



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Jéssica Andrade Tedesco

Caracterização biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua
dinâmica de interação

São José do Rio Preto

2019

Jéssica Andrade Tedesco

Caracterização biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua
dinâmica de interação

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação de Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

São José do Rio Preto

2019

T256c Tedesco, Jéssica Andrade
Caracterização Biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua
dinâmica de interação / Jéssica Andrade Tedesco. -- São José do Rio Preto,
2019
75 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto
de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Fernando Alves de Melo

1. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Proteínas. 3. Espalhamento Dinâmico
da Luz. 4. Calorimetria Diferencial de Varredura. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e
Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Jéssica Andrade Tedesco

Caracterização biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua
dinâmica de interação

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação de Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr. Ícaro Putinhon Caruso
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira
UNICAMP - Campinas

São José do Rio Preto

23 de abril de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, minha mãe Claudia Maria da Silva Andrade, por todo apoio ao longo destes 27 anos. Como ela mesma me escreveu em uma carta em 2016 “Percorremos sempre juntas este caminho e nem sempre foi fácil, não é filha? Mas hoje tenho certeza de que tudo valeu a pena”. Agradeço por todos os conselhos, todos os puxões de orelha que me fizeram a pessoa que sou hoje, e principalmente, por todos os longos telefonemas em momentos que eu precisava desabafar e compartilhar minhas frustrações e minhas vitórias.

Agradeço ao meu pai, Evaldo Tedesco, que mesmo de longe, sempre me apoiou e me ajudou a ser a pessoa que sou hoje. Todos os conselhos sobre eletricidade e mecânica. Ah, e não posso deixar de citar os dias incríveis que passamos juntos quando veio me visitar nessa cidade interiorana.

Agradeço ao meu gordinho, Matheus Tedesco, por todas as risadas compartilhadas e todas as comidas deliciosas. Mesmo de longe, eu sempre quero compartilhar do seu crescimento e das suas conquistas.

Agradeço a minha ‘avó’ de coração e criação, Enedi Andrade Silveira, por todo o majestoso apoio que vem me dando desde pitiquinha. É muito bom poder compartilhar as minhas conquistas com você e sempre aprender com a sua bondade para comigo e minha família. Com certeza, sem você nada disso seria possível.

Agradeço a minha maravilhosa prima, Flávia Lobo, por me apresentar e incentivar o vício da leitura. Você criou um monstrinho dentro de mim que eu jamais serei capaz de agradecer o suficiente.

Karoline Sanches, obrigado por todo o companheirismo desde 2012. Todos as conversas amorosas (e puxões de orelha também). Todas as horas estudando juntas e, principalmente, toda a paciência para me ensinar sobre essa vida de proteínas que era uma área totalmente nova para mim. Obrigado por todas as viagens incríveis que nós fizemos e por ser essa pessoa iluminada que você é.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Renan e Ingrid, obrigado por todas as ajudas, por descorarem os meus géis, desligarem a autoclave e, sem dúvidas, por partilharem as frustrações com a centrífuga.

Aos meus amigos de departamento, Raphael, Carol, Ingrid, Kenneth e Hugo, obrigado por todas as risadas, principalmente nas nossas aulinhas de inglês. E nunca se esqueçam: “There is a bitch on the beach doing a bit of beats”.

Às minhas eternas colegas de trabalho, Monique e Andreia, obrigado por continuarem sendo essas amigas incríveis, mesmo que não estejamos trabalhando no mesmo laboratório. Obrigado por serem a minha porta de entrada para esse mundo experimental.

Ao Acerola, vulgo Alessandro, obrigado por todos os momentos incríveis que compartilhamos desde 2012. Obrigado por ser essa pessoa indispensável na minha vida. Obrigado por todos os churrascos, todas as conversas, todos os conselhos. Só não vou agradecer pelas piadas porque já é abusar demais. Você sabe o quão importante é para mim.

Ao Edoardo, só tenho a agradecer todos os momentos de desabafo. Eu sei que às vezes eu pego você pra Cristo pra ouvir os meus problemas, obrigado por sempre me escutar. Obrigado por todos os almoços de domingo após algumas aulas de inglês. Obrigado por compartilhar o seu conhecimento e seus problemas comigo.

Wilton e Karina, mais conhecidos como Tiú e Baguete, obrigado pelo apoio e amizade. Obrigado por todas as festas, conversas, barzinhos, almoços e jantãs. É sempre maravilhoso passar o tempo com vocês, mesmo que seja só conversando.

Agradeço meu orientador Ferdinando, quer dizer, Fernando Alves de Melo, por toda paciência durante esses 18 meses e todo o aprendizado. Obrigado por ser essa pessoa leve e rígida em momentos cruciais. Obrigado por confiar em mim e sempre me encorajar em momentos que eu acreditava que nada daria certo.

Agradeço ao Professor Doutor Fabio Ceneviva por me receber tão prontamente no seu laboratório. Por toda a paciência empregada em me ensinar um pouco desse universo da Ressonância Magnética Nuclear. Sem dúvidas, este trabalho não seria possível sem o seu apoio e conhecimento.

Agradeço aos amigos que fiz no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear. Ramon, Felipe, Vitor, Karen, Chris e Mari, obrigado por toda a ajuda e por serem tão receptivos na minha estadia no Rio de Janeiro. Em especial, obrigado

Ramon e Felipe pelos momentos em Bento Gonçalves. Foi muito bom poder conhecer um pouco mais de vocês e compartilhar risadas e histórias incríveis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

“We’ve all got both dark and light inside us.

What matters is the part we choose to act on.

That’s who we really are.”

Harry Potter and the Order of the Phoenix [1]

RESUMO

FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) é uma proteína receptora que apresenta um papel crucial na regulação do metabolismo celular, expressão gênica, crescimento, divisão e diferenciação celular. Vias de sinalização se iniciam com a ligação de fatores de crescimento aos seus receptores localizados na porção extracelular proteína FGFR2, induzindo sua fosforilação seguida de recrutamento de proteínas parceiras do citosol. Uma destas parceiras é a proteína adaptadora Grb2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*). O mecanismo de interação entre estas duas proteínas é fundamental para o funcionamento da via de sinalização MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Elucidar tal mecanismo é crucial para o estudo da sinalização celular e seus comportamentos aberrantes.

Experimentos TROSY-based de taxas de relaxação transversa foram realizados em colaboração com o Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN). Os espectros 1D ^1H do domínio quinase demonstram uma boa estruturação e dinâmica de acordo com a proteína. Tempos de relaxação aparente entre 16,2 e 23,5 ns foram encontrados, sendo compatíveis com proteínas que apresentam massa molecular entre $38,508 \pm 7,709\text{kDa}$, coerentes com a massa molecular de 40kDa do domínio quinase. Os espectros 2D ^{15}N da interação entre FGFR2 e Grb2 mostram uma perda de sinal relacionado os domínios SH3-Grb2 quando comparados aos espectros da proteína Grb2 pura. Esta perda de sinal demonstra que ambos os domínios C- e N-terminal SH3-Grb2 estão participando da interação com FGFR2, enquanto o domínio SH2-Grb2 permanece dinâmico.

Experimentos de DSC e DLS foram realizados com Grb2 em diferentes pHs para a determinação de possíveis alterações na sua estrutura devido à mudança entre pHs ácidos e bases. Constatou-se boa conformação, congruente com resultados observados na literatura, para pHs básicos. No entanto, em pHs ácidos foi observado um aumento na turbidez da solução impossibilitando a realização das análises. Tal comportamento gera duas hipóteses: a agregação da proteína devido à mudança significativa na carga total da proteína e a formação de transições de fase líquido-líquido.

Palavras-chave: FGFR2, Grb2, Interação, Dinâmica, RMN, DSC, DLS.

ABSTRACT

FGFR2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2) is a receptor protein playing a crucial role in regulating cellular metabolism, genetic expression, growth, division and cellular differentiation. Signaling upstream starts when growth factors bind to receptors localized on the extracellular portion of FGFR2 which induce its phosphorylation followed by recruitment of protein partners from cytosol. One of these partners is the adaptor protein Grb2 (Growth Factor Receptor Bound Protein 2) which interaction mechanism between those proteins is fundamental for the health operation of MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Elucidating such mechanism is crucial for the study of that signaling pathway and its aberrant behavior.

TROSY-based studies of transverse relaxation rates were performed in collaboration with Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN). 1D ¹H spectrums of kinase domain demonstrate a good structure and dynamic of the protein. Apparent relaxation times between 16,2 and 23,5 ns were found, being compatible with proteins which present molecular weight of 38,508 ± 7,709kDa, coherent with the 40kDa molecular weight of kinase domain. 2D spectrums of FGFR2-Grb2 interaction showed a loss of signal related to SH3 domains in the compared spectrums of ¹⁵N isotopic labeled Grb2 and the mixture of labeled Grb2 and cytosolic FGFR2. This signal loss demonstrates that both N- and C-terminal Grb2-SH3 domains take place on the interaction with FGFR2 while Grb2-SH2 domain remains dynamic. This result adds a new figure to the FGFR2-Grb2 interaction tale which early was thought to be a role exclusively done by C-terminus Grb2-SH3 domain.

DSC and DLS experiments were carried on with Grb2 in different pH buffers to determine possible alterations on its structure due to acid and basic pH changes. On basic pH, Grb2 presents good conformation being consistent with results observed on the literature. However, on acid pH, an increase in the turbidity of the solution was observed, making impossible the analysis. Such behavior leads us to two hypotheses: aggregation of the protein due to significant change on the net charge and the formation of liquid-liquid phase transition.

Key-words: FGFR2, Grb2, Interaction, Dynamic, NMR, DSC, DLS.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 – Número estimado de casos incidentes de câncer mundialmente em 2012 para ambos os sexos. Pulmão (1.8 milhões), mama (1.6 milhões), colorretal (1.3 milhões), próstata (1 milhão), estômago (0.9 milhões), fígado (0.7 milhões), útero (0.5 milhões), esôfago (0.45 milhões), bexiga (0.42 milhões) e linfoma (0.38 milhões). 19
- Figura 2 – Três tipos de sinais encontrados em animais. (A) Endócrino – o sinal é transportado pela corrente sanguínea até uma célula alvo; (B) Parácrino – o sinal age em uma célula vizinha; (C) – o sinal age na própria célula que o produz. 20
- Figura 3 – Estrutura básica (fora de escala) do complexo FGF-FGFR compreende duas moléculas de receptores, dois FGFs e uma cadeia HSPG. FGFs se ligam com baixa afinidade à superfície celular das HSPGs (azul claro) e com alta afinidade aos FGFRs específicos. Os FGFRs, que são filogeneticamente próximos aos *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs), consistem em três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, uma única hélice transmembrana e um domínio tirosina quinase dividido em duas partes. O segundo (D2) e terceiro (D3) domínio do tipo Ig formam o sítio de ligação com ligantes e tem domínios distintos para a ligação de FGFs e HSPGs [8]. 22
- Figura 4 – Isoformas da FGFR2 geradas por *splicing* alternativo de FGFR transcrita. As duas formas são geradas através de *splicing* alternativo dos exons 8 e 9. A metade C-terminal do domínio D3 é codificada pelo exon 8, gerando a isoforma FGFR2b, enquanto a metade C-terminal do domínio D3 codificada pelo exon 9 gera a isoforma FGFR2c [8], [11], [14]. 23
- Figura 5 – Representação das estruturas cristalográficas do domínio quinase (a) e D2 (b) de FGFR2. 25
- Figura 6 – Esquema representativo da via de sinalização da RAS-MAPK. Inicialmente, FGFR2 é ativada pela ligação de um fator de crescimento, ativando a proteína RAS através da molécula adaptadora Grb2 que recruta um fator de troca do nucleotídeo guanina (Sos), o qual realiza a catálise, induzindo RAS a trocar seu GDP por um GTP. O processo se segue pela estimulação sequencial de proteínas quinases, como a Raf, 28

MEK e ERK. As ERK migram para o núcleo celular fosforilando um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, dando início ao processo de proliferação celular.

Figura 7 – Estrutura da proteína Grb2 em sua forma dimérica (SH2 em amarelo, C-SH3 em azul e N-SH3 em vermelho). 29

Figura 8 – Esquema representativo da formação do complexo heterotetrâmero do dímero Grb2 (domínios SH3 em amarelo; domínio SH2 em vermelho) e FGFR2 (preto e verde). O complexo inicial com excesso de Grb2 2:1 Grb2:FGFR2. Com adição de FGFR2, o complexo 2:2 é formado. 30

Figura 9 – Representação do mecanismo de controle da ativação de FGFR2 por Grb2. (A) Estado basal do completo FGFR2-Grb2. Grb2 (domínios SH3 em amarelo; domínio SH2 em vermelho) se liga através de seu domínio C-SH3 na região C-terminal de FGFR2, resultando no heterotetrâmero 2:2. O domínio quinase (verde) possui mobilidade suficiente para a fosforilação de alguns resíduos de tirosina (incluindo Y653 e Y654). Receptor ativo, sinalização inativa. (B) Fatores de crescimento extracelular (azul) e HSPG (azul claro) se ligam à FGFR2. Mudanças conformacionais ocorrem resultando na fosforilação de Grb2 pelo domínio quinase de FGFR2. (C) Grb2 fosforilada se desliga do receptor por repulsão eletrostática. O domínio quinase de FGFR2, na ausência de Grb2, se torna totalmente ativo acessando resíduos de tirosina previamente localizados na interface Grb2-FGFR2 por transfosforilação. Receptor ativo, sinalização ativa. 31

Figura 10 – Representação esquemática dos passos utilizados no processo de expressão e purificação das proteínas Grb2 e FGFR2_Q em meio mínimo enriquecido com ¹⁵N. 34

Figura 11 – Representação esquemática do processo de expressão das proteínas FGFR2_C e Grb2 em meio LB. 36

Figura 12 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a expressão da proteína FGFR2 quinase em *E.coli* BL21 (DE3) em duas diferentes temperaturas: a) 20°C e B) 37°C. Os valores na lateral do gel indicam referências de massa molar (97 kDa – Fosfolipase B; 40

66kDa – Albumina; 45kDa – Ovoalbumina; 30kDa – Anidride Carbônica; 20,1kDa – Inibidor de Tripsina e 14,4kDa – Lactoalbumina- α), MM : marcador de massa molar; A.I: antes da indução (onde não se nota a presença da proteína) e D.I: depois da indução (presença da proteína no gel).

Figura 13 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue 41 referente à expressão da proteína FGFR2 α com adição em 0,5 M de Sorbitol em duas temperaturas distintas: A) 20 °C e B) 37 °C. MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da Indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.

Figura 14 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue 42 referente à expressão da proteína FGFR2 α em duas temperaturas diferentes: A) 20 °C e B) 37 °C; com adição de diferentes concentrações de Triton X-100 na etapa de lise celular (1 – 0,2% Triton X-100; 2 – 1,0% Triton X-100; 3 – 2,0% Triton X-100). MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.

Figura 15 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue 43 referente à expressão da proteína FGFR2 α em duas temperaturas distintas: A) 20°C e B) 37°C; com adição de 10% de Glicerol na etapa de lise celular. MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.

Figura 16 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue 44 referente à expressão da proteína FGFR2 α em duas temperaturas distintas: A) 20 °C e B) 37 °C; com adição de 0,5mg/mL de Lisozima na etapa de lise celular. MM – Marcador de massa molar; A.I – antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.

Figura 17 – Gel SDS-PAGE 20% referente à purificação por afinidade de 45 FGFR2 quinase. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não apresentam afinidade por cobalto; 10-100mM – concentrações de

Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. Em vermelho, destaca-se a porção proteica utilizada para a etapa seguinte de gel filtração.

Figura 18 – Espectro da purificação de FGFR2_Q por exclusão molecular 46 através do sistema AKTA-*purifier*. As amostras são coletadas devido ao aumento na luz UV. Tais amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE para constatação de sua pureza e concentradas para futuros experimentos.

Figura 19 – Espectros 1D ¹H dos experimentos de TROSY-*based* de R₁ 47 (a) e R₂ (b) do domínio quinase de FGFR2. Em vermelho temos o espectro das intensidades (I) e, em azul, o espectro das intensidades de referência (I₀). As linhas verticais especificam os pontos que foram utilizados para os cálculos do tempo de relaxação aparente através das fórmulas (6) e (7).

Figura 20 – Espectro TROSY-HSQC 2D ¹H-¹⁵N do domínio quinase de 48 FGFR2 à 298 K, o qual apresenta uma estrutura parcialmente enovelada.

Figura 21 – Gel SDS-PAGE 15% referente à purificação por afinidade de 49 FGFR2 citoplasmática. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não apresentam afinidade por cobalto; 10-100 mM – concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. Em vermelho, destaca-se a porção proteica utilizada para a etapa seguinte de gel filtração.

Figura 22 – Espectro da purificação de FGFR2_C por exclusão molecular 50 através do sistema AKTA-*purifier*. As amostras são coletadas de acordo com o aumento da absorção da luz UV. Tais amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE para constatação de sua pureza e concentradas para futuros experimentos.

Figura 23 – Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% da solução utilizada 51 nos experimentos TROSY-*based* da interação de FGFR2_C e Grb2. A proteína Grb2 pura foi utilizada como marcador de massa molar para comparação das alturas no gel.

Figura 24 – Sobreposição dos espectros de TROSY-HSQC das proteínas 52 Grb2 pura (em rosa) e interagindo com FGFR2 (em marrom).

Figura 25 – Sobreposição dos espectros do domínio SH2 (em azul) e da 53 interação entre FGFR2 + Grb2 (em marrom).

Figura 26 – Identificação dos aminoácidos (em vermelho) presentes no 54
espectro da interação entre FGFR2-Grb2 na estrutura dimérica da
proteína Grb2. (D45, K64, I65, K69, A70, E71, E72, L74, K76, Q77, G81,
A82, L84, I85, S88, R89, S90, A91, G93, D94, S96, L97, S98, V99, K100,
F101, G102, D104, V105, Q106, H107, F108, V110, L111, R112, D113,
A115, G116, F119, V122, V123, K124, F125, N126, S127, L128, N129,
E130, L131, Y134, R136, T138, S141, N143, Q144, Q145, I146, F147,
D150). Estrutura gerada com o auxílio do programa UCSF – *Chimera* a
partir do PDB 1gri.

Figura 27 – Estrutura proposta após o *domain-swap* apresentado pela 55
proteína Grb2 evidenciando uma conformação aberta do domínio SH2.

Figura 28 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 por afinidade ao 56
Cobalto. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não
apresentam afinidade por cobalto; 10-500mM – concentrações de
Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.

Figura 29 – Cromatograma referente à troca de tampão para NaPi pH 7,0 57
da proteína Grb2. As amostras foram coletadas com base no aumento da
absorção UV.

Figura 30 – Cromatograma referente à troca de tampão para NaK pH 8,0 57
da proteína Grb2. As amostras coletadas levam em consideração o
aumento da absorção de luz UV.

Figura 31 – Espectro referente à troca de tampão para Acetato pH 4,0 da 58
proteína Grb2. Nota-se uma diferença na forma do espectro, tendo este
sido deslocado quando comparado aos espectros de pHs básicos.

Figura 32 – Espectro referente à troca de tampão para Acetato pH 5,0 da 58
proteína Grb2. Assim como em pH 4,0, nota-se uma alteração no perfil
do espectro, sendo este mais evidente do que o anterior. Devido ao
deslocamento do pico, as amostras coletadas apresentavam tampão
diferente do esperado, além de apresentar grande perda na
concentração de proteína quando comparado aos pHs básicos.

Figura 33 – Amostras de Grb2 pura em pH 7,0 e 5,0 (a) evidenciando o 59
aumento da turbidez em pH ácido após o processo de diálise. Em (b)

observa-se a formação do pellet azulado após centrifugação de 1 minuto à 10.000RPM.

Figura 34 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 pH 7,0 obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas de DSC para a proteína Grb2 foram obtidas entre 20 e 80 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min. Em preto tem-se a curva experimental obtida, em vermelho seu respectivo *fit*. Em verde tem-se a primeira deconvolução, seguida da segunda em azul e da terceira em ciano, com os respectivos picos correlacionados com os três domínios de Grb2. 61

Figura 35 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 pH 8,0 obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas de DSC para a proteína Grb2 foram obtidas entre 20 e 80 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min. Em ciano tem-se a curva experimental obtida, em azul escuro seu respectivo *fit*. Em preto tem-se a primeira deconvolução, seguida da segunda em verde e da terceira em vermelho, com os respectivos picos correlacionados com os três domínios de Grb2. 62

Figura 36 – Gráficos de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 em diferentes pHs básicos: 7,0 (a) e 8,0 (b). Nota-se em ambos os gráficos a presença de dois picos, sendo o primeiro muito mais presente com porcentagem em massa perto de 100%. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificidade de FGFs para as diferentes isoformas de FGFRs.	24
Tabela 2 – Variações genéticas e alterações de FGFR2 em síndromes.	26
Tabela 3 – Variações genéticas e alterações de FGFR2 em cânceres.	26
Tabela 4 – Dados dos tempos de correlação rotacionais compilados por J. Aramini. Todos os dados foram coletados em espectrômetro Bruker 600 MHz a 25 °C, exceto os assinalados com asterisco, coletados em campo de 800 MHz.	39
Tabela 5 - Valores das intensidades e seus respectivos R_1 e R_2 , calculados através da fórmula (6) e o tempo de relaxação aparente através da fórmula (7). A estimativa da massa molecular foi calculada através da fórmula (8).	47
Tabela 6 – Carga da proteína Grb2 em função da mudança de pH gerada pela plataforma <i>Protein Calculator</i> . Observa uma mudança no sinal da carga entre pHs ácidos e básicos podendo influenciar na conformação da proteína em seu ambiente químico.	59
Tabela 7 – Valores das temperaturas de <i>melting</i> (T_m) e da entalpia calorimétrica de cada um dos picos presentes no termograma da proteína Grb2 em pH 7,0. A temperatura de <i>melting</i> é determinada pelo máximo de C_p e a entalpia calorimétrica associada é obtida através da integração das gaussianas.	62

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

- ADP** – Adenosina difosfato
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- CcpNMR** – *Collaborative Computacional Project for NMR*
- DLS** – Espectroscopia Dinâmica da Luz
- DSC** – Calorimetria Diferencial de Varredura
- FGF** – *Fibroblast growth factors*
- FGFR2** – *Fibroblast growth factor receptor 2*
- FGFR2_c** – Porção citoplasmática da proteína FGFR2
- FGFR2_q** – Domínio quinase da proteína FGFR2
- FGFRs** – *Fibroblast growth factor receptors*
- Gab** – *Grb2-associated binding*
- GAP** – *GTPase-activating protein*
- Grb2** – *Growth-factor-receptor bound protein 2*
- GTP** – Trifosfato de guanosina
- HSPG** – Heparan sulfato
- IDR** – Regiões Intrinsicamente Desordenadas
- IPTG** – Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
- ITC** – *Isothermal Titration Calorimetry*
- JAK/STAT** – *Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*
- LCD** – Domínios de Baixa Complexidade
- LLPS** – Separação de Fase Líquido-Líquido
- MM** – Marcador Molecular
- MW** – Massa Molecular
- NF1** – *neurofibromin*
- PONDR[®]** – *Predictor of Natural Disordered Regions*
- Pi** – Fosfato inorgânico
- PI3K** – *Phosphoinositide 3-kinase*
- PLCγ** – *Phospholipase C-γ*
- Ras** – *Rat Sarcoma*

MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinase*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RTKs – *Receptor Tyrosine Kinase*

Ser – Serina

SHC – *Src Homology and Collagen containing protein*

Shp2 – *Src-homology 2 domain containing phosphatase 2*

Sos – *Son of Sevenless*

T₂ – Tempo de relaxação transversa

Thr – Treonina

TK – Domínio tirosina quinase

TROSY – *Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*

Tyr – Tirosina

WHO – Organização Mundial de Saúde

ν_N – Frequência de precessão do nitrogênio

τ_c – Tempo de relaxação aparente

SUMÁRIO

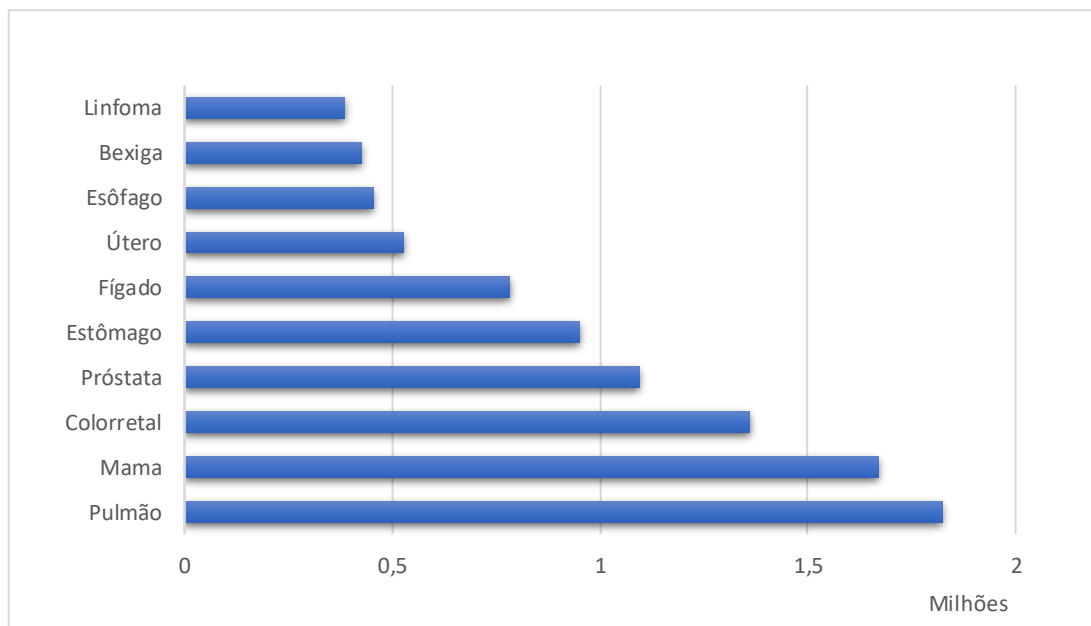
1.	Introdução	19
1.1.	Sinalização Celular	20
1.2.	<i>Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs)</i>	21
1.2.1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2)</i>	24
1.3.	Via de Sinalização RAS-MAPK (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)	27
1.4.	Interação FGFR2 – Grb2	29
2.	Motivação e Objetivos	32
3.	Materiais e Métodos	33
3.1.	Testes de Solubilidade FGFR2_Q	33
3.2.	Expressão das proteínas Grb2 e FGFR2_Q	33
3.3.	Expressão FGFR2_C	34
3.4.	Purificação das proteínas FGFR2_Q, FGFR2_C e Grb2	36
3.5.	Amostras para ressonância	37
3.6.	Amostras e tratamento dos dados de DSC	37
3.7.	Amostras para DLS	38
3.8.	Cálculos de R₁, R₂ e tempo de relaxação aparente τ_c	38
3.9.	Estimativa da massa molecular a partir do τ_c	38
4.	Resultados e Discussões	40
4.1.	FGFR2 domínio quinase (FGFR2_Q)	40
4.1.1.	Expressão e Purificação FGFR2 _Q	40
4.1.2.	Dinâmica estrutural FGFR2 _Q	46
4.2.	Interação FGFR2 citoplasmática (FGFR2_C) e Grb2	49
4.2.1.	Expressão e Purificação FGFR2 _C	49
4.2.2.	TROSY-HSQC da interação entre FGFR2 _C e Grb2	50
4.3.	Grb2	55
4.3.1.	Expressão e Purificação	55
4.3.2.	Grb2 – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	60
4.3.3.	Grb2 – Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)	63
5.	Conclusões e Perspectivas futuras	66
	Referências	69

1. Introdução

O desenvolvimento do câncer envolve sucessivas alterações genéticas e epigenéticas que permitem o escape do controle homeostático das células, suprimindo inapropriadamente a proliferação e inibição da sobrevivência de células aberrantemente proliferadas fora de seus nichos normais. A maioria dos cânceres surgem em células epiteliais, manifestados por carcinomas em órgãos como pulmão, mama, pele, fígado e pâncreas. Sarcomas, por outro lado, surgem de tecidos mesenquimais, ocorrendo em fibroblastos, miócitos, adipócitos e osteoblastos. Tumores não epiteliais podem também se desenvolver em células do sistema nervoso (gliomas, neuroblastomas e medulo-blastomas) e tecidos hematopoiéticos (leucemia e linfoma) [2].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2012, haviam 14,1 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões de mortes registradas e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer com diagnóstico de 5 anos. Dentre as maiores ocorrências (Figura 1), podem ser citados os cânceres de pulmão (1,8 milhões), mama (1,6 milhões), colorretal (1,3 milhões), próstata (1 milhão) e estômago (0,95 milhões) [3].

Figura 1 – Número estimado de casos incidentes de câncer mundialmente em 2012 para ambos os sexos. Pulmão (1.8 milhões), mama (1.6 milhões), colorretal (1.3 milhões), próstata (1 milhão), estômago (0.9 milhões), fígado (0.7 milhões), útero (0.5 milhões), esôfago (0.45 milhões), bexiga (0.42 milhões) e linfoma (0.38 milhões).



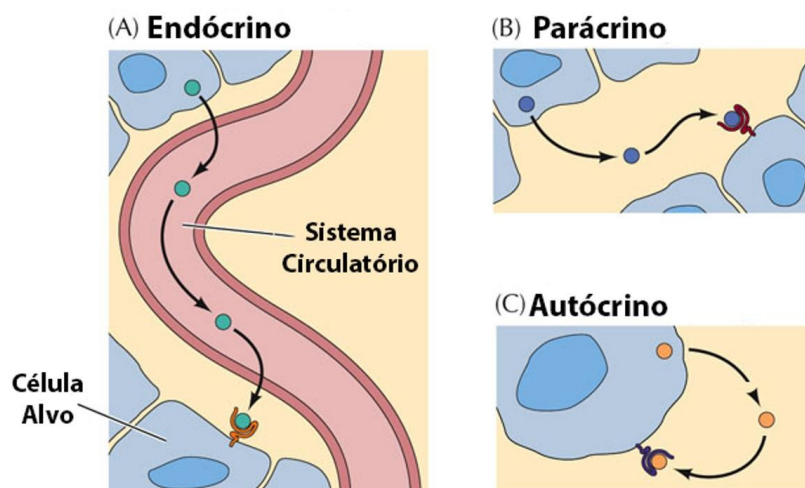
Fonte: [3].

Células tumorais desenvolvem características muito bem definidas como aumento da proliferação celular, incluindo a resistência à apoptose e outras formas de morte celular, mudanças metabólicas, instabilidade genética, indução de angiogênese e aumento da capacidade migratória. Tal sequência linear é, claramente, uma simplificação dos eventos complexos associados ao câncer; no entanto, auxilia no entendimento do papel crucial da sinalização desregulada em processos associados à iniciação e progressão do câncer [2].

1.1. Sinalização Celular

A capacidade das células em receber e responder a sinais para além da membrana plasmática é fundamental para a manutenção da vida. Células bacterianas recebem sinais constantes de proteínas de membrana que atuam como receptores de informação, monitorando o meio externo em relação ao oxigênio, disponibilidade de alimento, pH, força osmótica, luz e presença de substâncias químicas nocivas, predadores ou competidores por alimento. Tais sinais geram respostas apropriadas, como o movimento na direção do alimento ou oposto a substâncias nocivas. Em animais, observam-se três categorias de sinais: autócrinos (agem na própria célula que o produz), endócrinos (transportados pela corrente sanguínea até uma célula alvo), ou parácrinos (agem em uma célula vizinha) (Figura 2). Em qualquer um dos casos, o sinal é detectado por um receptor específico e convertido em uma resposta celular [4], [5].

Figura 2 – Três tipos de sinais encontrados em animais. (A) Endócrino – o sinal é transportado pela corrente sanguínea até uma célula alvo; (B) Parácrino – o sinal age em uma célula vizinha; (C) – o sinal age na própria célula que o produz.



A fosforilação reversível da cadeia lateral de aminoácidos é um meio de regulação da atividade de enzimas e sinalização de proteínas vastamente utilizado pelas células. Para essas reações, quantidades substanciais de energia são exigidas nos processos metabólicos e grande parte da energia livre é obtida pela oxidação de nutrientes e substratos disponíveis ao decorrer do catabolismo. Tal energia é conservada e transferida por meio de reações acopladas à produção de Adenosina difosfato (ADP) e Fosfato inorgânico (Pi) a partir de Adenosina trifosfato (ATP), sendo assim sistemas de transmissão de energia e vínculos entre as reações consumidoras e produtoras de energia [4].

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em alguns casos, de Trifosfato de guanosina (GTP), para serina, treonina (quinases específicas para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina. A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas [6].

A reação entre ATP, que contém grupos β - e γ -fosfatos, e uma hidroxila de álcool ou fenol produz quantidades muito pequenas de éster fosfato em água, pois este solvente compete como nucleófilo. Entretanto, a atividade catalítica das proteínas quinases pode favorecer cineticamente a reação. A hidrólise espontânea de monoéster fosfato, de maneira semelhante, tem cinética lenta nas condições fisiológicas normais, tornando necessária a ação de fosfatases para que a reação seja acelerada [7]. Assim, a fosforilação de proteínas é reversível e controlada por enzimas em ambas as direções.

1.2. *Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs)*

Fibroblast growth factors (FGF) e seus receptores (FGFRs) regulam uma vasta gama de processos fisiológicos celulares, como desenvolvimento embrionário, diferenciação, proliferação, sobrevivência, migração e angiogênese [8]. Componentes sinalizadores de FGFRs, estão frequentemente alterados em cânceres humanos.

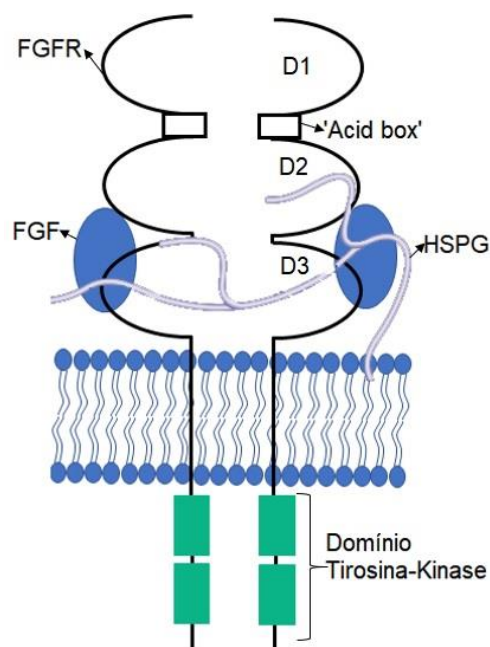
FGFs são glicoproteínas secretadas e rapidamente sequestradas pela matriz extracelular e superfície celular por proteoglicanas de heparan sulfato (HSPG), as quais estabilizam a interação entre o fator de crescimento e seu receptor através da proteção dos FGFs de degradação mediada por proteases. Embora os FGFs variem de tamanho entre 17-34 kDa, todos os membros da família compartilham de uma

sequência conservada de 120 resíduos de aminoácidos com similaridade sequencial entre 16-65% [9].

Em mamíferos, a família FGF compreende 18 ligantes, os quais exercem suas ações através de quatro receptores de tirosina quinase altamente conservados (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4). Um quinto receptor relacionado (FGFR5) pode ligar FGFs mas não possui domínio tirosina quinase, podendo regular negativamente a sinalização [9].

Na Figura 3, pode-se identificar o domínio de ligação extracelular dos FGFR, que é composto por três domínios do tipo imunoglobulina (*Ig-like*), designados D1-D3; um trecho de sete a oito resíduos ácidos na conexão entre D1 e D2, chamado de *acid box* e uma região positivamente carregada em D2 que tem como finalidade a ligação com heparinas [10]. Um domínio transmembrana, um domínio de tirosina quinase (TK) dividido em duas partes (TK1 e TK2) e uma cauda carboxil-terminal contendo 58 aminoácidos concluem a estrutura dos FGFR [11].

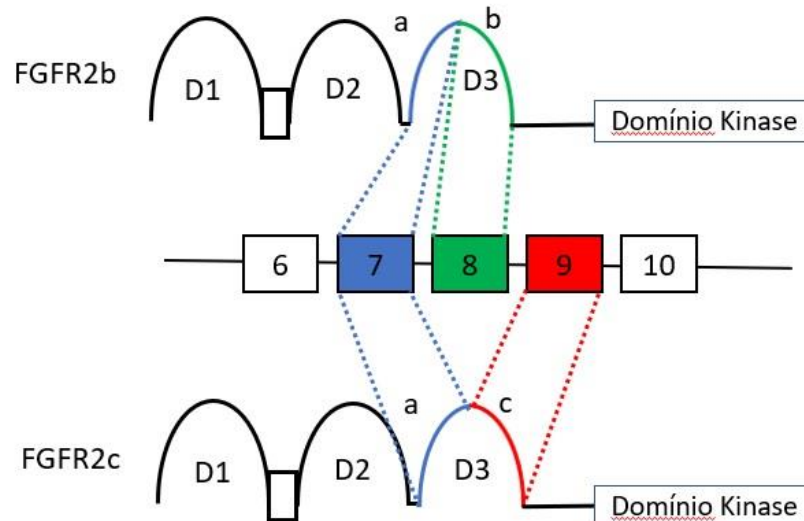
Figura 3 – Estrutura básica (fora de escala) do complexo FGF-FGFR compreende duas moléculas de receptores, dois FGFs e uma cadeia HSPG. FGFs se ligam com baixa afinidade à superfície celular das HSPGs (azul claro) e com alta afinidade aos FGFRs específicos. Os FGFRs, que são filogeneticamente próximos aos *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs), consistem em três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, uma única hélice transmembrana e um domínio tirosina quinase dividido em duas partes. O segundo (D2) e terceiro (D3) domínio do tipo Ig formam o sítio de ligação com ligantes e tem domínios distintos para a ligação de FGFs e HSPGs [9].



Fonte própria.

Uma importante marca registrada da família FGFR é a sua variedade de isoformas, geradas por *splicing* alternativo das FGFR transcritas [9], [12]. As diferentes isoformas incluem FGFRs com domínio extracelular composto por dois ou três domínios do tipo Ig, formas solúveis secretadas, assim como *splicing* alternativo no terceiro domínio do tipo Ig (D3) que mudam profundamente a especificidade da ligação entre FGFRs e ligantes [13], [14]. O *splicing* alternativo em D3 ocorre em FGFR1, FGFR2 e FGFR3 mas não em FGFR4 [9], [12], [15]. Foi mostrado que o exon 7 do gene FGFR2 (Figura 4) codifica a metade N-terminal do D3 (designada 'a'), enquanto os exons 8 e 9 codificam a metade C-terminal (respectivamente designadas 'b' e 'c'). As duas formas apresentam características distintas quando à ligação com FGFs, como pode ser visto na tabela 1. Por exemplo, enquanto FGFR2b liga FGF7 e FGF10, mas não FGF2, a isoforma FGFR2c liga FGF2 e FGF18, mas não FGF7 e FGF10.

Figura 4 – Isoformas da FGFR2 geradas por *splicing* alternativo de FGFR transcrita. As duas formas são geradas através de *splicing* alternativo dos exons 8 e 9. A metade C-terminal do domínio D3 é codificada pelo exon 8, gerando a isoforma FGFR2b, enquanto a metade C-terminal do domínio D3 é codificada pelo exon 9 gera a isoforma FGFR2c [9], [12], [15].



Fonte própria.

Tabela 1 – Especificidade de FGFs para as diferentes isoformas de FGFRs.

Isoformas FGFR	Especificidade FGFs
FGFR1b	FGF1, -2, -3 e -10
FGFR1c	FGF1, -2, -4, -5 e -6
FGFR2b	FGF1, -3, -7, -10 e -22
FGFR2c	FGF1, -2, -4, -6, -9, -17 e -18
FGFR3b	FGF1 e -9
FGFR3c	FGF1, -2, -4, -8, -9, -17, -18 e -23
FGFR4	FGF1, -2, -4, -6, -8, -9, -16, -17, -18 e -19

Fonte: [12].

A sinalização aberrante de FGFRs contribui para o desenvolvimento e progressão de carcinomas em três situações principais: (i) “mutações dirigidas”, nas quais a aquisição de alterações moleculares direcionadas estimulam diretamente a proliferação e sobrevivência de células cancerígenas; (ii) neoangiogênese; e (iii) resistência à agentes anticancerígenos [8], [15]. De forma geral, diversos modelos pré-clínicos providenciaram evidências convincentes do potencial oncogênico da sinalização aberrante de FGFRs na carcinogênese através de terapias por agentes específicos para FGFRs podendo ser utilizados para contra-atacar o crescimento tumoral, a angiogênese e reverter, ou prevenir, a aquisição de resistência à drogas anticancerígenas [15]–[20].

1.2.1. *Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2)*

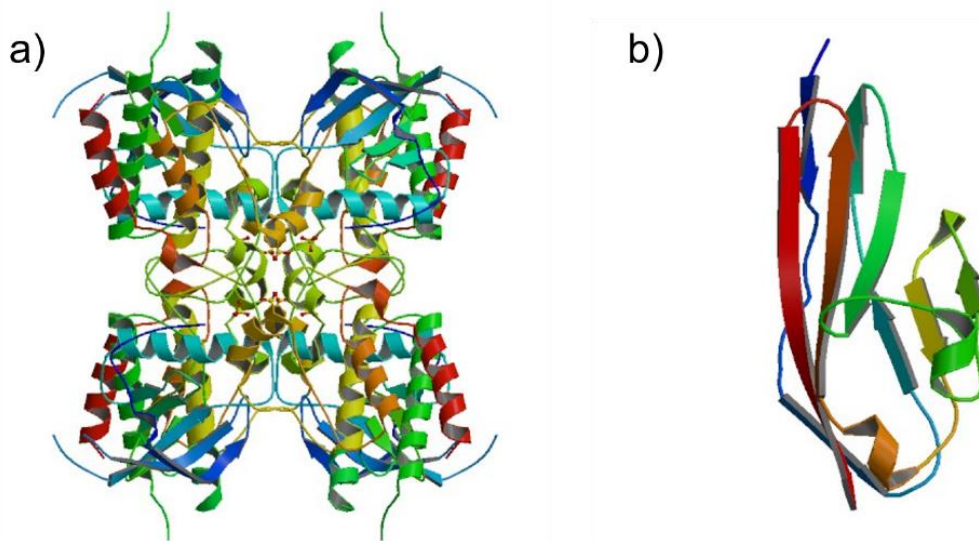
O gene FGFR2 está localizado no cromossomo 10q26 e contém 20 exons em humanos. Este codifica duas isoformas através de *splicing* alternativo, FGFR2b e FGFR2c, as quais possuem funções distintas no reconhecimento específico de fatores de crescimento (FGFs). FGFR2 são proteínas receptoras (RTKs – *Receptor Tyrosine Kinase*) e exercem um papel fundamental na regulação do metabolismo celular, na expressão gênica, no crescimento, divisão e diferenciação celular, na qual muitas cascatas de transdução de sinais são encaminhadas da membrana celular para o núcleo [22].

A proteína FGFR2 possui 821 aminoácidos (resíduos de aminoácido) em sua estrutura completa (massa molar 92 kDa) e 420 resíduos de aminoácido em sua porção citoplasmática – FGFR2c – (47,6 kDa) – sendo 354 resíduos de aminoácido

do domínio quinase – FGFR2_Q – (40,2 kDa) e 58 resíduos de aminoácido da sequência complementar (6,4 kDa).

Devido ao seu elevado número de aminoácidos e sua baixa solubilidade, por ser uma proteína de membrana, a resolução de sua estrutura se torna um desafio tanto por métodos cristalográficos quanto por ressonância magnética nuclear. Na literatura, pode-se encontrar partes de sua estrutura resolvidas, com foco no domínio quinase [23], [24] e domínio D2 (Figura 5) [25], [26].

Figura 5 – Representação das estruturas cristalográficas do domínio quinase (a) e D2 (b) de FGFR2.



Fonte: [24], [25].

Mutações na região C-terminal de FGFR2 foram identificadas em diversas síndromes como Crouzon, Melanoma, Pfeiffer, Apert e Beare-Stevenson. Além disso, muitas displasias como câncer de mama, próstata, ovário, bexiga e pulmão estão relacionadas à atividade enzimática aberrante de FGFR2. As tabelas 2 e 3 mostram, respectivamente, um resumo das desordens genéticas relacionadas com síndromes e cânceres associados com FGFR2.

Tabela 2 – Variações genéticas e alterações de FGFR2 em síndromes.

Síndrome	Mutação	Referências
Crouzon	A315T/S, A344G/P, C278F, F276V, G338R, K526E, N549D/K/H, Q289P, S267P, S347C, S354C, Y105C, Y281C, Y340C/H	[27]–[32]
Jackson-Weiss	R344G	[32]
Apert	M186T, P252S/W/F/L, P253L/R, S267P	[28], [33], [34]
Pfeiffer	A172F, A314D, C278F, C342F/R/S, K641R, N549D/K, S267P, T341P, W290C, Y340C/H	[28], [29], [35], [36]
Beare-Stevenson	Y375C, S372C	[37]

Fonte: Adaptado de [15], [38]

Tabela 3 – Variações genéticas e alterações de FGFR2 em cânceres.

Câncer	Mutação	Referências
Mama	R203C, N550K, S588C, K660M	[27], [39]–[42]
Gástrico	S267P, Q212K, G463E	[43, p. 2], [44], [45]
Útero	D101Y, G227E, 2252W, P253R, F276V, K310R, S373C, Y376C, C383R, A390T, M393R, V396D, L398M, I548D/V, N550H/K, K660E/M/N, C383R	[27], [39], [42], [46]
Pulmão	E116K, P253L, I381V, C383R, K421I, D480N, H454Q, G584V, I591M, Q621K, R626T, D138N, N211I, D247N, W290C, G302W, S320C, E471Q, M538I, G584W, D603E, K660N/E, L773F, T787K	[40], [42], [47], [48], [48]–[51]
Melanoma	S24F, V77M, H213Y, E219K, G227E, V248D, R251Q, G271E, G305R, T371R, E476K, D531N, E575K, E637K, M641I, I643V, A649T, S689F, G702S, P709S	[52]
Próstata	Mudança de FGFR2b para FGFR2c	[53]
Bexiga	M186T	[54]
Colorretal	R203H, R210Q, D334N, Q361R, L552I, P583L, R665W, E778K	[43], [55], [56]

Fonte: Adaptado de [12], [15].

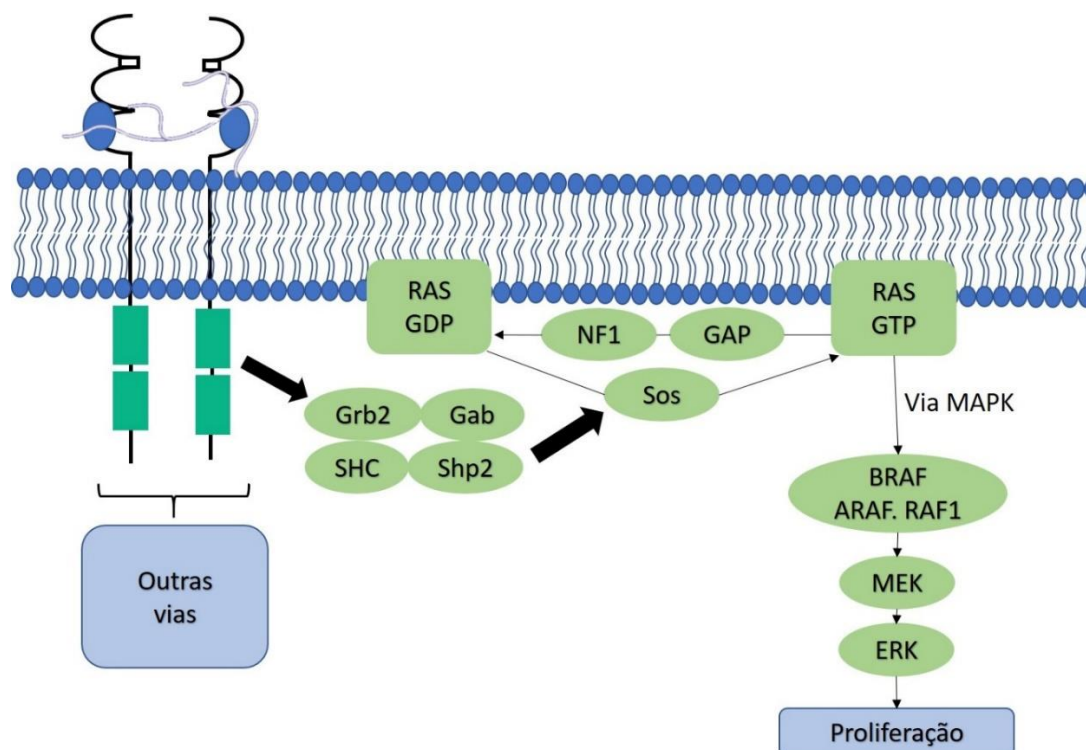
As vias de sinalização de FGFR2 se dividem em dois fluxos. O primeiro é dependente do substrato FGFR2 2 α (FGFR2 α), enquanto o outro não. FGFR2 está envolvida em 4 vias principais, incluindo MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), PLC γ (*Phospholipase C- γ*), PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) e JAK/STAT (*Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*). Atua em múltiplas vias de sinalização *downstream* representando um papel crucial na proliferação, sobrevivência, diferenciação e resistência a drogas [15].

1.3. Via de Sinalização MAPK

Um dos mecanismos envolvidos na sinalização celular é a interação entre proteínas responsáveis por transmitir estímulos extracelulares através de receptores da membrana plasmática até o núcleo celular. Proteínas que respondem à fosforilação de resíduos de Tirosina possuem domínios que mediam tal interação através do reconhecimento de sequências polipeptídicas específicas em proteínas adjacentes.

Na via de sinalização MAPK, como representado na Figura 6, FGFs se ligam aos HSPGs na superfície celular promovendo a dimerização do receptor. O processo de dimerização de FGFR2 é essencial para a ativação da quinase, resultando em um aumento da regulação de tal atividade e autofosforilação de resíduos de tirosina (Tyr) na região C-terminal. A autofosforilação dos resíduos de Tyr localizados em seu sítio ativo é essencial para a manutenção da sua forma ativa, porém sua sinalização continua inativa [57], [58]. A fosforilação de outros resíduos no domínio citoplasmático é essencial para a formação de sítios de ligação que recrutam proteínas adaptadoras como Grb2 (*Growth-factor-receptor bound protein 2*), SHC (*Src Homology and Collagen Containing Protein*) e Gab (*Grb2-associated binding*), possibilitando a ativação da sinalização do receptor, como será visto ao longo do texto.

Figura 6 – Esquema representativo da via de sinalização da RAS-MAPK. Inicialmente, FGFR2 é ativada pela ligação de um fator de crescimento, ativando a proteína RAS através da molécula adaptadora Grb2 que recruta um fator de troca do nucleotídeo guanina (Sos), o qual realiza a catálise, induzindo RAS a trocar seu GDP por um GTP. O processo se segue pela estimulação sequencial de proteínas quinases, como a Raf, MEK e ERK. As ERK migram para o núcleo celular fosforilando um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, dando início ao processo de proliferação celular.



Fonte própria.

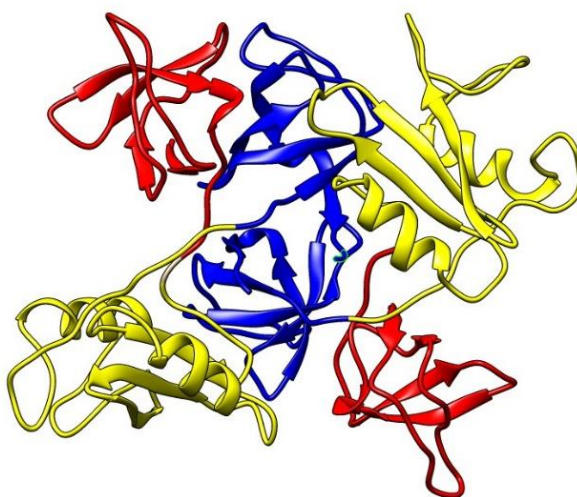
A via se segue com o recrutamento de Shp2 (*Src-homology 2 domain containing phosphatase 2*) e Sos (*“Son of Sevenless” – Pro-rich domain of GTP-GDP exchange factor*). Esta última, quando ligada a Grb2, atua na catálise de substituição do GDP ligado em Ras (*Rat Sarcoma*) por GTP. Em seguida, o complexo formado por GAP (*GTPase-activating protein*) e NF1 (*neurofibromin*) se ligam a Ras-GTP, catalisando sua conversão para Ras-GDP, finalizando a sinalização com a ativação da via de sinalização MAPK [59], [60].

Sendo assim, é de fundamental importância o estudo das proteínas FGFR2, responsável pela transdução do sinal, e da proteína Grb2, a qual atua diretamente na regulação da primeira proteína. A regulação da transdução do sinal para o interior da membrana é essencial para o controle de sinalizações aberrantes, responsáveis por uma série de carcinomas e síndromes anteriormente citadas.

1.4. Interação FGFR2 – Grb2

A proteína Grb2 (*Growth-factor-receptor bound protein 2*) é uma proteína adaptora, envolvida na transdução e sinalização celular [61], [62]. Possui 217 resíduos de aminoácidos (25,2 kDa) compreendendo um domínio SH2 entre dois domínios SH3, C- e N- terminal [61], [63], [64]. Foi cristalizada como um dímero, sendo observado em soluções com concentração de Grb2 maior que 10 mg/mL (Figura 7) [65].

Figura 7 – Estrutura da proteína Grb2 em sua forma dimérica (SH2 em amarelo, C-SH3 em azul e N-SH3 em vermelho).



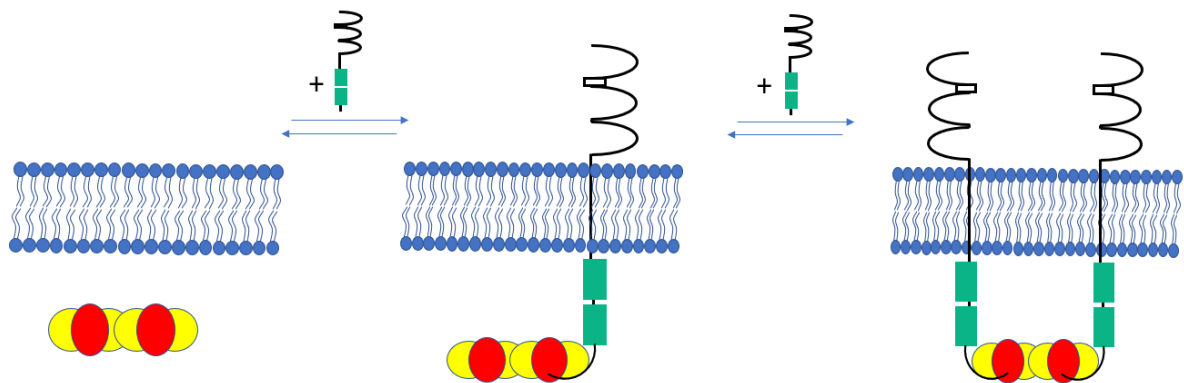
Fonte: adaptado de PDB 1GRI.

Estudos de ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*), DLS (*Differential Light Scattering*) e FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) realizados anteriormente determinaram propriedades acerca da interação entre Grb2 e a cauda terminal de FGFR2[57], [66]. Domínios SH3 se ligam com sequências ricas em prolina na forma de *motifs* PxxP. A região C-terminal de FGFR2 apresenta vários destes *motifs*, provendo sítios de interação para o domínio C-SH3 de Grb2, o domínio N-SH3 não mostrou nenhum tipo de interação nos estudos citados acima. Ahmed *et al.* (2010) determinou a constante de ligação, através de estudos de interação, entre sequências peptídicas equivalentes à cauda terminal de FGFR2 e Grb2. Grb2 C-SH3 se liga à sequência C-terminal de FGFR2 com constante de dissociação na ordem de 10-100 μ M, enquanto o domínio SH2 não se ligou a nenhum dos peptídeos estudados.

Lin *et al.* (2012) apresenta em seu trabalho dois mecanismos regulatórios cruciais na interação entre tais proteínas. Primeiramente, Grb2 induz a dimerização de FGFR2 anterior à estímulos extracelulares. À medida que FGFR2 (150 μ M) é titulada em Grb2

dimérica (15 μM), um complexo inicial é formado com estequiometria 2:1 Grb2:FGFR2. Com o aumento da concentração de FGFR2, o complexo 2:1 é saturado por FGFR2 dando origem à uma estequiometria 2:2. Devido à condição dimérica de Grb2 utilizada nos experimentos e sua ligação à FGFR2 ser detectada somente no domínio C-SH3, os dados de ITC podem ser elucidados assumindo-se que quanto maior a quantidade de FGFR2 titulada no complexo 2:1 Grb2:FGFR2, os domínios Grb2 C-SH3 recrutam uma molécula adicional de FGFR2, formando um heterotetrâmero (Figura 8).

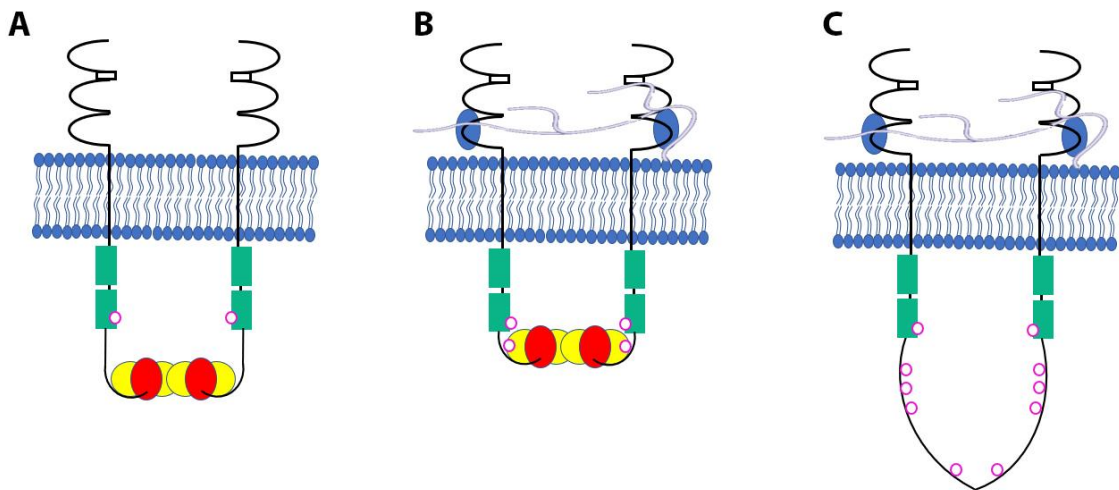
Figura 8 – Esquema representativo da formação do complexo heterotetrâmero do dímero Grb2 (domínios SH3 em amarelo; domínio SH2 em vermelho) e FGFR2 (preto e verde). O complexo inicial com excesso de Grb2 2:1 Grb2:FGFR2. Com adição de FGFR2, o complexo 2:2 é formado.



Fonte própria.

O heterotetrâmero (Figura 9), em seu estado basal, apresenta baixos níveis de atividade da quinase mas sem nenhum efeito sob a via de sinalização. A ligação de Grb2 com a região C-terminal de FGFR2 inibe o acesso à resíduos de tirosina que, na fosforilação, formam sítios de ligação para o recrutamento de proteínas parceiras. Quando ocorre a estimulação do receptor por fatores de crescimento externos à membrana, a atividade da quinase é regulada positivamente pela fosforilação do resíduo Y209 da Grb2. Neste estado fosforilado, Grb2 se dissocia do complexo devido à repulsão eletrostática entre as proteínas. O receptor então, é capaz de realizar mudanças conformacionais necessárias para adquirir um estado fosforilado e uma sinalização ativa [66].

Figura 9 – Representação do mecanismo de controle da ativação de FGFR2 por Grb2. (A) Estado basal do completo FGFR2-Grb2. Grb2 (domínios SH3 em amarelo; domínio SH2 em vermelho) se liga através de seu domínio C-SH3 na região C-terminal de FGFR2, resultando no heterotetrâmero 2:2. O domínio quinase (verde) possui mobilidade suficiente para a fosforilação de alguns resíduos de tirosina (incluindo Y653 e Y654). Receptor ativo, sinalização inativa. (B) Fatores de crescimento extracelular (azul) e HSPG (azul claro) se ligam à FGFR2. Mudanças conformacionais ocorrem resultando na fosforilação de Grb2 pelo domínio quinase de FGFR2. (C) Grb2 fosforilada se desliga do receptor por repulsão eletrostática. O domínio quinase de FGFR2, na ausência de Grb2, se torna totalmente ativo acessando resíduos de tirosina previamente localizados na interface Grb2-FGFR2 por transfosforilação. Receptor ativo, sinalização ativa.



Fonte própria.

2. Motivação e Objetivos

As proteínas FGFR2 e Grb2 são de fundamental importância para a transdução do sinal extracelular para o meio intracelular, participando de vias de sinalização importantes como a da MAPK. Como visto, sua desregulação acarreta uma variedade de síndromes e cânceres. Pretende-se, neste contexto, obter informações estruturais e dinâmicas referentes ao domínio quinase (FGFR2_Q) da proteína e caracterizar o mecanismo de interação entre o domínio citoplasmático de FGFR2 (FGFR2_C) com a proteína Grb2, já que esta última tem papel fundamental na regulação do sinal de FGFR2. Além de caracterizar mudanças estruturais de Grb2 em diferentes pHs, visto que células cancerígenas apresentam ambiente tumoral com pH mais ácido. Propõe-se então:

- a) Realizar a expressão e purificação das proteínas FGFR2_Q, FGFR2_C e Grb2;
- b) Determinar os tempos de relaxação T_1 e T_2 de FGFR2_Q;
- c) Obter informações acerca da interação entre FGFR2_C e Grb2 através de experimentos de T_2 ;
- d) Medir a interação entre FGFR2 e Grb2 por perturbação do deslocamento químico e de relaxação, utilizando ^{15}N Grb2 como repórter;
- e) Realizar uma caracterização estrutural de Grb2 em diferentes faixas de pH acima (7,0 e 8,0) e abaixo (4,0 e 5,0) do Ponto Isoelétrico (6,3).

3. Materiais e Métodos

3.1. Testes de Solubilidade FGFR2_α

A primeira expressão de FGFR2_α foi realizada seguindo protocolo usual com 10 mL de cultura expressos e induzidos em duas diferentes temperaturas (20 e 37 °C) com três tempos distintos de indução (14, 15 e 16 horas). O protocolo de expressão se dá por adição de 1 mL de pré-inóculo em 20 mL de meio LB com 50 mg/mL de Canamicina deixados a 100 RPM/37 °C em shaker *overnight*. Um volume de 2 mL desta cultura é rejuvenescida em 8 mL de meio LB com antibióticos e levados ao shaker com rotação de 100 RPM à 37 °C até atingir a DO_{600 nm}=0,6. Para a temperatura de 20 °C, estas culturas são induzidas e agitadas em shaker mantendo-se a rotação por tempos específicos de 14, 15 e 16 horas. As culturas expressas à 37 °C são induzidas e mantidas na rotação de 100 RPM por 3 horas. Após a indução, as culturas são centrifugadas por 30 minutos à 3583 xg/4 °C, sendo descartado o sobrenadante. A parte insolúvel (pellet) é submetida à tampão Tris-HCl (50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl; 1 mM de β-Mercaptoetanol; 0,1 mM de inibidor de protease P2714-1BTL), submetida à lise celular através de sonicação pulsada em 15 ciclos de 30 segundos cada (2 segundos *ON* e 1 segundo *OFF*) com 30 segundos de pausa entre os ciclos para evitar o aquecimento da amostra e novamente centrifugada por 90 minutos à 34957 xg/4 °C. Testes de solubilidade foram realizados a fim de melhorar a fração de proteína solúvel em ambas temperaturas. Na etapa da expressão foi adicionado 0,5 M de Sorbitol e na etapa de lise cinco diferentes testes foram realizados: a) três diferentes concentrações de Triton X-100 (0,2; 1,0 e 2,0%), b) 10% de glicerol, e c) 0,5 mg/mL de lisozima

3.2. Expressão das proteínas Grb2 e FGFR2_α em Meio Mínimo

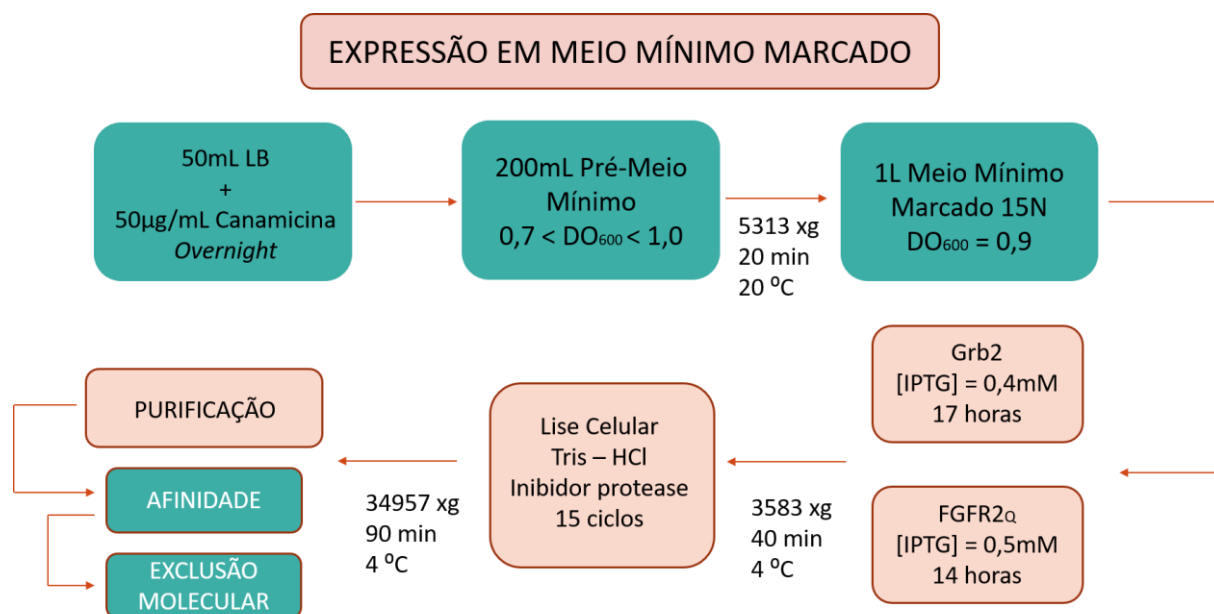
As proteínas foram expressas em bactéria *E. coli* BL21 (DE3). Foram cultivadas em 50 mL de meio líquido LB com os antibióticos de resistência (Canamicina 50 mg/mL para ambas as proteínas) e mantido sob agitação de 100 RPM a 37 °C *overnight*. Adicionou 5 mL desta cultura de bactérias em 200 mL de pré meio mínimo M9 (0,1 mM de CaCl₂; 1 g/L de NH₄Cl; 0,2 mM de MgSO₄; 10 mM de Cloreto de Ferro (III); coquetel vitamínico (1 mg/L de Biotina; 1mg/L de Cloreto de Colina; 1mg/L de Ácido Fólico; 1 mg/L de Nicotinamida; 1 mg/L de Ácido D-Pantotênico; 1 mg/L de Hidroclorato Piridoxal; 0,1 mg/L de Riboflavina), 2-3 g/L C₆H₁₂O₆; solução TS2 contendo íons metálicos (ZnSO₄; MnCl₂; H₃BO₃; CoCl₂; NiCl₂; CuCl₂; Na₂MoO₄;

Na₂SeO₃) e antibióticos), estando em DO_{600 nm} = 0,2. Então, incubou-se sob agitação de 100 RPM a 37 °C até atingir DO_{600 nm} entre 0,7 e 1,0. Centrifugou-se a 5313 xg, 20 °C durante 20 minutos. Os pellets foram ressuspensos em 1 L de meio mínimo M9 enriquecido com ¹⁵NH₄Cl para ambas as proteínas. Manteve sob agitação de 100 RPM a 37 °C até atingir DO_{600 nm} = 0,9. Para FGFR2_Q adicionou-se 0,2 M Sorbitol em ambos os meios (LB e M9) para aprimorar sua solubilidade. Atingida a DO_{600 nm}, a temperatura foi diminuída para 20 °C e as culturas de bactérias foram induzidas utilizando 0,4 mM de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) para Grb2 e 0,5 mM de IPTG para FGFR2_Q, permanecendo incubadas em 100 RPM *overnight* por 17 horas para Grb2 e 14 horas para FGFR2_Q. Após, as suspensões foram submetidas à centrifugação a 3.583 xg em 4 °C por 40 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à tampão Tris-HCl (50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl; 1 mM de β-Mercaptoetanol; 0,1 mM de inibidor de protease P2714-1BTL) e submetidas à lise celular através de sonicação pulsada em 15 ciclos de 30 segundos cada (2 segundos *ON* e 1 segundo *OFF*) com 30 segundos de pausa entre os ciclos para evitar o aquecimento da amostra. Os extratos foram coletados através de centrifugação a 34.957 xg a 4 °C com duração de 90 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em 0,45 μm Minisart®.

Alíquotas antes e após a indução foram coletadas para verificação das mesmas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Uma representação esquemática do processo de expressão pode ser visto na Figura 10 abaixo.

Figura 10 – Representação esquemática dos passos utilizados no processo de expressão e purificação das proteínas Grb2 e FGFR2 α em meio mínimo enriquecido com ^{15}N .



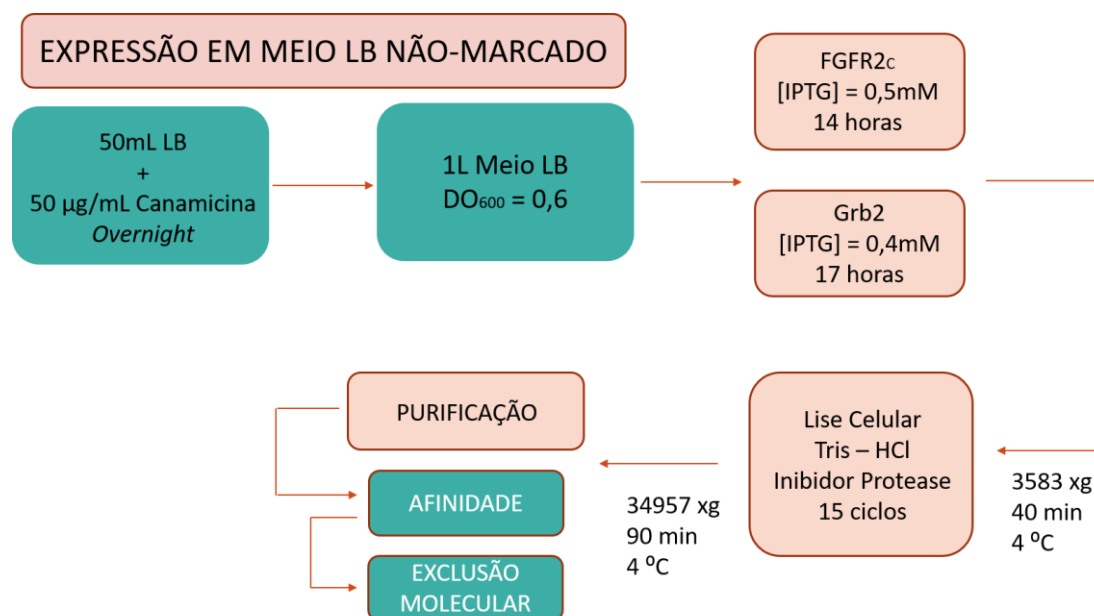
3.3. Expressão FGFR2 α e Grb2

As proteínas foram expressas em bactéria *E.coli* BL21 (DE3) e cultivadas em 50 mL de meio LB com Canamicina (50 mg/mL) e mantido sob agitação de 100 RPM a 37 °C *overnight*. Adicionou-se 5 mL desta cultura de bactérias em 1 L de meio LB e manteve-se a agitação de 100 RPM a 37 °C até atingir a $\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 0,6$. Acrescentou-se, para FGFR2 α , 0,5 mM de IPTG e, para Grb2, 0,4 mM de IPTG e induziu-se por 14 (FGFR2 α) e 17 (Grb2) horas a 20 °C. O meio de cultura foi centrifugado a 3583 xg por 40 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão de lise Tris-HCl (50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl; 1 mM de β -Mercaptoetanol) e lisadas por sonicação de 15 ciclos de 30 segundos cada (2 segundos *ON* e 1 segundo *OFF*) com 30 segundos de pausa entre cada ciclo para evitar o aquecimento da amostra. A amostra foi centrifugada a 34.957 xg por 90 minutos a 4 °C e o sobrenadante filtrado em 0,45 μm Minisart $^{\text{®}}$.

Alíquotas antes e após a indução foram coletadas para verificação das mesmas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Uma representação esquemática do processo de expressão pode ser visto na Figura 11 abaixo.

Figura 11 – Representação esquemática do processo de expressão das proteínas FGFR2_c e Grb2 em meio LB.



3.4. Purificação das proteínas FGFR2_Q, FGFR2_c e Grb2

Utilizou-se o sistema de purificação manual com resina *IMAC HiTrap HP* previamente carregada com cobalto. Esta foi lavada com água destilada e equilibrada com tampão (50 mM de Tris-HCl pH 8,0 com 100 mM de NaCl e 1 mM de β -Mercaptoetanol). Em seguida, a fração solúvel foi aplicada à coluna e lavada com 5 mM de imidazol para a retirada de interações inespecíficas. Posteriormente, foi realizada eluição com aumento gradativo da concentração de imidazol até o limite de 500 mM. As amostras retiradas do processo de purificação por afinidade foram concentradas para 2 mL antes de serem injetadas em resina *Sephacryl 100* ou *Superdex 75* para o processo de gel filtração (exclusão molecular) para retirada de contaminantes e troca de solução tampão da amostra. Utilizou-se tampão com 20 mM de NaPi pH 7,0 contendo 200 mM de NaCl e 1 mM de β -Mercaptoetanol (Grb2 pH 7,0 e FGFR2_c) e 100 mM de NaCl para FGFR2_Q. Para Grb2 pH 8,0 foi utilizado tampão contendo 20mM de NaK contendo 200 mM de NaCl e 1mM de β -Mercaptoetanol. Para pHs ácidos (4,0 e 5,0), amostras puras de Grb2 em pH 7,0 foram utilizadas e, através de diálise, foi realizado a troca para tampão de 5mM de acetato contendo as mesmas concentrações de NaCl e β -Mercaptoetanol. A pureza da amostra após cada etapa de purificação foi verificada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após concentração

da amostra final, adicionou-se *cocktail* de inibidor de protease P2714 – 1BLT – Sigma Aldrich®.

3.5. Amostras para ressonância

Amostras de ressonância foram preparadas com volume total de 600 µL contendo 103 µM de FGFR2_Q isotopicamente marcada com ¹⁵N em 20 mM NaPi e 100 mM NaCl, pH 7,0, 90% H₂O/10% D₂O.

Para a interação, as amostras foram preparadas com volume total de 600 µL contendo aproximadamente 100 µM de cada proteína, FGFR2_C e Grb2 isotopicamente marcada com ¹⁵N, em 20 mM NaPi e 200 mM NaCl, pH 7,0, 90% H₂O/10% D₂O.

A proteína Grb2 isotopicamente marcada com ¹⁵N foi expressa e purificada pela aluna de mestrado do grupo Karoline Sanches.

As sequências de pulso utilizadas em todos os experimentos estão contidas em *Protein Dynamics Measurements by TROSY-based NMR Experiments* [67] com temperatura de 25 °C no espectrômetro Bruker Avance III de 800 MHz localizado no Centro de Ressonância Magnética (Rio de Janeiro) em parceria com o Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda de Almeida, usando sondas de tripla ressonância e amplificadores de quatro sinais de gradiente, com T₁=0,4 s e T₂=0,01696 s.

Os espectros 1D foram analisados através do software *TopSpin 3.5pl7*, enquanto os espectros 2D foram analisados através do software *CcpNMR (Collaborative Computational Project for NMR)*. Todos os espectros obtidos foram processados utilizando *NMRDraw* e *NMRPipe* que se encontram na *NMRbox*.

As estruturas apresentadas no trabalho foram geradas pelo software *UCSF Chimera*.

3.6. Amostras e tratamento dos dados de DSC

Amostras de Grb2 em seus diferentes pHs foram preparadas para a técnica de DSC com volume total de 700 µL contendo 100 µM de proteína por amostra.

Após o equilíbrio do aparelho (CSC 6300 Nano DSC III – *Calorimetry Sciences Corporation*) com o mesmo tampão em que a proteína se encontrava, foram realizadas varreduras à 1 °C/min de 0 – 30 °C e de 0 – 90 °C alternando-se processos de aquecimento e resfriamento. O tempo de equilíbrio entre cada medida foi de 600 s.

Os espectros foram tratados através do programa *Origin 8 Pro*.

3.7. Amostras para DLS

Amostras de Grb2 em seus diferentes pHs foram preparadas para a técnica de DLS com volume total de 1,5mL contendo 60µM de proteína por amostra. As medições foram efetuadas em aparelho ZETASIZER NANO Series – Malvern Panalytical.

3.8. Cálculos de R_1 , R_2 e tempo de relaxação aparente τ_c

Os valores de R_1 e R_2 foram determinados através das intensidades dos picos medidos pela função da forma

$$R_{1,2} = -\frac{1}{T_{1,2}} \ln\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (6)$$

sendo $T_{1,2}$ os tempos de recuperação, I a intensidade do pico do espectro obtido e I_0 a intensidade do pico do espectro de referência [66].

O tempo de relaxação aparente (τ_c) foi calculado através da expressão aproximada para esferas rígidas

$$\tau_c \approx \frac{1}{4\pi\nu_N} \sqrt{6 \frac{R_2}{R_1} - 7} \quad (7)$$

sendo ν_N a frequência de precessão do nitrogênio.

3.9. Estimativa da massa molecular a partir do τ_c

Para a estimativa da massa molecular de FGFR2_C, foram utilizados os valores de T1 e T2 de proteínas globulares medidas por J. Aramini obtidas a partir do consorcio de genômica estrutural NESG (*northeastern structural genomics consortium*) (Tabela 4). Todos os dados foram obtidos com um campo de 600 MHz a 25 °C.

Tabela 4 – Dados dos tempos de correlação rotacionais compilados por J. Aramini. Todos os dados foram coletados em espectrômetro Bruker 600 MHz a 25 °C, exceto os assinalados com asterisco, coletados em campo de 800 MHz.

Proteína	MW (kDa)	¹⁵N T₁(ms)	¹⁵N T₂(ms)	τ_c (ns)
PsR76A (NC5)	7.2	478.0	128.0	5.10
VfR117 (NC)	11.2	605.0	119.0	6.30
Syr11 (NC5)	12.4	630.0	104.0	7.10
ER541-37-162 (NC5)	15.8	729.0	66.5	10.0
ER540 (NC5)	18.8	909.0	66.5	11.3
SoR190 (NC)	13.8	697.5	100.3	7.70
TR80 (NC5)	10.5	612.8	102.9	7.00
Ubiquitina (NC)	9.0	441.8	144.6	4.40
HR2873B (NC)	10.7	492.0	115.0	5.70
B-domain (NC)	7.2	423.5	153.5	4.05
BcR97A (NC)	13.1	705.8	80.6	8.80
PfR193A (NC)	13.6	733.9	80.9	9.00
MvR76 (NC)	20.2	1015.0	64.5	12.2
DvR115G (NC)	10.9	608.7	115.6	6.50
MvR110B (NC5)	11.8	707.0	99.2	7.80
VpR247 (NC5)	12.5	661.2	88.3	8.05
BcR147A (NC)	11.9	645.0	104.0	7.20
WR73 (NC5)	21.9	1261.0*	41.3*	13.0
NsR431C (NC5)	16.8	855.5	71.2	10.6
StR82 (NC)	9.2	537.3	100.4	6.6

Fonte: [68]

Os dados de τ_c e MW foram plotados no programa OriginPro 8 e foi realizada uma regressão linear obtendo-se a fórmula (8) utilizada para os cálculos das massas moleculares estimadas neste trabalho.

$$\tau_c = 0,16741 + 0,59981 \times MW \quad (8)$$

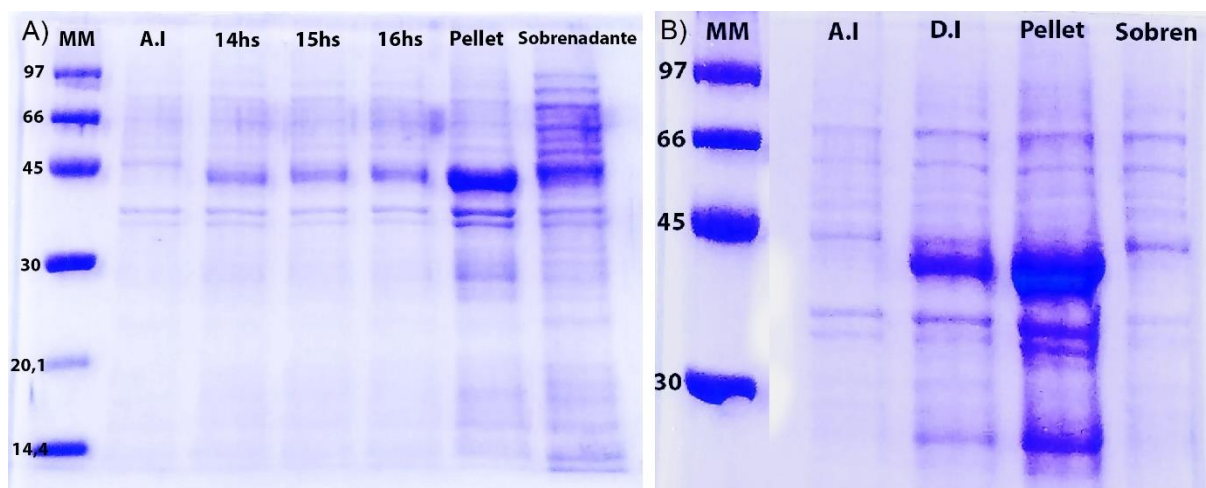
4. Resultados e Discussões

4.1. FGFR2 domínio quinase (FGFR2_o)

4.1.1. Expressão e Purificação

O domínio quinase da proteína FGFR2 apresentou baixa solubilidade após expressão e lise celular para temperaturas de 20 e 37 °C quando submetidos ao processo da seção 3.1 (Figura 12). Em relação ao tempo de indução à 20 °C, não se nota grande diferença na expressão para tais tempos, tendo sido escolhido um tempo de indução intermediário de 15 horas.

Figura 12 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a expressão da proteína FGFR2 quinase em *E.coli* BL21 (DE3) em duas diferentes temperaturas: a) 20°C e B) 37°C. Os valores na lateral do gel indicam referências de massa molar (97 kDa – Fosfolipase B; 66kDa – Albumina; 45kDa – Ovoalbumina; 30kDa – Anidrate Carbônica; 20,1kDa – Inibidor de Tripsina e 14,4kDa – Lactoalbumina- α), MM : marcador de massa molar; A.I: antes da indução (onde não se nota a presença da proteína) e DI: depois da indução (presença da proteína no gel).

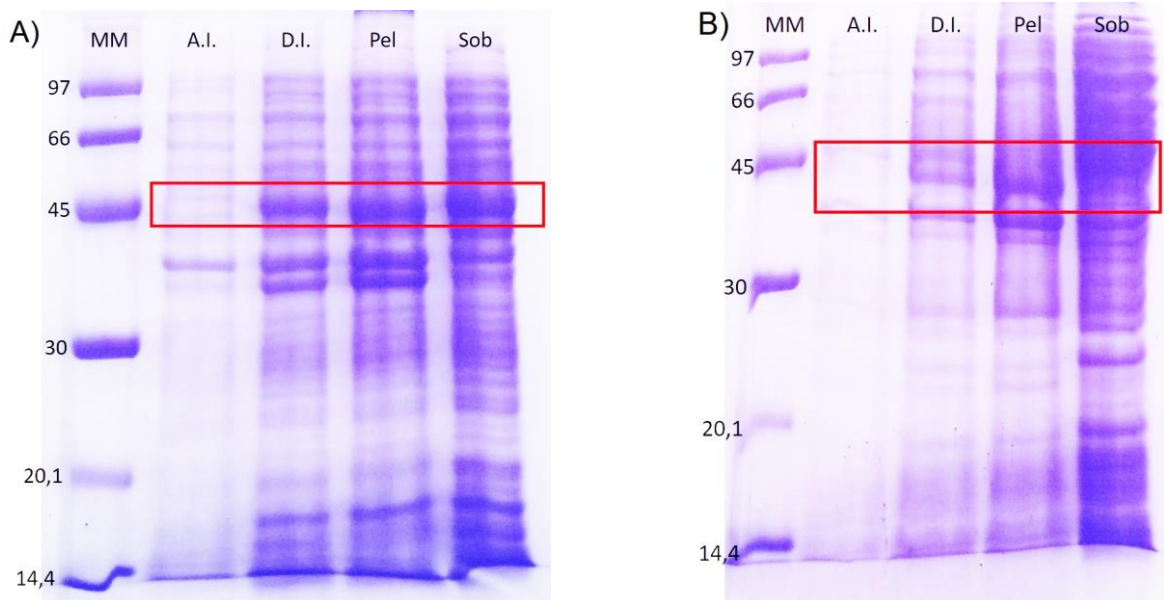


Os testes de solubilidade foram realizados a fim de aumentar a porção solúvel de proteína presente no sobrenadante após o processo de lise celular. Como citado na seção anterior, foram feitas adições nos processos de expressão e de lise para tal propósito.

Na Figura 13, temos os géis SDS-PAGE referente à adição de 0,5 M de Sorbitol na etapa de expressão da proteína em ambas temperaturas (20 e 37 °C). Nota-se a permanência de grande parte da proteína no pellet com a temperatura de expressão em 37 °C, enquanto com a temperatura de expressão mais baixa, é possível observar

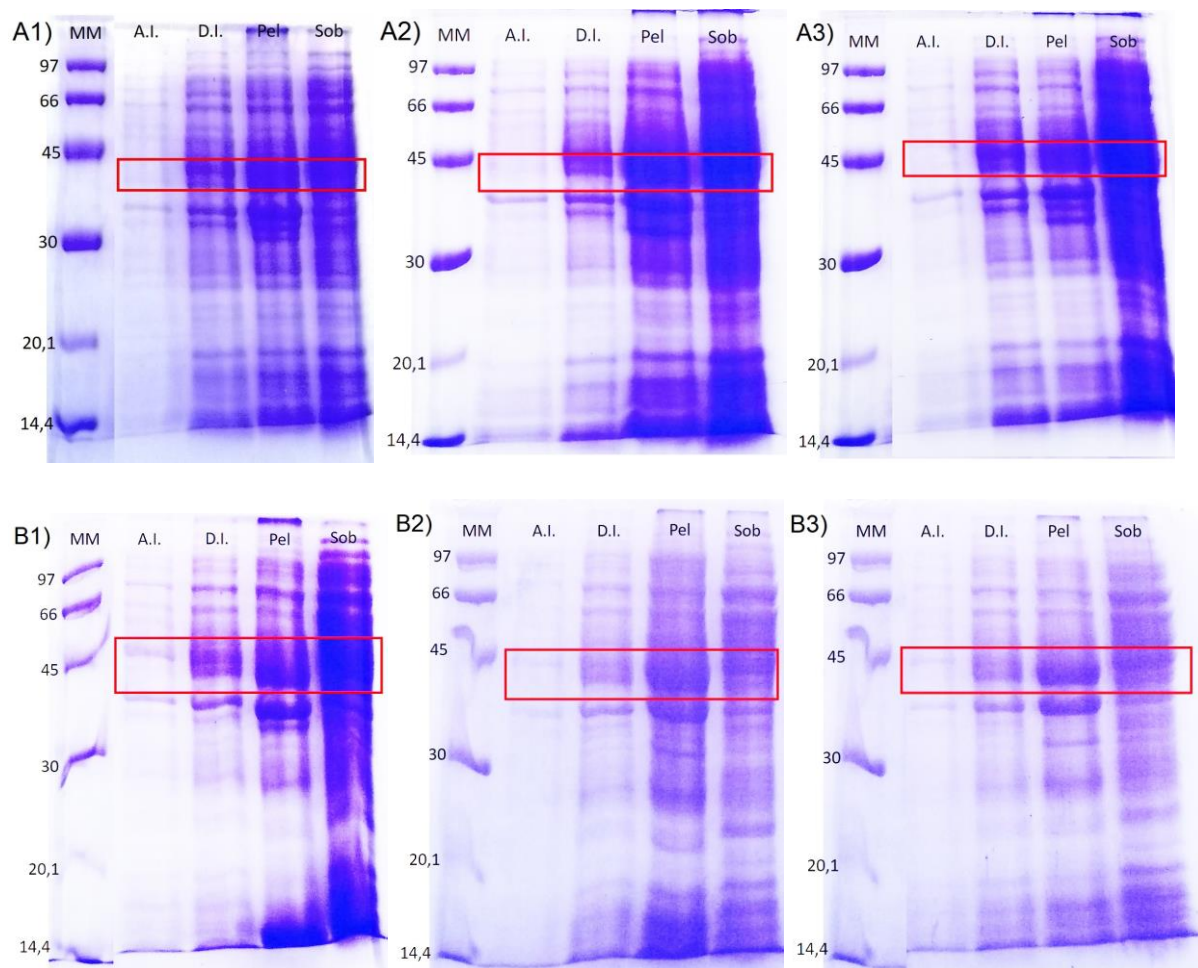
uma melhor distribuição entre as porções de proteína encontradas no pellet e no sobrenadante.

Figura 13 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente à expressão da proteína FGFR2 α com adição em 0,5 M de Sorbitol em duas temperaturas distintas: A) 20 °C e B) 37 °C. MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da Indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.



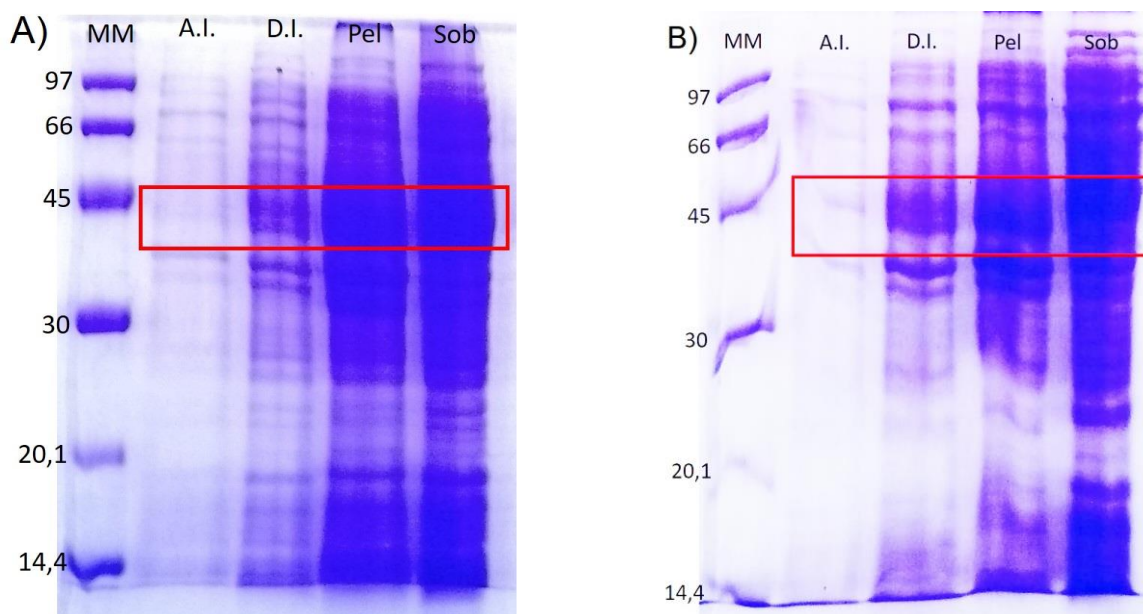
Os géis referentes às adições de diferentes concentrações de Triton X-100 ao tampão de lise, mostrados na Figura 14, indicam a permanência de grande parte da proteína no pellet, em ambas as temperaturas. O aumento da largura das bandas à temperatura de 20°C indica que, além de não solubilizar a proteína, a adição de Triton provocou o aumento de contaminantes no sobrenadante.

Figura 14 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente à expressão da proteína FGFR2_Q em duas temperaturas diferentes: A) 20 °C e B) 37 °C; com adição de diferentes concentrações de Triton X-100 na etapa de lise celular (1 – 0,2% Triton X-100; 2 – 1,0% Triton X-100; 3 – 2,0% Triton X-100). MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.



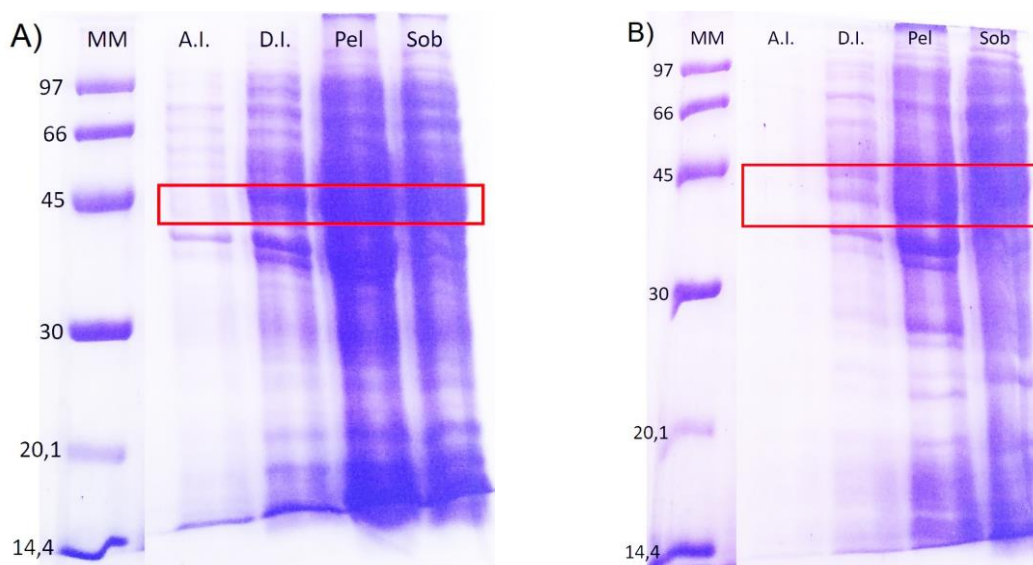
Na Figura 15, temos os géis SDS-PAGE referente à adição de 10% de Glicerol na etapa de lise celular da proteína em ambas temperaturas (20 e 37 °C). Nota-se a permanência de grande parte da proteína no pellet em ambas temperaturas além de um aumento na concentração dos contaminantes, evidenciado pelo aumento da largura das bandas nos géis, dificultando a visualização individual de cada banda.

Figura 15 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente à expressão da proteína FGFR2_Q em duas temperaturas distintas: A) 20°C e B) 37°C; com adição de 10% de Glicerol na etapa de lise celular. MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.



Os géis referentes à adição de 0,5mg/mL de Lisozima ao tampão de lise, mostrados na Figura 16, indicam a permanência de grande parte da proteína no pellet, em ambas as temperaturas. Porém, tal adição não teve grande influência no aumento da concentração de contaminantes.

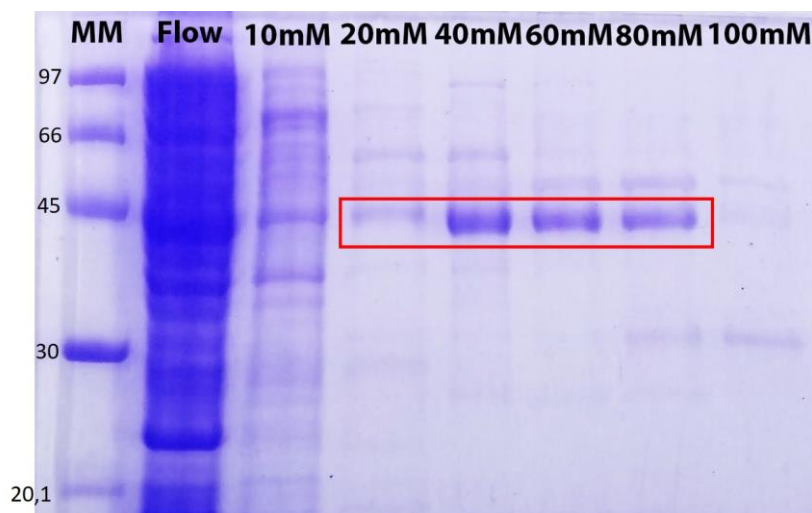
Figura 16 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente à expressão da proteína FGFR2_Q em duas temperaturas distintas: A) 20 °C e B) 37 °C; com adição de 0,5mg/mL de Lisozima na etapa de lise celular. MM – Marcador de massa molar; A.I – antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.



Através da análise dos géis de poliacrilamida SDS-PAGE foi possível inferir que a melhor temperatura de expressão para a proteína FGFR2_Q é a de 20 °C, visto que, mesmo com a adição das substâncias citadas, a grande maioria da proteína ainda se encontrava no pellet à temperatura de 37 °C. Dentre os testes realizados à 20 °C, determinou-se que o melhor aditivo para a solubilização da proteína foi o Sorbitol, como pode ser constatado pela figura 12. Além disso, as outras opções aumentaram a concentração de contaminantes, dificultando a visualização das porções do pellet e sobrenadante nos géis de poliacrilamida.

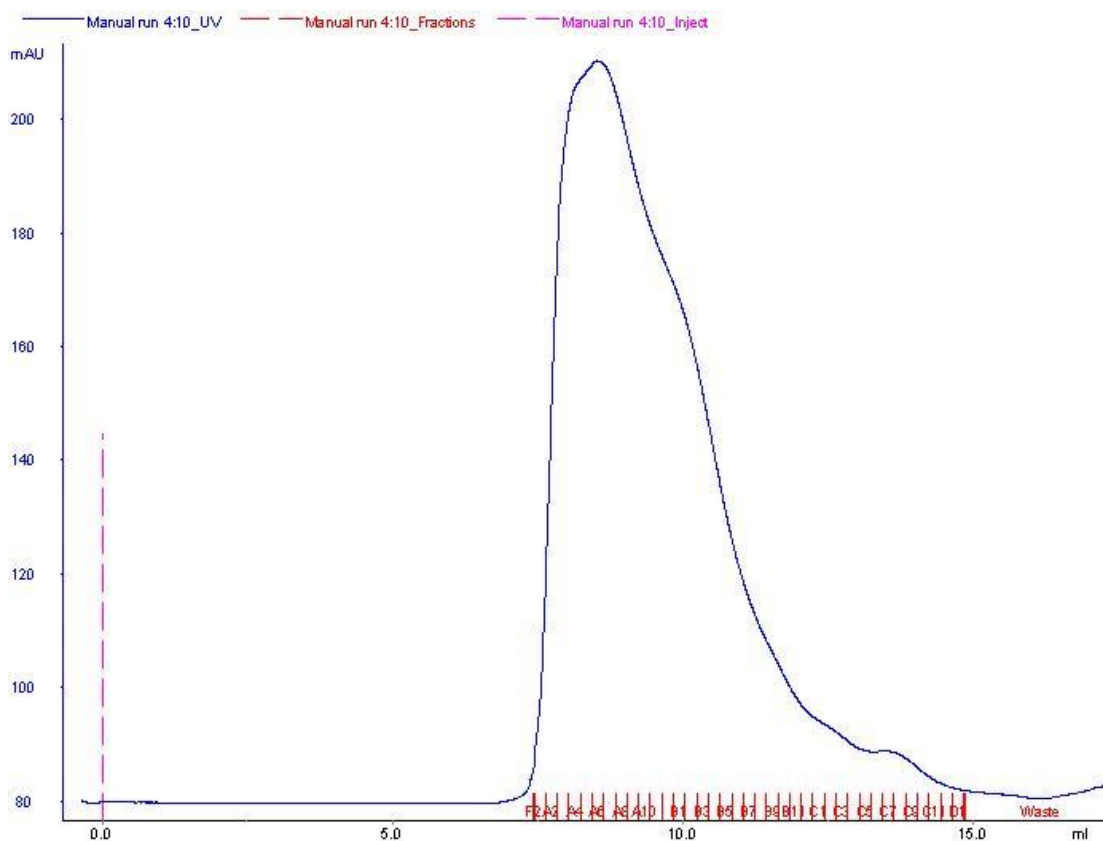
A purificação foi realizada em duas etapas: a primeira consistindo em cromatografia por afinidade ao Cobalto, devido à sua cauda de histidina, com concentrações crescentes de Imidazol para eluição da proteína (Figura 17) seguida de gel filtração com coluna *Superdex 75* para exclusão das proteínas contaminantes levando em consideração as diferentes massas molares.

Figura 17 – Gel SDS-PAGE 20% referente à purificação por afinidade de FGFR2 quinase. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não apresentam afinidade por cobalto; 10-100mM – concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. Em vermelho, destaca-se a porção proteica utilizada para a etapa seguinte de gel filtração.



Após a etapa de purificação por afinidade ao Cobalto, as amostras que continham a proteína em questão foram concentradas e submetidas à purificação por exclusão molecular com tampão NaPi/NaCl. As amostras foram coletadas de acordo com o aumento da intensidade ultravioleta do aparelho AKTA-*purifier*. Abaixo, encontra-se o perfil de purificação e as amostras coletadas (Figura 18).

Figura 18 – Cromatograma da purificação de FGFR2 α por exclusão molecular através do sistema AKTA-purifier. As amostras são coletadas devido ao aumento na luz UV. Tais amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE para constatação de sua pureza e concentradas para futuros experimentos.



Amostras de cada coleta foram aplicadas em gel SDS-PAGE para constatação de pureza. As amostras puras foram concentradas e utilizadas para os experimentos de ressonância magnética nuclear.

4.1.2 Dinâmica estrutural FGFR2 α

Valores de R1 e R2, foram determinados para 5 deslocamento químicos aleatórios compreendidos entre 8 – 10 ppm ^1H , região mais dinâmica, dos espectros 1D TROSY-based (*transferência de polarização do 1H para o 15N e vice versa via TROSY*) para o domínio quinase de FGFR2 (Figura 19) através das expressões (5) e (6).

Os picos escolhidos, assim como seus respectivos valores de R₁ e R₂ podem ser vistos na Tabela 5.

Figura 19 – Espectros 1D ^1H dos experimentos de TROSY-based de R_1 (a) e R_2 (b) do domínio quinase de FGFR2. Em vermelho temos o espectro das intensidades (I) e, em azul, o espectro das intensidades de referência (I_0). As linhas verticais especificam os pontos que foram utilizados para os cálculos do tempo de relaxação aparente através das fórmulas (6) e (7).

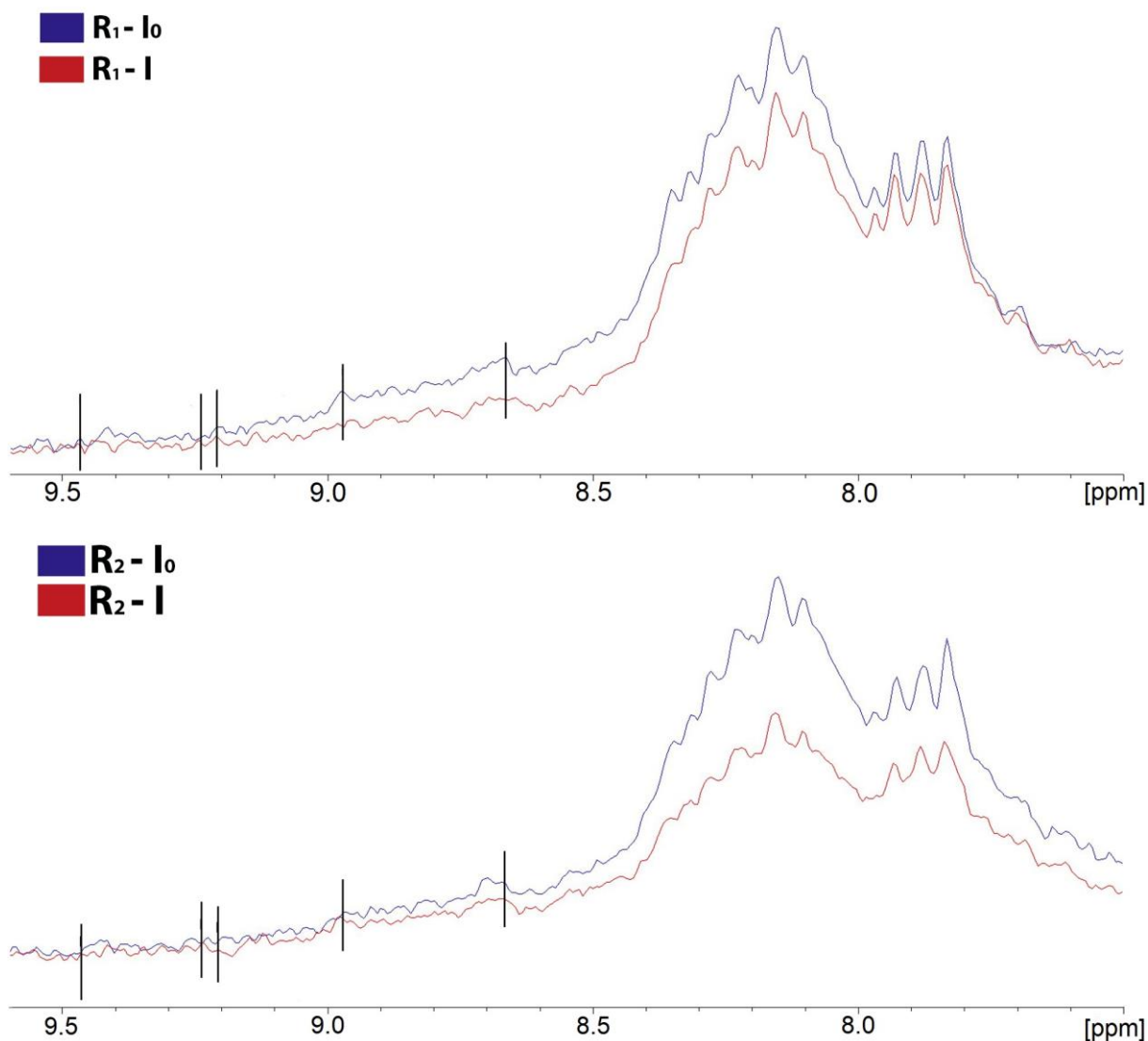


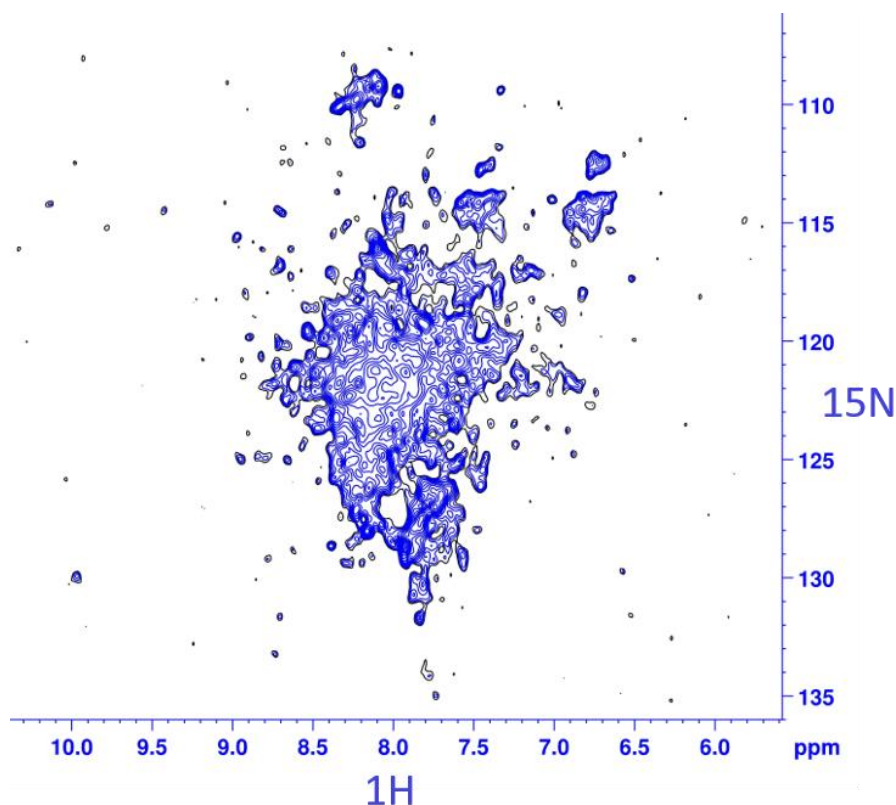
Tabela 5 - Valores das intensidades e seus respectivos R_1 e R_2 , calculados através da fórmula (6) e o tempo de relaxação aparente através da fórmula (7). A estimativa da massa molecular foi calculada através da fórmula (8).

Ppm	I_0 R2	I R2	I_0 R1	I R1	R2	R1	τ_c (ns)	MW (kDa)
8,666	9,23e4	4,94e4	4,63e4	3,44e4	36,85	0,74	16,8	28
8,972	5,78e4	2,27e4	2,52e4	2,0e4	55,1	0,57	23,5	39
9,207	2,24e4	1,06e4	3926	2697	43,89	0,938	16,24	27
9,237	1,35e4	4,7e3	1817	3099	62,27	1,33	16,29	27
9,465	1,03e4	4,13e3	5115	6404	53,88	0,56	23,44	39

Encontrou-se um tempo de relaxação aparente entre 16,2 ns e 23,5 ns, gerando estimativas de massas moleculares coerentes com o domínio quinase, o qual apresenta massa molecular de 40 kDa.

Experimentos de TROSY-HSQC 2D ^1H - ^{15}N também foram realizados (Figura 20) e, apesar da baixa concentração da proteína (103 μM), o que dificultou a realização de medidas mais precisas, é possível notar a presença de picos com alta dispersão de deslocamento químico indicando boa estruturação do domínio quinase, demonstrando uma estrutura, pelo menos, parcialmente enovelada. Nota-se também a presença de muitos picos sobrepostos no centro do espectro, entre 7.5 e 8.5 ppm para ^1H e 117 e 127 ppm para ^{15}N . Esta “mancha” pode indicar a presença de agregação parcial da proteína. Provavelmente temos uma mistura do domínio quinase enovelado com o domínio quinase agregado. Além disso, proteínas com alto conteúdo de hélice apresenta uma sobreposição maior nesta mesma região, como é o caso da proteína em questão. Estes dados indicam a necessidade de se trabalhar nas condições de preparação da amostra, como concentração de sal e pH, e condições de aquisição do espectro, como temperatura.

Figura 20 – Espectro TROSY-HSQC 2D ^1H - ^{15}N do domínio quinase de FGFR2 à 298 K, o qual apresenta uma estrutura parcialmente enovelada.

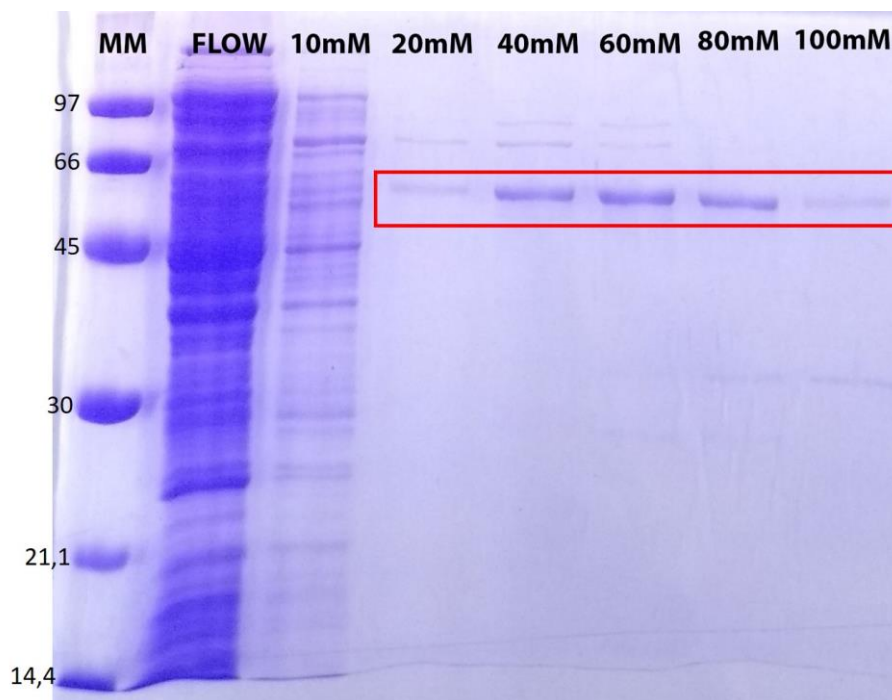


4.2. Interação FGFR2 citoplasmática (FGFR2_c) e Grb2

4.2.1. Expressão e Purificação FGFR2_c

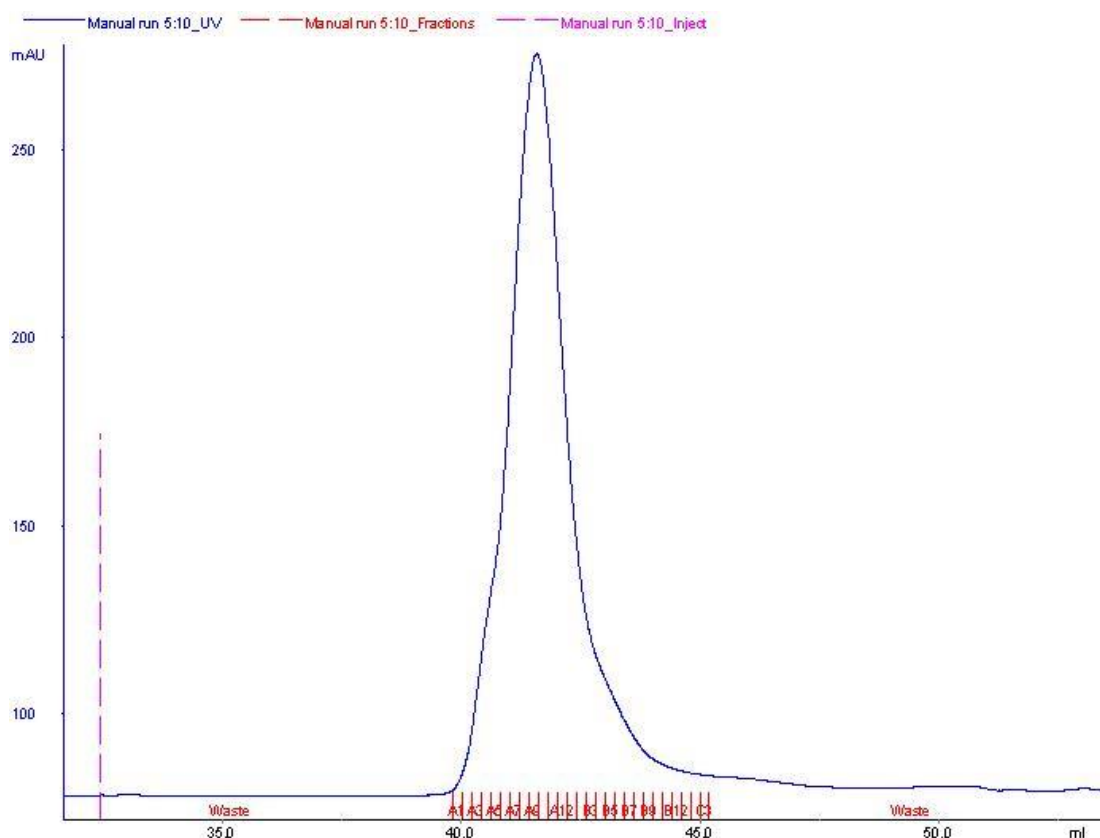
A porção citoplasmática da proteína FGFR2 não apresentou problemas de solubilidade e foi expressa seguindo protocolo especificado na seção 3.2. Sua purificação foi realizada primeiramente por afinidade ao Cobalto (Figura 21) devido à sua cauda de histidina e, posteriormente, por exclusão molecular.

Figura 21 – Gel SDS-PAGE 15% referente à purificação por afinidade de FGFR2 citoplasmática. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não apresentam afinidade por cobalto; 10-100 mM – concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. Em vermelho, destaca-se a porção proteica utilizada para a etapa seguinte de gel filtração.



Após a etapa de purificação por afinidade ao Cobalto, as amostras que continham a proteína em questão foram concentradas e submetidas à purificação por exclusão molecular com tampão NaPi/NaCl. As amostras foram coletadas de acordo com o aumento da intensidade ultravioleta do aparelho *AKTA-purifier*. Abaixo, encontra-se o perfil de purificação e as amostras coletadas (Figura 22).

Figura 22 – Cromatograma da purificação de FGFR2_c por exclusão molecular através do sistema AKTA-purifier. As amostras são coletadas de acordo com o aumento da absorção da luz UV. Tais amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE para constatação de sua pureza e concentradas para futuros experimentos.

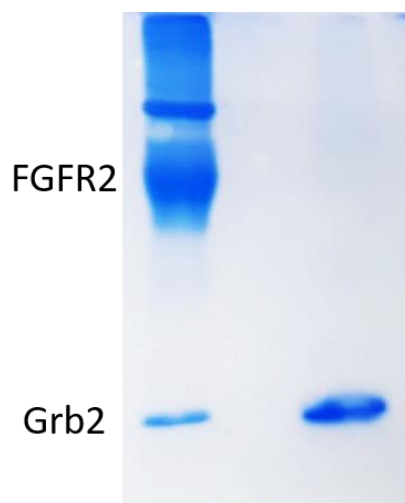


Amostras de cada coleta foram aplicadas em gel SDS-PAGE para constatação de pureza. As amostras puras foram concentradas e utilizadas para os experimentos de ressonância magnética nuclear.

4.2.2. TROSY-HSQC da interação entre FGFR2_c e Grb2

As proteínas Grb2 isotopicamente marcada e FGFR2_c foram expressas e purificadas separadamente seguindo-se protocolo das seções 3.1 e 3.2, respectivamente. Após a purificação, as proteínas puras foram juntamente concentradas para 600 μ L. A certificação da presença das duas proteínas na solução foi feita através de gel de poliacrilamida SDS-PAGE, como pode ser observado na figura 23.

Figura 23 – Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% da solução utilizada nos experimentos TROSY-based da interação de FGFR2_c e Grb2. A proteína Grb2 pura foi utilizada como marcador de massa molar para comparação das alturas no gel.

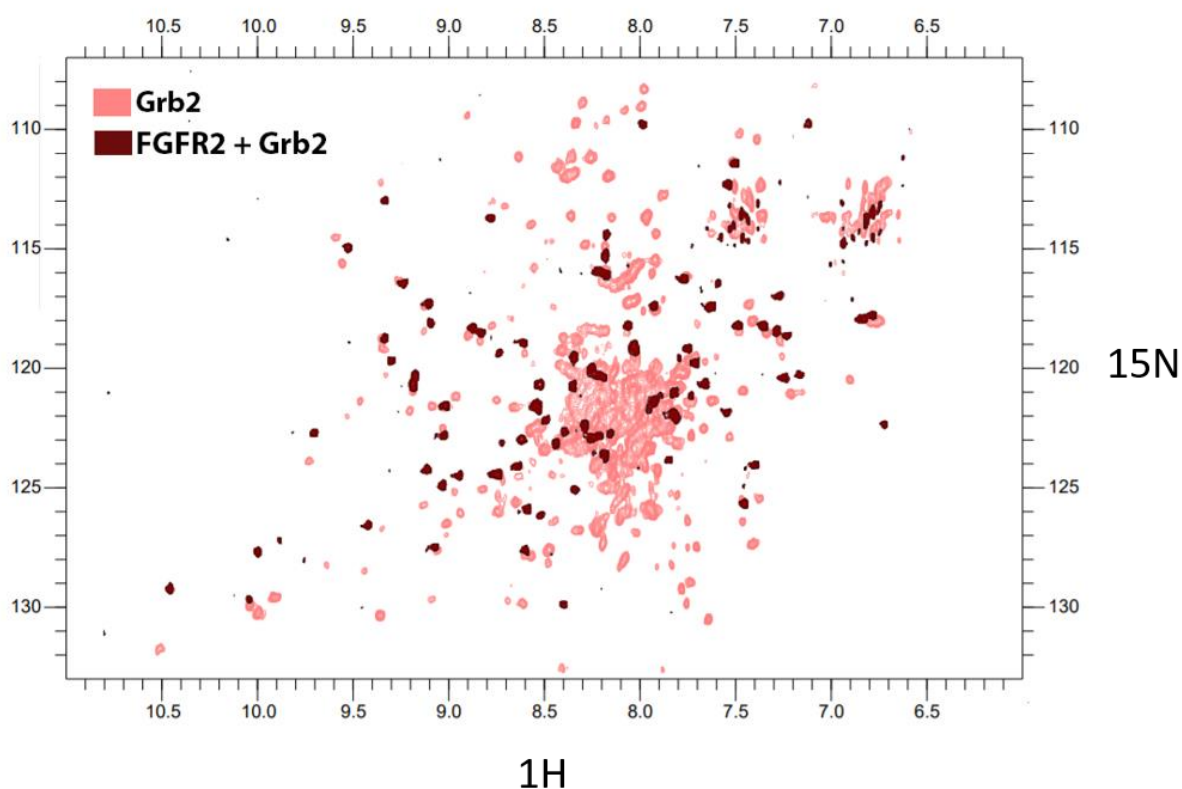


No gel de poliacrilamida (Figura 23), observa-se uma terceira marcação acima da porção citoplasmática da proteína FGFR2. Como tal marcação não é observada em nenhuma das etapas de purificação de Grb2 e somente após a gel filtração de FGFR2_c, duas alternativas surgem: a primeira seria que a utilização de tampão fosfato auxilia na fosforilação dos resíduos de tirosina na estrutura de FGFR2_c aumentando sua massa molecular; a segunda possibilidade é a formação de um complexo monômero-monômero de FGFR2_c-Grb2 após a interação, o que teria massa molar próxima à encontrada no gel. Experimentos de western blot com anticorpos de proteínas fosforiladas serão realizados para testar a primeira hipótese.

O estudo da interação foi obtido através da comparação entre os espectros de Grb2 pura e da interação de FGFR2_c + Grb2, sendo Grb2 marcada isotopicamente com ¹⁵N em ambos os casos.

É possível observar na figura 24 a sobreposição dos espectros 2D TROSY-HSQC de Grb2 pura e na interação com FGFR2_c. Nota-se uma grande perda de sinal no espectro da interação, visto que os aminoácidos de Grb2 que participam da interação com FGFR2 perdem parte de sua dinâmica.

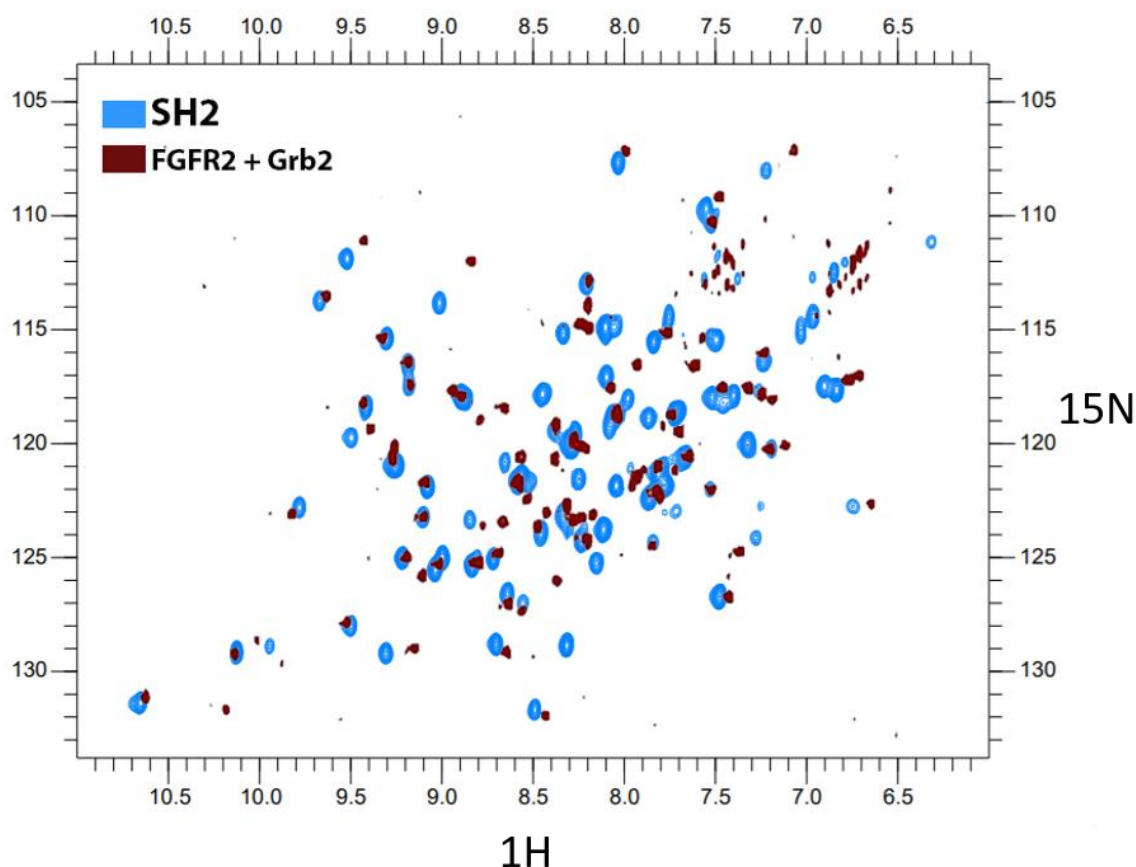
Figura 24 – Sobreposição dos espectros de TROSY-HSQC das proteínas Grb2 pura (em rosa) e interagindo com FGFR2 (em marrom).



A perda no sinal do espectro da interação quando comparado ao da proteína isolada evidencia que grande parte dos aminoácidos de Grb2 estão envolvidos na interação transiente, e não somente o domínio C-SH3 como reportado anteriormente na literatura [57], [66].

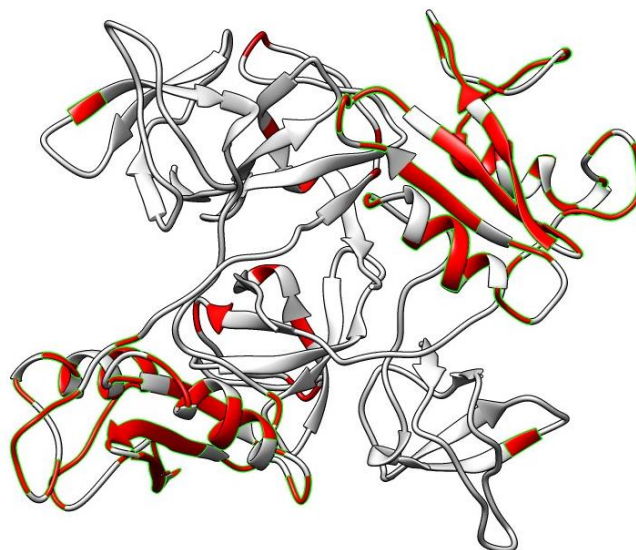
Visto que o domínio SH2 foi reportado pela literatura por não fazer parte da interação, e no intuito de caracterizar quais resíduos de aminoácidos dos domínios N- e C-SH3 estão interagindo com a proteína FGFR2, o espectro da interação entre FGFR2-Grb2 foi sobreposto ao do domínio SH2 isolado marcado isotopicamente com ^{15}N para comparação (Figura 25).

Figura 25 – Sobreposição dos espectros do domínio SH2 (em azul) e da interação entre FGFR2 + Grb2 (em marrom).



Visualmente, e através do assinalamento do espectro de interação por comparação ao assinalamento de Grb2 (realizado pela aluna Karoline Sanches e não mostrado neste trabalho), observa-se que grande parte do sinal é devido ao domínio SH2 e alguns aminoácidos pertencentes ao domínio N-SH3. Além disso, uma maior flexibilidade do domínio SH2 é observada quando comparada aos outros domínios (N-SH3 e C-SH3), evidenciando uma possível ligação forte entre FGFR2_C e ambos os domínios SH3. Na figura 26, foram identificados, na estrutura dimérica de Grb2, os aminoácidos presentes no espectro da interação entre FGFR2-Grb2.

Figura 26 – Identificação dos aminoácidos (em vermelho) presentes no espectro da interação entre FGFR2-Grb2 na estrutura dimérica da proteína Grb2. (D45, K64, I65, K69, A70, E71, E72, L74, K76, Q77, G81, A82, L84, I85, S88, R89, S90, A91, G93, D94, S96, L97, S98, V99, K100, F101, G102, D104, V105, Q106, H107, F108, V110, L111, R112, D113, A115, G116, F119, V122, V123, K124, F125, N126, S127, L128, N129, E130, L131, Y134, R136, T138, S141, N143, Q144, Q145, I146, F147, D150). Estrutura gerada com o auxílio do programa UCSF – *Chimera* a partir do PDB 1gri.

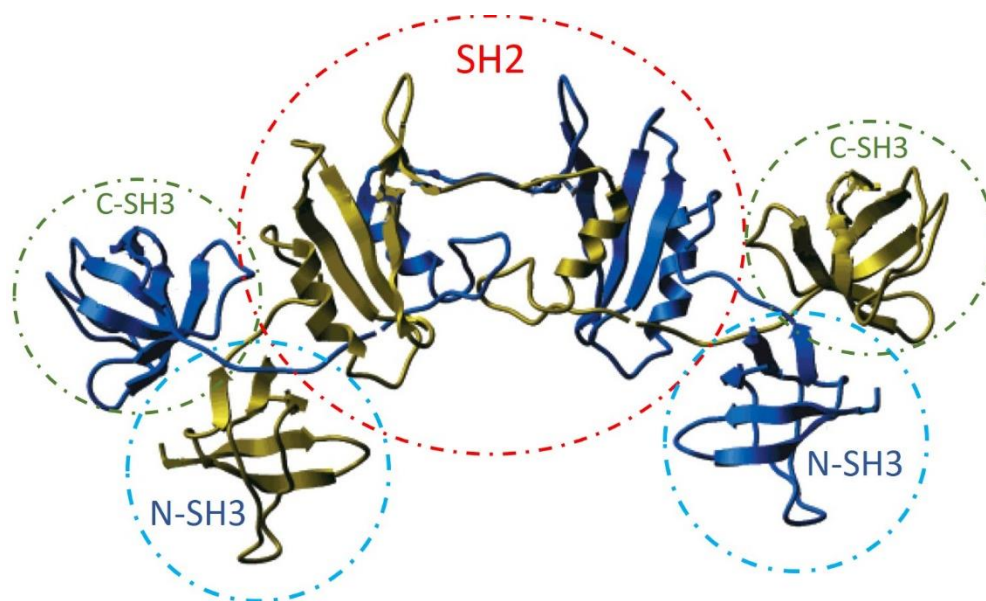


A falta de sinal da maioria dos aminoácidos do domínio N-SH3 indica que este também participa da interação entre as duas proteínas, e não somente o C-SH3 como era conhecido [57], [66]. Esta suposição pode ser explicada devido à propriedade de *domain-swap* que Grb2 possui. É importante ressaltar que a nossa hipótese de interação transiente se justifica pelo fato dos domínios N-SH3 e C-SH3 desaparecerem do espectro. A interação levaria a troca intermediária química e conformacional, o que justifica o alargamento extremo dos picos do N-SH3 e C-SH3. O domínio SH2 não participaria da interação e, portanto, não está envolvido em troca química e conformacional.

A propriedade de *domain-swap* foi observado em uma variedade de estruturas proteicas e propõe um mecanismo de associação reversível de oligômeros a partir de monômeros. Mudanças conformacionais na articulação de um loop levam à uma abertura do monômero, expondo uma interface ao solvente de uma subunidade interna [69]. Na estrutura reportada por Schiering *et al.*, os resíduos 121-123 que formam o loop EF na estrutura de Grb2, se modela como uma cadeia estendida e o

segmento restante é trocado por uma cadeia semelhante. Na estrutura dimérica, como mostrado na figura 27, os domínios SH2 adquirem uma conformação aberta.

Figura 27 – Estrutura proposta após o *domain-swap* apresentado pela proteína Grb2 evidenciando uma conformação aberta do domínio SH2.



Fonte: adaptada de Schiering *et al.* [69]

Analisando a estrutura proposta após *domain-swap* de Grb2, é possível ver uma aproximação dos domínios C- e N-SH3, o que possivelmente facilitaria a interação de ambos os domínios com a cauda terminal de FGFR2, mecanismo relatado pelos espectros 2D TROSY-HSQC.

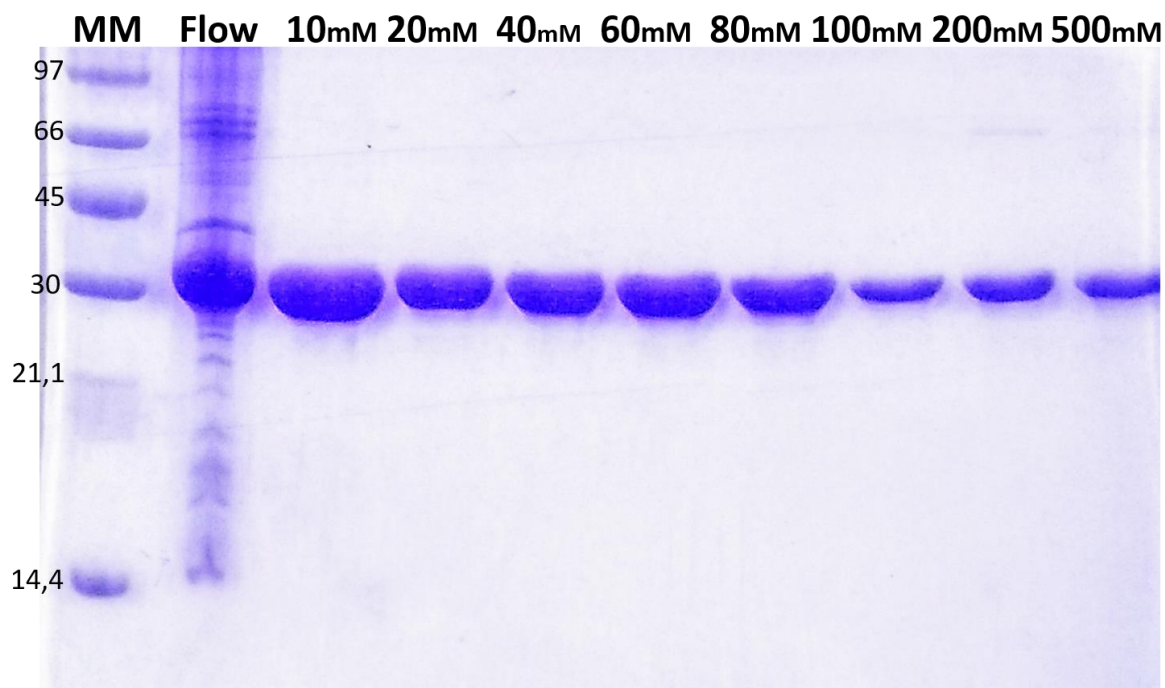
4.3. Grb2

4.3.1. Expressão e Purificação

A proteína Grb2 foi expressa seguindo protocolo da seção 3.3. O processo de purificação foi realizado em duas etapas: afinidade por Cobalto e exclusão molecular automatizada.

A purificação por afinidade ao Cobalto foi realizada com concentrações gradativas de Imidazol (10-1000 mM) e as amostras foram coletadas para aplicação em gel SDS-PAGE (Figura 28).

Figura 28 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 por afinidade ao Cobalto. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não apresentam afinidade por cobalto; 10-500mM – concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.



Visto que as amostras já se encontravam puras, estas foram concentradas e aplicadas em coluna *Sephacryl 100* apenas para troca de tampão nos pHs desejados. As purificações em pH 7,0 (Figura 29) e 8,0 (Figura 30) ocorreram normalmente com eluição da proteína entre 60 e 140mL de coluna, apresentando o perfil gaussiano esperado. As amostras em pH 4,0 (Figura 31) e 5,0 (Figura 32), por outro lado, não apresentaram tal perfil, sendo eluídas a partir de 60mL e ultrapassando o volume final de coluna. Desta forma, grande quantidade da proteína foi eluída com tampão diferente do esperado.

Figura 29 – Cromatograma referente à troca de tampão para NaPi pH 7,0 da proteína Grb2. As amostras foram coletadas com base no aumento da absorção UV.

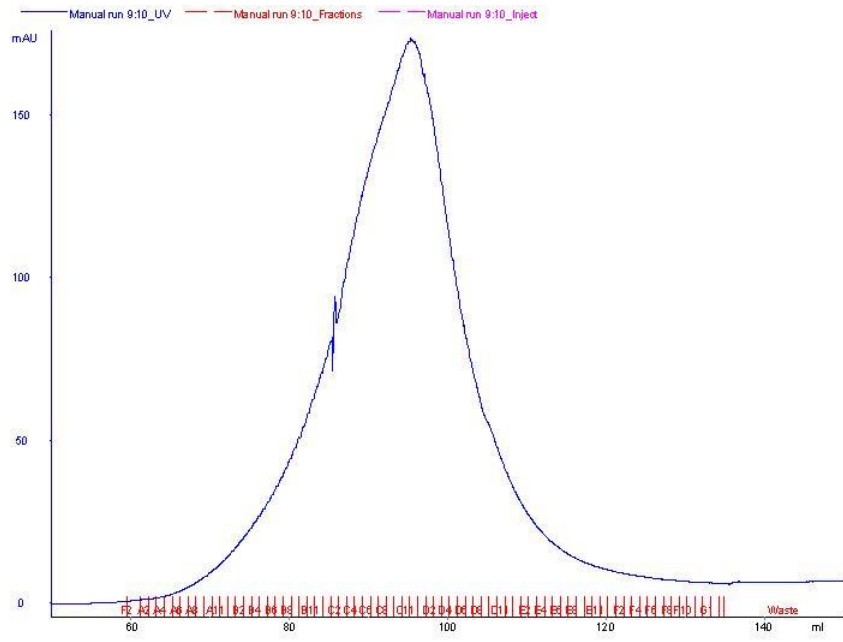


Figura 30 – Cromatograma referente à troca de tampão para NaK pH 8,0 da proteína Grb2. As amostras coletadas levam em consideração o aumento da absorção de luz UV.

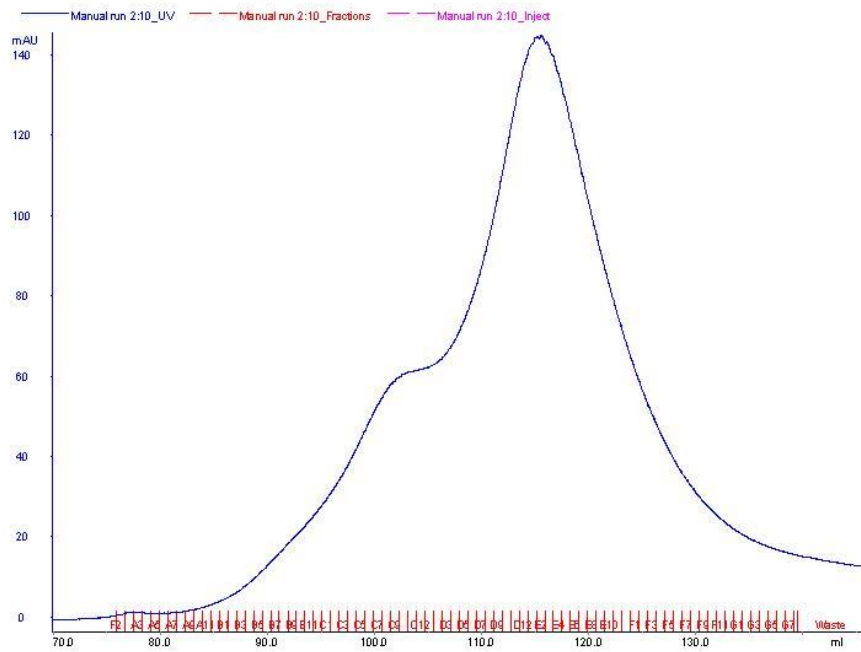


Figura 31 – Cromatograma referente à troca de tampão para Acetato pH 4,0 da proteína Grb2. Nota-se uma diferença na forma do espectro, tendo este sido deslocado quando comparado aos espectros de pHs básicos.

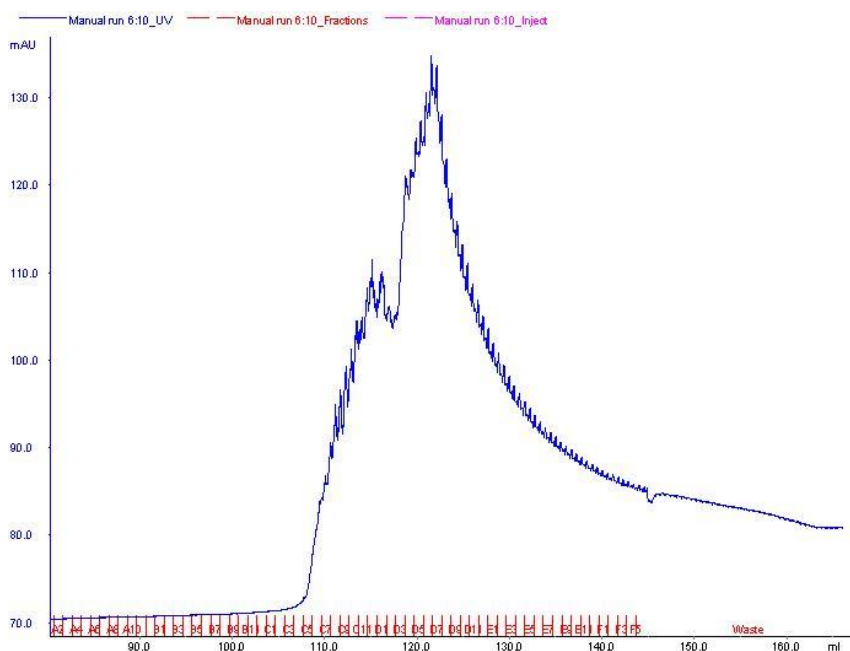
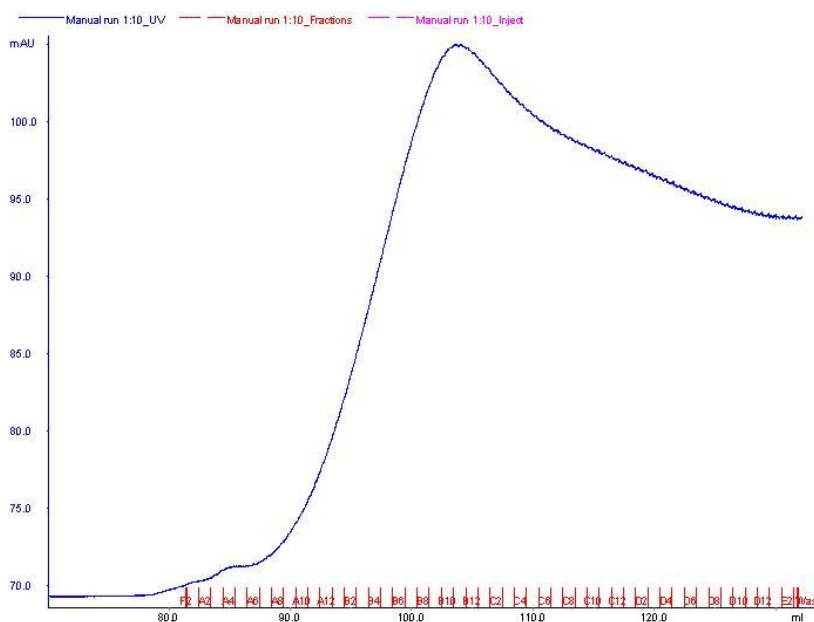


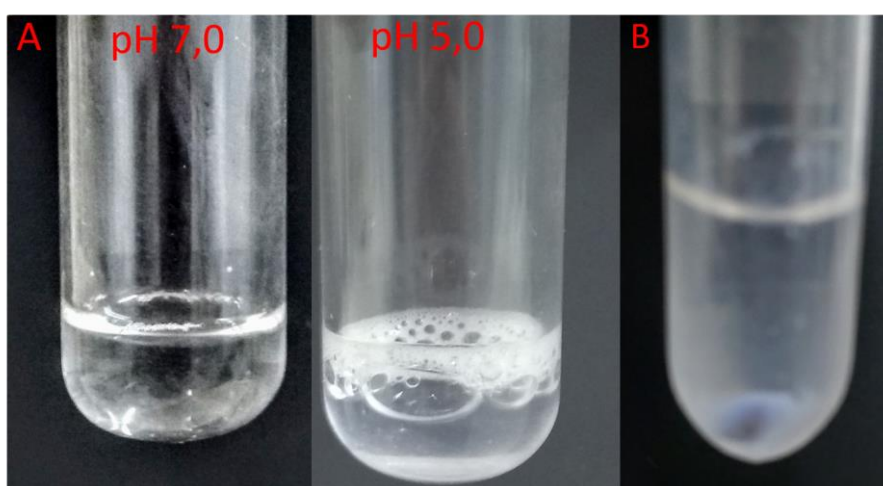
Figura 32 – Cromatograma referente à troca de tampão para Acetato pH 5,0 da proteína Grb2. Assim como em pH 4,0, nota-se uma alteração no perfil do espectro, sendo este mais evidente do que o anterior. Devido ao deslocamento do pico, as amostras coletadas apresentavam tampão diferente do esperado, além de apresentar grande perda na concentração de proteína quando comparado aos pHs básicos.



Na tentativa de solucionar tal problema, a troca de tampão para pHs ácidos foi feita através de diálise a partir das amostras de pH 7,0 com concentração de 100µM.

Após o processo de diálise, observou-se uma turbidez elevada da amostra (Figura 33a), impossibilitando os demais experimentos de DSC e DLS. Tal amostra foi submetida à centrifugação à 10.000 RPM por 1 minuto com o intuito de separar o conteúdo sólido da amostra. Após tal procedimento, observou-se a formação de um pellet azulado (Figura 33b), o qual continha a maior concentração de proteína da solução. Esta perda de concentração na parte solúvel da amostra foi constatada por medição em espectrômetro UV a 280 nm.

Figura 33 – Amostras de Grb2 pura em pH 7,0 e 5,0 (a) evidenciando o aumento da turbidez em pH ácido após o processo de diálise. Em (b) observa-se a formação do pellet azulado após centrifugação de 1 minuto à 10.000RPM.



Devido à mudança de perfil da purificação pelo sistema automatizado AKTA-*purifier* e à impossibilidade de troca de tampão por diálise, visto que grande parte da proteína se encontrava no pellet, duas hipóteses surgem: formação de agregados devido à mudança brusca de pH e transição de fase líquido-líquido da proteína Grb2. Através da plataforma *Protein Calculator*, foi possível determinar a carga total da proteína em seus diferentes pHs (Tabela 6).

Tabela 6 – Carga da proteína Grb2 em função da mudança de pH gerada pela plataforma *Protein Calculator*. Observa uma mudança no sinal da carga entre pHs ácidos e básicos podendo influenciar na conformação da proteína em seu ambiente químico.

pH	Carga
4,0	25,0
5,0	8,3
6,0	1,3
7,0	-2,7
8,0	-5,0

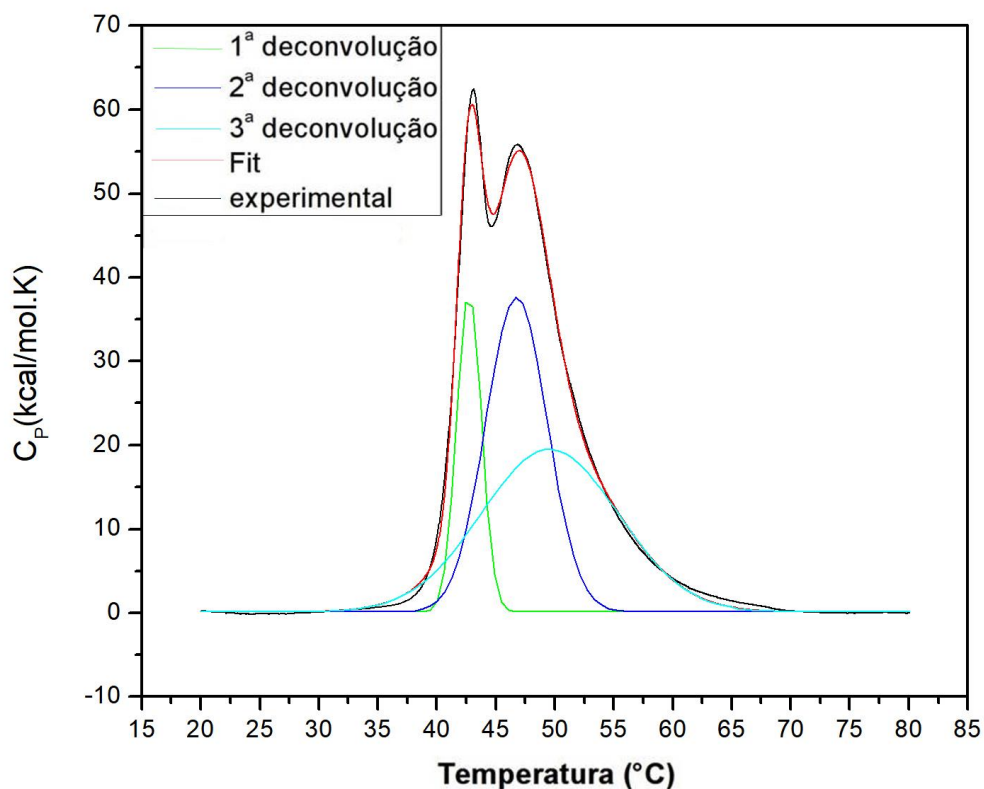
Devido à mudança significativa de carga entre os pHs ácidos e básicos, supõe-se que a estrutura de Grb2 é modificada quando o sinal da carga total da proteína é invertido, o que é observado na variação de pHs ácidos e básicos. Desta forma, tal mudança conformacional pode influenciar na passagem da proteína pela coluna de exclusão molecular, assim como sua desestabilização no processo de diálise.

Recentemente, foi observado que células organizam muitos processos bioquímicos em compartimentos sem membrana lipídica e que possuem propriedades de líquidos [70], [71]. Foi proposto que organelas sem membrana lipídica se formam através de um processo denominado separação de fase líquido-líquido (LLPS; *liquid-liquid phase separation*), o que permite que estes componentes se tornem rápido e reversivelmente concentrados em locais específicos da célula [72]. Embora os detalhes deste processo ainda sejam escassos, estudos recentes indicam que proteínas com baixa complexidade de sequência (LCDs; *low complexity sequence domains*) e que sejam intrinsecamente desordenadas (IDR; *intrinsically disordered regions*) podem mediar tal processo, o qual apresenta um aumento na turbidez da solução [73]. IDRs podem se auto associar através de uma variedade de interações entre cadeias laterais, promovendo o surgimento de LLPSs [73]–[76].

4.3.2. Grb2 – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Com o intuito de caracterizar mudanças de estabilidade térmica da proteína Grb2 em diferentes pHs, a proteína foi submetida à técnica de DSC para dois diferentes pHs básicos (7,0 e 8,0). O termograma obtido à pH 7,0 está representado abaixo na Figura 34.

Figura 34 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 pH 7,0 obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas de DSC para a proteína Grb2 foram obtidas entre 20 e 80 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min. Em preto tem-se a curva experimental obtida, em vermelho seu respectivo *fit*. Em verde tem-se a primeira deconvolução, seguida da segunda em azul e da terceira em ciano, com os respectivos picos correlacionados com os três domínios de Grb2.



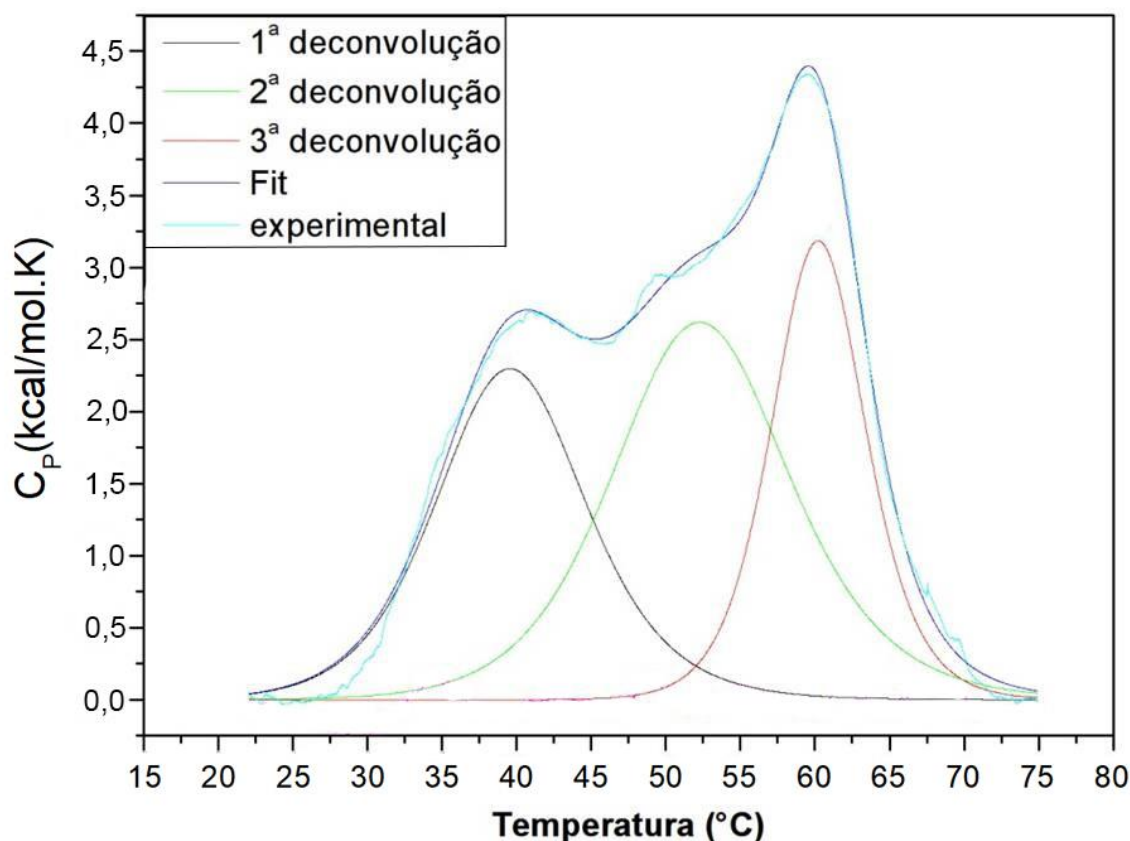
O termograma da proteína Grb2 apresentou um pico endotérmico, ajustado por três curvas gaussianas. O ajuste das três curvas pode ser relacionado com a presença de três domínios na proteína (N-SH3, SH2 e C-SH3), apresentando estabilidades térmicas independentes durante o processo de desnaturação proteica. Os valores das temperaturas de *melting* e entalpia calorimétrica de cada um dos picos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores das temperaturas de *melting* (T_m) e da entalpia calorimétrica de cada um dos picos presentes no termograma da proteína Grb2 em pH 7,0. A temperatura de *melting* é determinada pelo máximo de C_p e a entalpia calorimétrica associada é obtida através da integração das gaussianas.

Pico	T_m (°C)	ΔH (kJ/mol)
1	42,8	417,35
2	46,7	1025,62
3	49,5	1177,62

No caso do termograma obtido à pH 8,0 nota-se um alargamento da curva, ocorrendo deslocamento das temperaturas de *melting* associada a cada domínio da proteína (Figura 35).

Figura 35 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 pH 8,0 obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas de DSC para a proteína Grb2 foram obtidas entre 20 e 80 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min. Em ciano tem-se a curva experimental obtida, em azul escuro seu respectivo *fit*. Em preto tem-se a primeira deconvolução, seguida da segunda em verde e da terceira em vermelho, com os respectivos picos correlacionados com os três domínios de Grb2.



Como pode ser observado pelo termograma, as temperaturas de melting associada à cada gaussiana ajustada são de 39,7 °C para o primeiro, 52,4 °C para o segundo e 60,2 °C para o terceiro. Em relação à entalpia calorimétrica, nota-se um valor muito inferior quando comparado aos de pH 7,0. Para o primeiro pico tem-se uma entalpia de transição de 30,8 kJ/mol, enquanto para o segundo tem-se 41,4 kJ/mol e 26,8 kJ/mol para o último pico.

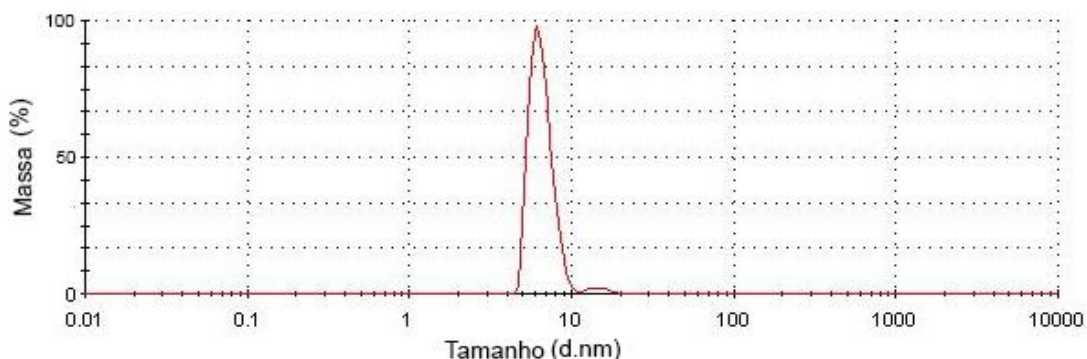
Comparativamente, nota-se uma maior cooperatividade em Grb2 à pH 7,0, evidenciado pela menor largura dos picos à meia altura de C_p . Apesar da proteína apresentar temperaturas de melting menores para o pH mais baixo, a maior cooperatividade juntamente com os valores mais altos da entalpia de transição mostram uma maior estabilidade da proteína em pH 7,0 visto que é necessário uma maior quantidade de energia para que ela se desnature totalmente.

4.3.3. Grb2 – Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

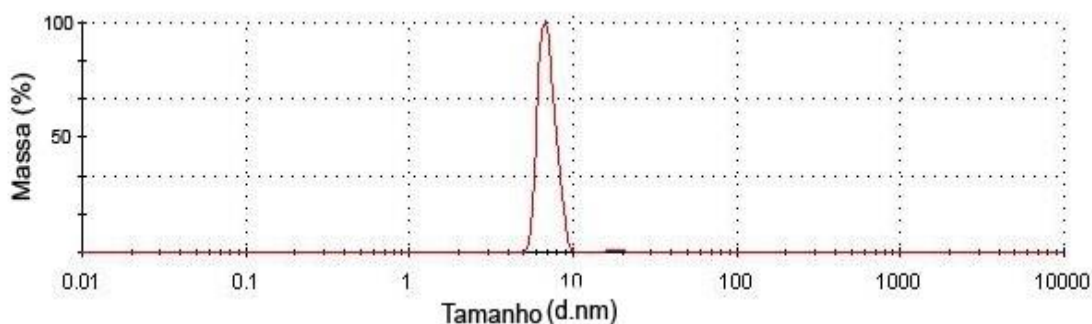
Medidas de espalhamento dinâmico da luz permitiram determinar o diâmetro hidrodinâmico (D_H) da proteína Grb2 nos sistemas investigados pela variação do pH. A figura 36 apresenta os gráficos de porcentagem em massa por tamanho em diâmetro-nanômetro das amostras de Grb2 em pH 7,0 (a) e pH 8,0 (b). Nota-se uma semelhança no tamanho da proteína em ambos pHs com um pequeno aumento para o pH alto.

Figura 36 – Gráficos de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 em diferentes pHs básicos: 7,0 (a) e 8,0 (b). Nota-se em ambos os gráficos a presença de dois picos, sendo o primeiro muito mais presente com porcentagem em massa perto de 100%.

a)



b)



Em pH 7,0 observam-se duas populações, sendo a primeira com porcentagem em massa de 97,9% e diâmetro de 6,509 d.nm característico de proteínas com massa molecular em torno de 53,2 kDa, compatível com o tamanho da proteína Grb2 em sua conformação dimérica. O segundo pico com 2,1% de porcentagem em massa e 14,68 d.nm apresenta massa molecular em torno de 357 kDa, podendo ser um aglomerado de Grb2 ou poeira que pode estar presente na amostra devido à manipulação entre as medidas.

Em pH 8,0 observa-se novamente duas populações, sendo a primeira com porcentagem em massa de 99,2% e diâmetro de 6,967 d.nm, caracterizando uma proteína com massa molecular em torno de 62,4 kDa, um pouco acima do esperado para a proteína Grb2 em dímero. O segundo pico com 0,8% de porcentagem em massa e 18,26 d.nm apresenta massa molecular em torno de 595 kDa podendo ser, novamente, os dois casos citados acima para o mesmo pico em pH 7,0.

Comparativamente, a mudança de pH desencadeia um aumento relativo no diâmetro da proteína mostrando um possível alongamento da cadeia e, possivelmente, um distanciamento entre os domínios da proteína Grb2. Sendo assim, é possível inferir que a proteína Grb2 apresenta dois estados distintos relacionados à mudança de pH.

5. Conclusões e Perspectivas futuras

A proteína FGFR2, sendo uma proteína de membrana, é fundamental para a transdução do sinal extra/intracelular de diversas vias de sinalização como MAPK, PI3K, JAK/STAT, entre outras. Sua desregulação está relacionada com muitas síndromes, como Crouzon, Pfeifer, Craniossinostose, e em muitos cânceres, como mama, próstata e bexiga. Elucidar sua estruturação e dinâmica é de fundamental importância para o completo entendimento de seu mecanismo regulatório dentro do organismo humano.

Após testes de solubilidade, foi possível tornar grande parte do domínio quinase da proteína FGFR2 solúvel através da adição de 0,5 M de Sorbitol na etapa de expressão. A purificação de ambas porções (quinase e citoplasmática) foi bem-sucedida, fornecendo uma concentração plausível (103 μ M) para a realização dos experimentos de ressonância magnética nuclear.

Dados de R_1 e R_2 demonstram uma boa estruturação do domínio quinase da proteína FGFR2. Os tempos de relaxação aparentes encontrados entre 16,2 e 23,5ns são compatíveis com proteínas com massa molecular de $38,508 \pm 7,709$ kDa, sendo coerente com o domínio quinase que apresenta massa molecular de 40kDa. No entanto, devido ao peso molecular da proteína, estudos mais criteriosos e em maior concentração de FGFR2_Q devem ser realizados para um maior entendimento da sua dinâmica.

O mecanismo de interação entre FGFR2 e Grb2 é fundamental para o funcionamento da via de sinalização MAPK. Elucidar este mecanismo é de grande importância para o estudo de tais vias de sinalização e seus comportamentos aberrantes.

Um novo mecanismo de interação entre as proteínas FGFR2 e Grb2, evidenciado pela perda de sinal nos espectros de TROSY-HSQC, é proposto neste trabalho. Sabe-se da literatura que Grb2 se liga através do domínio C-SH3 à FGFR2, porém a ligação ao domínio N-SH3 era inexistente. Os espectros de R_2 TROSY-*based* da interação inferem uma forte ligação entre os domínios SH3 e FGFR2 com uma maior dinâmica do domínio SH2. Comparações entre os espectros da interação e da proteína Grb2 pura evidenciam que o domínio N-SH3 também participa, em sua grande maioria, desta interação. Este novo mecanismo pode ser explicado pela propriedade de *domain-swap* da proteína Grb2, no qual mudanças conformacionais fazem com que

esta adquira uma estrutura mais aberta, expondo o domínio SH2, levando à uma aproximação dos domínios C- e N-SH3.

No intuito de caracterizar mudanças conformacionais da proteína Grb2, um estudo foi realizado em 4 diferentes pHs: dois ácidos (4,0 e 5,0) e dois básicos (7,0 e 8,0).

Em pH ácido, a proteína Grb2 apresentou uma desestabilização evidenciada pela mudança de perfil de purificação por exclusão molecular em sistema automatizado AKTA. Na tentativa de amenizar tal desestabilização, a proteína foi submetida à troca de tampão por diálise por ser uma técnica mais sutil no momento da troca de pH. Após diálise, Grb2 apresentou um aumento considerável na turbidez, impossibilitando análises estruturais de DSC e DLS. Tal comportamento levanta duas hipóteses quanto à mudança de estabilidade em pHs ácidos. A primeira se baseia na troca brusca da carga total da proteína, sendo negativa em pHs básicos e positiva em pHs básicos. Esta mudança na carga da proteína pode alterar a interação entre os domínios de Grb2 e a interação que pode ocorrer entre as proteínas isoladas na amostra, podendo a força de interação entre as proteínas, aumentando o fator de agregação. Na segunda hipótese, tem-se a possibilidade da proteína Grb2 apresentar uma transição de fase líquido-líquido característico de algumas proteínas que apresentam domínios intrinsecamente desordenados, como é o caso de Grb2. Tal transição faz com que a proteína se torne altamente concentrada formando *droplets*.

Para Grb2 em pHs básicos, foi possível realizar a caracterização biofísico-química através das técnicas de Calorimetria Diferencial de Varredura e Espalhamento Dinâmico da Luz. Através da técnica de DSC, foi observado um perfil semelhante entre os dois pHs estudados. Cada termograma apresentou 3 diferentes picos, os quais podem ser correlacionados com os diferentes domínios da proteína. Em pH 7,0 observa-se uma maior cooperatividade e uma necessidade de maior gasto energético para que as temperaturas de *melting* dos seguintes picos sejam acessadas, apesar destas serem menores quando comparadas às temperaturas de *melting* em pH 8,0. Para o pH mais básico, as T_m s foram de 39,7°C, 52,4°C e 60,2°C, enquanto para pH 7,0 tem-se 42,8°C, 46,7°C e 49,5°C.

Estudos de DLS para ambos os pHs básicos mostram uma pequena variação no tamanho da proteína em d.nm. Para pH 8,0, a proteína apresenta um tamanho de 6,967 d.nm característico de proteínas com massa molecular em torno de 62,4kDa.

Em pH 7,0 tal tamanho foi de 6,509 d.nm, com massa molecular aproximada de 53,2 kDa, coerente com a massa molecular de Grb2 em sua forma dimérica.

Visto que ambas as proteínas estão envolvidas com uma enorme gama de carcinomas, propõe-se estudos de fluorescência e ressonância magnética nuclear para a determinação de propriedades da interação de FGFR2 com compostos comprovadamente anticarcinogênicos, como flavonoides e cumarinas. Além disso, estudos de ressonância magnética nuclear serão empregados para uma continuação da caracterização do mecanismo de interação entre as proteínas FGFR2 e Grb2. Desta forma, possibilitando uma maior elucidação acerca das propriedades regulatórias de tais proteínas nas vias de sinalização envolvidas.

Estudos mais aprofundados de Grb2 em pHs ácidos serão realizados para comprovar qual hipótese melhor se enquadra na mudança conformacional apresentada por Grb2 em tais pHs. Propõe-se também a realização de estudos microscópicos para determinar se a proteína Grb2 apresenta transição de fase líquido-líquido em pHs ácidos, visto que ambientes tumorais apresentam pHs mais ácidos.

Referências

- [1] Yates, David, *Harry Potter and the Order of the Phoenix*. Warner Bros. Pictures, 2007.
- [2] R. Sever e J. S. Brugge, “Signal Transduction in Cancer”, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 5, nº 4, p. a006098–a006098, abr. 2015.
- [3] J. Ferlay *et al.*, “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012”, *Int. J. Cancer*, vol. 136, nº 5, p. E359–E386, mar. 2015.
- [4] D. L. Nelson e M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 6th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2013.
- [5] G. Krauss, *Biochemistry of signal transduction and regulation*, 5., completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2014.
- [6] S. R. Hubbard e J. H. Till, “Protein Tyrosine Kinase Structure and Function”, *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 69, nº 1, p. 373–398, jun. 2000.
- [7] A. J. Bridges, “Chemical Inhibitors of Protein Kinases”, *Chem. Rev.*, vol. 101, nº 8, p. 2541–2572, ago. 2001.
- [8] M. Touat, E. Ileana, S. Postel-Vinay, F. Andre, e J.-C. Soria, “Targeting FGFR Signaling in Cancer”, *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, nº 12, p. 2684–2694, jun. 2015.
- [9] N. Turner e R. Grose, “Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, nº 2, p. 116–129, fev. 2010.
- [10] J. Schlessinger *et al.*, “Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization”, *Mol. Cell*, vol. 6, nº 3, p. 743–750, set. 2000.
- [11] S.-G. Gong, “Isoforms of Receptors of Fibroblast Growth Factors: FGFR ISOFORMS”, *J. Cell. Physiol.*, vol. 229, nº 12, p. 1887–1895, dez. 2014.
- [12] V. P. Eswarakumar, I. Lax, e J. Schlessinger, “Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors”, *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 16, nº 2, p. 139–149, abr. 2005.

- [13] T. Miki *et al.*, “Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, n° 1, p. 246–250, jan. 1992.
- [14] A. Yayon, Y. Zimmer, G. H. Shen, A. Avivi, Y. Yarden, e D. Givol, “A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold”, *EMBO J.*, vol. 11, n° 5, p. 1885–1890, maio 1992.
- [15] H. Lei e C.-X. Deng, “Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Signaling in Breast Cancer”, *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 13, n° 9, p. 1163–1171, 2017.
- [16] J.-C. Soria *et al.*, “A phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors.”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, n° 15_suppl, p. 2500–2500, maio 2014.
- [17] F. Andre *et al.*, “Abstract LB-145: Results of a phase I study of AZD4547, an inhibitor of fibroblast growth factor receptor (FGFR), in patients with advanced solid tumors .”, *Cancer Res.*, vol. 73, n° 8 Supplement, p. LB-145-LB-145, abr. 2013.
- [18] A. L. Di Stefano *et al.*, “Detection, Characterization, and Inhibition of FGFR-TACC Fusions in IDH Wild-type Glioma”, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 21, n° 14, p. 3307–3317, jul. 2015.
- [19] J. Tabernero *et al.*, “Phase I Dose-Escalation Study of JNJ-42756493, an Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, n° 30, p. 3401–3408, out. 2015.
- [20] M. Javle *et al.*, “Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, n° 3, p. 276–282, jan. 2018.
- [21] L. Nogova *et al.*, “Targeting *FGFR1* -amplified lung squamous cell carcinoma with the selective pan-FGFR inhibitor BGJ398.”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, n° 15_suppl, p. 8034–8034, maio 2014.
- [22] S. E. Egan, B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland, e R. A. Weinberg, “Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation”, *Nature*, vol. 363, p. 45, maio 1993.

- [23] T. A. Ceska *et al.*, “FGFr2 kinase domain”, out. 2004.
- [24] T. A. Ceska *et al.*, “The FGFr2 tyrosine kinase domain”, ago. 2003.
- [25] A. Brown e T. L. Blundell, “Crystal structure of D2 domain from human FGFR2”, jun. 2008.
- [26] J. Sakon, F. Guo, R. Dakshinamurthy, K. M. Kathir, e S. K. K. Thallapuranam, “Crystal structure of the FGFR2 D2 domain”, ago. 2009.
- [27] P. M. Pollock *et al.*, “Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes”, *Oncogene*, vol. 26, nº 50, p. 7158–7162, nov. 2007.
- [28] X. Du, Y. Xie, C. J. Xian, e L. Chen, “Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration”, *J. Cell. Physiol.*, vol. 227, nº 12, p. 3731–3743, dez. 2012.
- [29] D. M. Ornitz, “FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease”, *Genes Dev.*, vol. 16, nº 12, p. 1446–1465, jun. 2002.
- [30] M. Tang e X. J. Huang, “Comment on ‘S267P Mutation in FGFR2: First Report in a Patient With Crouzon Syndrome’”, *J. Craniofac. Surg.*, vol. 26, nº 7, p. e677, out. 2015.
- [31] R. Ke, X. Yang, M. Ge, T. Cai, J. Lei, e X. Mu, “S267P Mutation in FGFR2: First Report in a Patient With Crouzon Syndrome”, *J. Craniofac. Surg.*, vol. 26, nº 2, p. 592–594, mar. 2015.
- [32] E. W. Jabs *et al.*, “Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2”, *Nat. Genet.*, vol. 8, nº 3, p. 275–279, nov. 1994.
- [33] Y. Tanimoto *et al.*, “A Soluble Form of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) with S252W Mutation Acts as an Efficient Inhibitor for the Enhanced Osteoblastic Differentiation Caused by FGFR2 Activation in Apert Syndrome”, *J. Biol. Chem.*, vol. 279, nº 44, p. 45926–45934, out. 2004.

- [34] J. Morita, M. Nakamura, Y. Kobayashi, C.-X. Deng, N. Funato, e K. Moriyama, “Soluble form of FGFR2 with S252W partially prevents craniosynostosis of the apert mouse model: Soluble FGFR2 Prevents Apert Syndrome”, *Dev. Dyn.*, vol. 243, n° 4, p. 560–567, abr. 2014.
- [35] S. Jay *et al.*, “The Fibroblast Growth Factor Receptor 2 p.Ala172Phe Mutation in Pfeiffer Syndrome-History Repeating Itself”, *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 161, n° 5, p. 1158–1163, maio 2013.
- [36] F. C. Kelleher, H. O’Sullivan, E. Smyth, R. McDermott, e A. Viterbo, “Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease”, *Carcinogenesis*, vol. 34, n° 10, p. 2198–2205, out. 2013.
- [37] A. Slavotinek *et al.*, “Novel FGFR2 deletion in a patient with Beare-Stevenson-like syndrome”, *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 149A, n° 8, p. 1814–1817, ago. 2009.
- [38] M. Katoh, “FGFR2 Abnormalities Underlie a Spectrum of Bone, Skin, and Cancer Pathologies”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 129, n° 8, p. 1861–1867, ago. 2009.
- [39] S. A. Byron *et al.*, “FGFR2 Point Mutations in 466 Endometrioid Endometrial Tumors: Relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 Mutations and Clinicopathological Features”, *PLoS ONE*, vol. 7, n° 2, p. e30801, fev. 2012.
- [40] C. Greenman *et al.*, “Patterns of somatic mutation in human cancer genomes”, *Nature*, vol. 446, n° 7132, p. 153–158, mar. 2007.
- [41] N. Reintjes, Y. Li, A. Becker, E. Rohmann, R. Schmutzler, e B. Wollnik, “Activating Somatic FGFR2 Mutations in Breast Cancer”, *PLoS ONE*, vol. 8, n° 3, p. e60264, mar. 2013.
- [42] A. Dutt *et al.*, “Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 25, p. 8713–8717, jun. 2008.
- [43] R. M. Hansen, A. Goriely, S. A. Wall, I. S. Roberts, e A. O. Wilkie, “Fibroblast growth factor receptor 2, gain-of-function mutations, and tumourigenesis: investigating a potential link”, *J. Pathol.*, vol. 207, n° 1, p. 27–31, set. 2005.
- [44] J. H. Jang, K. H. Shin, e J. G. Park, “Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers”, *Cancer Res.*, vol. 61, n° 9, p. 3541–3543, maio 2001.

- [45] R. McLendon *et al.*, “Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways”, *Nature*, vol. 455, n° 7216, p. 1061–1068, out. 2008.
- [46] F. Luo *et al.*, “Deformed Skull Morphology Is Caused by the Combined Effects of the Maldevelopment of Calvarias, Cranial Base and Brain in FGFR2-P253R Mice Mimicking Human Apert Syndrome”, *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 13, n° 1, p. 32–45, 2017.
- [47] J. Liang *et al.*, “Genetic variants in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) contribute to susceptibility of breast cancer in Chinese women”, *Carcinogenesis*, vol. 29, n° 12, p. 2341–2346, ago. 2008.
- [48] H. Davies *et al.*, “Somatic Mutations of the Protein Kinase Gene Family in Human Lung Cancer”, *Cancer Res.*, vol. 65, n° 17, p. 7591–7595, set. 2005.
- [49] The Cancer Genome Atlas Research Network, “Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers”, *Nature*, vol. 489, n° 7417, p. 519–525, set. 2012.
- [50] R. G. Liao *et al.*, “Inhibitor-Sensitive FGFR2 and FGFR3 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma”, *Cancer Res.*, vol. 73, n° 16, p. 5195–5205, ago. 2013.
- [51] J. H. Tchaicha *et al.*, “Kinase Domain Activation of FGFR2 Yields High-Grade Lung Adenocarcinoma Sensitive to a Pan-FGFR Inhibitor in a Mouse Model of NSCLC”, *Cancer Res.*, vol. 74, n° 17, p. 4676–4684, set. 2014.
- [52] M. G. Gartside *et al.*, “Loss-of-Function Fibroblast Growth Factor Receptor-2 Mutations in Melanoma”, *Mol. Cancer Res.*, vol. 7, n° 1, p. 41–54, jan. 2009.
- [53] B. Kwabi-Addo, F. Ropiquet, D. Giri, e M. Ittmann, “Alternative splicing of fibroblast growth factor receptors in human prostate cancer”, *The Prostate*, vol. 46, n° 2, p. 163–172, fev. 2001.
- [54] J. E. Ruhe *et al.*, “Genetic Alterations in the Tyrosine Kinase Transcriptome of Human Cancer Cell Lines”, *Cancer Res.*, vol. 67, n° 23, p. 11368–11376, dez. 2007.
- [55] D. C. Koboldt *et al.*, “Comprehensive molecular portraits of human breast tumours”, *Nature*, vol. 490, n° 7418, p. 61–70, set. 2012.

- [56] The Cancer Genome Atlas Network, "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer", *Nature*, vol. 487, p. 330, jul. 2012.
- [57] Z. Ahmed *et al.*, "Direct binding of Grb2 SH3 domain to FGFR2 regulates SHP2 function", *Cell. Signal.*, vol. 22, n° 1, p. 23–33, jan. 2010.
- [58] M. Mohammadi, I. Dikic, A. Sorokin, W. H. Burgess, M. Jaye, e J. Schlessinger, "Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction", *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, n° 3, p. 977–989, mar. 1996.
- [59] L. Buday e J. Downward, "Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor", *Cell*, vol. 73, n° 3, p. 611–620, maio 1993.
- [60] P. Shapiro, "Ras-MAP kinase signaling pathways and control of cell proliferation: relevance to cancer therapy", *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 39, n° 4–5, p. 285–330, set. 2002.
- [61] P. Nioche *et al.*, "Crystal structures of the SH2 domain of Grb2: highlight on the binding of a new high-affinity inhibitor", *J. Mol. Biol.*, vol. 315, n° 5, p. 1167–1177, fev. 2002.
- [62] H. Gram, R. Schmitz, J. F. Zuber, e G. Baumann, "Identification of phosphopeptide ligands for the Src-homology 2 (SH2) domain of Grb2 by phage display", *Eur. J. Biochem.*, vol. 246, n° 3, p. 633–637, jun. 1997.
- [63] N. Goudreau *et al.*, "NMR structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 1, n° 12, p. 898–907, dez. 1994.
- [64] S. Maignan, J. Guilloteau, N. Fromage, B. Arnoux, J. Becquart, e A. Ducruix, "Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor", *Science*, vol. 268, n° 5208, p. 291–293, abr. 1995.
- [65] P. Chardin, D. Cussac, S. Maignan, e A. Ducruix, "The Grb2 adaptor", *FEBS Lett.*, vol. 369, n° 1, p. 47–51, ago. 1995.

- [66] C.-C. Lin *et al.*, “Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2”, *Cell*, vol. 149, n° 7, p. 1514–1524, jun. 2012.
- [67] G. Zhu, Y. Xia, L. K. Nicholson, e K. H. Sze, “Protein Dynamics Measurements by TROSY-Based NMR Experiments”, *J. Magn. Reson.*, vol. 143, n° 2, p. 423–426, abr. 2000.
- [68] Aramini, J., “NMR determined Rotational correlation time” . .
- [69] N. Schiering, E. Casale, P. Caccia, P. Giordano, e C. Battistini, “Dimer Formation through Domain Swapping in the Crystal Structure of the Grb2-SH2-Ac-pYVNV Complex †”, *Biochemistry*, vol. 39, n° 44, p. 13376–13382, nov. 2000.
- [70] C. P. Brangwynne *et al.*, “Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation”, *Science*, vol. 324, n° 5935, p. 1729–1732, jun. 2009.
- [71] C. P. Brangwynne, T. J. Mitchison, e A. A. Hyman, “Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, n° 11, p. 4334–4339, mar. 2011.
- [72] A. A. Hyman, C. A. Weber, e F. Jülicher, “Liquid-Liquid Phase Separation in Biology”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, n° 1, p. 39–58, out. 2014.
- [73] A. Molliex *et al.*, “Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization”, *Cell*, vol. 163, n° 1, p. 123–133, set. 2015.
- [74] S. Wegmann *et al.*, “Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation”, *EMBO J.*, vol. 37, n° 7, p. e98049, abr. 2018.
- [75] H.-X. Zhou, V. Nguemaha, K. Mazarakos, e S. Qin, “Why Do Disordered and Structured Proteins Behave Differently in Phase Separation?”, *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, n° 7, p. 499–516, jul. 2018.
- [76] Y. Lin, S. L. Currie, e M. K. Rosen, “Intrinsically disordered sequences enable modulation of protein phase separation through distributed tyrosine motifs”, *J. Biol. Chem.*, vol. 292, n° 46, p. 19110–19120, nov. 2017.