987;49:50–7.
- [25] Penn RD, Paice JA. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. *Pain* 2000;85:291–6.
- [26] Prado MA, Guatimosim C, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J* 1996;314:145–50.
- [27] Reis HJ, Prado MA, Kalapothakis E, Cordeiro MN, Diniz CR, De Marco LA, et al. Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J* 1999;343:413–8.
- [28] Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J* 1993;296:313–9.
- [29] Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, et al. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *EMBO J* 2001;20:2349–56.
- [30] Smith MT, Cabot PJ, Ross FB, Robertson AD, Lewis RJ. The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. *Pain* 2002;96:119–27.
- [31] Snutch TP. Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age. *NeuroRx* 2005;2:662–70.
- [32] Staats PS, Hekmat H, Staats AW. The psychological behaviorism theory of pain and the placebo: its principles and results of research application. *Adv Psychosom Med* 2004;25:28–40.
- [33] Takahashi T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 1993;366:156–8.
- [34] Vieira LB, Kushmerick C, Hildebrand ME, Garcia E, Stea A, Cordeiro MN, et al. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:1370–7.
- [35] Wang YX, Bezprozvannaya S, Bowersox SS, Nadasdi L, Miljanich G, Mezo G, et al. Peripheral versus central potencies of N-type voltage-sensitive calcium channel blockers. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1998;357:159–68.
- [36] Winquist RJ, Pan JQ, Gribkoff VK. Use-dependent blockade of Cav2.2 voltage-gated calcium channels for neuropathic pain. *Biochem Pharmacol* 2005;70:489–99.
- [37] Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999;353:1959–64.
- [38] Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000;288:1765–9.
- [39] Woolfe G, MacDonald A. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1944;80:300–7.
- [40] Yaksh TL. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J Pain* 2006;7:S13–30.
- [41] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.