

Clonagem e expressão de toxina de interesse farmacológico

Milena de Mello Campos Leinmueller e Nanci do Nascimento
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

Os venenos ofídicos são considerados os fluídos secretórios de vertebrados mais concentrados de que se tem notícia [1]. Estas peçonhas tem despertado um grande interesse pela riqueza de substâncias bioativas com potencial aplicação no desenvolvimento de novos fármacos. Em experimentos recentes, isolamos uma fosfolipase A2 do veneno de *Bothrops erythromelas* (jararaca da seca). Muito pouco se sabe a respeito dos componentes deste veneno e de seu modo de ação. Por se tratar de um animal de pequeno porte e de difícil captura e manutenção em cativeiro, o veneno é escasso, dificultando estudos mais aprofundados sobre seus componentes. Em experimentos preliminares com a toxina supracitada, que constitui menos de 2% do peso seco do veneno, pudemos observar que a mesma tem potente ação inibitória sobre a agregação plaquetária. Estudos pormenorizados da toxina e de seu modo de ação poderiam levar ao desenvolvimento de drogas anti-trombóticas. No entanto, em razão da já referida escassez do veneno, tais estudos são praticamente inviáveis. Uma alternativa seria a produção da toxina por meio de técnicas de DNA recombinante.

OBJETIVO

Isolar, clonar e sequenciar o cDNA que codifica para a fosfolipase A2 do veneno de *B. erythromelas*, visando a sua expressão em *Escherichia coli*.

METODOLOGIA

Após transformação de bactérias DH5 α eletrocompetentes com uma alíquota de uma biblioteca de cDNA de glândula de veneno de *B. erythromelas*, clones isolados foram aleatoriamente selecionados para sequenciamento. O sequenciamento foi realizado em um seqüenciador automático (Applied Biosystems) usando o kit Big Dye

do mesmo fabricante. As seqüências geradas foram confrontadas com o banco de dados Genbank, permitindo a identificação dos clones positivos. Em uma segunda etapa, a região codante foi subclonada por reação de polimerase em cadeia (PCR) para inserção no vetor de expressão pET 24, utilizando primers apropriados. Estes primers foram desenhados de forma a inserir extremidades coesivas, permitindo a clonagem direcional do inserto. Foi também adicionado um códon iniciador (ATG) na posição -1. Esta construção foi então inserida em bactérias DH5 α e os transformantes foram selecionados em placas de meio LB agar contendo kanamicina.

RESULTADOS

Após sequenciamento, pudemos observar que, de forma similar a outras fosfolipases de serpentes já descritas, o cDNA é constituído de uma região 5' não traduzida (UTR), seguido de um peptídeo sinal de 16 aminoácidos, da região que codifica para a proteína madura (363 pb), um códon de parada e uma região 3' não traduzida. De acordo com os bancos de dados, esta arquitetura é comum a todas as fosfolipases A2 de serpentes até hoje seqüenciadas. Cabe ressaltar ainda, que as regiões não traduzidas apresentaram maior grau de homologia que a região codante. No presente momento, estamos realizando o sequenciamento do cDNA inserido no vetor de expressão, visando identificar eventuais erros de incorporação durante o PCR. Confirmada a exatidão da seqüência, esta construção será inserida em *E. coli* BL21, para obtenção da toxina recombinante.

CONCLUSÕES

No presente trabalho, isolamos o cDNA que codifica para uma toxina do veneno de *B. erythromelas* com potente ação anti-agregante. Este cDNA se mostrou homólogo

em sua arquitetura àqueles já descritos para outras serpentes. Cabe ainda ressaltar que esta toxina é a segunda cuja seqüência se conhece para esta serpente. Em experimentos futuros, pretendemos obter a toxina recombinante em quantidades suficientes para a sua caracterização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]STOCKER,K. F.-Medical of snake venom proteins CRC press. Composition of snake venoms. P. 34-50, 1990.

APOIO FINANCEIRO

CNPq/PIBIC