

ABSTRACT

The toxin Tx3-1 purified from the spider venom *Phoneutria nigriventer* is a blocker of potassium channels with great pharmacological potential. However the purification of the toxin from *Phoneutria nigriventer* crude venom is a long and expensive process. The objective of this work was standardize techniques of molecular biology that would allow the expression and purification in large scale of functional recombinant Tx3-1.

We cloned and expressed the toxin Tx3-1 tagged to the C-terminus of the maltose binding protein (MBP) in the cytoplasm of *E. coli* BL21. The hybrid protein purification was performed by affinity chromatography (amylase column). After purification, MBP-TX3-1 was cleaved by Factor Xa and recombinant Tx3-1 was purified by gel filtration using Superdex 75 column in FPLC system. Both, fusion protein MBP/Tx3-1 and recombinant Tx3-1 reacted with anti-*Phoneutria nigriventer* venom antibodies.

The biological activity of recombinant toxin Tx3-1 was tested in biological assays and compared to native toxin biological activity. In experiments using rat's cardiomyocytes, recombinant Tx3-1 toxin was able to increase the calcium transient in 20%, similarly to native toxin. Treatment of isolated rat hearts and atriums with recombinant Tx3-1, and native toxin, led to decrease in arrhythmia. These data suggest that the recombinant and native Tx3-1 probably present the same three-dimensional structure and function. These results open up the possibility of using the recombinant Tx3-1 to determine the molecular structure and action mechanisms of Tx3-1. Moreover, the recombinant protein enables the possibility of using the toxin Tx3-1 as a therapeutic drug for prevention and treatment of heart's diseases.

A toxina Tx3-1 purificada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, é um bloqueador de canais de potássio, com grande potencial farmacológico. Porém a purificação dessa toxina a partir do veneno total da aranha *Phoneutria nigriventer* é um processo longo e dispendioso. O objetivo desse trabalho foi padronizar técnicas de biologia molecular que permitissem a expressão e purificação de grandes quantidades da toxina Tx3-1 recombinante com características funcionais semelhantes à da proteína nativa.

Nós clonamos e expressamos a toxina Tx3-1 como um híbrido ligado a proteína ligadora de maltose (MBP) no citoplasma de *E.coli* BL21. Após purificação desta proteína híbrida por cromatografia de afinidade (coluna de amilose), a MBP-TX3-1 foi clivada por Fator Xa e a Tx3-1 recombinante foi purificada por gel filtração em coluna Superdex 75 em Sistema FPLC. Tanto a proteína de fusão MBP/Tx3-1 quanto a Tx3-1 recombinante reagiu com anticorpos antiveneno total da aranha *Phoneutria nigriventer*, indicando que a toxina foi clonada em fase de leitura correta.

A atividade biológica da toxina Tx3-1 recombinante foi testada em ensaios biológicos e comparada com a atividade da toxina nativa. Semelhantemente à toxina nativa, em ensaios utilizando cardiomiócitos de rato a toxina Tx3-1 recombinante foi capaz de aumentar a amplitude do cálcio transiente em 20%, quando comparada ao controle. Em ensaios com coração e átrios isolados de rato, a Tx3-1 recombinante apresentou efeito semelhante ao da Toxina Tx3-1 nativa, na redução do tempo de arritmia. Esses dados sugerem que a toxina Tx3-1 recombinante e a nativa apresentam a mesma estrutura tridimensional e abrem a possibilidade de utilizarmos a Tx3-1 recombinante para determinação da estrutura molecular da toxina e também para obter detalhes sobre o mecanismo molecular da ação da toxina. Além disso, a Tx3-1 recombinante viabiliza a possibilidade de utilização da toxina Tx3-1 como agente terapêutico para prevenção e tratamento de distúrbios cardíacos.