

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/07/2021.



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

RENAN PEREIRA PEDRO

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE O DOMÍNIO
SH3 C-TERMINAL DA GRB2 COM CUMARINA**

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2019

RENAN PEREIRA PEDRO

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE O DOMÍNIO
SH3 C-TERMINAL DA PROTEÍNA GRB2 COM CUMARINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em 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: CNPq – Proc: 134459/2017-2

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo
Coorientador: Dr. Ícaro Putinhon Caruso

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2019

P372c Pedro, Renan Pereira

Caracterização Biofísica da Interação entre o Domínio SH3 C-Terminal da Grb2 com Cumarina / Renan Pereira Pedro. -- São José do Rio Preto, 2019
85 f. : tabs. + 1 CD-ROM

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

Orientador: Fernando Alves de Melo
Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso

1. Proteína-ligante. 2. Interação. 3. Cumarina. 4. RMN. 5. Fluorescência. 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.

RENAN PEREIRA PEDRO

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE O DOMÍNIO
SH3 C-TERMINAL DA PROTEÍNA GRB2 COM CUMARINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em 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.

Área de concentração: Biofísica Molecular

Financiadora: CNPq – Proc: 134459/2017-2

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas
UEM – Campus de Umuarama-PR

Prof^a. Dr^a. Gabriela Campos de Araújo
UNESP – Campus de São José do Rio Preto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

29 de julho 2019

Dedicado à minha família e amigos!

AGRADECIMENTOS

Senhor Deus, hoje não quero pedir nada porque já pedi tanto e tanta coisa me foi dada. Quero simplesmente agradecer por ter me dado fôlego para continuar nesta caminhada. Sem Ti eu não estaria aqui hoje. Muito obrigado!

Ao meu pai e minha mãe, vocês são tudo em minha vida, sou eternamente grato por tudo o que fizeram por mim. Hoje sou o homem que sou devido ao que vocês me ensinaram, vocês são fundamentais na minha vida, amo vocês.

Ao meu irmão Andrey, entre idas e vindas, a cada gole perdido, você sempre esteve lá. Você é um exemplo de irmão, sempre me ajudando quando preciso, sou eternamente grato por sempre estar do meu lado. Te amo!

A minha família, que sempre me apoia para continuar estudando, me dão o suporte que necessito para continuar e entendem os momentos que fico longe por causa dos estudos. Muito obrigado!

A Karol Sanches. Se tem uma pessoa que realmente sabe tudo o que passei em todos esses anos foi você. Não existe palavras para demonstrar toda a gratidão que tenho por você. Obrigado por sempre estar comigo me apoiando e dando bronca nos momentos oportunos. Te admiro muito e um dia quero ser pelo menos 1% do que você é. Meus sinceros agradecimentos!

Ao Jão, Carol, Raphael, Ingrid, Thalita, Zezinho, Kenneth e Guilherme, que sempre estiveram comigo, me apoiando nos momentos difíceis, me dando broncas nos momentos que falhei me ensinando nos momentos de dúvidas e rindo nos momentos mais felizes. Vocês foram fundamentais nesta minha caminhada e sou grato por estarem comigo.

Aos amigos de departamento, por todas as risadas, brincadeiras, trabalhos sérios. Aqueles momentos que são importantes. Muito obrigado!

Ao meu orientador prof. Dr. Fernando Alves de Melo e coorientador Dr. Ícaro Putinhon Caruso. Obrigado pela oportunidade de aprender um pouco do que os senhores sabem, pela paciência nas horas que falhei tanto na pesquisa quanto com

vocês. Obrigado por não terem desistido de mim. Vocês não me ensinaram apenas como ser um profissional melhor, mas também como ser uma pessoa melhor. Esses dois anos de mestrado foram fundamentais para minha carreira. Muito obrigado!

Ao Raphael Vinícius Rodrigues Dias juntamente com seu orientador prof. Dr. Leandro Cristante pela colaboração com o trabalho teórico realizado neste projeto.

A profa. Dra. Fátima Pereira de Souza pela atenção, disponibilidade e paciência. Muito obrigado pelo conhecimento compartilhado!

Ao prof. Dr. Márcio Colombo por disponibilizar o laboratório de Espectroscopia.

Aos colegas do CMIB que me auxiliaram e me ajudaram quando necessitei. Muito obrigado!

Aos professores e técnicos do Departamento de Física pelo auxílio e ensinamento que me passaram.

À CNPq pelos auxílios financeiros para a realização deste trabalho.

À UNESP, por ter me dado a honra de estudar em uma das melhores universidades da América.

“Comemore cada momento, ninguém sabe o verdadeiro valor da sua vitória – e lembre: foguete não tem ré” (Teles, L. 2019)

RESUMO

As sinalizações celulares possuem um constante e preciso controle de sobrevivência e crescimento. Durante o processo de proliferação celular, essas sinalizações também estão sujeitas a falhas que podem gerar perda do crescimento celular dando início a um crescimento descontrolado ocasionando tumores. Uma das vias que sofrem essas alterações é a via *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK), que é mediada por proteínas como a adaptadora *Growth factor receptor bound-protein 2* (Grb2). A Grb2 é composta por um domínio SH2 flanqueado por dois domínios SH3, um N-Terminal e outro C-Terminal. Além da Grb2 atuar como adaptadora, também regula a via MAPK através de seu equilíbrio de estados monômeros/dímeros. Com a finalidade de entender a dinâmica estrutural do domínio SH3 C-Terminal, as ressonâncias do domínio foram observadas através dos deslocamentos químicos da cadeia principal. Os parâmetros de relaxação mostraram a presença de um sítio superficial em dinâmica conformacional lenta em escala de tempo de μs – ms . Sítios em trocas conformacionais frequentemente estão envolvidos em reconhecimento molecular. A análise da supressão de fluorescência mostrou que ocorre interação entre o domínio SH3c e a molécula cumarina, possuindo uma interação entropicamente dirigida em uma proporção 1:1 com constante de associação $K_b \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$. Trabalhos computacionais feitos em colaboração corroboraram com os resultados da fluorescência indicando três possíveis sítios de interação.

Palavra-chave: interação, proteína-ligante, biofísica molecular

ABSTRACT

The cell signaling has a constant and precise control of survival and growth. During the process of cell proliferation, these signals are also subject to errors that can lead to loss of cell growth leading to uncontrolled growth and can lead to tumors. One of the pathways that undergo these changes is the Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) pathway, which is mediated by proteins such as the Adapter Growth factor receptor bound-protein 2 (Grb2). Grb2 is composed of a SH2 domain flanked by two SH3 domains, one N-Terminal and another C-Terminal. In addition to Grb2, it also regulates the MAPK pathway through its monomer/dimer state balance. In order to understand the structural dynamics of the SH3 C-Terminal domain, domain resonances were observed through the chemical shifts of the main chain. The relaxation parameters showed the presence of a superficial site in slow conformational dynamics in time scale of μs - ms. Sites in conformational exchanges are often involved in molecular recognition. Analysis of fluorescence quenching showed that interaction occurs between the SH3c domain and the coumarin molecule, having an 1: 1 entropically directed interaction with $K_b \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ association constant. Collaborative computer works corroborated the results of fluorescence indicating three possible sites of interaction.

Keyword: interaction, protein-ligand, molecular biophysics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01:** Conceito de estrutura de uma proteína tirosina quinase. No meio extracelular se encontra o Receptor de fator de crescimento, a região transmembrana e no citosol se encontra a justamembrana, o domínio tirosina quinase e o motivo P-x-x-P. **21**
- Figura 02:** Modelo estrutural 3D da proteína Grb2 em sua forma dimérica. O domínio SH2 se encontra em verde, o domínio SH3 N-Terminal em azul e o domínio SH3 C-Terminal em vermelho. A figura foi obtida utilizando o programa *Chimera*, com o código 1GRI.pdb da proteína Grb2 em dímero. **22**
- Figura 03:** Mecanismo de regulação da FGFR2 através da Grb2. **(A)** A proteína FGFR2 (marrom) com o domínio quinase na região citoplasmática (elipse marrom) e Grb2 dimérica ligada através do domínio SH3, onde um heterotetrâmero na proporção 2:2 é obtido. **(B)** Fator de crescimento (azul escuro) interage na porção extracelular da FGFR2, induzindo mudanças conformacionais fazendo com que o domínio quinase da FGFR2 fosforile (verde-água) o domínio SH3 da Grb2. **(C)** Uma vez mais fosforilada, a Grb2 se desvincula da FGFR2. **24**
- Figura 04:** Esquema da ativação da via de sinalização MAPK. Após a FGFR2 fosforilar a Grb2, a Grb2 se dissocia da FGFR2 e interage com a Sos, que é responsável pela troca de GDP por GTP na proteína Ras. A Ras-GTP então interage com a proteína Raf dando início a via de sinalização MAPK. **25**
- Figura 05:** Estrutura do domínio SH3c. **A)** Topologia da estrutura secundária do domínio SH3c da proteína Grb2. **B)** Modelo estrutural 3D do domínio SH3c. A figura (A) foi de autoria própria e a figura (B) foi obtida utilizando o programa *Chimera*, com o código 2VVK.pdb do domínio SH3c da proteína Grb2. **26**
- Figura 06:** Bases estruturais de uma ligação de um domínio SH3 a um peptídeo de classe I e II. A hélice do PPII é representada com os

resíduos (círculo) ligados por ligações de amida (linhas). As unidades de ΦP do dipeptídeo são representadas pelas linhas em negrito, os resíduos do domínio SH3 encontrados no sítio de interação são representados em retângulos. **A)** Domínio SH3 da proteína beta-PIX complexado com um peptídeo derivado da AIP-4 (PDBid: 2P4R.pdb). O peptídeo contém o motivo de classe I (R/K) $\times\Phi P\times\Phi P$. **B)** Domínio SH3 da proteína p40(phox) complexado com um peptídeo derivado da p47(phox) (PDBid: 1W70.pdb). O peptídeo contém o motivo de classe II $\Phi P\times\Phi P\times(R/K)$.

27

Figura 07: Aplicação de um pulso de radiofrequência; **A)** Estado de equilíbrio do vetor magnetização que é paralelo ao campo magnético externo no eixo z; **B)** Quando o pulso de radiofrequência é aplicado, o vetor magnetização sai do seu estado de equilíbrio e vai para o plano xy; **C)** Quando o pulso é interrompido, ele retorna ao seu estado de equilíbrio fazendo um movimento de precessão; **D)** Essa precessão induz a formação de correntes elétricas sendo detectadas pelo FID e **E)** Nesse FID é aplicado uma Transformada de Fourier “traduzindo” para frequência e obtendo um gráfico típico de RMN.

39

Figura 08: SDS-PAGE 15% corado com Azul de Comassie[®] Brilhante R-250 referente a expressão do domínio Grb2-CSH3 fusionado com a tag GST em *E.coli* BL21 (DE3). O índice *A.I* corresponde a cultura de bactérias antes da indução e o índice *D.I* corresponde a cultura de bactérias depois da indução. O domínio Grb2-CSH3 fusionado à GST apresenta massa molecular de 34;360 kDa. (M – marcador de massa molecular). (Proteínas do marcador molecular: Fosforilase B – 97 kDa; Albumina – 66 kDa; Ovoalbumina – 45 kDa; Anidrase carbônica – 30 kDa; Inibidor de tripsina – 20.1 kDa; Lactoalbumina – 14.4 kDa).

57

Figura 09: Purificação do domínio Grb2-CSH3. **A)** SDS-PAGE 15% corado com Azul de Comassie[®] Brilhante R-250 referente a purificação por afinidade. *FLOW through* – Solução originária da expressão do

domínio; E1 – Primeira eluição; MM – Marcador Molecular; E2 – Segunda eluição; E3 – Terceira eluição. **B)** SDS-PAGE 15% corado com Azul de Comassie® Brilhante R-250 referente a purificação por afinidade a Glutathiona do domínio. MM – Marcador Molecular; *FLOW through* – Solução originária da expressão do domínio; E1 – Primeira eluição; ET – Eluição com trombina; E4 – Quarta eluição; E5 – Quinta eluição. **C)** SDS-PAGE 20% corado com Azul de Comassie® Brilhante R-250 referente a purificação por exclusão molecular com eluição em tampão 25 mM de Fosfato de Sódio pH 7,5 com 140 mM NaCl. **D)** Cromatograma referente a purificação por exclusão molecular em *ÄKTApurifier*® coluna Superdex® 75 10/300 GL.

58

Figura 10: Espectro de emissão de fluorescência do domínio SH3c na presença de Cumarina à 298 K. Com a titulação de cumarina (0 μ M à 8 μ M) a intensidade de fluorescência foi diminuindo sugerindo interação entre o domínio SH3c e a Cumarina.

60

Figura 11: Gráfico de Stern-Volmer: Supressão de Fluorescência do domínio Grb2-CSH3 nas temperaturas de 288 K (vermelho), 298 K (preto) e 308 K (azul). Este gráfico indica uma supressão dinâmica, onde K_{SV} aumenta com a temperatura devido ao aumento no número de colisões da cumarina com os fluoróforos.

61

Figura 12: Gráfico de Duplo-Log: Dados obtidos da supressão de fluorescência do domínio Grb2-CSH3 na presença de cumarina nas temperaturas de 288 K (vermelho), 298 K (preto) e 308 K (azul). Com base neste gráfico é possível determinar o número de sítios de ligação (n) e a constante de associação K_b das interações.

62

Figura 13: Gráfico de van't Hoff: Análise termodinâmica do complexo Grb2-CSH3/Cumarina nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K. O gráfico de van't Hoff relaciona a constante de associação com a temperatura. Com este gráfico é possível calcular os parâmetros termodinâmicos ΔH e ΔS , fundamentais para caracterizar que tipo de interação está ocorrendo no complexo. Conhecendo ΔH e ΔS

da interação é possível também determinar a energia livre de Gibbs (ΔG).

64

Figura 14: Perfil termodinâmico do complexo SH3c/Cumarina nas temperaturas 288 K, 298 K e 308 K. Em vermelho é representado a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde é representado a variação da entalpia (ΔH) e em azul é representado a variação da entropia ($T\Delta S$).

65

Figura 15: Parâmetros de relaxação do vetor ^1H - ^{15}N da cadeia principal do domínio SH3c. As taxas de relaxação R_1 e R_2 juntamente com o $\text{hNOE} < 0,65$ mostram que a região entre a $\beta 1$ e $\beta 2$ apresentam maior flexibilidade. As linhas contínuas do gráfico de R_1 e R_2 referem-se a média das mensurações e as linhas tracejadas referem-se ao desvio padrão de cada parâmetro calculado. Os retângulos amarelos representam as estruturas secundárias do domínio, sendo os números de folha- β contados a partir da estrutura secundária da Grb2 completa.

66

Figura 16: Parâmetros de relaxação do vetor ^1H - ^{15}N da cadeia principal do domínio SH3c. As taxas de relaxação R_1 e R_2 juntamente com o $\text{hNOE} < 0,65$ mostram que a região entre a $\beta 1$ e $\beta 2$ apresentam maior flexibilidade. A linha contínua do gráfico de R_2/R_1 refere-se a média das mensurações e as linhas tracejadas referem-se ao desvio padrão de cada parâmetro calculado. A linha em 1 Hz no gráfico de k_{ex} indica que os resíduos acima de 1 Hz estão em troca conformacional. Os retângulos amarelos representam as estruturas secundárias do domínio, sendo os números de folha- β contados a partir da estrutura secundária da Grb2 completa.

68

Figura 17: Resíduos em troca conformacional lenta (coloridos em verde) indicados na estrutura do domínio SH3c (coloridos em azul).

69

Figura 18: *Docking Molecular* entre o domínio SH3c e a Cumarina. Estes resultados foram obtidos à partir de simulações computacionais e utilizando os programas Chimera, Maestro e Dock6, entre o domínio SH3c e a Cumarina. Os clusters C1, C2 e C3 mostram três possíveis regiões de menor energia onde pode estar

ocorrendo a interação. Em azul está representado as folhas- β , em cinza representado as alças e em rosa representado a hélice 3_{10} do domínio SH3c, em verde se encontra a molécula de cumarina. **70**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Diferentes tipos de cumarinas com suas estruturas químicas gerais. **29**
- Tabela 02:** Relação dos experimentos realizados para medidas dos parâmetros de relaxação R_1 , R_2 e hNOE do domínio SH3c. Experimentos realizados em 800 MHz, 298 K, com 150 μ M SH3c marcado com ^{15}N . **55**
- Tabela 03:** Constantes de supressão K_{SV} : Valores obtidos do complexo SH3c/Cumarina nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K em um pH 7,5. **61**
- Tabela 04:** Constante de associação K_b e sítios de ligação (n): Valores referentes ao complexo SH3c/Cumarina nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K. **63**
- Tabela 05:** Parâmetros termodinâmicos referente ao complexo SH3c/Cumarina nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K. **64**

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------|--|
| DO | Densidade Óptica |
| FGF | Fatores de crescimento de fibroblastos |
| FGFR | Receptores de fatores de crescimento de fibroblastos |
| FGFR2 | Receptores de fatores de crescimento de fibroblastos 2 |
| FID | Sinal de decaimento livre |
| Grb2 | <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| MAPK | <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> |
| PPII | Poliprolina do tipo II |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RTKs | Receptores tirosina-quinases |
| SH2 | <i>Src homology 2</i> |
| SH3 | <i>Src homology 3</i> |
| SH3c | Domínio SH3 C-Terminal da proteína Grb2 |
| Src | Pronuncia "sarc", abreviação de sarcoma |

LISTA DE SIMBOLOS

| | |
|------------|---|
| kDa | Quilo Dalton |
| E | Energia |
| ν | Frequência |
| λ | Comprimento de onda |
| h | Constante de Planck |
| ψ | Função de Onda |
| r | Coordenada do elétron |
| R | Coordenada do núcleo |
| c | Velocidade da luz |
| K_{SV} | Constante de Stern-Volmer |
| K_q | Constante de supressão |
| H | Entalpia |
| S | Entropia |
| G | Energia livre de Gibbs |
| E | Campo elétrico |
| B | Campo magnético |
| μ | Momento magnético |
| γ | Razão giromagnética |
| \hbar | Constante de Planck dividido por 2π |
| M | Magnetização |
| ν_0 | Frequência de Larmor |
| ϵ | Coefficiente de extinção molar |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 19 |
| 1.1. Sinalização Celular | 20 |
| 1.2. A proteína adaptadora Grb2 e a via de sinalização MAPK | 22 |
| 1.3. O domínio SH3c | 25 |
| 1.4. Cumarina | 28 |
| 2. Fundamentação Teórica | 31 |
| 2.1. Princípios Básicos de Fluorescência | 32 |
| 2.1.1. Supressão de Fluorescência | 33 |
| 2.2. Teoria Básica de RMN | 37 |
| 2.2.1. Deslocamento químico | 39 |
| 2.2.2. Acoplamento Escalar | 40 |
| 2.2.3. Efeito <i>Overhauser</i> Nuclear (NOE) | 40 |
| 2.2.4. Relaxação dos spins (T_1 e T_2) | 41 |
| 2.2.5. Medidas de Relaxação | 42 |
| 2.2.6. Troca Conformacional | 44 |
| 2.3. <i>Docking Molecular</i> | 45 |
| 3. Objetivos | 47 |
| 3.1. Objetivos específicos | 48 |
| 4. Metodologia | 49 |
| 4.1. Análise do SH3c utilizando o servidor ProtParam | 50 |
| 4.2. Transferência de DNA plasmidial para células <i>E.Coli</i> linhagem DH5 α | 50 |
| 4.3. Transferência de DNA plasmidial para células <i>E.Coli</i> linhagem BL21 (DE3) | 51 |
| 4.4. Expressão do domínio SH3c para fluorescência | 51 |
| 4.5. Expressão do domínio SH3c enriquecido com $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ para RMN | 52 |
| 4.6. Purificação do domínio SH3c fusionado com GST | 53 |
| 4.7. Espectroscopia de absorção UV-Vis | 53 |
| 4.8. Espectroscopia de fluorescência | 54 |
| 4.9. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) | 54 |
| 5. Resultados e discussões | 56 |

| | | |
|------|--|----|
| 5.1. | Expressão e purificação do domínio SH3c | 57 |
| 5.2. | Fluorescência em estado estacionário SH3c/Cumarina | 58 |
| 5.3. | Dinâmica estrutural do domínio SH3c por RMN | 65 |
| 5.4. | <i>Docking Molecular</i> do complexo SH3c/Cumarina | 69 |
| 6. | Conclusões | 71 |
| 6.1. | Perspectivas | 73 |
| | REFERÊNCIAS | 74 |
| | ANEXOS | 80 |
| | ANEXO A – Meios de Culturas Utilizados | 81 |
| | ANEXO B – Tampões Utilizados | 82 |
| | ANEXO C – Expressão do domínio SH3 C-Terminal em <i>E.coli</i> BL21(DE3) | 83 |
| | ANEXO D – Purificação do domínio SH3 C-Terminal | 84 |

1 – INTRODUÇÃO

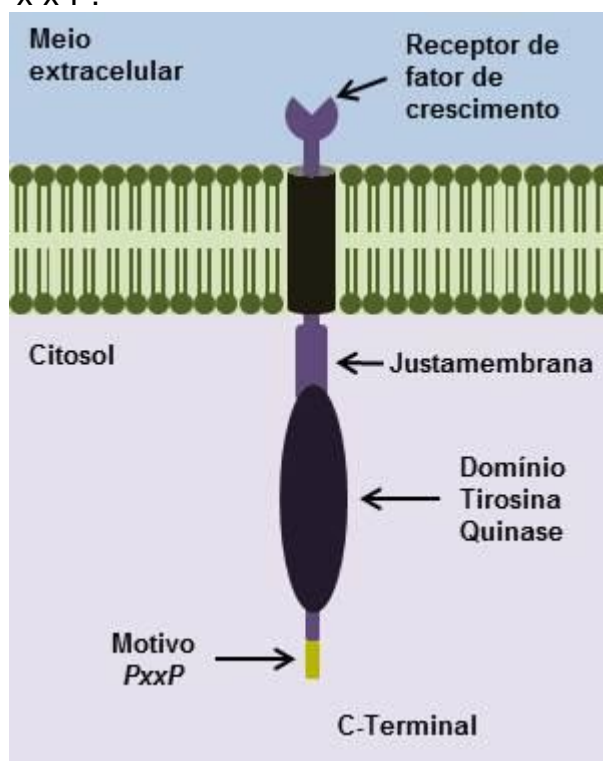
1. INTRODUÇÃO

1.1. SINALIZAÇÃO CELULAR

A sinalização celular é um meio que as células têm para se comunicar. Proteínas receptoras são responsáveis por receber informações e propaga-las ao meio e podem se encontrar na membrana celular, solúveis no meio citoplasmático ou na membrana nuclear. Uma vez que ocorra a interação com moléculas sinalizadoras, denominadas ligantes, sua forma ou atividade podem ser alteradas, acionando uma resposta dentro da célula. As proteínas receptoras na membrana citoplasmática são encarregadas de receber o sinal do ligante que está no meio extracelular e enviá-lo para o meio intracelular, propagando para outras proteínas sinalizadoras e desencadeando uma via de sinalização [01].

As proteínas receptoras que estão na membrana celular podem ser divididas em relação ao seu mecanismo de transdução de sinal. Algumas proteínas receptoras estão associadas a canais iônicos, a proteína G ou a enzimas [02, 03]. As que estão associadas às enzimas geralmente são quinases, com uma conformação de α -hélice transmembrana, composta por um sítio de interação com o ligante na região extracelular e um sítio catalítico na região intracelular. Um exemplo é a proteína receptora de fatores de crescimento tirosina quinase (*Fibroblast growth factor receptor 2* – FGFR2) ilustrada na **Figura 01** [02, 04]. Na região C-Terminal da FGFR2, nos últimos dez resíduos encontra-se o motivo P-x-x-P (sendo P o resíduo de aminoácido prolina e x qualquer resíduo de aminoácido), sendo este motivo importante no reconhecimento de proteínas parceiras [05].

Figura 01: Conceito de estrutura de uma proteína tirosina quinase. No meio extracelular se encontra o Receptor de fator de crescimento, a região transmembrana e no citosol se encontra a justamembrana, o domínio tirosina quinase e o motivo P-x-x-P.



Fonte: Farmacologia, Rang e Dale, 2012 – Adaptado.

As proteínas quinases que catalisam a fosforilação de resíduos de aminoácidos de tirosinas são denominadas tirosinas-quinases [06, 07, 08]. Nos seres-humanos existem 58 tipos de receptores tirosina-quinases (RTKs) classificados em 20 subfamílias [09, 10]. As proteínas RTKs interagem com fatores de crescimento e outros ligantes no meio proporcionando respostas específicas.

Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) induzem a sinalização celular por meio dos receptores de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFR1-4) [12]. Uma vez que há interação dos FGFs, na porção extracelular das FGFRs ocorre autofosforilação da porção citosólica da proteína tirosina-quinase [05]. Esta autofosforilação faz com que sua atividade aumente e então tirosinas fosforiladas e sequências vizinhas criam sítios de ancoragem para outras proteínas, como as adaptadoras [08, 10]. As proteínas adaptadoras são responsáveis por construir associações em interações proteína-proteína devido ao reconhecimento de resíduos de aminoácidos específicos, recrutando diferentes enzimas para a propagação da sinalização celular [01]. Estas proteínas adaptadoras são formadas por domínios

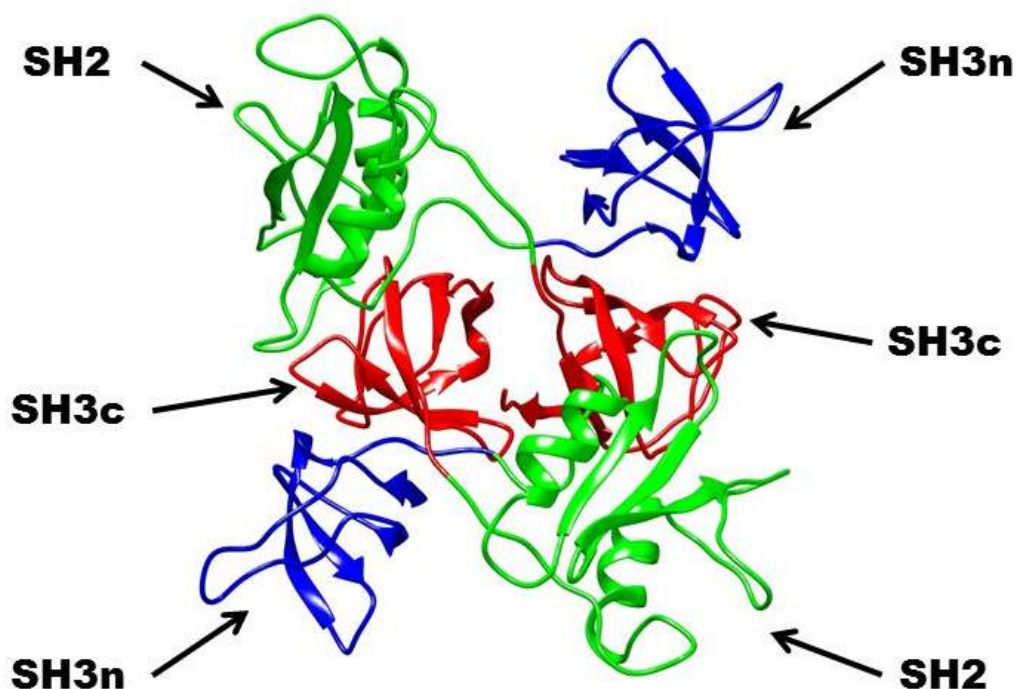
que permitem interação do tipo proteína-proteína, sendo os domínios SH2 (*Src homology 2*) e SH3 (*Src homology 3*) [09].

1.2. A PROTEÍNA ADAPTADORA GRB2 E A VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK

As proteínas adaptadoras possuem domínios que realizam o reconhecimento de sequências específicas, permitindo que haja interação proteína-proteína e contribuindo para a propagação da sinalização celular [15].

A *growth factor receptor bound-protein 2* (Grb2) é uma proteína adaptadora citosólica ubiquamente expressa em eucariontes, atuando em vias de sinalização de proteínas quinases [16]. A Grb2 em seu estado monomérico possui massa molecular de 25 kDa com 217 resíduos de aminoácidos onde cinco destes são triptofanos. Ela é composta por um domínio SH2 (*Src homology 2*) flanqueado por dois domínios SH3 (*Src homology 3*) sendo um N-Terminal e outro C-Terminal (Figura 02) [17, 18].

Figura 02: Modelo estrutural 3D da proteína Grb2 em sua forma dimérica. O domínio SH2 se encontra em verde, o domínio SH3 N-Terminal em azul e o domínio SH3 C-Terminal em vermelho. A figura foi obtida utilizando o programa *Chimera*, com o código 1GRI.pdb da proteína Grb2 em dímero.



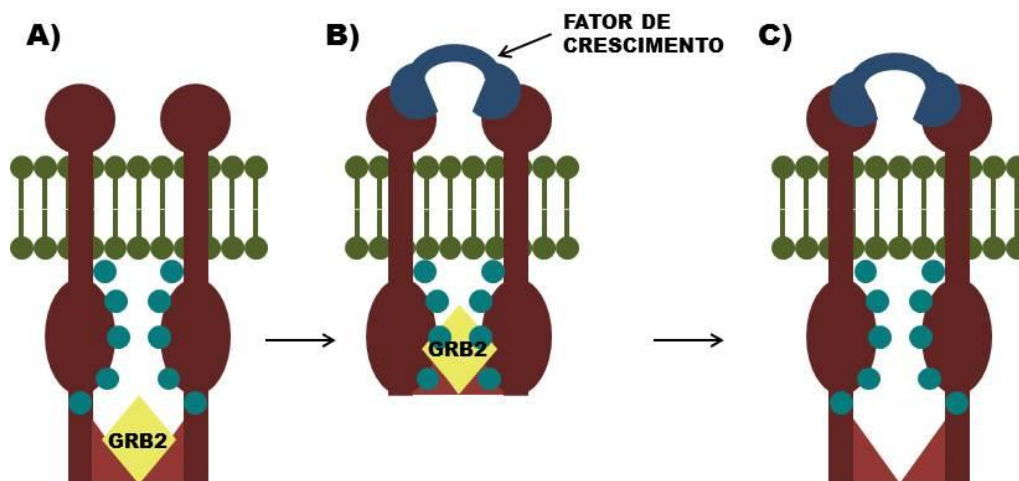
Fonte: *Protein Data Bank* (PDB). PDBid: 1GRI

Os domínios SH3 possuem em média 60 resíduos de aminoácidos e interagem com sequências de nove ou dez resíduos ricos em prolina (Pro ou P), possuindo um motivo P-x-x-P, sendo que x pode ser qualquer outro resíduo de aminoácido. A estrutura conformacional dos domínios SH3 possui um enovelamento composto por cinco folhas- β antiparalelas [02].

Os domínios SH2 possuem aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e são responsáveis pelo reconhecimento de tirosinas fosforiladas [20, 21]. Esta classe de domínio possui uma forma hemisférica organizado em cinco folhas- β antiparalelas se encontrando entre duas α -hélices paralelas [21].

Ahmed e colaboradores verificaram que a FGFR2 pode recrutar a adaptadora Grb2 mesmo na ausência de estímulos por fatores de crescimento. Uma vez que a FGFR2 é capaz de se autofosforilar na ausência desses, tem-se “um nível de fosforilação basal” (Figura 03) [22]. Este nível de fosforilação basal não ativa a via de sinalização, sendo um estado fosforilado e não sinalizador. Neste estado, a Grb2 em sua conformação dimérica é recrutada e interage via domínio SH3c na região C-Terminal da FGFR2, formando então com complexo tetramérico basal FGFR2-Grb2 (Figura 03a). Quando ocorre a interação de fatores de crescimento na porção extracelular da FGFR2 (Figura 03b), ela fosforila a Grb2, fazendo com que a Grb2 se desvincule, ficando livre para interagir com outras proteínas e ativar indiretamente a via de sinalização MAPK (Figura 03c) [14, 23]. Entendemos então que a Grb2 vai além de uma simples adaptadora, mas sim uma reguladora da atividade quinase de FGFR2.

Figura 03: Mecanismo de regulação da FGFR2 através da Grb2. **(A)** A proteína FGFR2 (marrom) com o domínio quinase na região citoplasmática (elipse marrom) e Grb2 dimérica ligada através do domínio SH3, onde um heterotetrâmero na proporção 2:2 é obtido. **(B)** Fator de crescimento (azul escuro) interage na porção extracelular da FGFR2, induzindo mudanças conformacionais fazendo com que o domínio quinase da FGFR2 fosforile (verde-água) o domínio SH3 da Grb2. **(C)** Uma vez mais fosforilada, a Grb2 se desvincula da FGFR2.

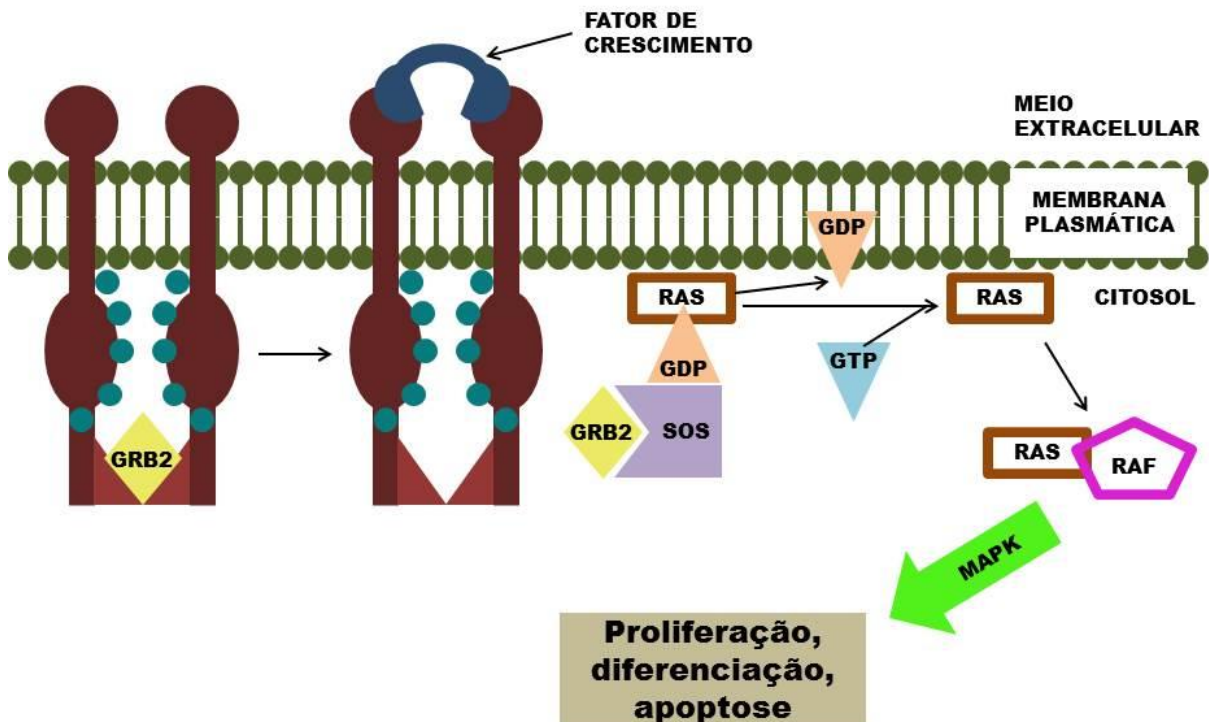


Fonte: Chi-Chuan Lin *et al*; 2012 – adaptado.

Em busca de uma melhor compreensão da função da Grb2 na ativação indireta da via da sinalização da *mitogen activated protein kinases* (MAPK), a **Figura 04** representa as sequências de acontecimentos até que dê início a MAPK. Para isto, a FGFR2 em sua forma dimérica na membrana leva a proximidade dos domínios quinases na região intracelular, permitindo que estes domínios se transfosforilem. Esta transfosforilação faz com que haja um aumento na atividade quinase intrínseca da FGFR2, ocasionando eventos secundários de fosforilação de tirosinas na região citosólica da FGFR2. As tirosinas fosforiladas e as regiões ao seu redor proporcionam sítios de interação para proteínas parceiras. A Grb2 através do seu domínio SH3c reconhece o motivo P-x-x-P na região C-Terminal da FGFR2, permitindo a interação Grb2-FGFR2 [05, 22]. Através do domínio SH2, a Grb2 recruta a proteína Sos que é responsável pela troca de GDP por GTP. Após a associação da Grb2 com a Sos, a Sos é reposicionada para a membrana celular onde está localizada a proteína Ras-GDP [24]. A proteína Sos ativa a Ras-GDP tornando-a em Ras-GTP, que posteriormente recruta a proteína Raf. A Ras-GTP fornece um grupo fosfato para a Raf, tornando-a ativa e pronta para fosforilar e dar início a via de sinalização MAPK. Quando a via MAPK (**Figura 04**) está ativa e não

regulada, leva a proliferação celular descontrolada, ocasionando alguns tipos de cânceres como o de mama, próstata e má formação fetal [22, 25].

Figura 04: Esquema da ativação da via de sinalização MAPK. Após a FGFR2 fosforilar a Grb2, a Grb2 se dissocia da FGFR2 e interage com a Sos, que é responsável pela troca de GDP por GTP na proteína Ras. A Ras-GTP então interage com a proteína Raf dando início a via de sinalização MAPK.



Fonte: Sanches, K; 2019 – Adaptado.

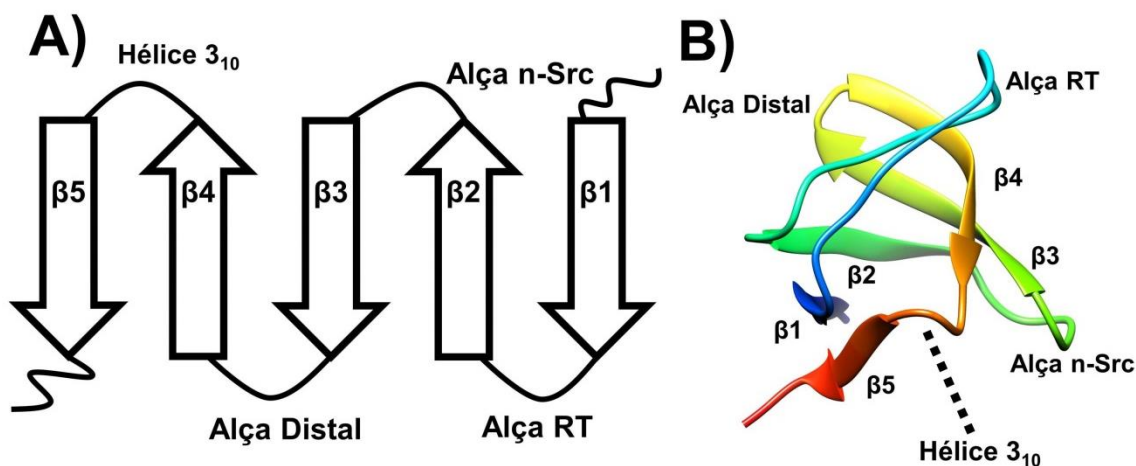
1.3. O DOMÍNIO SH3C

Inicialmente, os domínios SH3 foram descritos como um fragmento polipeptídico conservado de uma proteína tirosina quinase da família Src e de uma sequência da proteína adaptadora Crk. Posteriormente, estes domínios foram identificados em muitas outras proteínas de sinalização. Atualmente sabe-se que o genoma humano codifica aproximadamente 300 destes domínios [26]. Os domínios SH3 estão envolvidos em importantes processos celulares, incluindo sinalização celular, rearranjos e movimentos celulares do citoesqueleto, crescimento e diferenciação celular [26]. A grande maioria destes domínios caracterizados até hoje interagem com sequências ricas em prolina contendo um motivo P-x-x-P, em que x

denota qualquer aminoácido. Mesmo assim, a investigação para compreender como ocorre o controle deste mecanismo é vasta [27, 28, 29].

A estrutura do domínio SH3c da proteína Grb2 compreende em um barril- β formado por cinco folhas- β sendo três paralelas e duas antiparalelas. As folhas- β são ligadas por uma alça RT, uma alça n-Src, uma alça distal e uma hélice 3_{10} curta (Figura 05) [30]. O domínio SH3c é formado por 58 resíduos de aminoácidos onde dois destes são triptofanos e possui uma massa molecular de 8,36 kDa.

Figura 05: Estrutura do domínio SH3c. **A)** Topologia da estrutura secundária do domínio SH3c da proteína Grb2. **B)** Modelo estrutural 3D do domínio SH3c. A figura (A) foi de autoria própria e a figura (B) foi obtida utilizando o programa *Chimera*, com o código 2VVK.pdb do domínio SH3c da proteína Grb2.

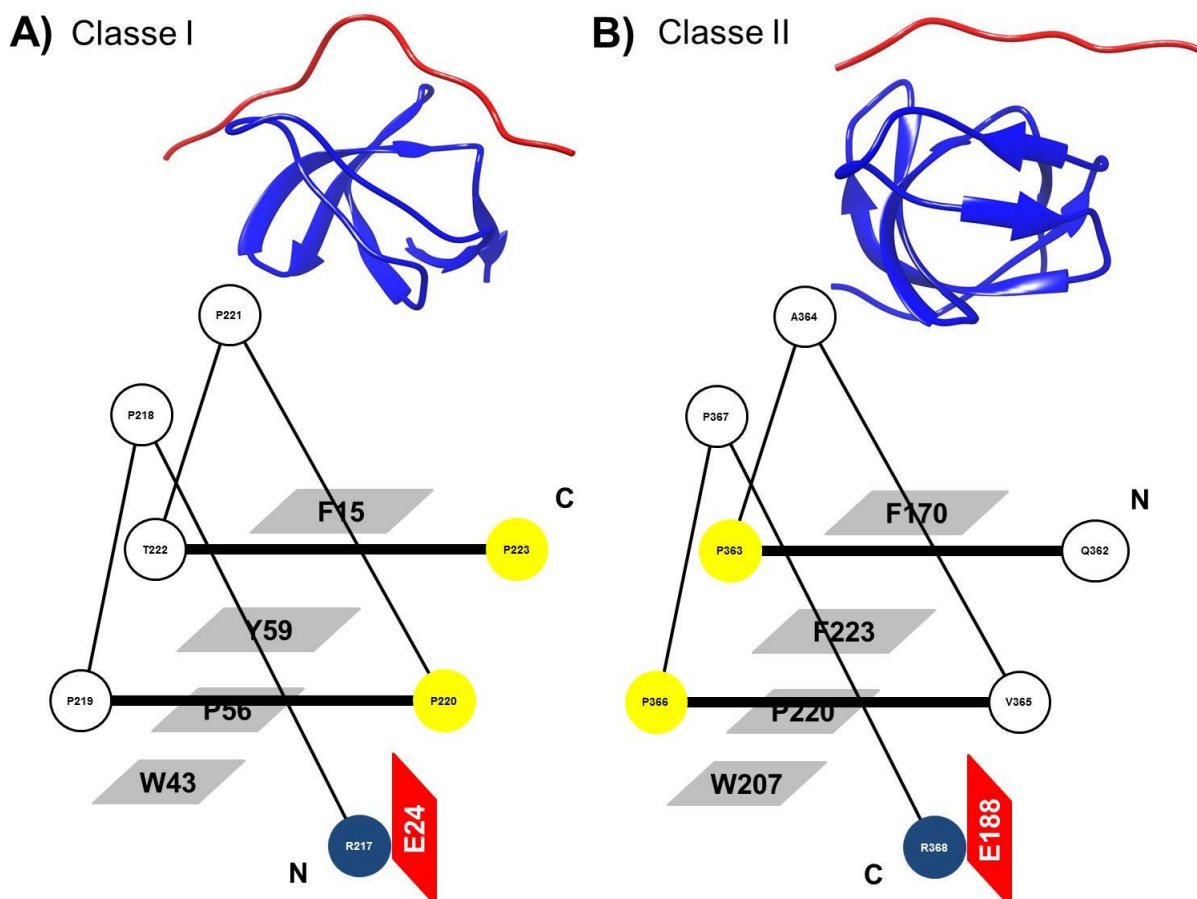


Fonte: A) J Mol Biol, Willians e Weijland, 1997 – Adaptado; B) *Protein Data Bank* (PDB). PDBid: 2VVK.

Estudos de interação de peptídeos relacionados ao domínio SH3 mostram que sua superfície é formada por dois sítios hidrofóbicos, revestidos principalmente por resíduos aromáticos que acomodam o ligante alvo dobrado em uma hélice de poliprolina do tipo II (PPII) e um sítio formado pelas alças RT e n-Src [31, 32]. Resíduos carregados positivamente, tais como arginina e lisina, localizados na alça RT desempenham um papel importante na interação de ligantes ao domínio SH3. Esses além de fornecer energia de ligação adicional através de interações eletrostáticas, também orientam o ligante em relação ao sítio de ligação do domínio SH3 [33]. Nos últimos anos, diversas abordagens experimentais foram realizadas para caracterizar a especificidade do reconhecimento de diferentes membros da família do domínio SH3 [30]. Foi verificado que os domínios SH3 fazem o

reconhecimento com os motivos $(R/K)\chi\Phi P\chi\Phi P$ ou $\Phi P\chi\Phi P\chi(R/K)$ onde Φ é um resíduo hidrofóbico e χ é qualquer aminoácido, esses motivos foram denominados como motivos classe I e classe II (**Figura 06**). A estrutura tridimensional dos domínios SH3 complexados com ligante da classe I ou da classe II se liga em orientações opostas [34].

Figura 06: Bases estruturais de uma ligação de um domínio SH3 a um peptídeo de classe I e II. A hélice do PPII é representada com os resíduos (círculo) ligados por ligações de amida (linhas). As unidades de ΦP do dipeptídeo são representadas pelas linhas em negrito, os resíduos do domínio SH3 encontrados no sítio de interação são representados em retângulos. **A)** Domínio SH3 da proteína beta-PIX complexado com um peptídeo derivado da AIP-4 (PDBid: 2P4R.pdb). O peptídeo contém o motivo de classe I $(R/K)\chi\Phi P\chi\Phi P$. **B)** Domínio SH3 da proteína p40(phox) complexado com um peptídeo derivado da p47(phox) (PDBid: 1W70.pdb). O peptídeo contém o motivo de classe II $\Phi P\chi\Phi P\chi(R/K)$.



Fonte: *Frontiers in Bioscience*, Kaneko e Li, 2008 – Adaptado.

Outro estudo importante foi realizado por Zamal e colaboradores (2015) relata sobre a atuação da Grb2 em seus estados dimérico e monomérico. Neste trabalho foi verificado que em células cancerígenas existe uma alta concentração de

Grb2 em sua forma monomérica, mostrando que o equilíbrio que o equilíbrio monômero-dímero é o ponto chave para a regulação da via MAPK. A Grb2 monomérica esta ativa para a via, enquanto que dimérica tende a inativa-la. O domínio SH2 exerce um papel fundamental, pois a Grb2 dimérica pode ser perturbada quando pequenas moléculas interagem em seu sítio de reconhecimento de fosfotirosinas e a tirosina 160 localizada no domínio SH3 C-Terminal é fosforilada [35].

Sabendo a importância em entender os mecanismos de reconhecimento bem como o papel estrutural das proteínas no que diz respeito a interações com parceiras, neste trabalho buscou-se verificar o papel estrutural do domínio SH3c bem como sua interação com uma pequena molécula da classe das cumarinas. A cumarina será brevemente introduzida na seção seguinte.

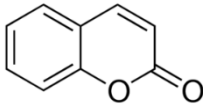
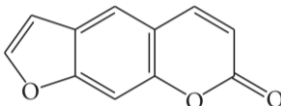
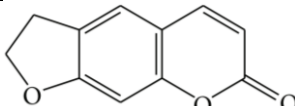
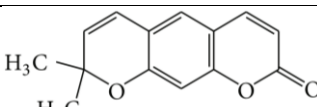
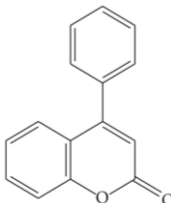
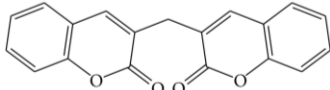
1.4. CUMARINA

A busca por tratamentos ou fármacos que possuam efeitos adversos menores ou inexistentes no tratamento do câncer vem aumentando. As cumarinas são moléculas com importantes propriedades farmacológicas como bactericida, anti-inflamatório, anticoagulante e atividade anticancerígena [38], onde consistem em uma grande classe de metabólicos secundários derivados do metabolismo da fenilalanina [55]. Foram isoladas pela primeira vez em 1820 por Vogel, membro da *Royal Academy of Science* em Munique. Vogel associou o cheiro doce das sementes de cumaru com o cheiro das flores de trevo (*Melilotus officinalis*), ele isolou nas duas espécies a cumarina em forma de cristais brancos idênticos [56].

As cumarinas são uma série de compostos que possuem em comum um anel benzeno ligadas a um anel α -pirona [38]. São amplamente distribuídas em frutos, sementes, raízes e folhas de plantas, principalmente em cenouras, morango, aipo, guaco, emburana, agrião, cereja, framboesa, damasco, canela e pimenta-da-índia. Possui um odor forte e característico de baunilha [57].

Elas são classificadas em seis tipos com base na estrutura química dos compostos: cumarinas simples, furanocumarinas, di-hidrofuranocumarinas, piranocumarinas, fenilcumarinas e bicumarinas (**Tabela 01**). As propriedades físico-químicas e as aplicações terapêuticas das cumarinas dependem do padrão de sua estrutura química.

Tabela 01: Diferentes tipos de cumarinas com suas estruturas químicas gerais.

| Tipo de Cumarina | Estrutura Química Geral | Exemplos |
|-------------------------|--|------------------------|
| Cumarinas Simples |  | Cumarina Esculetina |
| Furanocumarinas |  | <i>Methoxsalen</i> |
| Di-hidrofuranocumarinas |  | <i>Anthogenol</i> |
| Piranocumarinas |  | <i>Agasyllin</i> |
| Fenilcumarinas |  | <i>Isodispar B</i> |
| Bicumarinas |  | <i>Dicoumarol</i> |

Fonte: Medical Chemistry, Srikrishria e Godugu, 2016 – Adaptado.

A cumarina (1,2-benzopirona) é um cristal branco em temperatura ambiente, ponto de fusão de 70°C, massa molecular de 146,15 g/mol, ponto de ebulição de 299°C, densidade aparente de 0,7 g/ml sendo solúveis em etanol e clorofórmio e pouco solúvel em água.

Estudos com as cumarinas vêm crescendo devido seu amplo potencial em atividades biológicas. Campos-Toimil *et al* (2002) avaliaram a atividade vaso relaxante das cumarinas em ratos, os resultados encontrados mostraram potencial ação vasodilatadora indicando serem promissores agentes anti-hipertensivos. Kabeya *et al* (2000) realizaram estudos com a cumarina (1,2-benzopirona) sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelhos. Eles observaram que a cumarina apresentou efeitos inibitórios na produção de radicais superóxido.

A atividade antiviral das cumarinas é relatada em diversos estudos em diferentes mecanismos. Bourinbaier (2002) demonstrou que a cumarina possui um alto potencial na inibição da replicação do vírus do HIV.

Foi constatada sua atividade anticancerígena em células tumorais, onde ratos tiveram o câncer de próstata regredido quando tratados com a cumarina, outros estudos também foram realizados envolvendo câncer de mama, câncer de colo entre outros em que a cumarina possui efeitos inibitórios [39]. Com isso sabemos o potencial da molécula cumarina, tornando então seu estudo fundamental em áreas multidisciplinares.

6. CONCLUSÕES

A caracterização de interações do tipo proteínas-ligantes é importante na compreensão de mecanismo de ação que propicia conhecimentos para o desenvolvimento de novos fármacos. Estes resultados possibilitam entender a nível molecular o microambiente que a molécula interage bem como esta interação pode afetar física e estruturalmente a proteína. Além da importância a respeito da interação proteína-ligante, é fundamental o entendimento da dinâmica conformacional que a proteína apresenta, uma vez que esta dinâmica está intrinsecamente relacionada a funções específicas que a proteína desempenha dentro da célula.

Os parâmetros de relaxação do domínio SH3c mostraram que os resíduos que se encontram na alça RT e na hélice 3₁₀ possuem dinâmica térmica em escala de tempo de ps – ns, e os resíduos D153, K155, G158, V170 e M171 estão em troca conformacional lenta da ordem de μ s – ns. Estes resíduos formam um sítio superficial e troca conformacional e em dinâmica.

Experimentos de fluorescência mostraram que ocorre uma interação entropicamente dirigida entre o domínio SH3c e a cumarina, enquanto que efeitos hidrofóbicos favorecem a estabilização do complexo. Esta interação é moderada com $K_b \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ e ocorre com a proporção 1:1 enquanto que simulações computacionais indicaram três possíveis sítios de interação, sendo assim, estudos futuros serão necessários para estabelecer em qual sítio ocorre a interação.

A partir do levantamento bibliográfico que caracteriza as vias envolvendo a Grb2 juntamente com seu domínio SH3c, a cascata de sinalização MAPK e o ligante cumarina assim como os resultados aqui apresentados pode-se verificar que a proteína Grb2 é um alvo promissor e a cumarina uma molécula potencial para o desenvolvimento de fármacos. A dinâmica do domínio SH3c em diferentes escalas de tempo [é importante para o entendimento a respeito da função-estrutura desses importantes alvos proteicos.

6.1. PERSPECTIVAS

- Obter parâmetros de relaxação da interação do domínio SH3c e cumarina a fim de elucidar seleção conformacional;
- Realizar espectroscopia de fluorescência da interação entre o domínio SH3c e cumarina com o domínio SH3c fosforilado;
- Obter parâmetros de relaxação do domínio SH3c fosforilado;
- Obter parâmetros de relaxação da interação do domínio SH3c fosforilado e cumarina a fim de elucidar seleção conformacional;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- [01] A.K. Abbas, A.H.H. Lichtman, S. Pillai, *Imunologia Celular e Molecular*, Elsevier Brasil, 2015.
- [02] Donald Voet, Judith Voet, Charlotte Pratt, *Fundamentos de Bioquímica*, 4th ed., Artmed, 2014.
- [03] D.L. Nelson, *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, Edição: 6a, Artmed, 2014.
- [04] Rang, Dale, *Farmacologia*, 7th ed., Elsevier, 2012.
- [05] Artur A. Belov, Moosa Mohammadi, Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling, 5 (2012).
- [06] F. Bunz, *Principles of Cancer Genetics*, Springer Science & Business Media, 2008.
- [07] Bárbara V. Silva, Bruno A. C. Horta, Ricardo Bicca Ricardo Bicca de Alencastro, Angelo C. Pinto, *Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos*, (2009).
- [08] J. Schlessinger, Signal transduction by allosteric receptor oligomerization, *Trends in Biochemical Sciences*. 13 (1988) 443–447. doi:10.1016/0968-0004(88)90219-8.
- [09] Bruce Alberts, *Biologia Molecular da Célula*, Artmed Editora, 2010.
- [10] Caio Abner V G Leite, José Victor G Costa, Rodrigo B Callado, Nathanael L Torres, Roberto César P Lima Junior, Ronaldo A Ribeiro, *Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer*, (2012).
- [11] B. Alberts, *Biologia Molecular da Célula*, Edição: 5a, Artmed, Porto Alegre, 2009.
- [12] V. Kumar, Jon C. Aster, Abbas Abbas, *Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças*, 9th ed., Elsevier, 2015.
- [13] A.S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch, MAP kinase signalling pathways in cancer, *Oncogene*. 26 (2007) 3279–3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421.
- [14] Z. Ahmed, C.-C. Lin, K.M. Suen, F.A. Melo, J.A. Levitt, K. Suhling, J.E. Ladbury, Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity, *J. Cell Biol.* 200 (2013) 493–504. doi:10.1083/jcb.201204106.
- [15] V, Thomas, D. Giles, G. PM Basavarajaswamy, A. Kumer Das, A. Patel, *Coumarin derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents*, *Anti-Cancer Agents*

in *Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 17 (3) (2017) 415-423.

[16] Ana M. Tari, Gabriel Lopez-Berestein, Grb2: A pivotal protein in signal transduction, *28* (2001) 142–147.

[17] Lowenstein, E. J.; Daly, R. J.; Batzer, A. G.; Li, W.; Margolis, B.; Lammers, R.; Ullrich, A.; Skolnik, E. Y.; Bar-Sagi, D.; Schlessinger, J.; The SH2 and SH3 Domain-Containing Protein GRB2 Links Receptor Tyrosine Kinases to Ras Signaling. *Cell*. 1992. 431 – 442.

[18] Chardin, P.; Cussac, D.; Maignan, S.; Ducruix, A.; The Grb2 adaptor. *FEBS*. 1995. 47 – 51.

[19] S. Yuzawa, M. Yokochi, H. Hatanaka, K. Ogura, M. Kataoka, K. Miura, V. Mandiyan, J. Schlessinger, F. Inagaki, Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for target recognition, *J. Mol. Biol.* 306 (2001) 527–537. doi:10.1006/jmbi.2000.4396.

[20] A. Giubellino, T.R. Burke, D.P. Bottaro, Grb2 Signaling in Cell Motility and Cancer, *Expert Opin. Ther. Targets.* 12 (2008) 1021–1033. doi:10.1517/14728222.12.8.1021.

[21] D. Voet, J.G. Voet, *Bioquímica*, Artmed Editora, 2013.

[22] Chi-Chuan Lin, Fernando A. Melo, Ragini Ghosh, Kin M. Suen, Loren J. Stagg, John Kirkpatrick, Stefan T. Arold, Zamal Ahmed, John E. Ladbury, Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2, (2012).

[23] C.-C. Lin, F.A. Melo, R. Ghosh, K.M. Suen, L.J. Stagg, J. Kirkpatrick, S.T. Arold, Z. Ahmed, J.E. Ladbury, Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2, *Cell*. 149 (2012) 1514–1524. doi:10.1016/j.cell.2012.04.033.

[24] H. Lodish, A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, M.P. Scott, *Molecular Cell Biology*, 7th edition, W. H. Freeman, New York, 2012.

[25] R.J. Santen, R.X. Song, R. McPherson, R. Kumar, L. Adam, M.-H. Jeng, W. Yue, The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 239–256. doi:10.1016/S0960-0760(01)00189-3.

[26] T. Kancko, L. Li, S. S.-C. Li. The SH3 domain- a family of versatile peptide- and protein –recognition module. *Frontiers in Bioscience*. (2008).

[27] Superti-Furga, G.; Courtneidge, S. A.; Structure-function relationship in Src family and related protein tyrosine kinases. *BioEssays*. 1995. 321 – 330.

- [28] Yu, H.; Rosen, M. K.; Shin, T. B.; Seidel-Dugan, C.; Brugge, J. S.; Schreiber, S. L.; Solution Structure of the SH3 Domain of Src and Identification of Its Ligand-Binding Site. *Science*. 1992. 1665 – 1668.
- [29] Feng, S.; Chen, J. K.; Yu, H.; Simon, J. A.; Schreiber, S. L.; Two Binding Orientations for Peptides to the Src SH3 Domain: Development of a General Model for SH3-Ligand Interactions. *Science*. 1994. 1241 – 1247.
- [30] Williams, J. C.; Weijland, A.; Gonfloni, S.; Thompson, A.; Courtneidge, S. A.; Superti-Furga, G.; Wierenga, R. K.; The 2.35 Å Crystal Structure of the Inactivated Form of Chicken Src: A Dynamic Molecule with Multiple Regulatory Interactions. *J Mol Biol*. 1997. 757 – 775.
- [31] Schlessinger, J.; Ullrich, A.; Growth Factor Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Neuron*. 1992. 383 – 391.
- [32] Pawson, T.; Gish, G. D.; SH2 and SH3 Domains: From Structure to Function. *Cell*. 1992. 359 – 362.
- [33] Harkiolaki, M.; Tsirka, T.; Lewitzky, M.; Simister, P. C.; Joshi, D.; Bird, L. E.; Jones, E. Y.; O'Reilly, N.; Feller, S. M.; Distinct Binding Modes of Two Epitopes in Gab2 that Interact with the SH3C Domain of Grb2. *Structure*. 2009. 809 – 822.
- [34] Ahmed, Z.; George, R.; Lin, C.; Suen, K. M.; Levitt, J. A.; Suhling, K.; Ladbury, J. E.; Direct binding of Grb2 SH3 domain to FGFR2 regulates SHP2 function. *Cellular Signalling*. 2010. 23 – 33.
- [35] Z. Ahmed, Z. Timsah, K.M. Suen, N.P. Cook, G.R.L. Iv, C.-C. Lin, M. Gagea, A.A. Marti, J.E. Ladbury, Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7354. doi:10.1038/ncomms8354.
- [36] K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity, Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity, *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* 2013, 2013 (2013) e963248. doi:10.1155/2013/963248, 10.1155/2013/963248.
- [37] Anuradha Thakur, Ramit Singla, Vikas Jaitak, Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies, (2015).
- [38] Srikrishna, D.; Godugu, C.; Dubey, P. K.; A Review on Pharmacological Properties of Coumarin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2016. 1 – 30.

- [39] J.L. Mohler, B.T. Williams, I.M. Thompson, M.E. Marshall, Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 (1994) S35–S38. doi:10.1007/BF01377123.
- [40] Lakowics, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer. 1st. 1983.
- [41] Eisberg, R.; Resnick, R.; *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*. Elsevier. 1^{ed}. 1979.
- [42] Moreira, M. B.; Franciscato, D. S.; Toledo, K. C.; Souza, J. R. B.; Nakatani, H. S.; Souza, V. R.; *Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio*. *Química Nova*. 2015. 227 – 232.
- [43] Weert, M.; Stella, L.; *Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology*. *Journal of Molecular Structure*. 2011. 144 – 150.
- [44] Cavanagh, J.; *Protein NMR Spectroscopy – Principles and Practice*. Elsevier Trade Monographs. 2nd.
- [45] Keeler, J.; *Understanding NMR Spectroscopy*. Wiley. 1st. 2005.
- [46] Rule, G. S.; Hitchens, T. K.; *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. Springer. 1st. 2006
- [47] A.G. Palmer, J. Cavanagh, P.E. Wright, M. Rance, Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 1969. 93 (1991) 151–170. doi:10.1016/0022-2364(91)90036-S.
- [48] N.A. Farrow, O. Zhang, J.D. Forman-Kay, L.E. Kay, A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of ¹⁵N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium, *J. Biomol. NMR.* 4 (1994) 727–734.
- [49] Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins MR., Appel RD., Bairoch A., John MW. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, Human Press. 2005. 561-607.
- [50] Ghisaidoobe, A. B. T.; Chung, S. J.; *Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques*. *Int J Mol Sci*. 2014. 22518 – 22538.
- [51] Caruso, I. P.; Vilegas, W.; Souza, F. P.; Fossey, M. A.; Cornélio, M. L.; *Binding of antioxidante flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014. 100 – 106.

- [52] Taboada, P.; Barbosa, S.; Castro, E.; Gutiérrez-Pichel, M.; Mosquera, V.; Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous-alcohol mixed solvents. *Chemical Physics*. 2007. 59 – 68.
- [53] Connelly, P. R.; Aldape, R. A.; Bruzzese, F. J.; Chambers, S. P.; Fitzgibbon, M. J.; Fleming, M. A.; Itoh, S.; Livingston, D. J.; Navia, M. A.; Thomson, J. A.; Wilson, K. P.; Enthalpy of hydrogen bond formation in a protein-ligand binding reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 1964 – 1968.
- [54] Valente, A. P.; Miyamoto, C. A.; Almeida, F.C. L.; Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 3697–3703.
- [55] Kuster, R. M.; Rocha, L. M.; Cumarinas, Cromonas e Xantonomas. In. SIMÕES, C. O. S.; *et al* (Org.). *Farmacologia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003. 537 – 556.
- [56] Murray, R. D. H.; *Naturally Occurring Plant Coumarins*. 1 ed. New York. Springer-Verlag. 200 – 209.
- [57] Ojala, T.; *Biological Screening of Plant Coumarins*. 2001. 62f. Academic Dissertation. University of Helsinki.
- [58] Lengauer, T.; Rarey, *Computational methods for biomolecular docking*. *Current Opinion in Structural Biology*. 1996. 402 – 406.
- [59] Kitchen D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J.; *Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications*. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004. 935 – 949.
- [60] Rarey, M.; Kramer, B, Lengauer, T.; *Multiple automatic base selection: Protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 1997. 369 – 384.
- [61] Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L.; *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2, Enrichment Factors is Database Screening*. *J Med Chem*. 2004. 1750 – 1759.
- [62] Chaudhary, K. K.; Mishra, N.; *A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery*. *SciMedCentral JSM Chemistry*. 2016. 1029 – 1033.