

# PURIFICAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA HSP90 COM O INIBIDOR NOVOBIOCINA, UM ALVO MOLECULAR NO COMBATE

## AO CÂNCER

Lopes, G. O.<sup>1</sup>; Gava L. M.<sup>1,2</sup>; e Ramos C. H. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química; <sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Biologia

Funcional e Molecular, Universidade de Campinas.

Palavras-chave: chaperonas, inibidor novobiocina

E-mail: gilce.lopes@gmail.com

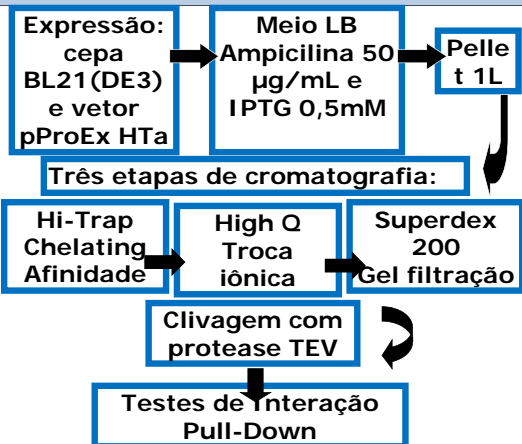


### INTRODUÇÃO

A família da chaperona molecular HSP90 (Heat shock protein) está envolvida na sinalização celular, proliferação, e sobrevivência do organismo e é ubiquamente expressa nas células. Muitas proteínas envolvidas no câncer são dependentes da HSP90 para manutenção de sua estabilidade, re-enovelamento e maturação. A inibição da Hsp90 parece atingir unicamente proteínas clientes envolvidas com a manutenção do fenótipo tumoral. Por isso, a Hsp90 tem sido um alvo promissor no tratamento dessa doença.

Apresentamos a purificação do domínio C-terminal da Hsp90α humana e os testes iniciais de ligação com novobiocina. A presença da novobiocina parece afetar tanto a estabilidade, como investigado por denaturação térmica e a estrutura, investigada por técnicas que fornecem informações sobre a estrutura secundária.

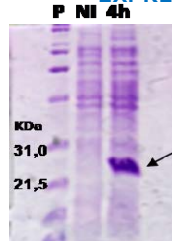
### MATERIAL E MÉTODO



### AGRADECIMENTOS

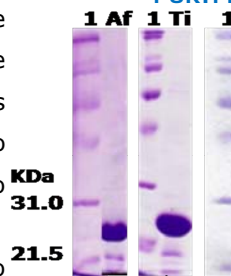
### RESULTADOS

#### EXPRESSION DA HSP90



**Fig. 1:** SDS-Page 12% - Expressão da proteína Hsp90(C90), evidenciada pela seta. P- Padrão Broad Range (Bio-Rad) NI - Não induzido

#### PURIFICAÇÃO DA HSP90

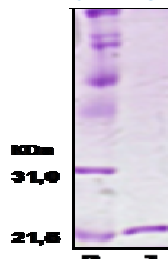


**Fig. 2 :** SDS-Page 15% Três etapas cromatográficas

1 - Padrão Broad Range (Bio-Rad) Af - Depois da afinidade Ti - Depois da troca iônica Gf - Depois da gel filtração

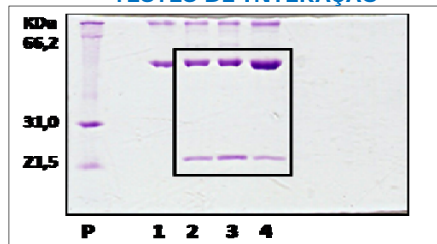
A proteína apresentou-se com alto grau de pureza ao final destes processos. A gel filtração foi necessária para separar os agregados.

#### CLIVAGEM COM PROTEASE TEV

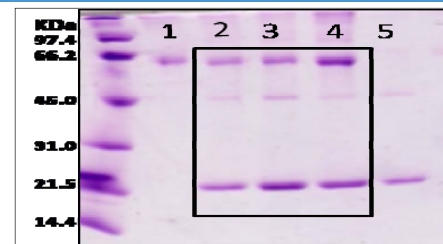


**Fig.3:** SDS-Page 12% Clivagem da cauda de histidina da proteína Hsp90(C90) utilizando protease TEV. P - Padrão Broad Range (Bio-Rad); 1 - Proteína Hsp90(C90) sem cauda de histidina;

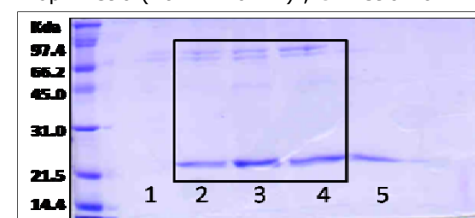
#### TESTES DE INTERAÇÃO



**Fig.4:** SDS-PAGE 15% Pull-Down da Tom 70 com o Hsp90(C90) P - Padrão Broad Range (Bio-Rad); 1 - Tom 70 (10 mM); 2- Tom 70 + C90 (10mM:10mM); 3 - Tom 70 + C90 (10mM:20mM); 4 - Tom 70 + C90 (20mM:10mM)



**Figura 5:** SDS-PAGE 15% Pull-Down da Hop 70 com Hsp90(C90) na presença do inibidor novobiocina. Padrão Broad Range (Bio-Rad); 1 - Hop 10mM; 2 - Hop + C90 (10mM:10mM); 3 - Hop + C90 (10mM:20mM); 4 - Hop + C90 (20mM:10mM); 5 - C90 10mM



**Fig. 5:** SDS-PAGE 15% Pull-Down da Hsp 70 com Hsp90(C90) na presença do inibidor novobiocina. Padrão Broad Range (Bio-Rad); 1 - Hsp 70 10mM; 2 - Hsp 70+ C90(nov) (10mM:10mM); 3 - Hsp 70 + C90(nov) (10mM:20mM); 4 - Hsp 70 + C90(nov) (20mM:10mM); 5 - C90(nov) 10mM

A presença de uma banda no poço 5 na altura da Hsp90(C90), nos géis das figuras 5 e 6, talvez se deva ao fato das lavagens ainda serem inadequadas. O experimento está em andamento e precisa ser padronizado.

### CONCLUSÃO

- Hsp90 foi eficientemente purificada, como mostrado por SDS-PAGE, pelas três etapas cromatográficas com alto grau de pureza.

- Houve interação entre o C-terminal da Hsp90 e a proteína Tom, como mostra a presença das duas proteínas na gel e a ausência delas nos controles. .

- Os testes realizados com Hsp70, Hop e o inibidor Novobiocina, ainda estão em andamento.

### BIBLIOGRAFIA

GAVA, L.M. & RAMOS, C.H.I.(2009) Human 90 kDa heat shock protein Hsp90 as a target for cancer therapeutics. *Curr. Chem. Biol.* 3, 330-341.