



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

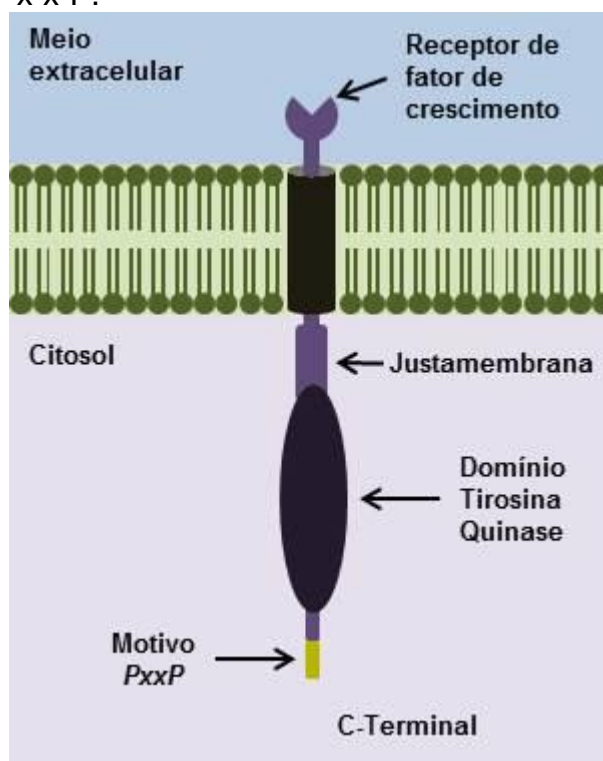
1. INTRODUÇÃO

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

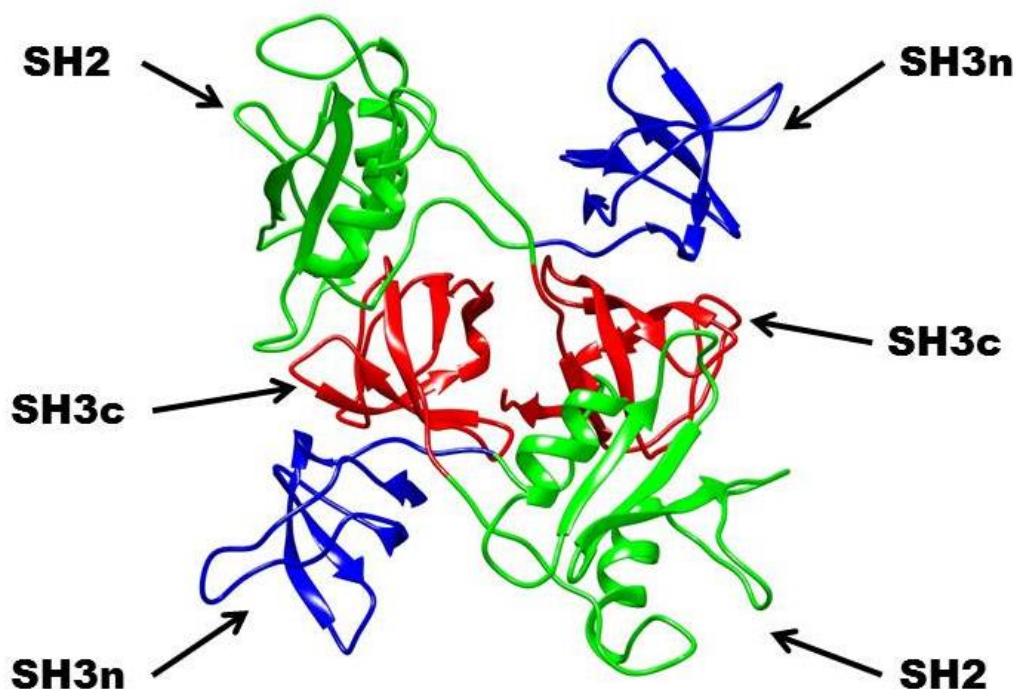
que permitem interação do tipo proteína-proteína, sendo os domínios SH2 (*Src homology 2*) e SH3 (*Src homology 3*) [09].

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.



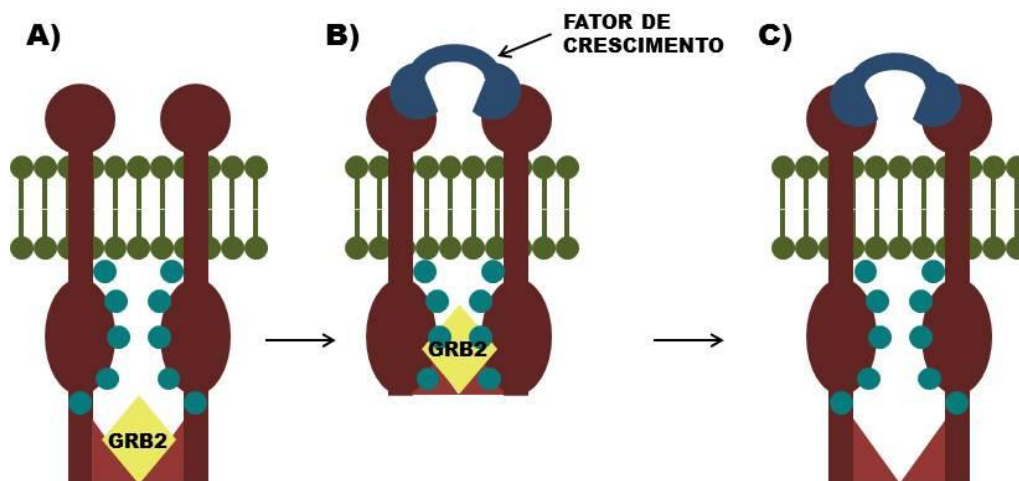
Fonte: *Protein Data Bank* (PDB). PDBid: 1GRI

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.

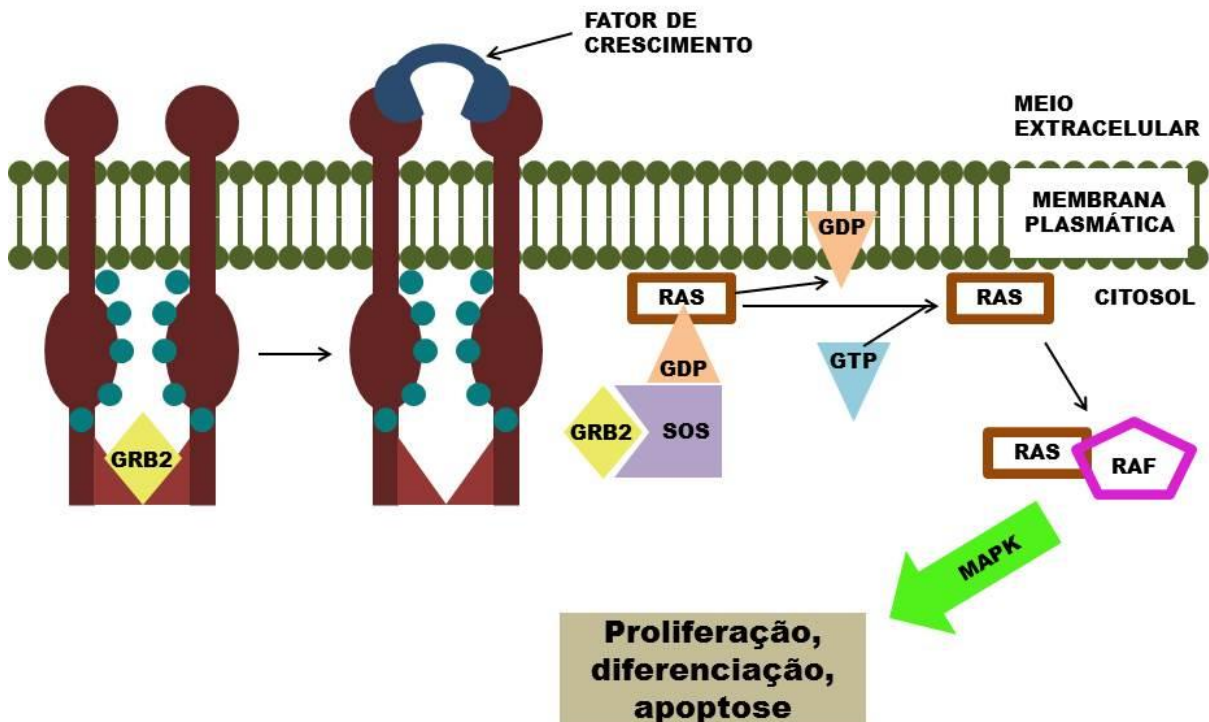


Fonte: Chi-Chuan Lin *et al*; 2012 – adaptado.

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.

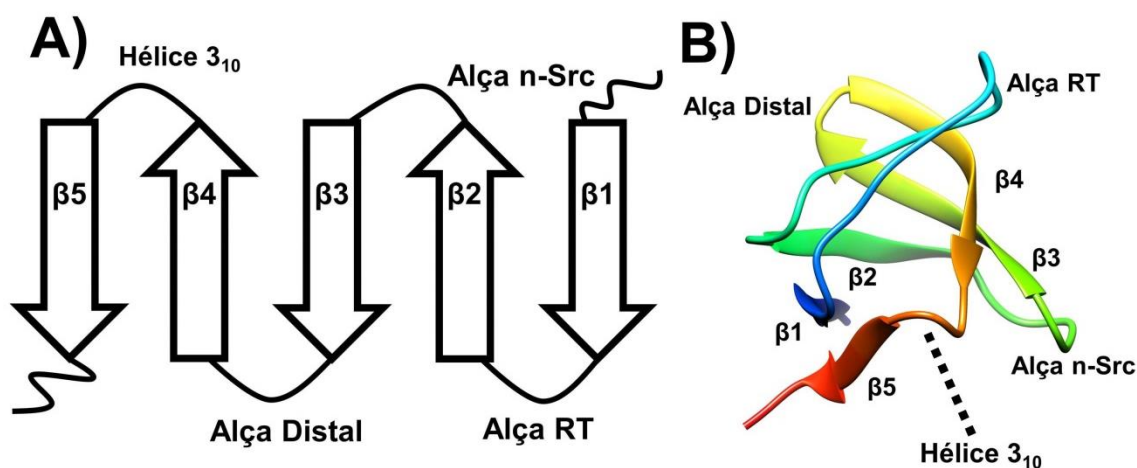
1.3. O DOMÍNIO SH3C

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.

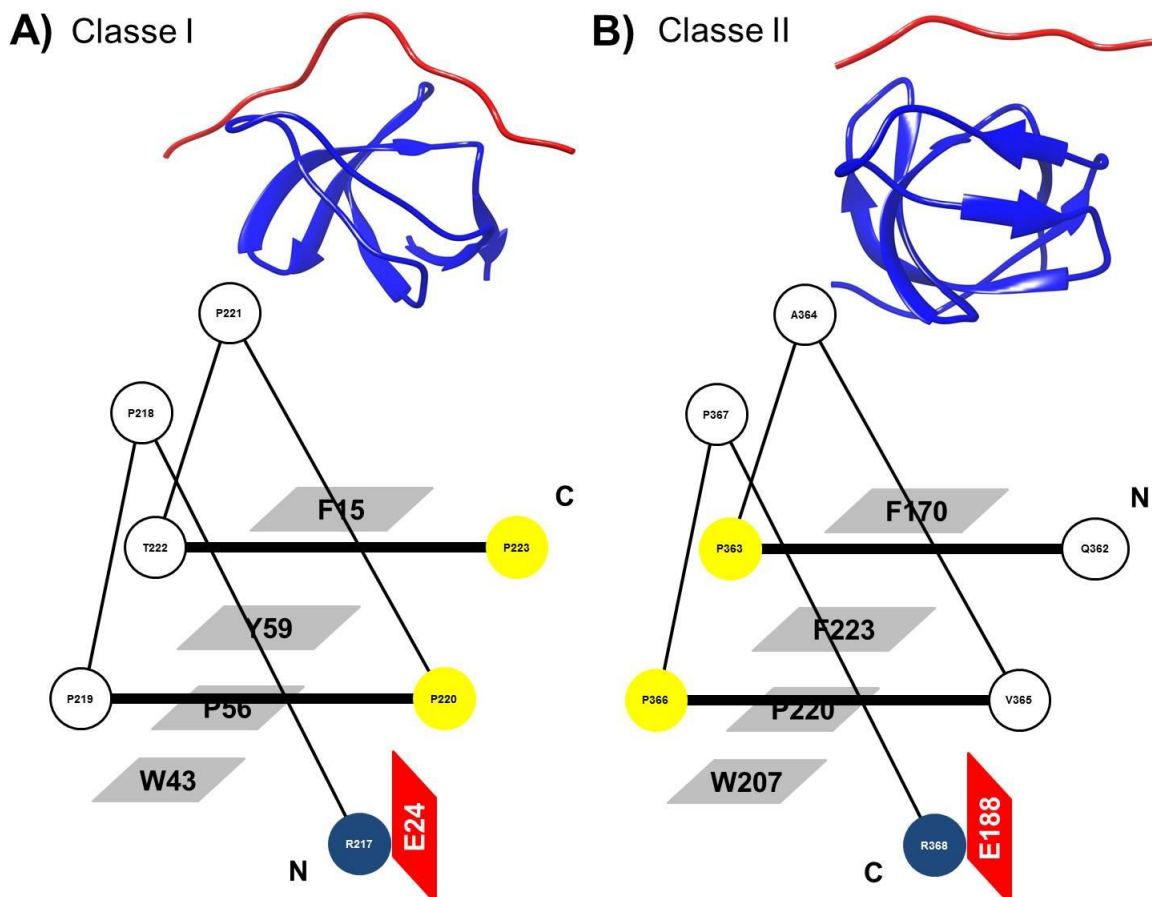


Fonte: A) J Mol Biol, Willians e Weijland, 1997 – Adaptado; B) *Protein Data Bank* (PDB). PDBid: 2VVK.

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.

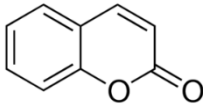
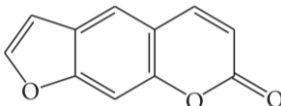
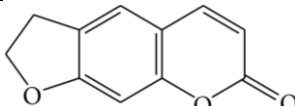
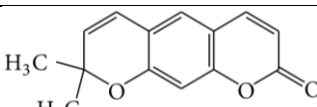
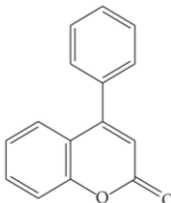
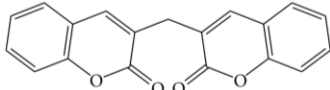
1.4. CUMARINA

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.

2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. PRINCÍPIOS BÁSICOS DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência se baseia na detecção da emissão de fótons para determinar a energia absorvida e emitida por diversas moléculas [44]. Pela Mecânica Quântica é possível determinar essa energia absorvida:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (01)$$

onde ν é a frequência da luz, λ o comprimento de onda e h a Constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J*s) [41].

O fenômeno é descrito sob a suposição de que um elétron em um determinado átomo sofra a interação positiva com os prótons do núcleo e interação negativa com os outros elétrons [40]. Pela Mecânica Quântica, cada elétrons é descrito por uma função de onda ψ_e , sendo que o conjunto formado por elétrons e núcleos devem obedecer O Princípio de Exclusão de Pauli [41]. Utilizando a Aproximação de Born-Oppenheimer, os movimentos dos elétrons e dos núcleos podem ser analisados separadamente possuindo uma função de onda total que relaciona a função de onda do elétron com a função de onda do núcleo:

$$\psi_T = \psi_e(r, R) \chi \psi_{nu}(R) \quad (02)$$

sendo r a coordenada do elétron e R a coordenada do núcleo [41].

O elétron possui uma posição r nativa correspondente ao arranjo nuclear mais estável, quando uma radiação eletromagnética atravessa o elétron, parte da radiação é absorvida em um comprimento de onda λ_A , passando do estado de mais baixa energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado) (Equação 03) [40, 41].

$$\Delta E_{12} = \frac{hc}{\lambda_A} \quad (03)$$

No entanto, quando o elétron voltar para seu estado fundamental ocorre emissão de radiação com comprimento de onda λ_F :

$$\Delta E_{21} = \frac{hc}{\lambda_F} \quad (04)$$

Uma propriedade importante a se destacar é que o espectro da radiação emitida é independente do comprimento de onda que foi absorvido [40].

2.1.1. Supressão de fluorescência

Pensando na relação entre λ_F e λ_A sabe-se que as proteínas não possuem um alto rendimento quântico, definido como o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Entretanto o estudo de fluorescência tem tido um papel importante nas pesquisas atuais [40].

Os resíduos de aminoácidos não apresentam uma absorção da radiação na região do visível, sendo que apenas três absorvem radiação na região do ultravioleta [40], sendo eles: Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr) e Fenilalanina (Phe). Esses resíduos de aminoácidos são conhecidos como fluoróforos e possuem a capacidade de absorver fótons nos comprimentos de onda $\lambda_{Trp} = 280$ nm, $\lambda_{Tyr} = 274$ nm e $\lambda_{Phe} = 257$ nm, sendo que essa absorção faz com que os elétrons da molécula saiam do estado fundamental partindo para um estado excitado, e quando eles retornam para o estado fundamental ocorre a perda de energia do elétron fazendo com que ele emita um fóton de comprimento de onda maior [40].

O Triptofano presente nas proteínas servem como uma sonda fluorescente eficiente para monitorar mudanças físico-químicas ocasionadas pela interação de algum ligante de interesse devido ao fato do espectro emitido seja suprimido quando ocorre a interação. A supressão de fluorescência está relacionada com qualquer processo que diminua a intensidade do espectro de emissão da amostra conforme se adiciona moléculas supressoras [40].

Podem ocorrer duas formas de supressão: dinâmica e estática. A supressão estática irá ocorrer quando há a formação de um complexo não fluorescente com um supressor no estado fundamental. Quando este complexo absorve radiação ele retorna ao estado fundamental sem emitir fótons, sendo o sinal de fluorescência observado oriundos dos fluoróforos não complexados. Já a supressão dinâmica acontece quando o complexo é formado durante o estado excitado. [40].

Pela a equação de Stern-Volmer, a supressão de fluorescência pode ser definida pela **Equação 05**, sendo que I e I_0 são as intensidades de fluorescência no estado estacionário na presença e na ausência de supressor $[Q]$, respectivamente; K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, K_q é a constante de supressão e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência de supressor [74].

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (05)$$

A razão I_0/I demonstra um comportamento linear com a concentração do supressor. Caso exista mais de uma classe de fluoróforos possuindo acessibilidades distintas, poderá ocorrer contribuições supressoras estáticos e dinâmicos, fazendo a equação de Stern-Volmer adquire um comportamento não-linear [40]. Observando a **Equação 05** e sabendo sua dependência linear, a constante de Stern-Volmer será o coeficiente angular desta reta, mostrando a efetividade da supressão causada pelo supressor [42].

O equilíbrio da reação é dado por:



sendo $[P]$ a concentração de proteína, n o número de sítios de ligação, $[L]$ a concentração de ligante e $[L_nP]$ é o complexo proteína/ligante . Através da equação de equilíbrio, temos a constante de associação K_b calculada por:

$$K_b = \frac{[L_nP]}{n[L][P]} \quad (07)$$

Considerando que a proteína pode se encontrar complexada ou livre, segue a relação:

$$[P_T] = [L_n P] + [P_F] \quad (08)$$

sendo que $[P_T]$ e $[P_F]$ são as concentrações de proteína total e livres, respectivamente. A razão de proteína total no sistema por proteína livre é igual a razão entre a intensidade de supressão na ausência de ligante por intensidade suprimida:

$$\frac{[P_T]}{[P_F]} = \frac{I_0}{I} \quad (09)$$

Determinando que o complexo proteína/ligante seja dado por $[P_A]$, se têm:

$$[P_A] = [L_n P] \quad (10)$$

E substituindo as equações (06) e (07) na equação (04) e fazendo algumas manipulações matemáticas é obtido:

$$\frac{I_0 - I}{I} = K_b [L_F]^n \quad (11)$$

Admitindo que a concentração de ligante livre $[L_F]$ seja muito maior que a concentração de ligante ligado, então a concentração total de ligante pode ser aproximada a concentração de ligante livre de tal forma que $[L_T] \cong [L_F]$, a equação de supressão no equilíbrio se torna:

$$\log\left(\frac{I_0 - I}{I}\right) = \log(K_b) + n \log([L]) \quad (12)$$

Onde se observa uma dependência linear, podendo obter os valores relativos ao número n de sítios de ligação por proteína e a constante de associação K_a relativa a interação do ligante com a proteína [40, 42, 43].

Variando a temperatura, a técnica de fluorescência permite fazer um estudo termodinâmico da interação proteína/ligante. Sabe-se que a estabilização do complexo proteína-ligante é dada por ligação de hidrogênio, interação de van der Waals, interações eletrostáticas e contatos hidrofóbicos no sítio de ligação [40]. Através dos parâmetros termodinâmicos pode se entender o tipo de interação predominante para a formação do complexo por meio da análise das contribuições energéticas da entalpia, entropia e energia livre de Gibbs. Sabe-se que tanto contribuições entálpica quanto entrópica estão relacionadas com mudanças conformacionais na estrutura da proteína. Mudanças na entalpia sugerem quebra ou formação de interações não covalentes entre átomos da proteína, e entre solvente e proteína. Já mudanças na entropia estão relacionadas a alterações dinâmicas da cadeia principal e lateral da proteína, além de organização do solvente, principalmente em regiões hidrofóbicas. A equação de van't Hoff (**Equação 13**) permite entender melhor cada contribuição, fornecendo o perfil termodinâmico da interação. Se $\Delta H, \Delta S > 0$ o sistema é dominado por interações hidrofóbicas, se $\Delta H, \Delta S < 0$ o sistema é dominado por ligações de hidrogênio ou van der Waals, e se $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ o sistema é dominado por interações eletrostáticas [40, 42].

$$\ln(K_b) = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (13)$$

Onde R é a constante universal dos gases e K_a é a constante de associação referente a temperatura utilizada no experimento. Vide que a **Equação 13** é uma equação linear, os parâmetros ΔH e ΔS são facilmente obtidos, enquanto a energia livre de Gibbs ΔG pode ser encontrada a partir da **Equação 14**:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (14)$$

2.2. TEORIA BÁSICA DE RMN

A base dos estudos de RMN é na detecção das transições de energia que ocorrem entre os estados do *spin* nuclear quando está sob a presença de um campo magnético externo (**B**). Possuindo uma carga líquida positiva e um momento angular de *spin* diferente de zero, o núcleo atômico passa a apresentar um momento magnético (**μ**) tendo em si um comportamento de dipolo magnético [44]. Dipolos magnéticos sofrem interação de campos magnéticos externos (**B**=(0,0,B)), possuindo uma energia de interação dada pela **Equação 15**:

$$E = -\vec{\mu} * \vec{B} \quad (15)$$

Os núcleos de hidrogênio (¹H), carbono (¹³C) e nitrogênio (¹⁵N) os quais possuem *spin* nuclear (I) 1/2 podem assumir dois estados energéticos (S = 2I + 1) (**Equação 16**) sendo que as energias sob a presença do campo magnético dependem da orientação do momento magnético **μ** em relação ao campo magnético, sendo esses átomos, do ponto físico-químico, constituintes essenciais de biomoléculas [45].

$$E_1 = -\frac{1}{2} \hbar \gamma B ; E_2 = \frac{1}{2} \hbar \gamma B \quad (16)$$

sendo que γ é a razão giromagnética que é uma característica de cada núcleo relacionando o momento magnético e momento angular do *spin*, e \hbar é a constante de Planck dividido por 2π . Em relação aos outros núcleos, núcleos que não apresentam *spin*, ou seja, possuem massa e número atômicos pares não ativos na RMN, enquanto que os que possuem *spin* > 1/2 apresentam mais que dois estados de energia [44].

As considerações feitas foram pensando em apenas um *spin*, no caso da macromolécula em solução haverá um conjunto de *spins*, denominado como *ensemble*. Neste *ensemble*, quando há a presença de um campo magnético externo, ocorre a formação de vários *spins* no estado de menor energia, sendo então

representado por vetor magnetização (**M**), que é formado quando é atingido o equilíbrio térmico na presença de **B**.

O grau da polarização é correspondente à diferença de energia E_1 e E_2 , sendo diretamente proporcional a razão giromagnética e a magnitude do campo externo (**Equação 17**). Essa diferença, quando expressada em termos da frequência de ressonância do núcleo (ν_0) é denominada como Frequência de Larmor [45].

$$\Delta E = E_2 - E_1 = \hbar\gamma B \rightarrow \frac{\Delta E}{\hbar} = \gamma B = \nu_0 \quad (17)$$

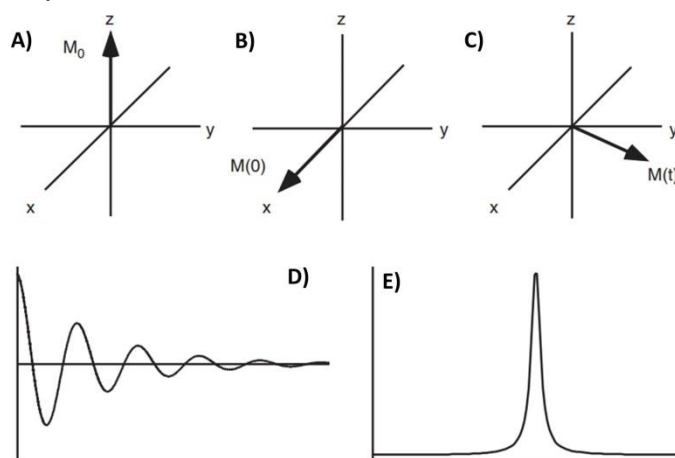
Para que ocorram transições do estado de menor energia para um estado de maior energia é necessário que haja a aplicação de pulsos de radiofrequência (magnitude de MHz), sendo a frequência deste pulso dependente do núcleo que pretende ser excitado (razão giromagnética) e também da intensidade do campo magnético externo. Enquanto está ocorrendo o pulso de radiofrequência o meio é perturbado mudando seu estado de energia, quando encerra a aplicação do pulso, o sistema volta para seu estado de equilíbrio por um processo conhecido como relaxação, dissipando a radiação eletromagnética absorvida para os *spins* vizinhos, processo conhecido como emissão induzida [44, 45].

Classicamente, o estado de equilíbrio corresponde ao vetor magnetização estático, este que é paralelo ao campo magnético externo que se encontra no eixo z experimental (**Figura 07a**). O pulso de radiofrequência que corresponde a um campo magnético que oscila, é aplicado de forma perpendicular ao campo magnético externo, possuindo o efeito de tirar o vetor magnetização de seu equilíbrio levando para o plano xy (**Figura 07b**). Quando o pulso é interrompido, o vetor magnetização retorna a posição de origem, fazendo um movimento de precessão em derredor do campo magnético externo com frequência ν_0 (**Figura 07c**). Então, em decorrência deste movimento de precessão, é induzida uma corrente oscilatória nas bobinas de detecção conhecido como FID (*free induction decay*), que corresponde ao sinal de RMN (**Figura 07d**) [45].

Quando se tem uma macromolécula, cada núcleo excitado irá emitir uma frequência diferente e de forma simultânea, sendo que o FID terá todas essas frequências. Este sinal é recebido de forma temporal, sendo necessária uma

Transformada de Fourier para “traduzir” o sinal oscilatório nas frequências de precessão, dando origem aos sinais característicos de RMN (**Figura 07e**).

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 aplicada uma Transformada de Fourier “traduzindo” para frequência e obtendo um gráfico típico de RMN.



Fonte: Protein NMR Spectroscopy, Cavanagh, – Adaptado.

2.2.1. Deslocamento químico

Os *spins* possuem a capacidade de reconhecer campos magnéticos locais vagamente diferentes do campo magnético externo. Isto ocorre devido a estrutura química da macromolécula e também de sua conformação, as quais modificam moderadamente a distribuição dos elétrons no local [45]. O campo magnético externo estimula movimentos nos elétrons das nuvens eletrônicas da região, surgindo campos magnéticos induzidos que possuem uma direção oposta ao campo magnético externo. Somando os dois campos magnéticos, surge um campo magnético resultante, tendo que cada *spin* da macromolécula apresente frequências de ressonância vagamente diferentes. O deslocamento químico (δ) é originário deste fenômeno, o qual fornece informações da estrutura molecular e conformação [45].

Graças ao deslocamento químico, é possível comparar resultados obtidos em aparelhos de RMN com diferentes intensidades de campos magnéticos. O deslocamento químico é expresso em ppm (parte por milhão):

$$\delta = \frac{\nu_0 - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \quad (18)$$

Sendo que ν e ν_{ref} são as frequências de ressonância do *spin* nuclear e de referência, respectivamente.

2.2.2. Acoplamento escalar

A aparência de um espectro de RMN não é influenciado apenas pelo deslocamento químico, mas também pelos desdobramentos causados pelo acoplamento escalar (J) e pelas propriedades de relaxação dos *spins* [44].

O acoplamento escalar é um efeito puramente quântico causado pela interação entre dois *spins* (I e S), sendo um próximo ao outro [81]. Com isto, a transição do *spin* I será dividida em duas, sendo que as frequências irão depender se o *spin* S estiver no estado E_1 ou E_2 . A diferença de uma frequência para outra é denominada como constante de acoplamento escalar, sendo que esta constante permite compreender como estão conectados os núcleos via ligação química. A magnitude do acoplamento escalar não depende da intensidade do campo magnético externo mas sim da natureza dos núcleos, sendo que a presença deste acoplamento faz com que surja multipletos no espectro [46].

2.2.3. Efeito Overhauser Nuclear (NOE)

O efeito Overhauser nuclear (NOE) é uma ferramenta muito usada na determinação da estrutura tridimensional de macromoléculas [46]. Este efeito ocorre quando dois núcleos estão próximos um do outro (menor que cinco angströms) podendo ocorrer transferência de magnetização entre os dois momentos de dipolos acoplados [46].

A medida do NOE é possível ser realizada através de espectros bi e tridimensional (ex., 2D: [^1H , ^1H] NOESY, 3D [^1H , ^1H] NOESY-HSQC editado para ^{13}C ou ^{15}N). A intensidade no espectro de RMN depende da distância entre os núcleos que estão interagindo, fornecendo uma importante informação estrutural. Esta

intensidade é proporcional ao inverso da sexta potência da distância entre os núcleos, sendo que esses espectros são utilizados para obter restrições [45].

2.2.4. Relaxação dos spins (T_1 e T_2)

Como já mencionado anteriormente, quando a magnetização retorna ao seu estado de equilíbrio após ser perturbada por um pulso de radiofrequência, esse acontecimento recebe o nome de relaxação. Quando comparado com outras técnicas espectroscópicas (ex: fluorescência), a evolução da relaxação é um tanto quanto mais lento (Fluorescência na ordem de nano segundos e RMN em milissegundos), fazendo com que seja possível observar uma magnetização transversal [45]. Em RMN, existe a relaxação de magnetização longitudinal, sendo que esta ocorre com uma constante de tempo característica denominada como T_1 , e também existe a relaxação de magnetização transversal, denominada como T_2 . Tanto T_1 quanto T_2 são muito importantes para o estudo em RMN, possuindo uma dependência com o tamanho da molécula. [44].

T_1 é um processo onde os *spins* que estão excitados retornam para o estado de equilíbrio por meio da redistribuição do *ensemble* dos estados do *spin* nuclear. Do ponto de vista vetorial, T_1 é encarregado em levar o vetor magnetização resultante ao eixo z, paralelo ao campo magnético externo, voltando então ao equilíbrio de Boltzmann [45]. T_1 é importante, pois é ele quem determina o tempo mínimo necessário para a realização de um novo experimento sem que haja perda significativa da intensidade do sinal.

T_2 representa a perda da coerência do vetor magnetização no plano xy, sendo assim, define o tempo aquisição do FID, tendo que a largura dos sinais de RMN são diretamente proporcionais a $1/T_2$. Macromoléculas grandes possui um T_2 muito curto e quando esse valor é muito pequeno a largura dos sinais são muito grande chegando até no ponto de não serem detectados [46]. Desta forma se explica o porquê da dificuldade de se trabalhar com proteínas grandes em solução no RMN.

Tanto T_1 quanto T_2 só acontecem porque existem campos magnéticos locais, que variam de forma aleatória em magnitude e direção conforme a molécula volta para sua posição de origem. Esta variação deve acontecer em uma frequência específica para que haja transições entre os estados de *spins*. Esta oscilação que

acontece nos campos magnéticos locais em função do tempo ocorre por dois meios principais de $I = 1/2$: a anisotropia do deslocamento químico do *spin* e o acoplamento dipolar entre os *spins* próximos [44, 46]. A anisotropia depende do núcleo em questão, sendo resultado do arranjo variado dos elétrons em torno do núcleo.. Estes elétrons blindam o núcleo do campo magnético externo, diminuindo o campo efetivo, surgindo uma densidade eletrônica anisotrópica que faz com que o campo magnético efetivo dependa da orientação proteica em relação ao campo magnético externo e, portanto, flutue de acordo com a proteína se movimentando em solução. O acoplamento dipolar é um resultado da interação que ocorre entre o campo magnético gerado por um núcleo com outro campo magnético oriundo de outro núcleo próximo. Esta interação ocorre dependendo da orientação dos núcleos e da distância entre eles, se essa orientação e distância variar com o tempo, o campo magnético efetivo também irá variar [44, 46].

A relaxação que ocorre no *spin* de ^{15}N em proteínas ocorre devido a interação dipolar com o ^1H sendo que este está ligado covalentemente, e também pela anisotropia do deslocamento químico do ^{15}N [44].

Além do que já foi mencionado sobre T_1 e T_2 , eles também possuem uma dependência da dinâmica interna que a proteína possui com o decorrer do tempo. Sendo assim, eles também podem ser utilizados para obter informações de movimento, se tornando uma ótima ferramenta tanto para explorar ambientes químicos do núcleo quanto a dinâmica que as proteínas possuem [46]. Devido a alta sensibilidade do acoplamento dipolar, a análise dos parâmetros de relaxação T_1 e T_2 fornece informações valiosas a respeito da dinâmica da proteína em escalas de tempo de ps a ns, referentes a dinâmica interna do vetor entre o nitrogênio e o hidrogênio (N-H) e da difusão rotacional global. Além de informações de movimentos lentos da ordem de μs a ms , os quais envolvem trocas conformacionais.

2.2.5. Medidas de Relaxação

Como já mencionado, a dinâmica de uma proteína pode ser analisada através das medidas de relaxação por RMN. Três parâmetros de relaxação, T_1 (relaxação longitudinal), T_2 (relaxação transversal) e NOE heteronuclear ^{15}N - ^1H , são tipicamente mensurados para cada núcleo em uma amostra uniformemente marcada com isótopo ^{15}N .

Considere uma proteína em solução onde todas orientações são igualmente prováveis. No equilíbrio, a magnetização nuclear da amostra está paralela ao campo magnético do espectrômetro de RMN. Após ocorrer uma perturbação via pulso de radiofrequência, a magnetização volta para o equilíbrio. A taxa que isto ocorre é dirigida pela dinâmica molecular que permite que a energia de interação nuclear oscilar na escala de tempo de pico a nano segundos [46]. Assim sendo, as informações de movimentos em escala de tempo rápida pode ser obtida das taxas de relaxações de um *spin*. Os experimentos usuais focam nas taxas R_1 , R_2 (correspondentes ao inverso de T_1 e T_2) e NOE heteronuclear, no qual descreve a formação de uma magnetização longitudinal (paralela ao campo magnético) e o decaimento da magnetização transversal (perpendicular ao campo magnético) conforme o sistema retorna ao equilíbrio [46].

No caso dos vetores ^{15}N - ^1H das proteínas, as taxas de relaxações de ^{15}N são dirigidas pelos movimentos do vetor ligação NH, o qual modula tanto o deslocamento químico do ^{15}N quanto a força de interação dipolo-dipolo $^{15}\text{N}/^1\text{H}$. as taxas de relaxação do ^{15}N separam os movimentos do vetor ligação de formas distintas: escala de tempo de pico segundos referente à dinâmica interna e nano segundos referente a difusão rotacional da molécula [45, 46].

As taxas de relaxação R_1 , R_2 e hNOE dependem da função de densidade espectral $J(\omega)$:

$$R_1 = d^2 [J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c^2 J(\omega_N) \quad (19)$$

$$R_2 = \left(\frac{d^2}{2}\right) [4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N) + 6J(\omega_H)] + \left(\frac{c^2}{6}\right) [4J(0) + J(\omega_N)] \quad (20)$$

$$NOE = 1 + \left[\left(\frac{\gamma_H}{\gamma_N}\right) d^2 \left\{ \frac{6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)}{R_1} \right\} \right] \quad (21)$$

onde

$$d^2 = \left(\frac{1}{10}\right) \gamma_H^2 \gamma_N^2 \left(\frac{h}{2\pi}\right)^2 (\langle r_{NH}^{-3} \rangle)^2 \quad (22)$$

$$c^2 = \left(\frac{2}{15}\right) \omega_N^2 (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \quad (23)$$

h é a constante de Planck, γ_H e γ_N são as razões giromagnéticas de ^1H e ^{15}N , ω_H e ω_N as frequências de Larmor, r_{NH} a distância intermolecular (valor médio de 1,02 angstrom), σ_{\parallel} e σ_{\perp} as componentes paralelas e perpendiculares de um tensor de deslocamento químico do ^{15}N com simetria axial [45, 46].

O hNOE informa sobre a movimentação dos vetores ligação NH individualmente. Os vetores NH experimentam movimentos mais rápidos do que a difusão rotacional global da molécula (de pico a nano segundos) evidenciando uma redução na intensidade do NOE relativo a medida observada para a maioria dos resíduos. Desta forma, a redução nas intensidades do NOE e até a inversão das intensidades são usualmente encontradas em resíduos flexíveis da proteína [46].

As medidas de relaxação podem ser analisadas um formalismo dinâmico livre do modelo de Lipari-Szabo [46]. Neste modelo, a mobilidade é caracterizada por um parâmetro de ordem (S^2) o qual pode ser interpretado como a amplitude do movimento e um tempo de correlação (τ_c) que refere a um tempo característico deste movimento. Pelo formalismo de Lipari-Szabo os movimentos do vetor NH são matematicamente separados em um tombamento global da proteína e em oscilações rotacionais internas dos vetores NH. O movimento do vetor NH é descrito por um modelo de difusão em cone, dentro do cone o vetor NH é livre para se difundir, entretanto este vetor não tem acesso fora do cone. De modo geral, a ligação é rígida quando $S^2 = 1$, e que o movimento é isotrópico quando $S^2 = 0$ [46].

2.2.6. Troca Conformacional

Muitos eventos bioquímicos acontecem em uma escala de tempo de micro a milissegundos, desta forma é interessante caracterizar as transições conformacionais que estão envolvidas em tais processos.

A escala de tempo em RMN para detectar trocas conformacionais é definida pela taxa de troca para o evento, k_{ex} relativa a escala de tempo do deslocamento químico ($\Delta\omega$ é a diferença de deslocamento químico entre as espécies interconvertendo). A interconversão é lento-intermediária quando $k_{ex} \ll \Delta\omega$, intermediária quando k_{ex} é aproximadamente $\Delta\omega$ e rápido-intermediário quando $k_{ex} > \Delta\omega$ [45]. Para trocas lentas, sub-estados são observados como picos distintos no espectro de RMN, sendo possível uma caracterização estrutural. Ao contrário, em trocas intermediárias ou rápidas, um único sinal relativo à população média é observado [46].

2.3. DOCKING MOLECULAR

Docking Molecular é um método o qual prevê a orientação de um ligante no receptor (proteína) gerando um complexo estável [58]. O *docking* é frequentemente aplicado para prever a orientação de ligação dos candidatos a fármacos contra alvos proteicos, a fim de prever a afinidade e a atividade do fármaco, desempenhando um papel fundamental no processo de design e descoberta de drogas. O principal objetivo deste método é simular computacionalmente o processo de identificação molecular e realizar uma conformação otimizada em que a energia livre do sistema seja minimizada [59].

Este método pode ser separado em duas seções.

- **Algoritmo de busca:** Primeiro é necessário um algoritmo que crie um número ótimo de configurações que, pelo método de experimentação, determinam os métodos de ligação [60].
- **Função Scoring:** Esta função fornece o posicionamento dos ligantes proporcionalmente a outro. Idealmente, o *scoring* deve corresponder diretamente à afinidade de interação proteína/ligante, de modo que quanto melhor o *scoring* mais intensa é a afinidade [61].

O *docking* é um processo no qual a interação proteína/ligante é estudada *in-silico*, onde a macromolécula é um receptor proteico e a micromolécula é um ligante. Desta forma, o processo segue algumas etapas [62]:

Etapa 01 – Preparo da Proteína: A estrutura tridimensional da proteína ser encontrada no *Protein Data Bank* (PDB), sendo esta depois pré-processada, ou seja, remoção de água das cavidades da molécula, estabilização das cargas, preencher os resíduos de aminoácidos faltantes, gerar cadeias laterais mais o que for necessário para o estudo em questão.

Etapa 02 – Predição do Sítio Ativo: Após o preparo da proteína, o sítio ativo da proteína deve ser predita. O receptor pode possuir mais de um sítio ativo, portanto uma análise deve ser feito levando em conta qual sítio ativo proporciona a menor energia de ligação.

Etapa 03 – Preparo do Ligante: Os ligantes podem ser encontrados em vários bancos de dados. Com o ligante escolhido as cinco Regras de Lipinsky deve ser utilizada. As Regras de Lipinsky auxilia na avaliação entre candidatos não farmacológicos e semelhantes drogas. Ela promete uma alta chance de sucesso ou fracasso se o ligante cumprir duas ou mais regra. As Regras de Lipinsky são:

- I. Menos de cinco doadores de ligação de hidrogênio;
- II. Menos de dez aceitadores de ligações de hidrogênio;
- III. Massa Molecular inferior a 500 Da;
- IV. Alta lipofilicidade (expressa como $\log(P)$ não superior a cinco);
- V. A refratividade molar deve estar entre 40 e 130;

Etapa 04 – Docking: O ligante se liga na proteína e as interações são analisadas sendo que quanto melhor o scoring mais forte a interação proteína/ligante.

Estes estudos foram realizados em colaboração pelo aluno de Pós-Graduação em Biofísica Molecular Raphael Vinícius Rodrigues Dias orientado pelo Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE), Departamento de Física, situado na cidade de São José do Rio Preto – SP.

3 – OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O propósito deste trabalho foi estudar a dinâmica estrutural do domínio SH3c da proteína Grb2 via ressonância magnética nuclear (RMN) e conjuntamente verificar e caracterizar a interação do domínio com cumarina via espectroscopia de fluorescência. Esses estudos possibilitaram descrever os mecanismos moleculares realizados pela Grb2 para desempenhar seu papel biológico. E ainda, foi obtido melhor entendimento da termodinâmica envolvida na interação entre o SH3c e a cumarina.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressou e purificou o domínio SH3c;
- Expressou e purificou o domínio ^{15}N -SH3c;
- Calculou os parâmetros termodinâmicos da interação SH3c e cumarina por espectroscopia de fluorescência;
- Assinalou as ressonâncias do domínio SH3c por comparação;
- Mediu-se os parâmetros de relaxação R_1 , R_2 e hNOE do domínio SH3c;
- Realizou cálculos teóricos utilizando *docking molecular* do domínio SH3c na presença e ausência de Cumarina;

4 – METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. ANÁLISE DO SH3C UTILIZANDO O SERVIDOR PROTPARAM

A análise da sequência de resíduos de aminoácidos domínio SH3 C-Terminal (PDBid: 2VVK.pdb) da proteína Grb2 foi realizado utilizando o servidor ProtParam [49]. Verificou-se que a massa molecular do domínio é de 8,360 kDa e o ponto isoelétrico teórico de 6,05. O servidor também forneceu o valor do coeficiente de extinção molar sendo de $\epsilon_{280} = 13.980 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Os dados da massa molecular e do ponto isoelétrico foram utilizados na expressão/purificação e preparo de tampões respectivamente, enquanto o coeficiente de extinção molar foi utilizado na determinação de concentração do SH3c. Conhecendo a sequência e sabendo que há dois resíduos de triptofano no domínio, esses resíduos foram utilizados como marcadores para a caracterização por espectroscopia de fluorescência, por possuírem uma absorção muito específica em 280 nm [50].

4.2. TRANSFERÊNCIA DE DNA PLASMIDIAL PARA CÉLULAS *E.COLI* LINHAGEM DH5A

Os plasmídeos que possuem os genes que codificam o domínio SH3c foram cedidos pelo professor John Edward Ladbury da Universidade de Leeds, Reino Unido.

Para que fosse possível aumentar a quantidade de plasmídeos recombinantes, eles foram transformados em *Escherichia coli* DH5 α quimicamente competentes, seguindo o protocolo descrito no Anexo I. Incubou-se três microlitros de plasmídeo em células competentes ao longo de 30 minutos no gelo. Em seguida foi realizado choque térmico à 42 °C por 30 segundos seguido de dois minutos sob o gelo. Após, foi adicionado 300 μl de meio de cultura líquido LB (*Lúria-Bertani* – L3022 Sigma-Aldrich®) e incubado por uma hora à 37 °C sob agitação de 90 RPM. Posteriormente a cultura foi centrifugada por um minuto à 10.000 RPM. O *pellet* resultante da centrifugação foi ressuspenso e seis microlitros da cultura foram adicionadas a uma placa de petri contendo meio LB sólido e antibiótico (50 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina). As placas foram incubadas *overnight* à 37 °C. Ao término do período de

incubação as colônias foram selecionadas e os plasmídeos purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Quiagem®) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante (Anexo II).

4.3. TRANSFERÊNCIA DE DNA PLASMIDIAL PARA CÉLULAS *E.COLI* LINHAGEM BL21 (DE3)

Para que a expressão do domínio pudesse ocorrer, os plasmídeos foram inseridos em bactérias que possuem uma maquinaria específica de expressão. Desta forma, os plasmídeos recombinantes foram transformados em células BL21 (DE3) quimicamente competentes similares ao item 4.2.

Logo após, as colônias foram selecionadas e crescidas em cinco mililitros de meio de cultura LB contendo 50 µg/ml de Ampicilina e incubado *overnight* à 100 RPM em 37 °C. Armazenou-se em alíquotas de um mililitro com 50% de glicerol em - 80 °C.

4.4. EXPRESSÃO DO DOMÍNIO SH3C PARA FLUORESCÊNCIA

Inicialmente um mililitro de pré-inóculo mencionado no item 4.3 foi inserido a 50 ml de meio de cultura LB líquido acrescido de 50 µg/ml de ampicilina e mantido sob agitação de 100 RPM à 37 °C por 14 horas. Após, adicionou dez mililitros da cultura de bactérias em 200 ml de pré meio-mínimo M9 [0,1 mM CaCl₂, 1 g/l NH₄Cl, 0,2 mM MgSO₄, 10 mM Cloreto de Ferro (III), coquetel de vitaminas (1 mg/l Biotina, 1 mg/l Cloreto de Colina, 1 mg/l Ácido Fólico, 1 mg/l Nicotinamida, 1 mg/l Ácido D-Pantatênico, 1 mg/l Hidroclorato Piridoxal, 0,1 mg/l Riboflavina), 2-3 g/l C₆H₁₂O₆ (Glicose), solução de TS2 com íons metálicos (ZnSO₄, MnCl₂, H₃BO₃, CaCl₂, NiCl₂, CuCl₂, Na₂MoO₄, Na₂SeO₃) e 50 mg/ml Ampicilina] estando com densidade óptica (DO) de 0,2. Foi incubado sob agitação de 100 RPM à 37 °C por três horas até atingir DO₆₀₀ = 0,9. Após, o meio de cultura foi centrifugado à 5.300xg, em 20 °C durante 20 minutos. O *pellet* formado após a centrifugação foi ressuspenso em um litro de meio-mínimo M9. Foi mantido sob agitação de 100 RPM à 37 °C por três horas até atingir uma DO₆₀₀ = 0,9. Com a DO₆₀₀ necessária atingida, a temperatura foi diminuída para 20 °C e as culturas com bactérias foram induzidas utilizando 0,4

mM de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo), permanecendo incubada em 100 RPM *overnight* por 20 horas. Em seguida, o meio com bactérias foi submetido à centrifugação a 3.500xg em 4 °C por 90 minutos. Então, as células foram incubadas com tampão de lise (50 mM Tris pH 7,5, 1 M NaCl, 2% v/v Tween 20, 1 mM 2-Mercaptoetanol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄) e após 30 minutos a amostra foi submetida à lise celular por meio de sonicação pulsada em dez ciclos (dois segundos *ON* e um segundo *OFF*). O extrato foi centrifugado a 35.000xg à 4 °C por 90 minutos. O sobrenadante foi filtrado em 0,45 μ m Minisart®.

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

4.5. EXPRESSÃO DO DOMÍNIO SH3C ENRIQUECIDO COM ¹⁵NH₄Cl PARA RMN

Inicialmente um mililitro de pré-inóculo mencionado no item 4.3 foi inserido a 50 ml de meio de cultura LB líquido acrescido de 50 μ g/ml de ampicilina e mantido sob agitação de 100 RPM à 37 °C por 14 horas. Após, adicionou dez mililitros da cultura de bactérias em 200 ml de pré meio-mínimo M9 [0,1 mM CaCl₂, 1 g/l NH₄Cl, 0,2 mM MgSO₄, 10 mM Cloreto de Ferro (III), coquetel de vitaminas (1 mg/l Biotina, 1 mg/l Cloreto de Colina, 1 mg/l Ácido Fólico, 1 mg/l Nicotinamida, 1 mg/l Ácido D-Pantatênico, 1 mg/l Hidroclorato Piridoxal, 0,1 mg/l Riboflavina), 2-3 g/l C₆H₁₂O₆ (Glicose), solução de TS2 com íons metálicos (ZnSO₄, MnCl₂, H₃BO₃, CaCl₂, NiCl₂, CuCl₂, Na₂MoO₄, Na₂SeO₃) e 50 mg/ml Ampicilina] estando com densidade óptica (DO) de 0,2. Foi incubado sob agitação de 100 RPM à 37 °C por três horas até atingir DO₆₀₀ = 0,9. Após, o meio de cultura foi centrifugado à 5.300xg, em 20 °C durante 20 minutos. O *pellet* formado após a centrifugação foi ressuspenso em um litro de meio-mínimo M9 enriquecido com ¹⁵NH₄Cl. Foi mantido sob agitação de 100 RPM à 37 °C por três horas até atingir uma DO₆₀₀ = 0,9. Com a DO₆₀₀ necessária atingida, a temperatura foi diminuída para 20 °C e a cultura com bactérias foram induzidas utilizando 0,4 mM de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo), permanecendo incubada em 100 RPM *overnight* por 20 horas. Em seguida, o meio de bactérias foi submetido à centrifugação a 3.500xg em 4 °C por 90 minutos. Então, as células foram incubadas com tampão de lise (50 mM Tris pH 7,5, 1 M NaCl, 2%

v/v Tween 20, 1 mM 2-Mercaptoetanol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄) e após 30 minutos a amostra foi submetida à lise celular por meio de sonicação pulsada em dez ciclos (dois segundos *ON* e um segundo *OFF*). O extrato foi centrifugado a 35.000xg à 4 °C por 90 minutos. O sobrenadante foi filtrado em 0,45 µm Minisart®.

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

4.6. PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO SH3C FUSIONADO COM GST

Foi utilizado o sistema de purificação por afinidade manual com resina GSTrap 4B®. Esta foi lavada com água destilada e previamente equilibrada com tampão de Tris-HCl (50 mM Tris pH = 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoetanol). Em seguida, a fração solúvel foi aplicado à coluna e incubado por duas horas à 20 °C em 80 RPM. Após o tempo de incubação, a resina foi lavada com dois volumes de coluna de tampão Tris-HCl.

Foi aplicado 100 unidades de trombina e a resina ficou *overnight* sob agitação por 16 horas à 20 °C em 80 RPM. Então, a amostra foi eluída com três volumes de coluna com tampão Tris-HCl. Concentrou-se a amostra retirada do processo de purificação por afinidade e realizou-se a purificação por gel filtração (exclusão molecular) utilizando a coluna Superdex® 75 10/300 GL para a retirada de contaminantes e também a troca de solução tampão da amostra. Utilizou-se tampão mono-di-fosfato [25 mM Na₂HPO₄ NaH₂PO₄ pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM Tris(2-carboxietil) fosfina]. A pureza da amostra após a purificação foi verificada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 20%.

4.7. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS

Com a finalidade de determinar a concentração do domínio SH3c e da cumarina, efetuaram-se medidas de absorção UV-Vis em espectrofotômetro *Thermo Scientific® BIOMATE UV-Visible*.

As medidas foram realizadas utilizando uma faixa de leitura de 200 à 500 nm em temperatura ambiente com cubeta de quartzo de um centímetro óptico. Para o cálculo de concentrações fez-se um espectro de linha de base do tampão e foi

utilizado o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280} = 13980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o SH3c. A cumarina foi preparada em etanol e a concentração foi determinada utilizando $\epsilon_{277} = 11438 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.8. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro ISS PC1 (*Champaign, IL, USA*)[®] equipado com banho térmico Neslab RTE-221 (*Thermo Electron Corporation, USA*)[®]. Utilizou uma cubeta de quartzo com caminho óptico de um centímetro. O comprimento de onda para excitação dos triptofanos do domínio SH3c foi de 295nm e a faixa de comprimento de onda para coleta dos espectros de 305 nm à 500 nm.

As medidas foram realizadas nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K, utilizando um concentração de SH3c mantida em 3 μM em 2 ml, realizando titulações de um $\Delta = 0,5 \mu\text{l}$ e a concentração variando de zero até 8 μM de cumarina.

4.9. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As medidas de RMN foram realizadas em espectrômetro Bruker[®] III HD 600 MHz equipado com criosonda localizado no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB/IBILCE) e em Bruker[®] Avance III 800 MHz localizado no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN/UFRJ).

Os parâmetros de relaxação R_1 , R_2 e hNOE para o domínio SH3c foram adquiridos utilizando experimentos de HSQC (**Tabela 02**) com 150 μM de ^{15}N -SH3c em pH 7.5. Para as medidas de R_1 , os tempos T de relaxação utilizados foram: 20 ms, 100 ms, 250 ms, 500 ms, 750 ms e 1000 ms. Para as medidas de R_2 , os tempos T de relaxação utilizados foram: 16,96 ms, 101, 76 ms, 33,92 ms, 135,68 ms, 50,88 ms e 67, 84 ms. As medidas de $\{^1\text{H}\} - ^{15}\text{N}$ NOE heteronuclear foram analisadas baseadas na razão entre as medidas de intensidades do espectro saturado e não saturado.

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 .

Experimento	Número de Scan	Matriz de dados	Referência
^{15}N , ^1H -HSQC	10	1024 x 400	47
^{15}N , ^1H -HSQC R_1	32	1024 x 90	48
^{15}N , ^1H -HSQC R_2	37	1024 x 90	48
^{15}N , ^1H -HSQC hNOE	56	1024 x 180	48

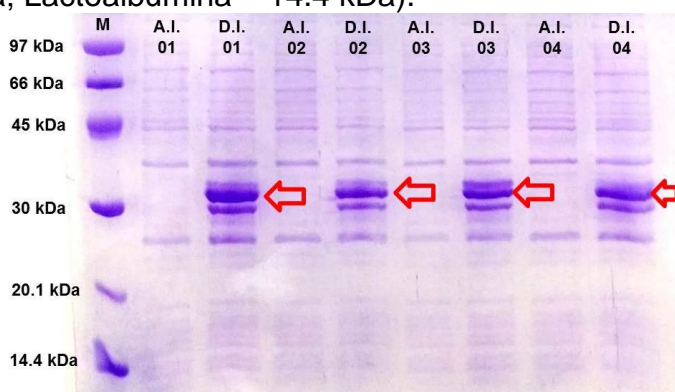
5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO SH3C

O domínio SH3c possui uma massa molecular de 8,36 kDa e ele foi expresso fusionado com a tag GST que possui uma massa molecular de 26 kDa, possuindo então uma massa molecular total de 34,36 kDa. A expressão foi realizada em quatro frascos *Erlenmeyer* diferentes podendo ser observado a semelhança entre eles (**Figura 08**).

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./ corresponde a cultura de bactérias antes da indução e o índice D./ 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).

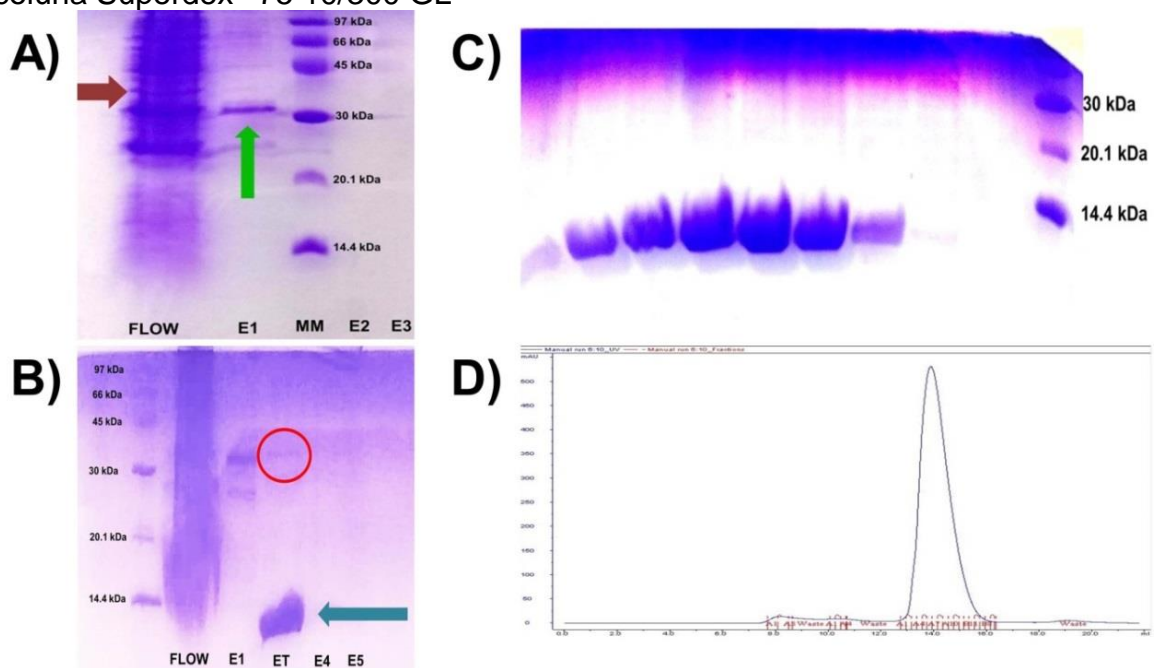


Fonte própria.

Através do SDS-PAGE (**Figura 08**) nota-se que na região antes da indução não houve a expressão do domínio SH3c, enquanto que na região depois da indução houve a expressão do domínio.

Os resultados de purificação do domínio SH3c podem ser visualizados através do SDS-PAGE (**Figura 09**). Estes resultados mostram que o domínio foi purificado com um alto grau de pureza. Este grau de purificação permitiu realizar os experimentos biofísicos propostos de forma adequada, com concentração da ordem de 150µM de SH3c.

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 Glutationa 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



Fonte própria.

Como é possível perceber (**Figura 09a**), o *flow through* que foi obtido na etapa de expressão e que foi inserido na resina GSTrap 4B®, o domínio SH3c ainda fusionado com a *tag* GST ficou ligado a resina, sendo que ele não aparece na região destacada pela seta vermelha, que é a *flow through*. Após a primeira eluição (E1), o contaminante encontrado na etapa da expressão foi eliminado como é possível perceber pela seta verde. A segunda e terceira (E2 e E3) eluições sugerem que o domínio possui um alto grau de pureza pelo fato de não aparecer nenhum contaminante nessas eluições.

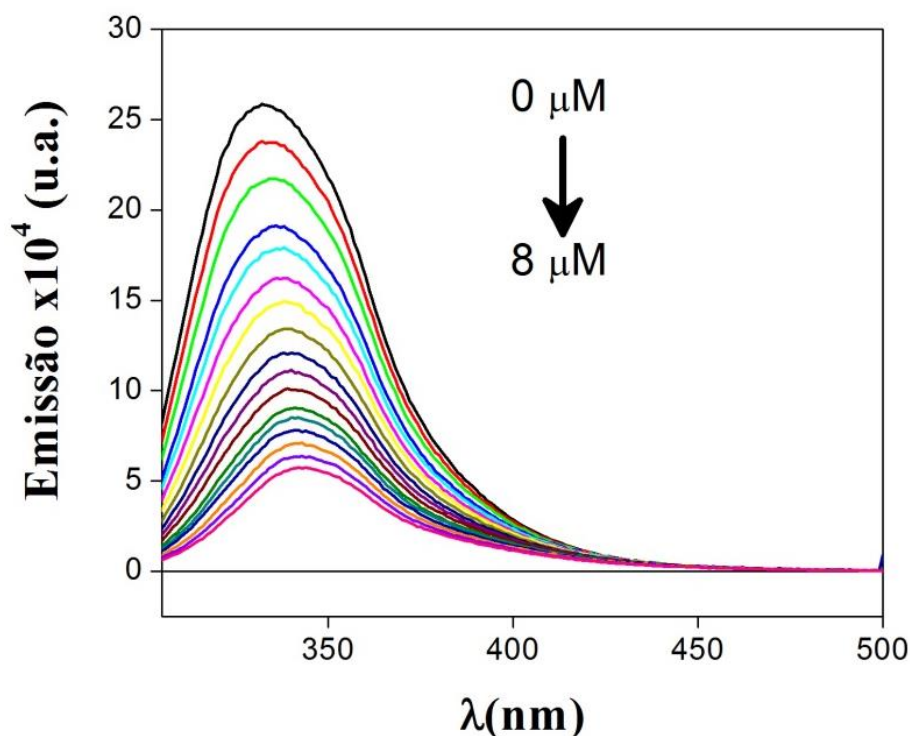
Com o domínio SH3c fusionado com a *tag* GST ficou ligado na resina, é necessário fazer a separação do domínio SH3c da *tag* GST e, para isto, foi utilizado a enzima Trombina (37 kDa), por ela reconhecer um sítio de clivagem encontrado na

GST. Pela **Figura 09b** o *flow through* e a eluição E1 foram mantidos no novo gel apenas para fazer a comparação com as novas eluições, as eluições E2 e E3 pelo fato de não possuírem nada foi apenas descartada. Na eluição contendo a trombina é possível observar o domínio SH3c indicado pela seta azul. Após a clivagem da *tag* GST, é então necessário uma purificação por exclusão molecular para separar a trombina (37 kDa) do domínio SH3c (8.36 kDa). As eluições E4 e E5 foram feitas para observar se todo o domínio foi desacoplado da *tag* GST. Pela purificação por exclusão molecular (**Figura 09d**) foi possível fazer a separação do domínio SH3c da trombina, pelo SDS-PAGE 20% (**Figura 09c**) é possível perceber que o domínio teve uma alta qualidade em sua purificação e possuiu um rendimento de aproximadamente 150 μ M, após isto o domínio foi concentrado e utilizado para fazer as medidas de espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de RMN.

5.2. FLUORESCÊNCIA EM ESTADO ESTACIONÁRIO SH3C/CUMARINA

Através do espectro de emissão de fluorescência do domínio SH3c (**Figura 10**) é possível perceber a supressão na intensidade do sinal conforme foi titulado a cumarina. Foi utilizado 3 μ M de SH3c e a concentração de cumarina variou de 0 à 8 μ M com titulações de 0,5 μ M. Através do espectro se observa que o pico de emissão máxima se desloca para o vermelho conforme a cumarina é titulada indicando que um ou mais resíduos de triptofano estão se tornando mais acessíveis ao solvente conforme aumenta a concentração de cumarina no meio [51].

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

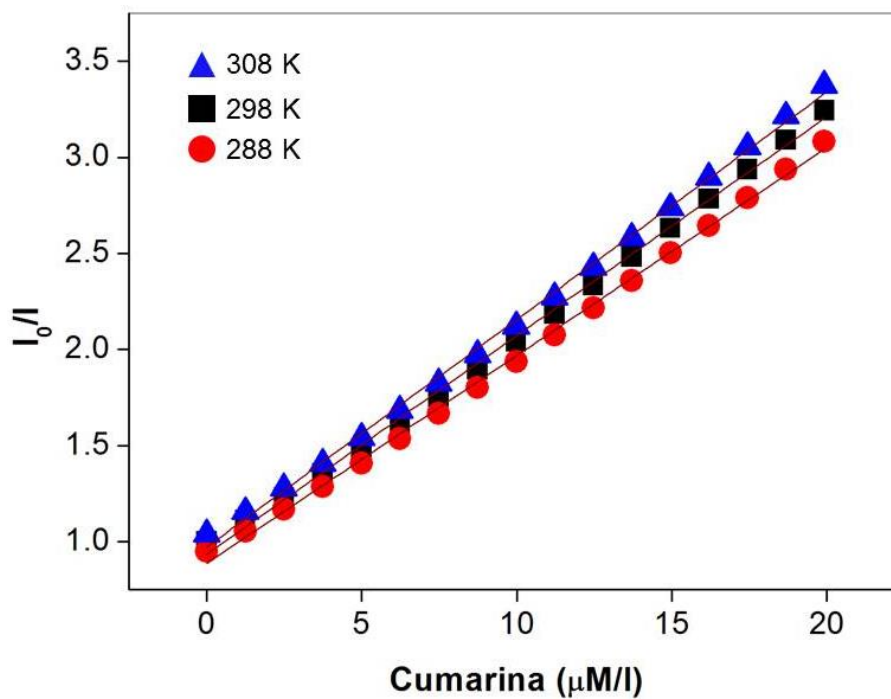


Fonte própria.

Nos experimentos realizados, a cumarina foi preparada em etanol absoluto, entretanto, o volume de etanol alcançado no sistema SH3c/Cumarina não ultrapassou 5%, sendo uma proporção de etanol incapaz de desnaturar o domínio, uma vez que valores acima de 10% podem causar alterações na conformação do domínio [52].

A **Figura 11** demonstra que os valores de supressão de fluorescência que foram obtidos estão de acordo com a equação de Stern-Volmer nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K, possuindo uma razão linear da intensidade de fluorescência do domínio SH3c tanto na ausência quanto na presença de Cumarina no meio (I_0/I).

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.



Fonte própria.

As constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) nas três temperaturas foram obtidas através do ajuste linear (**Tabela 03**), os valores encontrados são diretamente proporcionais ao aumento de temperatura, indicando uma ocorrência de supressão dinâmica.

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.

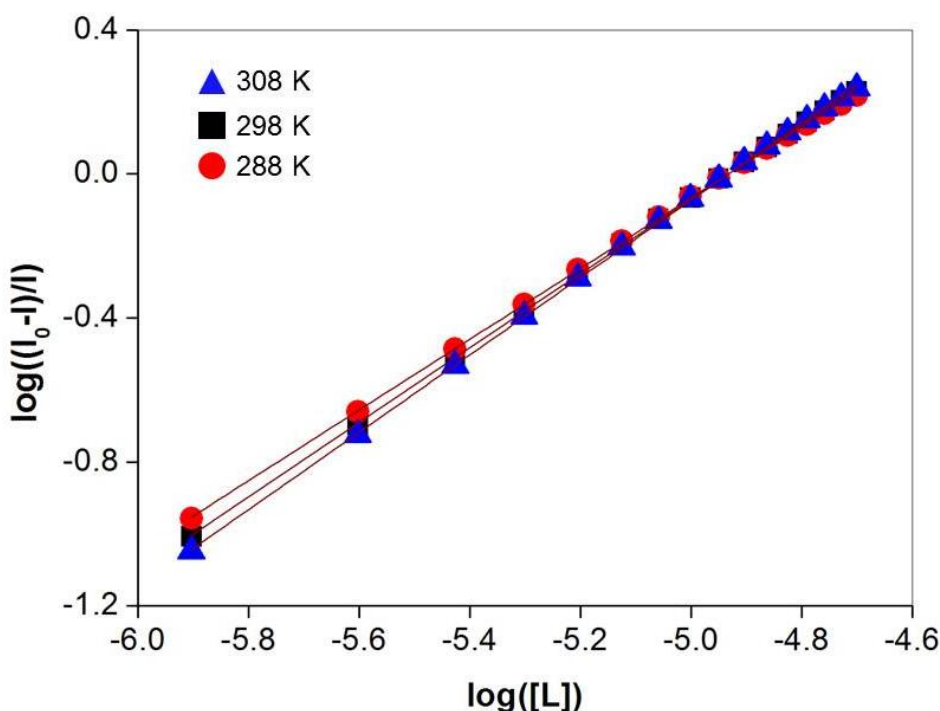
SH3c/Cumarina		
	T(K)	$K_{SV} (x10^5 M^{-1})$
pH 7.5	288	1.08 ± 0.01
	298	1.14 ± 0.01
	308	1.18 ± 0.01
R = 0.998 (coeficiente de correlação)		

O aumento de temperatura faz com que a viscosidade do meio onde ocorre a interação diminua, favorecendo então a interação da cumarina difundindo no

fluoróforo em seu estado excitado. Com isto, conforme há um aumento de temperatura há então um aumento nas colisões dos fluoróforos excitados do domínio SH3c com a cumarina, resultando em um aumento da constante de supressão K_{SV} [40].

Com os resultados obtidos a partir da supressão de fluorescência da SH3c com a cumarina, as constantes de ligação K_b e o número de sítios de ligação (n) por domínio podem ser previsto pela equação (12). Essa equação fornece uma relação entre a razão da diferença entre a fração de SH3c livre pela fração de Grb2-CSH3 ligada com a cumarina em função da concentração de cumarina. A **Figura 12** mostra o gráfico da SH3c e cumarina nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K ajustados pela equação (12).

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.



Fonte própria.

As constantes de associação (K_b) e os sítios de ligação (n) nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K foram obtidos através do ajuste linear, esses valores se encontram **Tabela 04**:

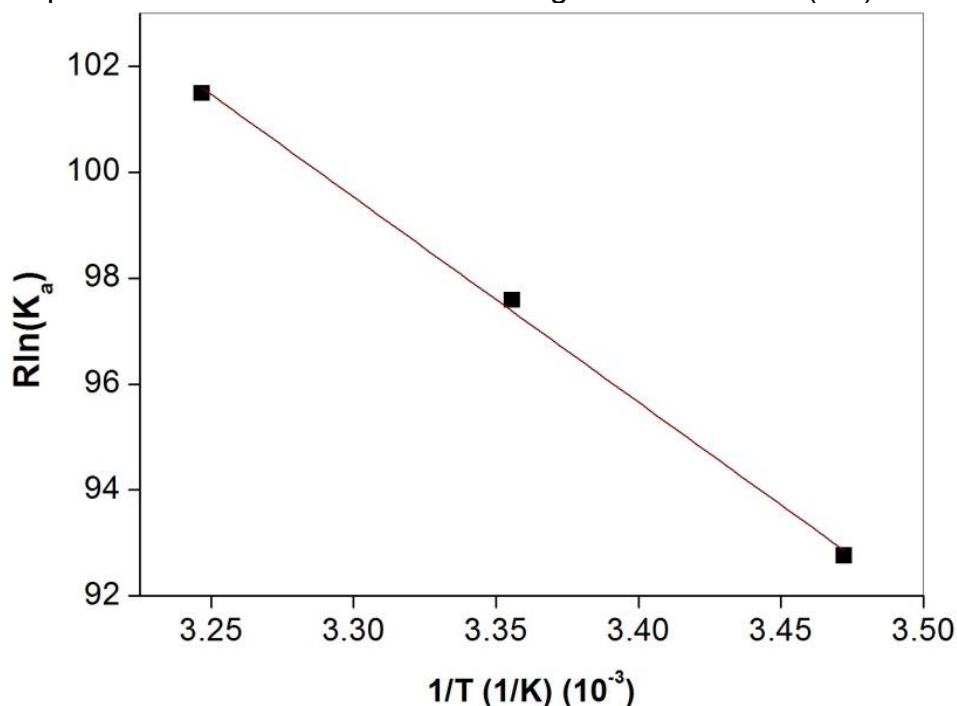
Tabela 04: Constante de associação K_b e sítios de ligação (n): Valores referentes ao complexo Grb2-CSH3/Cumarina nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K.

SH3c/Cumarina			
	T (K)	n	K_b ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)
pH 7.5	288	0.98 ± 0.01	0.70 ± 0.02
	298	1.03 ± 0.01	1.25 ± 0.02
	308	1.07 ± 0.01	2.00 ± 0.02
R=0.999 (coeficiente de correlação)			

É possível perceber através dos resultados encontrados (**Tabela 04**) que nas três temperaturas estudadas o sítio de ligação (n) é aproximadamente 1.0, enquanto que os valores da constante de associação sofreu um aumento conforme a temperatura foi aumentando. Esses resultados mostram que a temperatura favorece a formação do complexo SH3c/Cumarina.

Para verificar as contribuições energéticas da interação foi utilizada a equação (13). A **Figura 13** mostra o gráfico de van't Hoff para o sistema nas três temperaturas estudadas.

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).



Fonte própria.

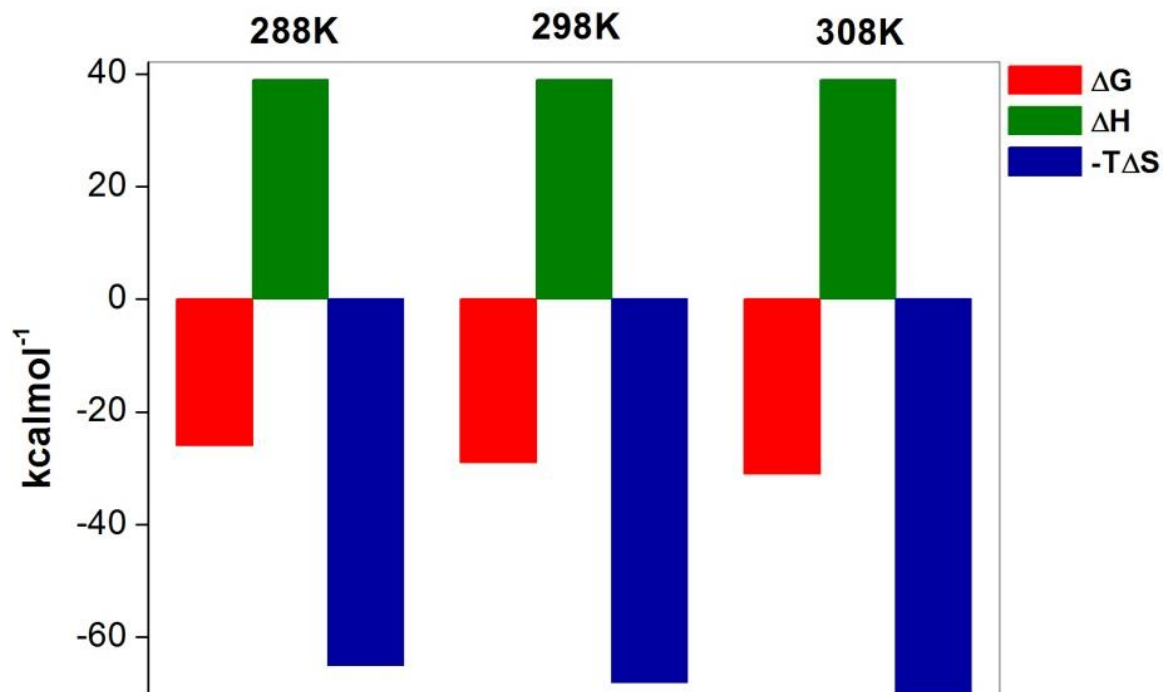
Na **Tabela 05** encontram os valores de ΔH , $-T\Delta S$ e ΔG determinados a partir da **Figura 13** e das equações (20) e (21).

Tabela 05: Parâmetros termodinâmicos referentes ao complexo SH3c/Cumarina nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K.

SH3c/Cumarina				
	T(K)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
pH 7.5	288	-26.0 ± 2.0		-65.0 ± 1.0
	298	-29.0 ± 2.0	39.0 ± 1.0	-68.0 ± 1.0
	308	-31.0 ± 2.0		-70.0 ± 1.0

Abaixo, é possível visualizar uma representação quantitativa do perfil termodinâmico do sistema:

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 ($T\Delta S$).



Fonte própria.

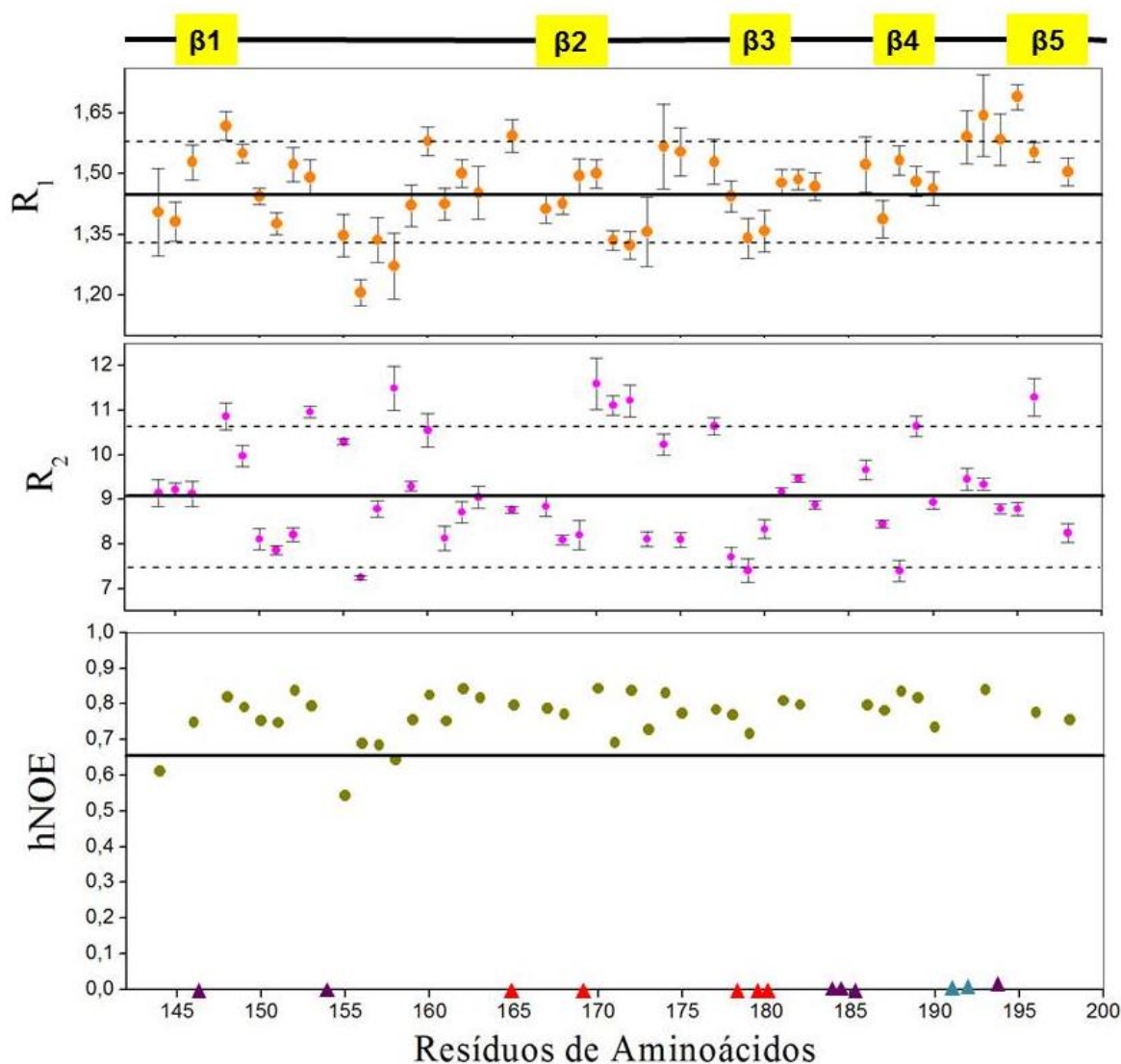
A variação entálpica do sistema nas três temperaturas continua a mesma de acordo com a **Tabela 03**, tem ainda que os valores de ΔH são positivos, caracterizando uma reação endotérmica na qual a ligação entre a cumarina e o domínio SH3c é desfavorecida quanto maior for esse valor [53]. A variação da energia livre de Gibbs é negativa, mostrando ser uma interação espontânea. A contribuição entrópica é negativa devido a equação (14). No complexo SH3c/Cumarina tanto a contribuição entálpica quanto a entrópica são positivas ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$), sendo assim a interação é entropicamente dirigida, dominada por efeitos hidrofóbicos [51]. O alto custo entrópico se deve as moléculas de água que são retiradas da camada de solvatação da proteína quando a cumarina se aproxima do sítio de ligação [51].

5.3. DINÂMICA ESTRUTURAL DO DOMÍNIO SH3C POR RMN

Através dos experimentos 2D ¹H, ¹⁵N-HSQC caracterizou-se a dinâmica de cada vetor ¹H-¹⁵N da cadeia principal do domínio SH3c. As taxas de relaxações R_1

($1/T_1$), R_2 ($1/T_2$) e hNOE (**Figura 15**) foram medidas utilizando amostra ^1H , ^{15}N -SH3c uniformemente marcada.

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 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.



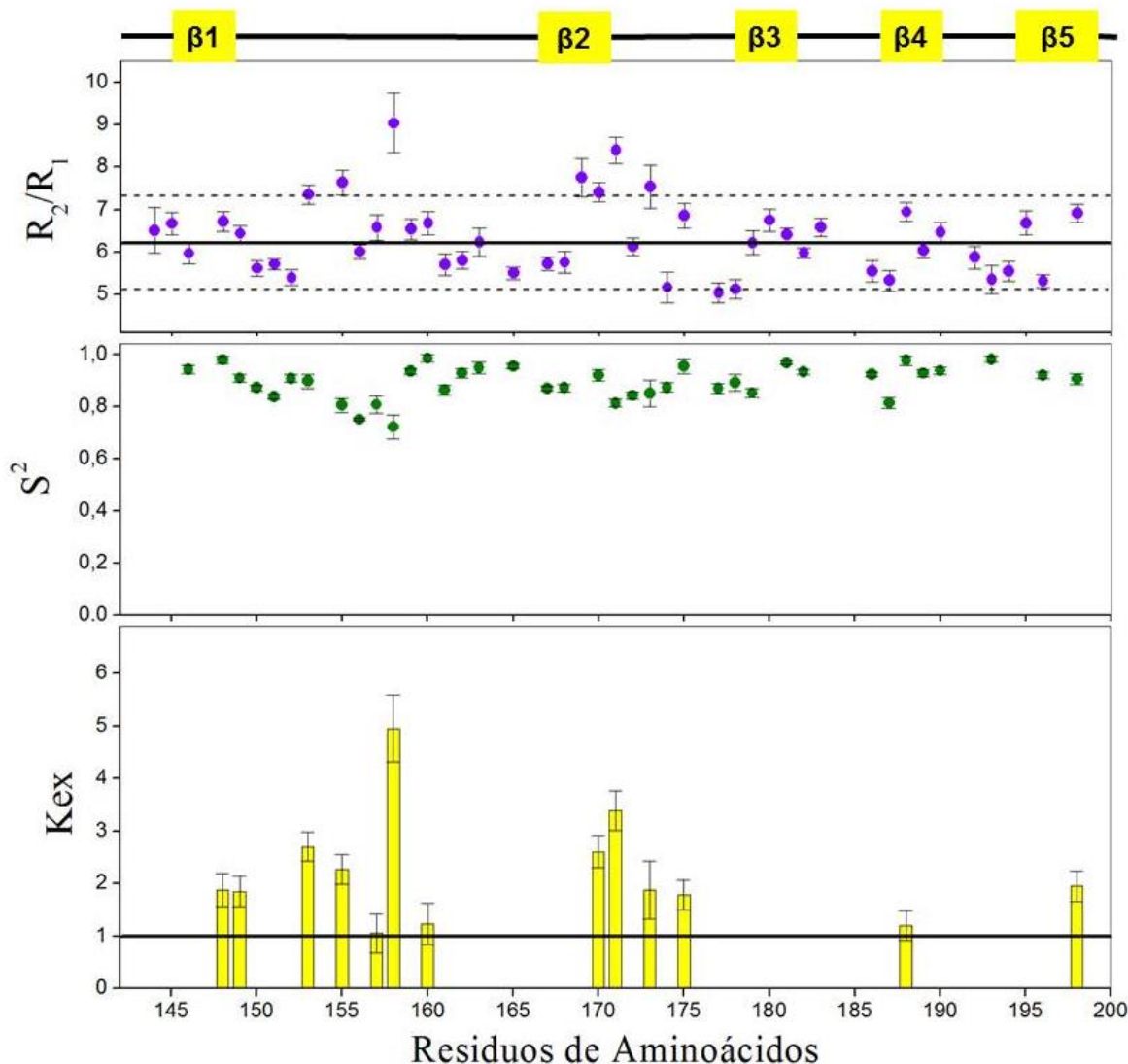
Fonte própria.

A taxa de relaxação R_1 média encontrada para o domínio SH3c foi de $1,45 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$. Pode se perceber que a região entre a $\beta 1$ e $\beta 2$ e também $\beta 4$ e $\beta 5$ que são a alça RT e a hélice 3_{10} encontram-se com R_1 fora da média encontrada para o

domínio SH3c, indicando que essa região está em dinâmica rápida da ordem de ps – ns. Já para a taxa de relaxação transversal (R_2) a média encontrada foi de $9,1 \pm 1,5 \text{ s}^{-1}$ podendo verificar que os resíduos E156 e G158 localizados entre a $\beta 1$ e $\beta 2$, os resíduos V170, M171 e D172 localizados entre a $\beta 2$ e $\beta 3$ e o resíduo V195 localizado no final da hélice 3_{10} encontram-se com taxa de relaxação com relaxação acima da média calculada para o domínio, indicando que esses encontram-se em troca conformacional lenta na ordem de μs – ms. O hNOE próximo ou menor que 0,65 é tipicamente encontrada para resíduos com uma maior flexibilidade. Os resíduos que estão marcados com o triângulo vermelho foram resíduos que possuíram um hNOE $> 0,88$, os triângulos roxos são referentes a resíduos que não foram possíveis identificar por não possuírem nitrogênio na cadeia lateral, os triângulos azuis são referentes a resíduos não sinalizados.

Através da razão R_2/R_1 foi possível obter quais resíduos estavam em troca conformacional (**Figura 16**).

Figura 16: Parâmetros de relaxação do vetor $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ da cadeia principal do domínio SH3c. As taxas de relaxação R_1 e R_2 juntamente com o 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.

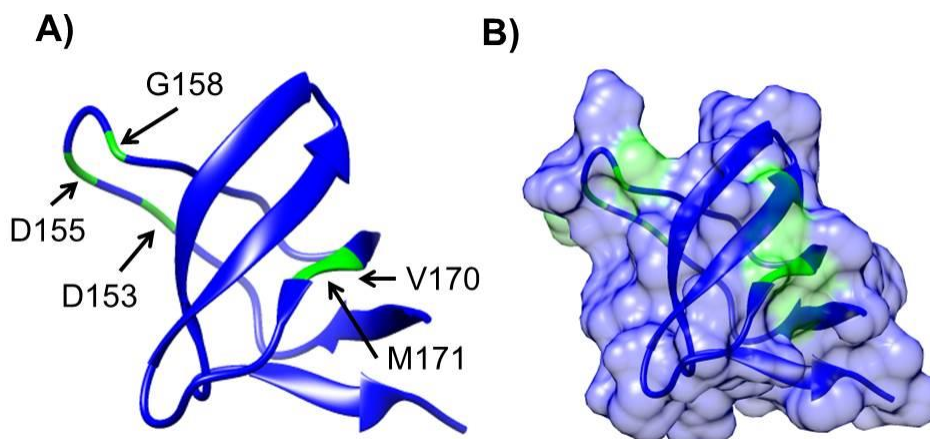


Fonte própria.

A média da razão R_2/R_1 foi de $6,2 \pm 1,1$ mostrando que os resíduos D153, K155, G158, V170 e M171 estão em troca conformacional lenta da ordem de μs – ns, podendo ser verificados juntamente com o gráfico de K_{ex} , onde os resíduos que possuem valores acima de 1 Hz estão em troca conformacional. No gráfico de S^2 , os resíduos que possuem valores baixos tem movimentos reorientais de maior

amplitude, enquanto valores altos indicam um grau mais elevado de restrição, esse parâmetro reflete sensivelmente a dinâmica reorientacional em escalas de tempo de ps – ns. Esses resíduos podem ser visualizados na estrutura do domínio SH3c (**Figura 17a e 17b**), evidenciando um sítio superficial em troca conformacional.

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



Fonte própria.

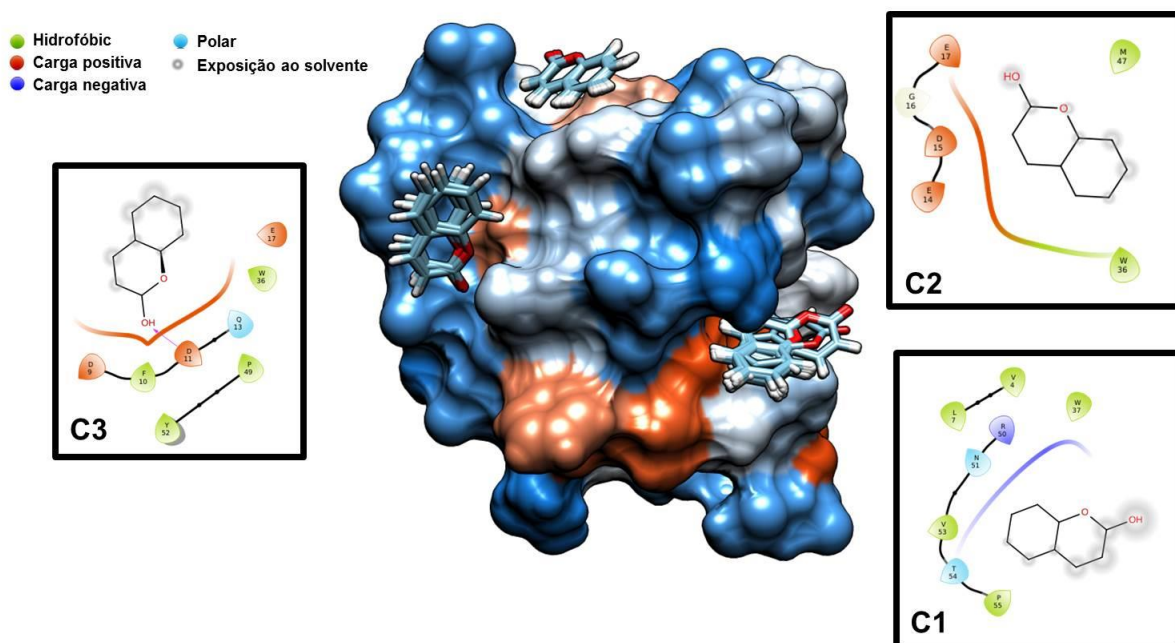
A mobilidade encontrada nesses sítios pode estar relacionada a funções específicas deste domínio em interações proteína-proteína dentro da célula [54].

5.4. DOCKING MOLECULAR DO COMPLEXO SH3C/CUMARINA

Este trabalho de *docking molecular*, feito em colaboração com o aluno de Pós-Graduação em Biofísica Molecular Raphael Vinícius Rodrigues Dias e orientado pelo Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE), tem o intuito de obter informações sobre qual região está ocorrendo a interação SH3c/Cumarina. Este estudo é interessante, pois a interação de pequenas moléculas à macromoléculas tem sido alvo de estudos no desenvolvimento de fármacos [53].

As simulações computacionais realizadas corroboraram com os resultados de espectroscopia de fluorescência indicando a interação entre o domínio SH3c e cumarina (**Figura 18**), foram encontradas três possíveis regiões onde a cumarina pode estar se ligando ao domínio SH3c.

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.



Fonte própria.

O cluster C1 indica que os resíduos V146, W179, R192, N193, V195, T196 e P197 estão colaborando com a interação entre o domínio SH3c e cumarina. No cluster C3 está indicado que os resíduos F152, D153, D155, W178 e Y194 estão colaborando com a interação além de que o resíduo D153 formou uma interação de hidrogênio com a hidroxila da cumarina. Os resíduos D153 e D155 foram dois resíduos que se observou pela RMN que estão em trocas conformacionais. O cluster C2 indica que os resíduos E156, D157, G158, E159, W178 e M189 estão participando da interação entre o domínio Sh3c e a cumarina enquanto que o resíduo G158 também foi um resíduo que mostrou estar em troca conformacional segundo a RMN.

Os resultados de fluorescência indicaram que ocorre uma interação entre o domínio SH3c e a cumarina, os resultados de ressonância magnética nuclear foram essenciais para compreender sobre a dinâmica estrutural do domínio enquanto que

o *docking molecular* corroborou com os resultados anteriormente obtidos fornecendo também três possíveis sítios de interação.

6 – CONCLUSÕES

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.

ANEXOS

ANEXO A – MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Meio de Cultura Lúria-Bertani (LB) líquido	
LB Broth (Lennox)[®] <i>Sigma-Aldrich</i>	20 g
H₂O destilada	1000 ml
pH	7.5
Autoclavar por 20 min em 120°C	

Meio mínimo M9 – 200 ml	
H₂O Milli-Q[®]	50 ml
CaCl₂ (1 M)	20 µl
TS2 (0.2 V%)	400 µl
Fe III (10 mM)	200 µl
Ampicilina (50 mg/ml)	200 µl
Coquetel de Vitaminas	200 µl
B2	200 µl
B1	200 µl
MgSO₄ (1 M)	400 µl
Glicose (20%)	5 ml
NH₄Cl	0.2 g
M9 (5x)	40 ml
Completar até 200 ml com H₂O Milli-Q[®]	

Meio mínimo M9 – 1000 ml

H₂O Milli-Q®	200 ml
CaCl₂ (1 M)	100 µl
TS2 (0.2 V%)	2 ml
Fe III (10 mM)	1 ml
Ampicilina (50 mg/ml)	1 ml
Coquetel de Vitaminas	1 ml
B2	1 ml
B1	1 ml
MgSO₄ (1 M)	2 ml
Glicose (20%)	50 ml
NH₄Cl*	1 g
¹⁵NH₄Cl**	1 g
M9 (5x)	200 ml
Completar até 1000 ml com H₂O Milli-Q®	

**Foi utilizado nos experimentos de fluorescência*

***Foi utilizado nos experimentos de ressonância magnética nuclear*

ANEXO B – TAMPÕES UTILIZADOS

Tampão de Lise Celular – 30 ml	
Tris-HCl (50 mM)	3 ml
CaCl ₂ (1 mM)	600 µl
MgSO ₄ (1 mM)	30 µl
2-Mercaptoetanol (1mM)	2.1 µl
Tween 20	2%
pH	8.0
Completar com NaCl (1 M) até 30 ml	

Tampão de Equilíbrio (Afinidade) – 350 ml	
Tris-HCl (20 mM)	14 ml
NaCl (150 mM)	52.5 ml
2-Mercaptoetanol (1mM)	24.5 µl
pH	8.0

Tampão de Exclusão Molecular* – 400 ml	
Fosfato de Sódio (25 mM)	Na ₂ HPO ₄ – 5.44 g/l
	NaH ₂ PO ₄ – 0.56 g/l
NaCl (140 mM)	56 ml
1,4-Ditiotreitol (1mM)	24.5 µl
Ph	7.5

**Tampão utilizado tanto nos experimentos de fluorescência quanto nos experimentos de ressonância magnética nuclear.*

ANEXO C – EXPRESSÃO DO DOMÍNIO SH3 C-TERMINAL EM *E.COLI* BL21(DE3)

- 1)** Colocar 1 ml de pré-inóculo de SH3c em 50 ml de meio de cultura LB acrescido de 50 µl de Ampicilina (50 mg/ml);
- 2)** Manter à 37°C em 100 rpm por 14 h (tempo necessário para atingir uma DO = 0.9);
- 3)** Após o tempo decorrido, colocar 20 ml do meio de cultura LB agora com bactérias em 200 ml de meio mínimo (quantidade suficiente para iniciar com uma DO = 0.2);
- 4)** Manter à 37°C em 100 rpm por 3 h (tempo necessário para atingir uma DO = 0.9);
- 5)** Centrifugar o meio mínimo em 5000xg por 20 min à 20°C;
- 6)** Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 1000 ml de meio mínimo;
- 7)** Manter à 37°C em 100 rpm por 3 h (tempo necessário para atingir uma DO = 0.9);
- 8)** Induzir com 0.4 mM de IPTG à 20°C em 100 rpm por 20 h.
- 9)** Após o tempo decorrido centrifugar o meio mínimo agora com bactérias em 4000xg por 90 min à 4°C;
- 10)** Descartar o sobrenadante e armazenar o *pellet* em -80°C;

ANEXO D – PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO SH3 C-TERMINAL

- 1) Coletar o *pellet* armazenado em -80°C e deixar em repouso contendo 15 ml de tampão de lise sob o gelo;
- 2) Após o descongelamento do *pellet*, sonicar em 10 ciclos (2 segundos *ON* e 1 segundo *OFF*);
- 3) Centrifugar a amostra em 17000 rpm por 1h30min à 4°C
- 4) Filtrar o sobrenadante em um filtro com resolução de 0.45 µm;
- 5) Injetar o sobrenadante filtrado na coluna GSTrap 4B[®] previamente equilibrada com tampão de lise;
- 6) Ressuspender a resina da coluna e em um frasco de Erlenmeyer armazenar por 2h em 70 rpm à 20°C;
- 7) Após o tempo decorrido voltar a resina para a coluna e eluir com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio;
- 8) Acrescentar 10 ml de tampão de equilíbrio contendo 100 unidades de trombina;
- 9) Ressuspender a resina da coluna e em um frasco de Erlenmeyer armazenar por 17h em 70 rpm;
- 10) Após o tempo decorrido voltar a resina para a coluna e eluir com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio;
- 11) Concentrar a amostra para 500 µl para ser utilizada na coluna de purificação por exclusão molecular;