



B0104

ANÁLISE ESTRUTURAL DA PROTEÍNA EFHC1, RELACIONADA À EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL

André Henrique Zamboni (Bolsista FAPESP), Marcelo J. Murai, Prof. Dr. Ricardo Aparício (Colaborador) e Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes (Orientadora), Faculdade de Ciências Médicas - FCM, UNICAMP

A Epilepsia Mioclônica Juvenil (EMJ) representa 7% a 9% de todas as epilepsias. A região 6p12-p11 do cromossomo 6 humano foi identificada como responsável pela doença. Análises de interação da proteína EFHC1 com canais de cálcio voltagem-dependente revelaram que a primeira aumenta o influxo de cálcio pelo canal, acarretando, dessa forma, morte celular programada. O objetivo do trabalho é clonar o gene EFHC1 com a cauda de fusão SUMO, expressar e purificar a porção C-terminal da proteína EFHC1, para posterior análise estrutural da mesma. Amplificou-se o gene por PCR, a partir de cDNA total de hipocampo humano. Os produtos foram purificados e clonados em vetor pETSUMO (Invitrogen). Verificou-se a presença de clones positivos por digestão enzimática. Dois clones foram selecionados para os testes de expressão. Transformou-se a cepa BL21(DE3) juntamente com o plasmídeo pRARE. Obteve-se proteína solúvel e pura utilizando-se cromatografia de afinidade através da resina Ni-NTA (Qiagen). Nos testes de clivagem com a protease SUMO 1, a eficiência da reação foi próxima de 95%, e a proteína não precipitou após a separação da cauda solubilizadora. Para separação da cauda SUMO, passou-se a reação por uma segunda coluna de afinidade (Ni-NTA), obtendo-se pureza superior a 95%. Serão realizados estudos estruturais, como caracterização do estado conformacional através de técnicas espectroscópicas como DLS e CD, além de SAXS, afim de se construir um modelo de baixa. Adicionalmente, testes cristalográficos serão realizados com essa porção da proteína. Também estão em andamento testes de clonagem, expressão e purificação de construções contendo o N-terminal da EFHC1.

EMJ - EFHC1 - Caracterização protéica