

RENAN PEREIRA PEDRO

**ABORDAGEM DUAL NA INVESTIGAÇÃO DA
PROTEÍNA GRB2:
EXPLORAÇÃO DA INTERAÇÃO ESPECÍFICA E
ANÁLISE DINÂMICA DO ENOVELAMENTO**

São José do Rio Preto

2024

RENAN PEREIRA PEDRO

**ABORDAGEM DUAL NA INVESTIGAÇÃO DA PROTEÍNA GRB2:
EXPLORAÇÃO DA INTERAÇÃO ESPECÍFICA E ANÁLISE DINÂMICA
DO ENOVELAMENTO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq - Processo: 140306/2020-0

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso

Coorientador: Dr. Raphael Vinícius Rodrigues Dias

São José do Rio Preto

2024

P372a Pedro, Renan Pereira.

Abordagem dual na investigação da proteína GRB2: exploração da interação específica e análise dinâmica do enovelamento / Renan Pereira Pedro. -- São José do Rio Preto, 2024

173 f. : il., tabs., fotos

Orientador: Fernando Alves de Melo

Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso

Coorientador: Raphael Vinicius Rodrigues Dias

Tese (doutorado – Biofísica Molecular) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Growth factor Receptor-Bound protein 2 (GRB2). 2. Src Homology 2 (SH2). 3. Meiotic Recombination 11 (MRE11). 4. Histone H2AX. 5. Nuclear Magnetic Resonance (NMR). I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

RENAN PEREIRA PEDRO

**ABORDAGEM DUAL NA INVESTIGAÇÃO DA PROTEÍNA GRB2:
EXPLORAÇÃO DA INTERAÇÃO ESPECÍFICA E ANÁLISE DINÂMICA DO
ENOVELAMENTO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq - Processo: 140306/2020-0

Comissão Examinadora:

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

Prof. Dr João Ruggiero Neto
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Adolfo Henrique de Moraes Silva
Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte

Prof. Dr. Luis Felipe Santos Mendes
Universidade de São Paulo - São Carlos

Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas
Universidade de São Paulo - São Paulo

São José do Rio Preto

03 de abril de 2024

*Este trabalho é dedicado a Ivanilda e Benedito, meus pais, cujo apoio constante
sempre impulsionou meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, pois reconheço que toda a trajetória é permeada por Sua orientação.

Agradeço profundamente à minha família, em especial à minha mãe, Ivanilda, ao meu pai, Benedito, e ao meu irmão, Andrey, pelo apoio incondicional ao longo de toda a minha jornada. Sem o suporte de vocês, não teria alcançado este ponto crucial em minha vida acadêmica. Seu papel foi e continua sendo fundamental para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Estendo meus agradecimentos aos meus tios e avós, cuja ajuda e compreensão foram inestimáveis até aqui. Manifesto também minha gratidão à minha namorada, Isabela, por sua constante presença, apoio, compreensão e paciência ao longo desses anos.

Ao meu orientador, Fernando, que tem sido um mentor desde os dias de graduação até o presente momento, expresso minha sincera gratidão. Sua orientação, respeito e paciência têm sido essenciais para o meu crescimento como profissional. Agradeço ao meu co-orientador, Ícaro, por sua disponibilidade em auxiliar e orientar, contribuindo significativamente para a minha formação.

Expresso minha gratidão a todos os professores que, de diversas formas, contribuíram para minha formação acadêmica, em especial à professora Fátima, cuja abordagem diferenciada permitiu-me enxergar os desafios do cotidiano científico sob uma nova perspectiva.

Ao Laboratório de Biofísica Molecular, onde adquiri as habilidades necessárias para a pesquisa, especialmente à Larissa, por suas contribuições científicas, momentos de descontração e discussões acadêmicas.

Aos colegas do departamento de Física - Barbosa, Fernando, Isabela, Ingrid, João, Juliana, Karol, Larissa, Murilo, Raphael, Thainá e Thalita - expresso minha gratidão. Além de tornarem a jornada mais leve com sua amizade e bom humor, contribuíram significativamente para o meu crescimento acadêmico.

Manifesto meu apreço à UNESP e ao IBILCE pela oportunidade de estudar em uma das melhores universidades do Brasil e do mundo, proporcionando-me oportunidades que jamais imaginei.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 140306/2020-0.

“But still, like air, I’ll rise.”

Maya Angelou em *And Still I Rise* (1).

RESUMO

As células estão sujeitas a processos de regulação associados à sobrevivência, crescimento, diferenciação e apoptose. Durante o ciclo de proliferação celular, eventuais falhas podem resultar em um crescimento celular descontrolado, levando ao desenvolvimento de tumores. A via de sinalização MAPK é uma das vias impactadas por essas alterações, com a proteína adaptadora GRB2 desempenhando um papel significativo nesse contexto. A GRB2 é composta por três domínios, sendo um domínio SH2 flanqueado por dois domínios SH3 (N- e C-terminal). Embora as funções citoplasmáticas da GRB2 sejam bem conhecidas, uma nova função foi recentemente observada em vias de reparo de DNA. O reparo de quebras na fita dupla do DNA é iniciado pela proteína MRE11, direcionando a recombinação por homologia. Nesse processo, a proteína GRB2 atua como intermediária na interação entre o DNA e a MRE11, utilizando seu domínio SH2, ou seja, a proteína GRB2, através de seu domínio SH2, reconhece a proteína MRE11 e a conduz para a região do DNA danificado e assim, então, iniciar a via de reparo. No entanto, até o momento, não houve investigações moleculares abordando essa interação. Com o objetivo de compreender a interação entre o domínio SH2 e o peptídeo MRE11, assim como possíveis interações com outras proteínas parceiras, foram conduzidos experimentos de ^{15}N -HSQC-NMR. Durante a titulação entre o domínio SH2 e o peptídeo MRE11-pY, foram observadas consideráveis mudanças nos CSP dos resíduos de aminoácidos, especialmente no sítio de interação I, apresentando uma conformação inédita na literatura. Apesar de desafios de solubilidade, as análises de interação entre GRB2-SH2 e MRE11-22 indicaram uma interação significativa, conforme evidenciado por um CSP global. Experimentos de dinâmica molecular revelaram uma similaridade na forma de interação entre os peptídeos MRE11-pY e o MRE11-22. Tentativas de interação com um peptídeo curto não fosforilado, MRE11-07, não obtiveram sucesso. Experimentos adicionais com um peptídeo hipotético, MRE11-7Y, corroboraram os resultados obtidos para os peptídeos derivados de MRE11. Por fim, nas titulações entre GRB2-SH2 e peptídeos derivados da histona H2AX (H2AX-pSpY e H2AX-pS), não foram observadas perturbações químicas, indicando ausência de interação. No entanto, o peptídeo H2AX-pY demonstrou interação, sugerindo que a presença de uma fosfotirosina é crucial para a interação, enquanto a adição de uma fosfoserina impede tal interação. Esses resultados sugerem novas perspectivas para as funções da GRB2 em vias biológicas.

Palavra-chave: GRB2, SH2, MRE11, H2AX, RMN.

ABSTRACT

Cells are subject to regulatory processes associated with survival, growth, differentiation, and apoptosis. During the cell proliferation cycle, potential failures can result in uncontrolled cell growth, leading to tumor development. The MAPK signaling pathway is one of the pathways impacted by these alterations, with the adaptor protein GRB2 playing a significant role in this context. GRB2 is composed of three domains, with an SH2 domain flanked by two SH3 domains (N- and C-terminal). Although the cytoplasmic functions of GRB2 are well-known, a new function has recently been observed in DNA repair pathways. Repair of double-strand DNA breaks is initiated by the protein MRE11, directing homology recombination. In this process, the GRB2 protein acts as an intermediary in the interaction between DNA and MRE11, utilizing its SH2 domain. Specifically, the GRB2 protein, through its SH2 domain, recognizes the MRE11 protein and guides it to the region of damaged DNA to initiate the repair pathway. However, to date, there have been no molecular investigations addressing this interaction. To understand the interaction between the SH2 domain and the MRE11 peptide, as well as possible interactions with other partner proteins, ¹⁵N-HSQC-NMR experiments were conducted. During the titration between the SH2 domain and the MRE11-pY peptide, considerable changes in chemical shift perturbations of amino acid residues were observed, especially at interaction site I, presenting a novel conformation in the literature. Despite solubility challenges, interaction analyses between GRB2-SH2 and MRE11-22 indicated significant interaction, as evidenced by a global CSP. Molecular dynamics experiments revealed similarity in the interaction mode between MRE11-pY peptides and MRE11-22. Attempts to interact with a short unphosphorylated peptide, MRE11-07, were unsuccessful. Additional experiments with a hypothetical peptide, MRE11-7Y, corroborated the results obtained for peptides derived from MRE11. Lastly, in titrations between GRB2-SH2 and peptides derived from histone H2AX (H2AX-pSpY and H2AX-pS), no chemical shift perturbations were observed, indicating no interaction. However, the H2AX-pY peptide demonstrated interaction, suggesting that the presence of a phosphotyrosine is crucial for the interaction, while the addition of a phosphoserine impedes such interaction. These results suggest new perspectives for the functions of GRB2 in biological pathways.

Keywords: *GRB2, SH2, MRE11, H2AX, RMN.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1:	Estrutura de um Receptor Tirosina-Quinase.	23
Figura 1.1.2:	Representação em <i>cartoon</i> da proteína GRB2 em sua configuração monomérica.	24
Figura 1.1.3:	Vias de Sinalização Mediadas pela Proteína GRB2.	27
Figura 1.1.4:	Modelo do Recrutamento do Complexo MRN em Quebras de Fita Dupla (DSBs).	30
Figura 1.1.5:	Configuração tridimensional do domínio SH2 da proteína GRB2.	32
Figura 1.1.6:	Domínio SH2 das Proteínas LNK e GRB2.	33
Figura 1.2.1:	Momento Magnético Nuclear.	37
Figura 1.2.2:	Representação dos Estados de <i>Spin</i> Nuclear.	38
Figura 1.2.3:	Precessão de Larmor.	39
Figura 1.2.4:	Vetor de Magnetização Bulk.	41
Figura 1.2.5:	Acoplamento de <i>Spin</i> Nuclear em um Grupo ^{13}C -H.	43
Figura 1.2.6:	Representação Vetorial da Variação da Magnetização ao Longo de um Experimento de HSQC.	47
Figura 1.2.7:	Dependência do Pico de RMN Bidimensional com a Taxa de Troca.	53
Figura 1.2.8:	Algoritmos de pesquisa e métricas de pontuação empregados em <i>docking</i> molecular.	56
Figura 1.2.9:	Os elementos de um campo de força, que denotam interações vinculadas e não vinculadas.	63
Figura 1.4.1:	Diagrama do vetor pET-28a(+).	71
Figura 1.5.1:	Purificação do domínio GRB2-SH2.	80
Figura 1.5.2:	Análise dos principais CSP na interação entre GRB2-SH2 e MRE11-pY.	82
Figura 1.5.3:	Titulação de MRE11-pY no domínio GRB2-SH2 monitorado por experimento de HSQC.	84
Figura 1.5.4:	RMSD da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-pY.	85

Figura 1.5.5:	Representação em <i>cartoon</i> do complexo GRB2-SH2 ligado ao fosfopeptídeo MRE11-pY, acompanhado de uma visualização esquemática da interação através do LigPlot.	87
Figura 1.5.6:	Análise dos CSP mais proeminentes na interação entre GRB2-SH2 e MRE11-22.	89
Figura 1.5.7:	Titulação de MRE11-22 no domínio GRB2-SH2 monitorado por experimento de HSQC.	91
Figura 1.5.8:	Análise da dinâmica molecular entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-22.	92
Figura 1.5.9:	Representação em <i>cartoon</i> do domínio GRB2-SH2 complexado com o peptídeo MRE11-22.	93
Figura 1.5.10:	Titulação de MRE11-07 no domínio GRB2-SH2 monitorado por experimento de HSQC.	95
Figura 1.5.11:	Representação em <i>cartoon</i> da interação dos fosfopeptídeos derivado de EGFR e de MRE11.	97
Figura 1.5.12:	Representação em <i>cartoon</i> da interação dos peptídeos derivados de MRE11.	99
Figura 1.5.13:	Titulação dos fosfopeptídeos derivados de H2AX no domínio GRB2-SH2 monitorada por meio do experimento de HSQC.	101
Figura 1.5.14:	Análise dos principais CSP na interação entre GRB2-SH2 e H2AX-pY.	103
Figura 1.5.15:	Titulação de MRE11-pY no domínio GRB2-SH2 monitorado por experimento de HSQC.	105
Figura 1.5.16:	Análise da dinâmica molecular entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo H2AX-pY.	106
Figura 1.5.17:	Representação em <i>cartoon</i> do complexo GRB2-SH2 ligado ao fosfopeptídeo H2AX-pY, acompanhado de uma representação esquemática da interação através do LigPlot.	108
Figura 1.5.18:	Representação em <i>cartoon</i> da interação dos fosfopeptídeos derivado de EGFR e de H2AX.	109
Figura 2.5.1:	Processo de Purificação da Proteína GRB2.	123
Figura 2.5.2:	Análise do espectro de emissão de fluorescência da proteína GRB2 em variações de temperatura.	124
Figura 2.5.3:	Determinação do Centro de Massa Espectral (CM).	125

Figura 2.5.4:	Termograma da Proteína GRB2 obtido por meio de Calorimetria Diferencial de Varredura.	126
Figura 2.5.5:	Análises Termodinâmicas dos Perfis da Proteína GRB2 e do Domínio GRB2-SH2 Conduzidas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).	127
Figura 2.5.6:	Correlação Estrutural entre o Funil de Energia e os Mapas de Contato é Destacada, Evidenciando os Conjuntos Correspondentes a cada Mapa.	129
Figura SIV.1:	Resíduos com <i>chemical shift</i> mais proeminentes da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-pY.	147
Figura SV.1:	Resíduos com <i>chemical shift</i> mais proeminentes da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-22.	154
Figura SVI.1:	Resíduos com <i>chemical shift</i> mais proeminentes da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo H2AX-pY.	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.1:	Exemplos de Proteínas Receptoras:	21
Tabela 1.1.2:	Exemplos de proteínas sinalizadoras e receptores tirosina-quinases (RTKs).	22
Tabela 1.2.1:	Características dos Isótopos mais Empregados em Ressonância Magnética Nuclear.	36
Tabela 1.2.2:	Estatísticas do <i>Protein Data Bank</i> .	61
Tabela 1.4.1:	Peptídeos Utilizados no Estudo.	75
Tabela 1.4.2:	Relação dos experimentos de HSQC das titulações dos peptídeos.	76
Tabela 1.5.1:	Propriedades físico-químicas teóricas.	79
Tabela 1.5.2:	Resíduos que apresentaram CSP maiores que a média e maiores que a média mais desvio padrão.	83
Tabela 1.5.3:	Resíduos que apresentaram CSP maiores que a média e maiores que a média mais desvio padrão.	90
Tabela 1.5.4:	Resíduos mais proeminentes na interação GRB2-SH2/MRE11-pY e GRB2-SH2/MRE11-22.	94
Tabela 1.5.5:	Resíduos que demonstraram CSP superiores à média e que excederam a média acrescida do desvio padrão.	104
Tabela 2.5.1:	Características Teóricas de Natureza Físico-Química da Proteína GRB2.	122
Tabela AI.1:	Solução RF1.	142
Tabela AI.2:	Solução RF2.	142
Tabela AI.3:	Meio SOB.	142
Tabela AVII.1:	Pré-meio mínimo de 200 ml.	168
Tabela AVII.2:	Pré-meio mínimo de 1000 ml.	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
BER	Reparo por Excisão de Bases
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance data Bank</i>
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i>
CSP	Perturbação do Deslocamento Químico
DDR	Resposta a Danos no DNA
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSB	Quebras da dupla-hélice de DNA
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FGFR2	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i>
FGFs	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
GDP	Guanosina difosfato
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound protein 2</i>
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HDR	Recombinação dirigido por Homologia
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MMR	Reparo de Mau-pareamento
MRE11	<i>Meiotic Recombination 11 homolog</i>
MRN	Complexo formado pelas proteínas MRE11, RAD50 e NBS1
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NHEJ	União de Extremidades não Homólogas
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases

PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RAS	<i>Rat sarcoma virus</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
RTKs	Receptores Tirosinas-Quinases
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SH3	<i>Src Homology 3</i>
SHP2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. CAPÍTULO 1.....	18
2.1. INTRODUÇÃO.....	19
2.1.1. SINALIZAÇÃO CELULAR.....	19
2.1.2. A PROTEÍNA GRB2 E VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	24
2.1.3. A PROTEÍNA GRB2, A PROTEÍNA MRE11 E A VIA DE REPARO DE DNA. 28	
2.1.4. O DOMÍNIO SH2 DA PROTEÍNA GRB2.....	31
2.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	36
2.2.1. FUNDAMENTOS BÁSICOS DE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	36
2.2.1.1. Acoplamento J.....	41
2.2.1.2. ¹⁵ N, ¹ H-HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).....	45
2.2.1.3. Perturbação do Deslocamento Químico.....	48
2.2.2. DOCKING MOLECULAR.....	55
2.2.3. DINÂMICA MOLECULAR.....	60
2.2.3.1. Princípios da Dinâmica Molecular.....	62
2.2.3.2. Condições Periódicas de Contorno.....	64
2.2.3.3. Termostato e Modelos de Solventes.....	65
2.2.3.4. Minimização de Energia em Simulações de Dinâmica Molecular.....	65
2.2.3.5. Análises RMSD e RMSF.....	67
2.3. OBJETIVOS.....	70
2.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	70
2.4. METODOLOGIA.....	71
2.4.1. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO.....	71
2.4.2. TRANSFORMAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE EM CÉLULAS DE ESCHERICHIA COLI LINHAGEM DH5α.....	72
2.4.3. TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE ESCHERICHIA COLI LINHAGEM BL21 (DE3).....	73
2.4.4. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO ¹⁵ N-GRB2-SH2.....	73
2.4.5. PEPTÍDEOS DERIVADOS DE MRE11 E H2AX.....	74
2.4.6. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS.....	75
2.4.7. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	75
2.4.8. DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR.....	77
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	79
2.5.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO DOMÍNIO GRB2-SH2 E DOS PEPTÍDEOS.....	79
2.5.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO ¹⁵ N-GRB2-SH2.....	79
2.5.3. INTERAÇÃO ENTRE MRE11-pY E GRB2-SH2.....	81
2.5.4. INTERAÇÃO ENTRE MRE11-22 E GRB2-SH2.....	88

2.5.5. INTERAÇÃO ENTRE MRE11-07 E GRB2-SH2.....	94
2.5.6. MODO DE INTERAÇÃO ENTRE OS PEPTÍDEOS DERIVADOS DE MRE11 E O DOMÍNIO GRB2-SH2.....	96
2.5.7. INTERAÇÕES ENTRE H2AX-pSpY E GRB2-SH2 E ENTRE H2AX-pS E GRB2-SH2.....	100
2.5.8. INTERAÇÃO ENTRE H2AX-pY E GRB2-SH2.....	102
2.6. CONCLUSÕES.....	110
2.7. PERSPECTIVAS.....	113
3. CAPÍTULO 2.....	114
3.1. PREÂMBULO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	115
3.2. INTRODUÇÃO.....	116
3.3. OBJETIVOS.....	119
3.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	119
3.4. METODOLOGIA.....	120
3.4.1. PREPARO DE PROTEÍNA.....	120
3.4.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	120
3.4.3. ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA...	121
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	122
3.5.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA PROTEÍNA GRB2.....	122
3.5.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GRB2.....	122
3.5.3. PERFIL DE DESENOVELAMENTO DA PROTEÍNA GRB2 VIA FLUORESCÊNCIA. 123	
3.5.4. PERFIL DE DESENOVELAMENTO DA PROTEÍNA GRB2 VIA CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL.....	126
3.6. CONCLUSÕES.....	130
3.7. PERSPECTIVAS.....	131
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
REFERÊNCIAS.....	133
ANEXO A.....	143
ANEXO B.....	145
ANEXO C.....	146
ANEXO D.....	148
ANEXO E.....	155
ANEXO F.....	165
ANEXO G.....	169
ANEXO H.....	171

1. INTRODUÇÃO

A proteína *Growth Factor Receptor-Bound 2* (GRB2) é um componente chave nas vias de sinalização intracelular, desempenhando um papel crucial na transmissão de sinais extracelulares para o interior da célula. Sua importância é evidenciada pela sua conservação evolutiva em organismos, destacando sua função fundamental em processos fisiológicos essenciais.

A estrutura da GRB2 compreende diversos domínios funcionais, incluindo um domínio N-terminal SH3, um domínio central SH2 e um domínio C-terminal SH3. Estes domínios conferem à GRB2 a capacidade de interagir com múltiplos parceiros moleculares dentro da célula, desempenhando papéis variados em diferentes contextos celulares.

A principal função conhecida da GRB2 é sua participação em vias de sinalização de receptores tirosina-quinase (RTKs), onde atua como um mediador entre o receptor ativado e a proteína SOS, desencadeando a ativação da proteína Ras e subsequente ativação de cascatas de sinalização, como a via MAPK. Além disso, a GRB2 também está envolvida em outras vias de sinalização, como a via de sinalização ativada por integrinas e a via de sinalização mediada por citocinas e mais recentemente vias de reparo de DNA.

No contexto da regulação do ciclo celular e da diferenciação celular, a GRB2 desempenha papéis cruciais, influenciando a proliferação celular, a sobrevivência e a migração. Alterações na expressão ou na atividade da GRB2 foram associadas a diversas patologias, incluindo câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, destacando a importância de entendermos os mecanismos de regulação dessa proteína em condições normais e patológicas.

Considerando sua importância central nas vias de sinalização celular e seu potencial como alvo terapêutico, a proteína GRB2 é objeto de estudo em diversos campos da biologia e da medicina. No contexto específico desta tese de doutorado, a GRB2 será investigada em dois capítulos distintos. No primeiro capítulo, será examinada a interação entre a GRB2 e peptídeos relevantes para a via de reparo de DNA, proporcionando conhecimentos sobre seu papel na manutenção da integridade genômica. No segundo capítulo, serão explorados os mecanismos de enovelamento da GRB2, ampliando nossa compreensão sobre sua estrutura e dinâmica molecular. Esses estudos contribuirão para uma melhor compreensão dos

processos biológicos regulados pela GRB2 e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no contexto de doenças relacionadas.

2. CAPÍTULO 1

EXPLORANDO A INTERAÇÃO ESPECÍFICA DO DOMÍNIO SH2 DA PROTEÍNA GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND 2 NA VIA DE REPARO DE DNA MEDIADA POR MRE11

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. SINALIZAÇÃO CELULAR

A competência intrínseca das células em captar e reagir a estímulos provenientes do ambiente extracelular, mediados pela membrana plasmática, desempenha um papel crucial na sustentação da vida. Em específico, nas células bacterianas, esse fenômeno é orquestrado pela recepção de informações por meio de proteínas intermembranas que atuam como receptores de sinal. Estas moléculas desempenham a função essencial de monitorar o ambiente extracelular em relação a uma ampla gama de fatores, tais como temperatura, luminosidade, pH, pressão osmótica, e outros elementos determinantes para a sobrevivência celular. (2,3).

Em organismos multicelulares, ocorre uma complexa rede de comunicação entre células, onde estas, desempenhando funções especializadas, estabelecem trocas de sinais cruciais para a coordenação e regulação de processos vitais. No âmbito vegetal, células respondem de maneira sensível a hormônios de crescimento e alterações na luminosidade ambiente, enquanto nas células animais, a comunicação é mediada por sinais provenientes de proteínas parceiras, desempenhando papéis específicos em diversos contextos fisiológicos. Em todos esses casos, a transmissão de informações entre células é viabilizada por um complexo sistema de sinalização celular, uma propriedade inerente a todas as células, independentemente de sua especialização. A base desse processo repousa na capacidade de receptores específicos em reconhecer e interpretar os sinais recebidos, desencadeando uma série de eventos intracelulares (4,5).

A sinalização celular nas comunicações intercelulares em organismos multicelulares é mediada por moléculas de sinalização extracelular. Para que ocorra a recepção efetiva desses sinais, são necessárias proteínas receptoras, geralmente localizadas na superfície celular. Esses receptores atuam como sensores altamente especializados, capazes de reconhecer e se ligar a moléculas de sinalização específicas. A interação entre a molécula de sinalização e o receptor desencadeia uma cascata de eventos intracelulares, dando início à transdução do sinal. Essa transdução de sinal, por sua vez, depende não apenas dos receptores de superfície, mas também de uma rede de proteínas sinalizadoras intracelulares. Estas atuam no processamento do sinal no interior da célula receptora, direcionando a informação

recebida para alvos intracelulares adequados. Dentre esses alvos, as chamadas proteínas efetoras desempenham um papel crucial na condução da resposta celular (2,4).

As proteínas efetoras, situadas na etapa final das vias de sinalização, são moduladas pelo sinal recebido e, por conseguinte, orquestram a alteração apropriada no comportamento celular. Estes efetores podem desempenhar papéis diversos, atuando como reguladores de transcrição, controladores de canais iônicos, participantes de vias metabólicas ou integrantes do citoesqueleto celular. A especificidade da resposta celular é, assim, determinada pela interação dinâmica entre a natureza do sinal, o tipo celular envolvido e o estado fisiológico da célula receptora (2,5).

As proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática podem ser categorizadas de acordo com o mecanismo de transdução de sinal ao qual estão associadas. Embora os estímulos de cada sistema possam variar, as características gerais da transdução de sinal são consistentes: um sinal interage com o receptor, que, ao ser ativado, estabelece interações com proteínas parceiras, desencadeando um segundo sinal ou promovendo alterações na atividade de uma proteína celular específica. Dessa forma, a função dessa proteína celular é modulada, resultando em modificações na via de sinalização e, por fim, concluindo o processo de transdução (3,5). A **Tabela 1.1.1** destaca alguns exemplos representativos de receptores.

Tabela 1.1.1: Exemplos de Proteínas Receptoras: Existem seis tipos fundamentais de receptores amplamente reconhecidos na literatura.

Receptores	Descrição
Associados à proteína G	Ativam de forma indireta, por meio de proteínas de ligação ao GTP ou proteínas G, enzimas responsáveis pela geração de novos mensageiros intracelulares.
Tirosinas-Quinases	Receptores de membrana plasmática com função enzimática que, ao serem ativados por ligantes extracelulares, promovem a fosforilação de várias proteínas citosólicas.
Guanilil-Ciclases	Receptores localizados na membrana plasmática, dotados de domínio enzimático citoplasmático, operam por meio da ativação desencadeada por um mensageiro intracelular. Esse processo induz a uma resposta que envolve uma proteína-quinase citosólica, responsável por fosforilar e alterar as atividades de proteínas celulares.
Canais Iônicos	Apresentam estruturas na membrana plasmática que operam por meio de um mecanismo de abertura e fechamento, sendo sensíveis a interações com ligantes químicos ou variações no potencial transmembranar.
de Adesão	Estabelecem interações com macromoléculas presentes na matriz extracelular, desencadeando sinais que são transmitidos ao sistema do citoesqueleto, influenciando processos relacionados à migração ou adesão à matriz.
Nuclear	Estabelecem interações com ligantes específicos, alterando a taxa de transcrição e tradução dos genes, resultando na síntese de proteínas celulares.

Fonte: Adaptada da referência (3).

É importante salientar a presença de inúmeras proteínas de sinalização extracelular que operam por meio dos receptores tirosina-quinases (RTKs). Este grupo abrange proteínas secretadas e aquelas ancoradas à superfície celular, desempenhando papéis cruciais na coordenação do comportamento celular, tanto durante o desenvolvimento animal quanto na fase adulta. Na **Tabela 1.1.2**, são apresentados exemplos específicos dessas proteínas, juntamente com seus respectivos receptores. Para uma compreensão mais aprofundada, é essencial considerar que as interações entre os receptores e suas proteínas parceiras podem desencadear eventos intracelulares complexos, tais como modificações pós-traducionais, ativação de vias de sinalização específicas e regulação da

expressão gênica. Esses processos refinados constituem aspectos fundamentais da transdução de sinal, destacando a rede de comunicação celular e suas implicações nas respostas fisiológicas e no desenvolvimento biológico (3,6).

Tabela 1.1.2: Exemplos de proteínas sinalizadoras e receptores tirosina-quinases (RTKs). Proteínas de sinalização que desempenham funções em cascata nas vias associadas aos receptores tirosina-quinases.

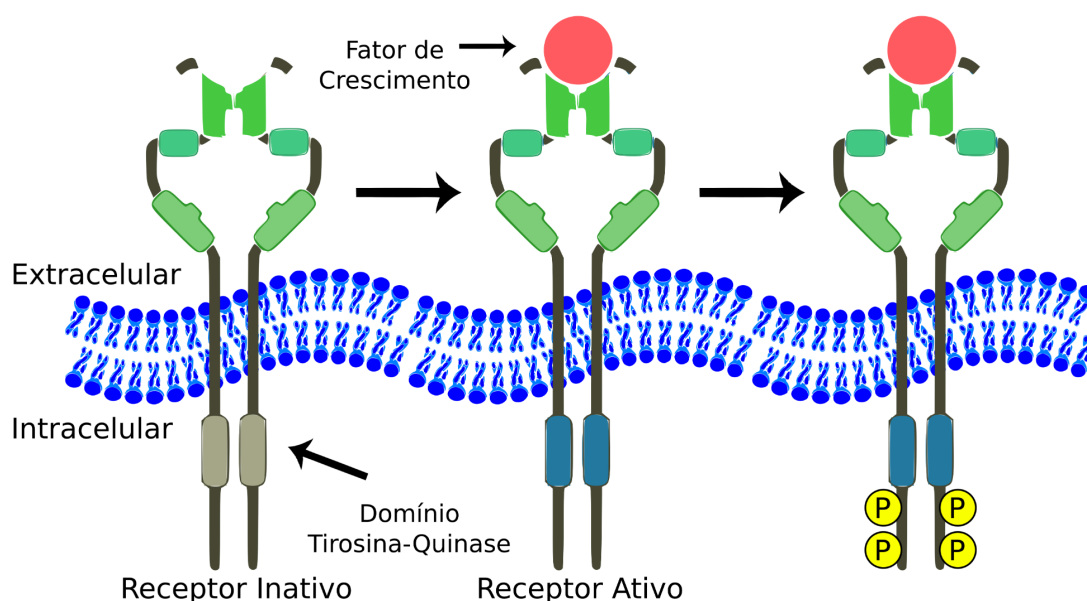
Família das proteínas de sinalização	Família dos receptores	Algumas respostas representativas
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Receptores EGF	Fomentam a sobrevivência, o crescimento e a proliferação; desempenham o papel de sinal indutor no processo de desenvolvimento.
Insulina	Receptor de Insulina	Promovem o aproveitamento de carboidratos e a síntese proteica.
Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1)	Receptor IGF-1	Estimulam o crescimento celular e a sobrevivência em diversos tipos celulares.
Fator de crescimento neural (NGF)	Receptores TRK	Estimulam a sobrevivência e o crescimento de determinados neurônios.
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	Receptores PDGF	Estimulam a sobrevivência, o crescimento, a proliferação e a migração de diversas linhagens celulares.
Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)	Receptores FGF	Estimulam a proliferação de diversas linhagens celulares, inibem a diferenciação de determinadas células precursoras; atuam como sinal indutor no processo de desenvolvimento.

Fonte: Adaptada da referência (3).

As RTKs representam uma classe crucial de receptores de membrana envolvidos na transmissão de sinais intracelulares em organismos multicelulares (7). A estrutura molecular típica de uma RTK (**Figura 1.1.1**) consiste em uma porção extracelular, uma região transmembrana e uma porção citosólica contendo um domínio tirosina-quinase (6). Esses receptores podem ser divididos em mais de 50 tipos distintos, agrupados em diferentes subfamílias estruturais, cada uma associada a uma família específica de proteínas parceiras (8). Ao receber um sinal extracelular,

a interação entre a proteína de sinalização e o domínio correspondente na porção extracelular da RTK desencadeia um evento fundamental: a ativação do domínio tirosina-quinase na porção citosólica. Esse processo crítico resulta na fosforilação das cadeias laterais de tirosina no domínio citosólico do receptor (**Figura 1.1.1**) (6,9). Tal fosforilação cria sítios de interação que estabelecem vínculos com diversas proteínas parceiras no meio intracelular. Por exemplo, a RTK do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e a RTK do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) são exemplos notáveis. A interação dessas RTKs com seus ligantes específicos, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), respectivamente, desencadeia a ativação da RTK. Em seguida, essas RTKs fosforilam o domínio citosólico, gerando sítios de interação que se ligam a proteínas adaptadoras como a GRB2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*) (6,8,9). Essa interação desencadeia uma cascata de eventos moleculares intracelulares, levando à ativação de vias de sinalização celulares e influenciando processos fundamentais como proliferação celular, diferenciação e sobrevivência.

Figura 1.1.1: Estrutura de um Receptor Tirosina-Quinase. Na ausência do ligante, o receptor encontra-se associado a dois monômeros, permanecendo inativo. A molécula sinalizadora e o receptor extracelular conjugam-se para formar dímeros na membrana. As extremidades das caudas dos dois receptores e os domínios intracelulares interagem para promover a ativação da função da proteína quinase, desencadeando a fosforilação dos resíduos de tirosina nas caudas. A fosforilação induz a montagem da cauda do domínio intracelular do receptor em um complexo de sinalização. O local da tirosina fosforilada torna-se um ponto de ligação para proteínas de sinalização intracelular.

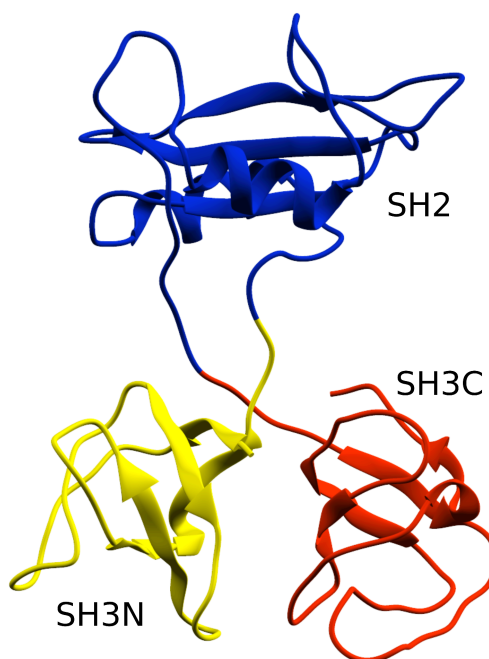


Fonte: Figura adaptada da referência (10).

2.1.2. A PROTEÍNA GRB2 E VIAS DE SINALIZAÇÃO

As proteínas adaptadoras apresentam domínios responsáveis pelo reconhecimento de sequências específicas de aminoácidos, viabilizando a interação com proteínas parceiras e, assim, facilitando a sinalização celular (11). A proteína GRB2 destaca-se como uma adaptadora de importância fundamental, principalmente pela sua presença no citosol, onde desempenha funções em diversas vias de sinalização de proteínas quinases (12). Composta por 217 resíduos de aminoácidos, essa proteína possui uma massa molecular aproximada de 25 kDa e estrutura-se através de um domínio central SH2, flanqueado por domínios SH3 (N-terminal e C-terminal) (13) (conforme representado na **Figura 1.1.2**).

Figura 1.1.2: Representação em *cartoon* da proteína GRB2 em sua configuração monomérica. O domínio SH3N encontra-se destacado em amarelo, o domínio SH2 apresenta coloração em azul, e o domínio SH3C exibe-se em vermelho.



Fonte: PDB id: 1GRI adaptado (13).

Os domínios SH3 estão presentes em mais de 220 proteínas distintas, desempenhando um papel crucial dentro da célula ao regularem vias celulares, proliferação celular, migração e modificações no citoesqueleto (14–17). Estes

domínios possuem uma estrutura secundária composta por uma pequena hélice-3₁₀ e quatro a oito fitas- β , organizadas em um arranjo de duas folhas- β ou barril- β . Adicionalmente, suas alças, denominadas RT, n-Src e distal, são regiões essenciais no processo de reconhecimento de parceiros para interação (16,18,19). Estudos adicionais indicam que o domínio SH3 apresenta afinidade de interação com regiões ricas em prolina (P) que possuem o motivo PxxP, sendo acomodado em dois sítios distintos (onde "x" representa qualquer resíduo) (20,21). Ademais, peptídeos contendo o motivo PxxP podem interagir por meio de duas conformações opostas, definidas pela posição relativa de um resíduo carregado positivamente (+xxPxxP ou xPxxPx+), sendo crucial a consideração destas posições relativas para a efetiva comunicação celular (22,23).

Os domínios SH2 estão presentes em mais de 100 proteínas distintas, predominando em organismos multicelulares. Sua presença é notável em proteínas quinases, fatores de transcrição, supressores de sinalização de citocinas e proteínas adaptadoras, o que enfatiza a relevância desse domínio na comunicação intracelular (24–27). Com aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, esse domínio constitui um módulo globular, caracterizado por uma estrutura secundária altamente conservada. Essa estrutura é composta por uma folha- β central antiparalela, flanqueada por duas α -hélices em cada lado. É importante destacar a existência de dois sítios de interação específicos, denominados Sítio I e Sítio II, que desempenham um papel crucial na capacidade do domínio de mediar interações proteína-proteína nas vias de sinalização celular (28–31). A abordagem detalhada desse domínio será apresentada de forma mais aprofundada na **seção 1.5**.

A principal função reconhecida da proteína GRB2 reside na facilitação da comunicação entre os receptores de fatores de crescimento, como os receptores de tirosina quinase, e as cascatas de sinalização intracelular (12,32). A GRB2 está frequentemente associada à ativação de RTKs, como o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) e o Receptor 2 do Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGFR2) (32–34). A ligação da GRB2 aos receptores ativados promove a formação do complexo GRB2-SOS (*Son of Sevenless*), desencadeando a ativação da proteína Ras e, consequentemente, a ativação de diversas vias, notadamente a via MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) e PI3K (*Fosfatidilinositol 3-quinase*) (**Figura 1.1.3**) (12,35–38). A intervenção da proteína adaptadora GRB2 no processo de ativação da proteína Ras desencadeia a cascata de sinalização MAPK,

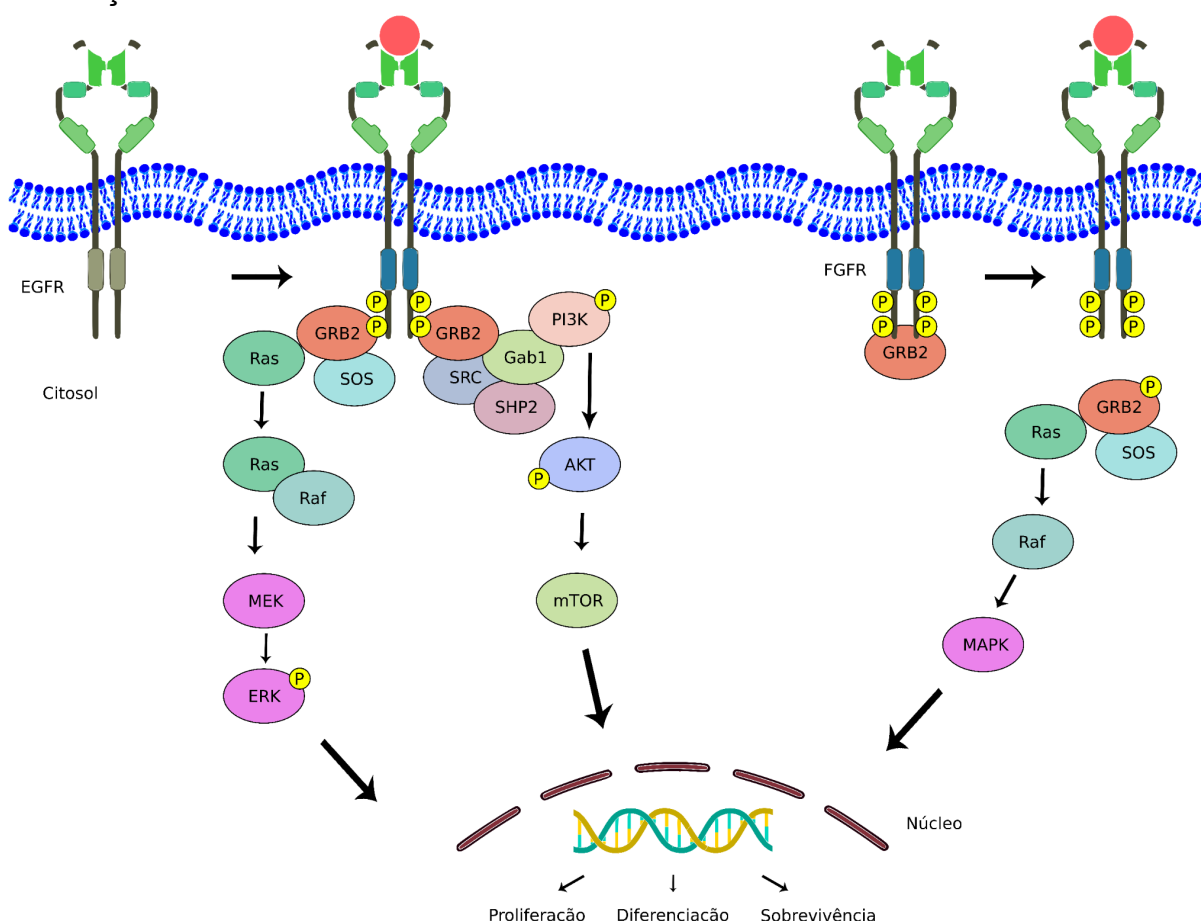
resultando na fosforilação sequencial de MAPKKK, MAPKK e MAPK (39). Essa via desempenha um papel crucial na regulação de processos celulares fundamentais, como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Ressalta-se a importância da regulação precisa da atividade da proteína GRB2 na modulação desses processos biológicos (39,40). A GRB2 desempenha uma função central na transmissão do sinal intracelular, atuando como mediadora essencial na comunicação entre a superfície celular e as vias de sinalização intracelular (34,35,41).

Adicionalmente, a proteína GRB2 associa-se à ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), culminando na ativação da proteína quinase Akt. A via de sinalização PI3K/Akt, desempenhando um papel central na regulação do metabolismo, crescimento celular e sobrevivência, contribui de maneira significativa para eventos fisiológicos e patológicos. Além de sua influência nos receptores de fatores de crescimento, a GRB2 desempenha um papel substancial nas vias de sinalização do receptor de insulina. A interação crucial entre a GRB2 e o receptor de insulina é vital para a regulação do metabolismo glicêmico e o armazenamento de glicose nas células (38,42).

Também foi observado que a interação entre a proteína GRB2 e a proteína FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) pode ocorrer de maneira independente de estímulos extracelulares (41). Nesse cenário, a FGFR2 é fosforilada previamente, resultando em um nível basal de fosforilação, embora insuficiente para ativar a via de sinalização. A GRB2, existindo nas formas monomérica e dimérica, tem sua forma monomérica ativadora da via de sinalização, enquanto a forma dimérica a inibe (35). Entretanto, em condições de fosforilação basal, a GRB2 dimérica interage com a FGFR2 por meio do domínio SH3C, formando o complexo FGFR2-GRB2. Quando fatores de crescimento se ligam à FGFR2 extracelularmente, a GRB2 é fosforilada, dissociando-se da FGFR2 e tornando-se livre para interagir com proteínas no citosol, ativando vias de sinalização como a MAPK (34,41). Ao longo desse processo, o equilíbrio entre monômeros e dímeros da GRB2 é crucial para a ativação e desativação da via. Mudanças nesse equilíbrio são influenciadas pela regulação positiva da quinase e da fosforilação pela GRB2 ou ligantes cognatos (35). A dissociação da GRB2 do estado dimérico representa um ponto de verificação na transdução de sinal da MAPK, sendo passível de reversão pela ação de fosfatases. Fatores como níveis de expressão e

fosforilação impactam esse equilíbrio, e flutuações nesses elementos podem afetar a sinalização da MAPK, contribuindo para proliferação celular descontrolada e possivelmente associadas a certos tipos de câncer, como o de mama e próstata (35,41,43).

Figura 1.1.3: Vias de Sinalização Mediadas pela Proteína GRB2. A ativação é desencadeada pela ligação de um fator de crescimento extracelular ao seu receptor transmembrana específico, uma tirosina-quinase receptora. Dois cenários distintos: A interação de fatores de crescimento com a RTK leva à autofosforilação do receptor em resíduos de tirosina, criando sítios de ligação para a proteína adaptadora GRB2. A GRB2 se liga ao receptor fosforilado iniciando uma cascata de eventos intracelulares; A GRB2 se associa à RTK antes mesmo da ligação do fator de crescimento. A interação do fator de crescimento com o receptor leva à fosforilação da GRB2, que é então liberada para o citosol. Essa fosforilação da GRB2 permite sua interação com diversas proteínas parceiras, propagando a cascata de sinalização.



Fonte: Figura adaptada da referência (36).

Embora a GRB2 seja amplamente reconhecida por seu papel nas vias de sinalização no citosol, sua presença no núcleo foi inicialmente descrita no final da década de 90, sem que, contudo, atribuições funcionais fossem estabelecidas

(44,45). *B. Hou et al.* sugeriram a existência de um possível eixo de sinalização GRB2-PTEN (PTEN: homólogo da fosfatase e tensina) que poderia desempenhar um papel no reparo do DNA e na manutenção da estabilidade genômica. No entanto, a presença da GRB2 no núcleo, assim como suas implicações moleculares e celulares, permaneceram obscuros (46). *Z. Ahmed et al.* conduziram um estudo com o intuito de elucidar potenciais atividades nucleares da GRB2 (47). Surpreendentemente, observou-se uma associação limitada entre GRB2 e PTEN. Por outro lado, os resultados revelaram a formação de um complexo entre GRB2 e a proteína MRE11 (*Meiotic Recombination 11*), fornecendo evidências consistentes do papel da GRB2 no núcleo. Esta nova função da GRB2 será abordada na **seção 1.3**.

2.1.3. A PROTEÍNA GRB2, A PROTEÍNA MRE11 E A VIA DE REPARO DE DNA

Quando ocorre dano ao DNA, torna-se necessário realizar a reparação para preservar a integridade genômica e, conseqüentemente, inibir a propagação de mutações (48). O material genético do DNA está sujeito a diversas agressões diárias provenientes de substâncias químicas, fatores físicos e agentes biológicos. Portanto, a rapidez tanto no reconhecimento quanto na correção do DNA danificado é crucial para a plenitude do genoma (48). Nesse contexto, as células eucarióticas possuem cinco vias principais de reparo de DNA, cada uma delas envolvendo inúmeras proteínas, por vezes compartilhadas. As estratégias de reparo do DNA compreendem: Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) (49); Reparo de Mau-pareamento (MMR) (50); Reparo por Excisão de Bases (BER) (51); Recombinação dirigida por Homologia (HDR) (52); e vias de reparo de União de Extremidades não Homólogas (NHEJ) (53). Cada uma dessas vias desempenha um papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica, contribuindo para a preservação da informação genética e prevenção de alterações indesejadas no material genético.

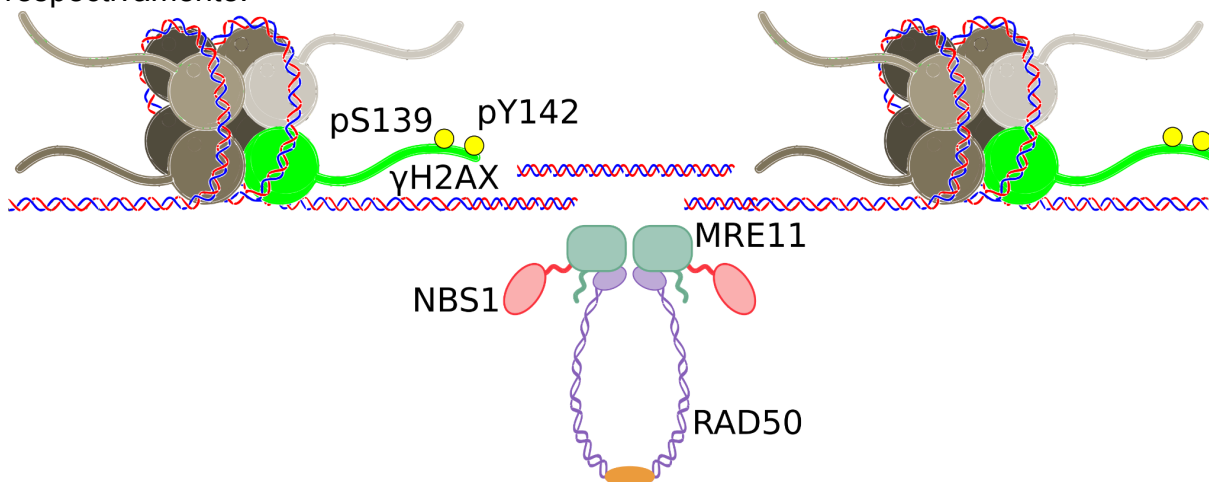
Uma das formas de reparo de DNA amplamente estudadas é aquela destinada a corrigir as quebras na dupla-hélice de DNA, conhecida como DSB (*Double-Strand Break*), uma das formas mais danosas de lesão ao material genético (48). Para a reparação da DSB, a Via de Resposta a Danos no DNA (DDR) engloba diversas moléculas, incluindo a proteína MRE11 do complexo MRN, composto pelas

proteínas MRE11, RAD50 e NBS1. Este complexo atua como sensor para as quebras na dupla-hélice de DNA. Após a detecção da DSB, o complexo MRN desempenha diversas funções na via DDR, promovendo o reparo do DNA e prevenindo o acúmulo de quebras, assim como rearranjos cromossômicos potencialmente patológicos (54).

Essencial para muitos dos seus papéis na via de resposta a danos no DNA, o complexo MRN apresenta diversas atividades enzimáticas, tais como a atividade exonuclease 3'-5', atividade endonuclease de MRE11, ATPase e atividade de adenilato quinase de RAD50 (55). Adicionalmente, a proteína RAD50 possui um domínio "*zinc hook*", crucial para as funções do complexo MRN e contribui para a formação do mesmo (56). Embora a proteína NBS1, sendo o componente menos conservado do complexo, não apresente atividade enzimática, desempenha papel na localização nuclear do complexo e regula as atividades por meio da influência nas interações proteína-proteína, como a Ctp1, Tel1 e ATM (54,57,58).

O recrutamento ágil do complexo MRN para DSBs ocorre de maneira independente de modificações pós-traducionais nos membros do complexo. Em resposta à quebra da fita dupla do DNA (**Figura 1.1.4**), a histona variante H2AX sofre inicialmente fosforilação na tirosina-142 (pY142) (59), catalisada pela quinase ATM, seguida por fosforilação na serina-139 (pS139) (60), resultando na formação de γ H2AX ao redor da DSB. Este sinal crucial serve como base para o recrutamento de proteínas envolvidas na via DDR (61).

Figura 1.1.4: Modelo do Recrutamento do Complexo MRN em Quebras de Fita Dupla (DSBs). Antes da ocorrência do dano no DNA, tanto a histona H2AX quanto o complexo MRN estão localizados no núcleo, prontos para desempenhar suas funções. Após a formação da DSB, a histona H2AX é fosforilada (através da quinase ATM) nos resíduos de tirosina-142 e serina-139, sinalizando a presença do dano ao ambiente celular. Com o reconhecimento da DSB, o complexo MRN é recrutado para a via de Reparo de Dano ao DNA. A histona H2AX é representada em tons de verde e verde puro, enquanto as proteínas MRE11, RAD50 e NBS1 do complexo MRN são representadas em verde marinho suave, lavanda suave e rosa pêssego, respectivamente.



Fonte: Autoria própria.

O complexo MRN é mobilizado para as regiões de quebras na dupla-hélice do DNA por meio de diversos processos independentes. Diversos estudos em cultura de células destacam o papel crucial de γ H2AX no recrutamento do complexo MRN para a cromatina, através da associação entre NBS1, MDC1 e H2AX (62–64). Nesse contexto, a proteína NBS1 interage com a MDC1 (proteína fosforilada mediadora do *checkpoint* de dano ao DNA 1), a qual, por sua vez, interage com γ H2AX, delineando um mecanismo de recrutamento do complexo MRN para os locais de quebras duplas no DNA (65–68). Em resumo, diversos processos podem direcionar o complexo MRN para as áreas com quebras na fita dupla do DNA, enfatizando a importância do recrutamento apropriado da proteína MRE11 para o início e a eficácia da via de reparo do DNA. Este processo é crucial para a sobrevivência celular e a estabilidade genômica (69).

Conforme mencionado anteriormente, estudos indicaram a possível participação da proteína GRB2 nas vias de resposta ao dano ao DNA (46,47,70). Nesse contexto, Z. Ahmed e colaboradores exploraram essa possível interação. Em seu trabalho, observou-se a formação de um complexo entre a proteína GRB2 e a MRE11 (complexo GM), constituindo uma entidade distinta do complexo MRN

canônico, o que foi inesperado até então (69). Em outras palavras, a GRB2 promove um reparo via HDR, recrutando a MRE11 para γ H2AX, desempenhando um papel fundamental no reparo eficiente e oportuno das quebras duplas no DNA. Além disso, Z. Ahmed destacou que a GRB2 utiliza seu domínio SH2 (GRB2-SH2) para interagir com a proteína MRE11. No entanto, a interface de interação específica e adaptada para essa interação não foi esclarecida no referido estudo, devido à escassez de informações moleculares no sistema.

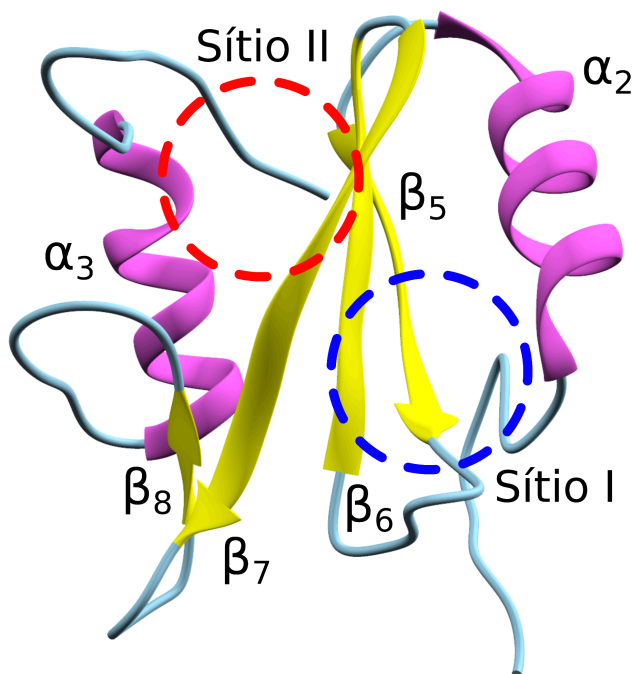
Em resumo, as atribuições nucleares de GRB2, elucidadas por Z. Ahmed *et al.* (47), fornecem esclarecimentos sobre o mecanismo de recrutamento da proteína MRE11 para locais de DSBs, com repercussões funcionais na via de Reparo de Danos ao DNA por meio da Recombinação Homóloga Direcionada. Esta rota revela-se significativa e associada a determinados tipos de câncer (71,72). Contudo, observa-se uma carência de informações em nível molecular acerca da maneira como ocorre a interação GRB2-MRE11 por meio do domínio GRB2-SH2.

2.1.4. O DOMÍNIO SH2 DA PROTEÍNA GRB2

Presente em mais de 110 proteínas distintas, o domínio SH2 foi identificado em 1986 e está presente em quinases, fatores de transcrição, proteínas adaptadoras, fosfatases e supressores (23,73,74). Está documentado na literatura que esses domínios desempenham um papel crucial no reconhecimento de tirosinas fosforiladas (pY) durante a interação proteína-proteína, facilitando a formação de complexos multiproteicos essenciais para a sinalização celular. Apesar da alta especificidade do domínio no reconhecimento de pY, há uma ampla gama de estudos em andamento para compreender os mecanismos de controle envolvidos (28,29,75–77).

A estrutura dos domínios SH2 é notavelmente conservada, consistindo em uma folha- β central circundada por duas α -hélices (**Figura 1.1.5**) (78).

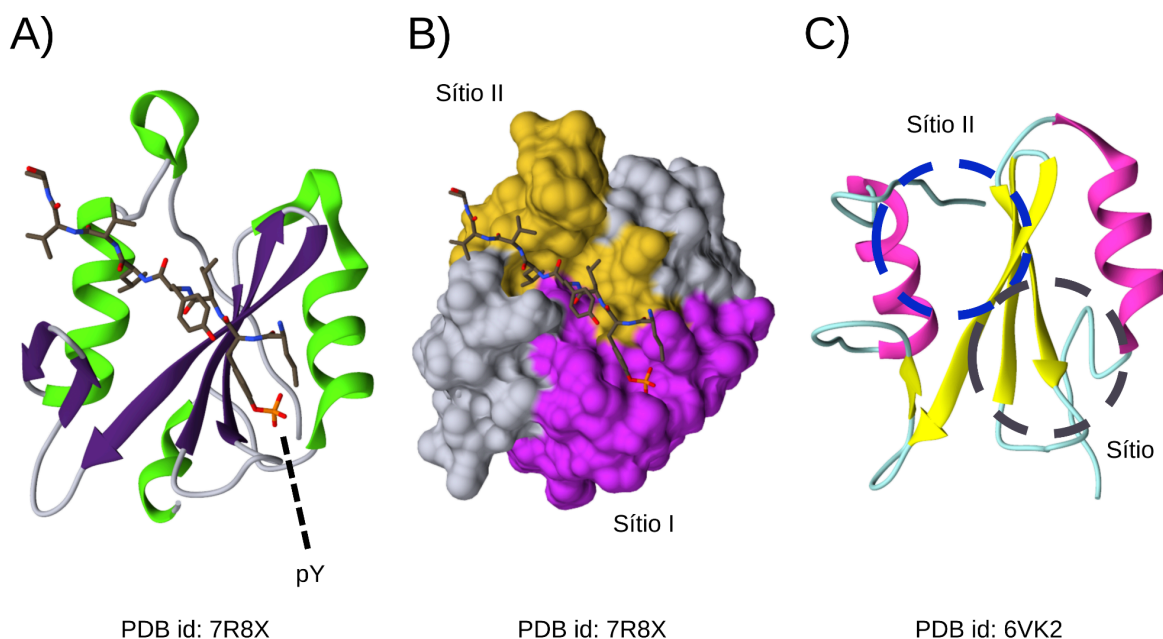
Figura 1.1.5: Configuração tridimensional do domínio SH2 da proteína GRB2. As α -hélices são representadas em tonalidade rosa, enquanto as folhas- β assumem uma coloração amarela, e os *loops* são distintos por uma coloração azul clara. Os sítios I e II estão destacados em azul e vermelho, respectivamente.



Fonte: PDB id: 6VK2 (79).

Estudos acerca da interação entre peptídeos e domínios SH2 de diversas proteínas indicam que os peptídeos contendo tirosina fosforilada adotam uma conformação clássica ao interagir com a superfície do SH2 (80–83). Essa interação se inicia na extremidade de uma α -hélice, estendendo-se até a outra, de maneira perpendicular à folha- β (conforme ilustrado na **Figura 1.1.6**). Adicionalmente, o domínio SH2 apresenta dois sítios de interação distintos. O primeiro sítio de interação, designado como sítio I, desempenha o papel de reconhecimento de resíduos fosforilados (pY). Este sítio é constituído por resíduos positivamente carregados, cujas cadeias laterais estão estruturalmente próximas. Tal proximidade possibilita interações com fosopeptídeos por meio de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. O segundo sítio, denominado sítio II e situado nas proximidades da segunda α -hélice (denominada α_3), é responsável pelo reconhecimento de resíduos de tirosina fosforilada localizados nas posições pY+1 até pY+5 de resíduos específicos. Essas interações contribuem para a compreensão do mecanismo subjacente à regulação mediada por SH2 na cascata de sinalização celular (79,84–88).

Figura 1.1.6: Domínio SH2 das Proteínas LNK e GRB2. **A)** Representação em *cartoon* do domínio LNK-SH2, representando a configuração clássica de interação entre esse domínio e o fosfopeptídeo. As α -hélices estão destacadas em verde, as fitas- β em roxo escuro, os *loops* em cinza e o fosfopeptídeo em marrom. **B)** Apresentação da superfície do domínio LNK-SH2, onde o sítio I de interação é delineado em roxo claro, enquanto o sítio II é destacado em amarelo. **C)** Representação em *cartoon* do domínio GRB2-SH2, evidenciando os dois sítios de interação.



Fonte: PDBs id: 7R8X e 6VK2 (83,88).

Os domínios SH2 estabelecem interações com peptídeos que contêm tirosina fosforilada, manifestando diferentes afinidades (87,89). Nesse contexto, a precisão da interação com proteínas específicas em vias de sinalização é aprimorada por meio de mecanismos adicionais, como a formação de complexos multiproteicos ou interações com proteínas secundárias (83,90–93). Destaca-se que os domínios SH2 são frequentemente encontrados em associação com outros módulos proteicos, abrangendo desde domínios catalíticos (como domínios proteicos ou lipídicos, quinases e fosfatases) até outros módulos de interação proteica (como o domínio SH3; o domínio *Pleckstrin Homology* - PH; e o domínio *Phosphotyrosine Binding* - PTB) (29,94–97).

Assim, dependendo da natureza desses módulos associados, as proteínas que possuem domínios SH2 desempenham diversas funções intracelulares. No contexto da proteína GRB2, em sua via mais reconhecida, observa-se que ela recruta os reguladores *downstream* SOS e Gab1 após a ativação do RTK. O domínio

GRB2-SH2 é crucial nesse processo, interagindo com sítios fosforilados no RTK (96). Além disso, estudos anteriores indicam que a proteína GRB2 também desempenha um papel na via de DDR, interagindo com a proteína MRE11 por meio do domínio GRB2-SH2 (46,47,70). Contudo, detalhes moleculares sobre essa interação, como o sítio de ligação e os resíduos de aminoácidos envolvidos, permanecem desconhecidos.

Este estudo abordou a interação entre o domínio GRB2-SH2 e os peptídeos derivados da proteína MRE11. Os peptídeos correspondem à região 107-128 da proteína MRE11, que constitui uma alça entre as estruturas α_2 - β_3 , caracterizada por sua natureza flexível e não estruturada. A análise da estrutura cristalina da proteína MRE11 (PDB id: 3T1I (98)) revela a ausência dessa região na estrutura depositada, sugerindo sua instabilidade conformacional. No entanto, a proteína MRE11 é um componente essencial do complexo MRN (constituído pelas proteínas MRE11-RAD50-NBS1), com a proteína NBS1 interagindo em proximidade a essa região. A seleção dos peptídeos derivados dessa região foi embasada na hipótese de que a proteína GRB2 interage nesse local, conferindo estabilidade à alça e, por conseguinte, facilitando a interação entre a proteína NBS1 e a MRE11, culminando na formação do complexo MRN funcional (98).

Os resultados alcançados são comparados com o peptídeo derivado da proteína EGFR (pEGFR). Este peptídeo reside na porção da cauda C-terminal da proteína EGFR, a qual é uma região que contém tirosinas fosforiladas e é o local onde ocorre a interação com a proteína GRB2. A comparação é pertinente devido à ampla investigação desta interação por diversos grupos, inclusive pelo nosso colaborador (47) e nosso próprio grupo (79), tornando-se um parâmetro significativo de análise, dado que os peptídeos examinados neste estudo são provenientes de proteínas que ainda carecem de informações sobre sua interação com a proteína GRB2.

Ademais, foram conduzidos estudos de controle visando explorar a interação entre a proteína GRB2 e peptídeos derivados da histona H2AX. Estes peptídeos abrangem os resíduos de aminoácidos 136-142, os quais constituem os últimos resíduos da histona H2AX e englobam uma região de uma longa alça que serve como sítio de interação para proteínas que participam da via de reparo do DNA, tais como MDC1 (*Mediator of the DNA damage checkpoint 1*) (99) e MCPH1 (*Microcephalin*) (100). Devido ao fato de ser uma região propensa à interação e

conter tirosina fosforilada, foram realizados estudos de interação entre o domínio SH2 da proteína GRB2 e peptídeos da histona H2AX para investigar a possibilidade de interação entre estas proteínas, considerando sua localização na mesma região da via de reparo do DNA.

O presente estudo foi conduzido com o propósito de mapear os contatos de interação e discernir resíduos de significância para tal interação. Os achados revelam possíveis mecanismos de interação não tradicionais entre GRB2 e uma variedade de parceiros celulares, enfatizando a essencialidade desta proteína em múltiplas vias biológicas ao longo da progressão dos processos celulares.

2.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2.1. FUNDAMENTOS BÁSICOS DE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi inicialmente identificada na década de 1940 por Edward Purcell e subsequentemente elucidada por Felix Bloch (101,102). Decorridos mais de 70 anos desde as primeiras detecções em amostras tanto de líquidos quanto de sólidos, avanços significativos na RMN orientaram o aprimoramento da técnica, fazendo com que se tornasse, ao lado da Cristalografia de Raios-X e da Crio-microscopia Eletrônica (cryo-EM), uma das principais ferramentas para a obtenção de informações estruturais (103–105).

Os núcleos dos átomos são caracterizados por um número quântico de *spin* nuclear I , que pode assumir valores maiores ou iguais a zero e que são múltiplos de $\frac{1}{2}$. Aqueles com $I=0$ não exibem *spin* nuclear, resultando na impossibilidade de apresentarem RMN; tal é o caso de todos os núcleos que possuem massa atômica e número atômico pares. Contudo, alguns elementos químicos possuem pelo menos um isótopo que possui *spin* nuclear, tornando-os, assim, observáveis por meio da RMN (conforme apresentado na **Tabela 1.2.1**).

Tabela 1.2.1: Características dos Isótopos mais Empregados em Ressonância Magnética Nuclear. Apresentando as frequências correspondentes a um espectrômetro de 600 MHz (106).

Isótopo	Abundância Natural (%)	Frequência de RMN (MHz)
^1H	99,9885	600,130
^2H	0,0115	92,124
^{13}C	1,07	150,903
^{15}N	0,364	60,834
^{19}F	100,0	564,686

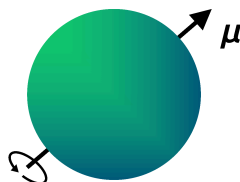
Fonte: Adaptado da referência (107).

Os núcleos em rotação apresentam um momento angular P e, de forma evidente, possuem carga. O movimento dessa carga resulta em um momento magnético associado μ , conforme ilustrado na **Figura 1.2.1**. Portanto:

$$\mu = \gamma P \quad (1.2.1)$$

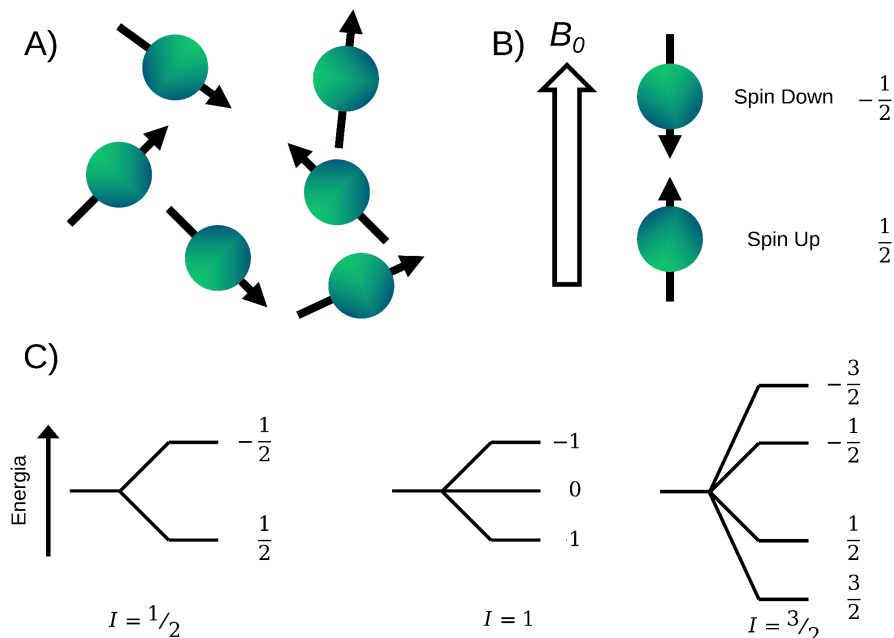
sendo γ a razão giromagnética, a qual permanece constante para qualquer isótopo específico e pode ser interpretada como uma medida da intensidade magnética de um isótopo. Tanto o momento angular quanto o momento magnético são grandezas vetoriais, ou seja, possuem magnitude e direção. Ao serem expostos a um campo magnético estático externo B_0 , os momentos magnéticos se alinham em relação a esse campo (**Figura 1.2.2 A-B**), assumindo um número discreto de orientações devido à quantização dos estados de energia envolvidos. Para um *spin* com número quântico magnético I , há $2I+1$ estados de *spin* possíveis. Portanto, para um núcleo com *spin* $\frac{1}{2}$, como o próton, existem dois estados possíveis denominados $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$. Já para $I=1$, os estados são $+1$, 0 e -1 , e assim por diante (**Figura 1.2.2 C**) (107,108).

Figura 1.2.1: Momento Magnético Nuclear. Um núcleo, dotado de carga, manifesta um momento magnético μ quando em movimento.



Fonte: Autoria própria.

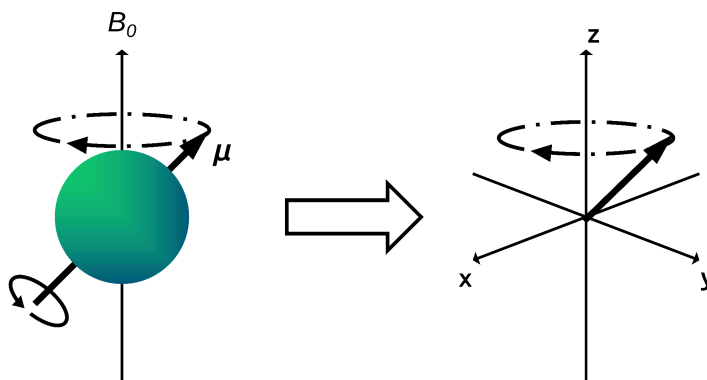
Figura 1.2.2: Representação dos Estados de *Spin* Nuclear. **A)** Quando não há presença de campo magnético, os *spins* podem adotar posições aleatórias. **B)** Sob a influência de um campo magnético B_0 , eles se alinham a favor (*up*) ou contra (*down*) o campo. **C)** Núcleos com *quantum* magnético I podem apresentar $2I+1$ orientações possíveis em relação ao campo magnético.



Fonte: Autoria própria.

Para um núcleo de *spin* $\frac{1}{2}$, os dois estados acessados refletem a representação popular de um núcleo que adota duas orientações possíveis em relação ao campo magnético: paralela e antiparalela, sendo a primeira configurada como o estado de menor energia. A influência do campo estático sobre o momento magnético pode ser delineada por meio da mecânica clássica, onde o campo exerce um torque sobre o momento magnético, resultando em um percurso circular em torno do campo aplicado (conforme ilustrado na **Figura 1.2.3**) (107–110).

Figura 1.2.3: Precessão de Larmor. Fenômeno em que um campo magnético estático é aplicado a um núcleo, resultando em seu movimento de precessão a uma taxa determinada pela intensidade do campo e pela razão giromagnética do *spin*. Convencionalmente, o campo magnético é direcionado ao longo do eixo z em um sistema de coordenadas cartesianas, enquanto o movimento do núcleo é representado como um vetor deslocando-se na superfície de um cone.



Fonte: Autoria própria.

Este fenômeno é caracterizado como precessão, mais especificamente *precessão de Larmor* neste contexto específico. Um exemplo que se assemelha à precessão de Larmor é o movimento de um pião, que quando você gira um pião e o coloca em uma superfície plana, ele não apenas gira em torno do seu próprio eixo, mas também começa a oscilar de forma mais ampla, descrevendo um movimento de precessão. A taxa de precessão, determinada pela velocidade angular ou frequência (ω em rad/s ou ν em Hz, respectivamente), é expressa por (109,110):

$$\omega = -\gamma B_0 \text{ rad s}^{-1} \text{ ou } \nu = \frac{-\gamma B_0}{2\pi} \text{ Hz} \quad (1.2.2)$$

A **Equação 1.2.2** fornece a frequência de Larmor do núcleo, cuja direção de movimento é determinada pelo sinal de γ , podendo adotar um sentido horário ou anti-horário. O fenômeno da ressonância magnética nuclear ocorre quando o estado de *spin* do núcleo se altera, impulsionado pela absorção de um *quantum* de energia (ΔE). Essa energia é aplicada na forma de radiação eletromagnética, sendo crucial que sua frequência coincida com a precessão de Larmor para que a condição de ressonância seja atendida. A energia envolvida nesse processo é expressa por:

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (1.2.3)$$

em que h é a constante de Planck. Em termos mais simples, a frequência de ressonância de um *spin* é, em essência, a sua frequência de Larmor (107,108). Agora, consideremos diversos núcleos de *spin* $\frac{1}{2}$ semelhantes sob a influência de um campo magnético aplicado. Como mencionado anteriormente, a orientação paralela ao campo aplicado possui uma energia ligeiramente inferior à orientação antiparalela. Logo, em equilíbrio, haverá um excesso de núcleos no estado paralelo (devido à conservação de energia), conforme estabelecido pela distribuição de Boltzmann.

$$\frac{N_{\uparrow\uparrow}}{N_{\uparrow\downarrow}} = e^{\Delta E/k_b T} \quad (1.2.4)$$

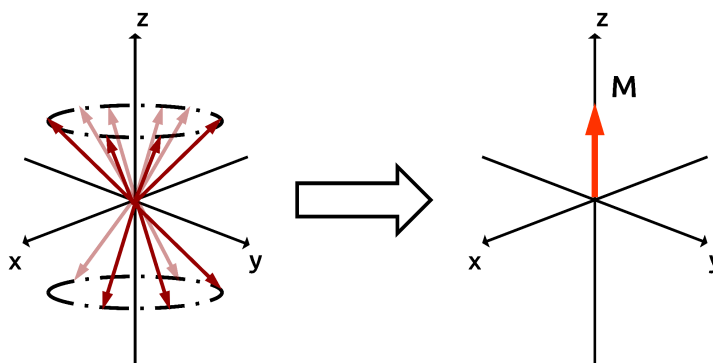
sendo que $N_{\uparrow\uparrow,\uparrow\downarrow}$ representa o número de núcleos na orientação do *spin*, k_b é a constante de Boltzmann, e T é a temperatura. Devido às pequenas discrepâncias entre os níveis de energia de *spin*, as diferenças correspondentes nas populações são igualmente reduzidas. Esta característica distingue a resolução do RMN de técnicas como espectroscopia de infravermelho ou ultravioleta, onde as disparidades energéticas entre os estados fundamental e excitado são mais significativas (107–109).

O ligeiro excesso populacional de *spins* nucleares pode ser expresso como um conjunto de *spins* distribuídos de maneira aleatória em torno do cone precessional e paralelos ao eixo z. Estes originam um vetor de magnetização *bulk* resultante, representado por **M**, ao longo do eixo (conforme ilustrado na **Figura 1.2.4**). É crucial notar que essa magnetização ao longo de z emerge devido às disparidades populacionais entre os diversos estados de *spin* possíveis. Dada a ausência de uma orientação preferencial estabelecida para os *spins* na direção transversal, os momentos magnéticos individuais se distribuem aleatoriamente em torno do cone de precessão. Consequentemente, não há uma magnetização líquida no plano x,y. Para simplificar essa complexidade, é viável representar múltiplos momentos magnéticos similares por meio de um único vetor de magnetização **bulk**,

cujo comportamento segue as leis da mecânica clássica. Essa abordagem simplificada é conhecida como modelo vetorial de Bloch (em honra ao físico Felix Bloch) ou, de maneira mais ampla, como modelo vetorial de Ressonância Magnética Nuclear. A magnetização bulk, expressa por um único vetor, encapsula a distribuição de momentos magnéticos individuais, possibilitando uma descrição simplificada do comportamento magnético do sistema. Essa simplificação é crucial para a compreensão e análise de sistemas complexos, tais como os encontrados em RMN (107,110).

Ao considerarmos a conexão entre a magnetização bulk e o acoplamento J , torna-se essencial compreender como este último influencia a interação entre spins em um sistema magnético. O acoplamento J exerce uma influência direta na dinâmica da magnetização bulk, modificando a distribuição e o comportamento dos *spins*. Ao compreendermos essas modificações, podemos aprofundar nossa compreensão do modelo vetorial de Bloch e sua aplicabilidade na interpretação de fenômenos magnéticos complexos.

Figura 1.2.4: Vetor de Magnetização Bulk. No contexto do modelo vetorial de RMN, diversos *spins* semelhantes são caracterizados mediante um vetor de magnetização bulk. Em situação de equilíbrio, o excesso de *spins* no estado "up" ($\uparrow\uparrow$) alinha esse vetor paralelamente ao eixo $+z$.



Fonte: Autoria própria.

2.2.1.1. Acoplamento J

O acoplamento J , também conhecido como acoplamento escalar, decorre de interações *spin-spin* que ocorrem por meio dos elétrons de ligação de núcleos conectados através de ligações químicas. Este fenômeno induz a divisão das linhas espectrais para ambos os *spins* acoplados por uma quantidade J , denominada constante de acoplamento (**Figura 1.2.5**) (111,112).

A constante de acoplamento entre dois spins é representada por:

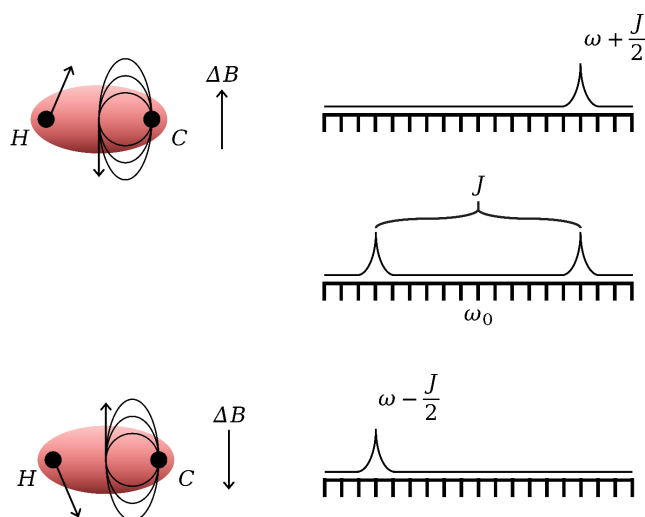
$${}^nJ_{AB} \quad (1.2.5)$$

sendo n é o número de ligações intermediárias, e A e B são os *spins* acoplados. Por exemplo, a constante de acoplamento entre o nitrogênio amida e o carbono C_β seria indicada como ${}^2J_{NC_\beta}$. O valor de J , expresso em Hertz (Hz), corresponde à

separação de frequência observada entre as linhas de ressonância, a qual é influenciada pelo acoplamento entre os *spins*. Em outras palavras, J é usado para calcular a diferença nas frequências das linhas de ressonância, considerando o efeito do acoplamento. Uma linha de ressonância dividida devido ao acoplamento J é comumente referida como um multipletto. O espectro apresentado na **Figura 1.2.5** é um exemplo de dupletto. Caso a linha de ressonância seja dividida em três sinais ou quatro sinais, será denominado, respectivamente, tripleto ou quarteto (111,112). O núcleo de um próton tem a capacidade de realizar rotações tanto para cima quanto para baixo, resultando na geração de um campo magnético. Representado na **Figura 1.2.5** por linhas de campo ovaladas, este campo magnético circunda o próton. É importante salientar que tanto os núcleos de hidrogênio quanto os de carbono contêm prótons, e estes últimos também geram um campo magnético devido ao seu *spin*. A distinção principal reside na detecção e influência desse campo magnético sobre outros núcleos na técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. O isótopo mais comum do hidrogênio, o ${}^1\text{H}$, consiste em um único próton. Apesar de possuir um campo magnético, os núcleos de ${}^1\text{H}$ são abundantemente presentes na maioria das moléculas, o que por vezes pode mascarar os efeitos sutis dos *spins* de prótons adjacentes no RMN, tornando-a menos ideal para observar fenômenos específicos representados na **Figura 1.2.5**. Por outro lado, o isótopo de carbono ${}^{13}\text{C}$ apresenta um *spin* diferente de zero, resultando em seu próprio campo magnético. Além disso, o ${}^{13}\text{C}$ é menos abundante que o ${}^1\text{H}$ na maioria das moléculas. Essa combinação confere ao ${}^{13}\text{C}$ uma maior sensibilidade à influência dos *spins* de prótons próximos, permitindo a detecção de mudanças no campo magnético causadas pelos estados de *spin* do próton em

experimentos de RMN. Além disso, é relevante considerar que os elétrons circundantes ao grupo C-H são influenciados pelo campo magnético do próton, fenômeno conhecido como polarização. Esta polarização dos elétrons pode resultar no aumento ou diminuição do campo magnético experimentado pelo núcleo de ^{13}C . Na molécula superior, observa-se um cenário em que o *spin* do próton intensifica o campo magnético no núcleo de carbono, enquanto na molécula inferior, ocorre o oposto, com o *spin* do próton reduzindo o campo magnético. Essas variações no campo magnético do núcleo de carbono se refletem na espectroscopia de RMN como deslocamentos na linha de ressonância. Na molécula superior, com um campo magnético mais forte, observa-se um pico em uma posição mais baixa (*downfield*) no espectro, enquanto na molécula inferior, com um campo magnético mais fraco, o pico ocorre em uma posição mais alta (*upfield*). O espectro resultante, combinando esses dois efeitos, apresenta dois picos separados por um valor específico denominado constante de acoplamento J (111,112).

Figura 1.2.5: Acoplamento de Spin Nuclear em um Grupo $^{13}\text{C-H}$. Dois grupos C-H distintos, provenientes de moléculas idênticas, distinguem-se exclusivamente pelo estado de *spin* do próton. Os elétrons de ligação presentes no orbital σ tornam-se polarizados em resposta ao dipolo magnético do próton, conforme evidenciado pelas linhas de campo ovais. A polarização dos elétrons pode, consoante o estado do *spin* do próton, amplificar ou reduzir o campo magnético no núcleo ^{13}C . Uma orientação específica do *spin* do próton ocasiona um aumento no campo magnético (conforme ilustrado na molécula superior), ao passo que a outra orientação provoca uma diminuição no campo aparente (molécula inferior), resultando em um deslocamento para um patamar inferior na linha de ressonância. Tal deslocamento é contingente ao estado do *spin* do próton associado. O espectro de carbono observado constitui a combinação dessas duas ressonâncias, originando dois picos discerníveis, separados pela constante de acoplamento J .



Fonte: Autoria própria.

O efeito do acoplamento J no espectro está intrinsecamente relacionado à disparidade de frequência entre os *spins* acoplados. Se a discrepância nas frequências de ressonância dos dois *spins* acoplados for considerável ($\Delta\nu > J$), o sistema é categorizado como um sistema AX , onde X denota que os deslocamentos químicos dos dois *spins* são substancialmente distintos. Todos os acoplamentos entre diferentes tipos de átomos, ou *spins* heteronucleares, são classificados como acoplamentos do tipo AX devido à significativa diferença nas frequências dos *spins* acoplados (111,112).

Conforme previamente mencionado, o acoplamento J emerge da interação entre o momento magnético nuclear e os elétrons envolvidos na ligação química, sendo que a polarização do *spin* nuclear de um átomo influencia a polarização dos elétrons correlatos. A polarização eletrônica subsequente ocasiona uma modificação no campo magnético, perceptível pelo *spin* acoplado. A título de ilustração, consideremos um grupo C-H em uma molécula (**Figura 1.2.5**). O *spin* nuclear do próton polariza o elétron no orbital σ de ligação, resultando em uma alteração no campo magnético no núcleo do carbono. Uma vez que existem apenas dois estados possíveis para o dipolo magnético do próton, o campo efetivo no núcleo do carbono é amplificado ou reduzido, dependendo do estado de *spin* do próton associado. Devido à equiprobabilidade entre as populações dos dois estados de *spin* do próton, metade dos carbonos ligados experimentam um aumento no campo magnético local, enquanto a outra metade experimenta uma diminuição. Essa disparidade no campo magnético local no núcleo do carbono resulta em um deslocamento na frequência de ressonância do carbono. Com dois estados possíveis de *spin* do próton, o espectro de carbono se apresenta bifurcado em duas linhas, com a separação entre elas equivalente ao acoplamento J (111,112).

A alteração no campo magnético induzida pelos *spins* do próton é diretamente proporcional à razão giromagnética do hidrogênio (γ_H). Da mesma forma, a mudança correspondente na frequência de ressonância do carbono é proporcional ao produto dessa variação de campo e à razão giromagnética do *spin* do carbono (γ_C), conforme expresso pela **Equação 1.2.6**:

$$\Delta\omega \propto \pm \gamma_H \gamma_C \quad (1.2.6)$$

O efeito do *spin* do carbono sobre o *spin* do próton é calculado de maneira análoga. A variação no campo magnético local no núcleo do próton é proporcional a γ_C , resultando em uma alteração na frequência dos prótons de $\pm\gamma_C\gamma_H$. Como consequência, o *spin* do próton experimenta a mesma variação de frequência que seu parceiro acoplado, ocasionando uma divisão equivalente na linha de ressonância do próton, similar à linha de ressonância do carbono associado. É imperativo observar que a mudança na frequência observada depende exclusivamente do produto das razões giromagnéticas dos *spins* acoplados, sendo que a constante de acoplamento escalar permanece independente do campo magnético aplicado (B_0) (111,112).

Em relação aos acoplamentos de ligações múltiplas, é relevante considerar que a conformação dos átomos acoplados exerce influência sobre a constante de acoplamento. Nesse contexto, a relação entre a constante de acoplamento e o ângulo de torção é expressa pela equação de Karplus (113), representada por:

$$J = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C \quad (1.2.7)$$

em que A , B e C são constantes empíricas. Um exemplo prático desse fenômeno ocorre no ângulo ϕ da ligação peptídica, o qual impacta a intensidade do acoplamento entre os prótons amida e alfa.

É importante ressaltar que o efeito do acoplamento J desempenha papel fundamental na análise estrutural de moléculas, tanto pequenas quanto macromoleculares. Por meio da aplicação de pulsos de radiofrequência específicos, é possível realizar a transferência de magnetização entre os núcleos, como exemplificado no experimento de HSQC empregado neste estudo (111,112).

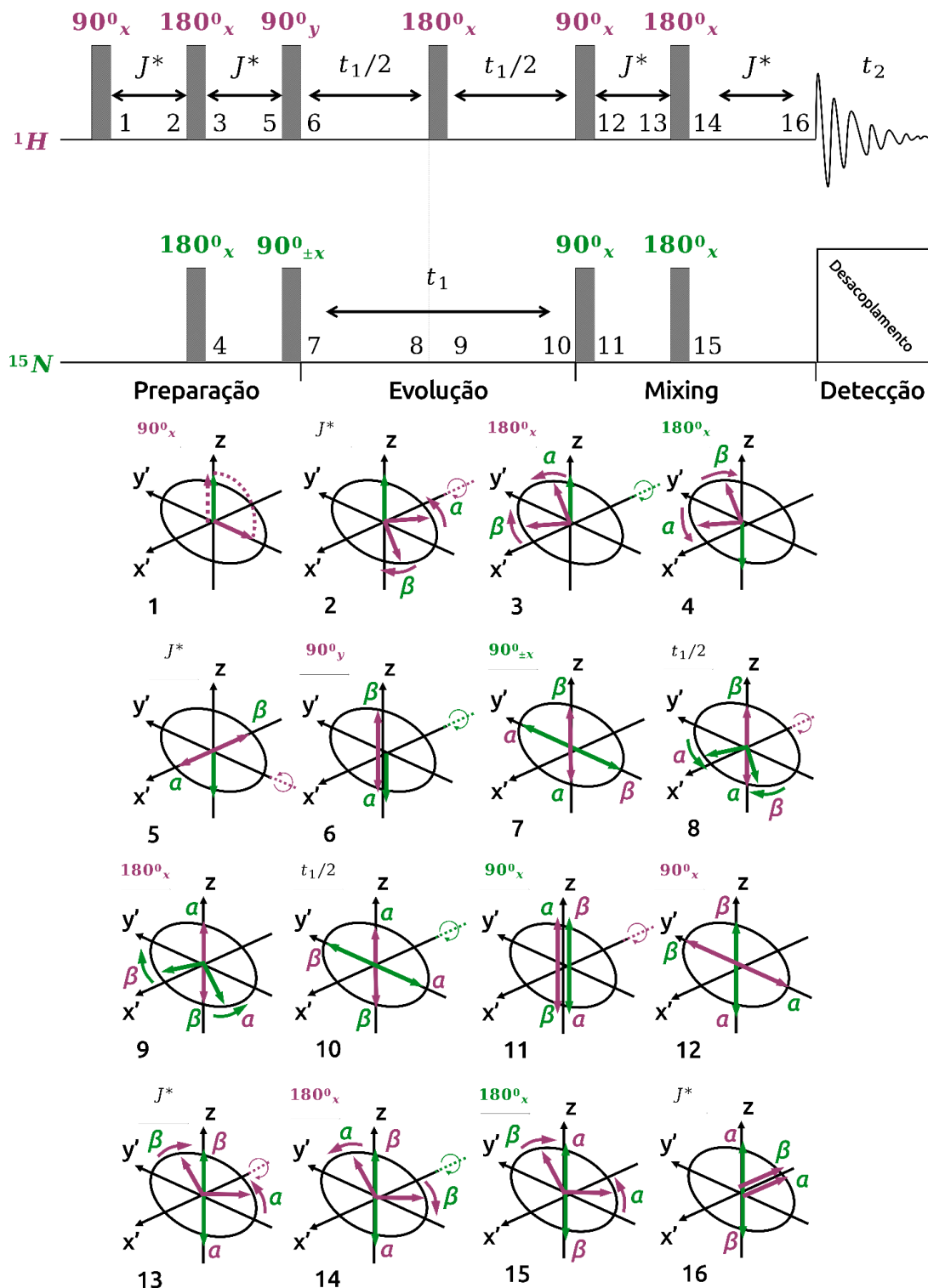
2.2.1.2. ^{15}N , ^1H -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

O experimento de HSQC realiza o mapeamento da correlação bidimensional dos deslocamentos químicos heteronucleares entre os núcleos de hidrogênio (^1H) e ^nX diretamente conectados, em que ^nX representa um heteronúcleo, como, por

exemplo, o ^{15}N . Esta técnica é amplamente empregada na determinação estrutural de moléculas orgânicas, notadamente na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de proteínas (114). O espectro obtido por meio do experimento é bidimensional, apresentando os prótons (^1H) em um eixo e o heteronúcleo ^nX (com um núcleo atômico diferente do próton, geralmente ^{13}C ou ^{15}N) no outro eixo. Neste espectro, são identificados picos cruzados, correspondendo a cada próton singular conectado ao heteronúcleo em consideração (115,116).

A técnica de HSQC, inicialmente aplicada em um sistema ^1H - ^{15}N , destaca-se por sua alta sensibilidade. O experimento envolve a transferência de magnetização do próton para o núcleo ^{15}N por meio da técnica INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer* - **Anexo C**). Após um intervalo de tempo (t_1), a magnetização é revertida para o próton através de um processo retro-INEPT, sendo o sinal resultante registrado. No decorrer do experimento de HSQC, uma série de experimentos é realizada, incrementando-se o atraso de evolução t_1 . O sinal ^1H é detectado na dimensão diretamente medida em cada experimento, enquanto o deslocamento químico de ^{15}N é registrado na dimensão indireta da série de experimentos (115,116).

Figura 1.2.6: Representação Vetorial da Variação da Magnetização ao Longo de um Experimento de HSQC. As barras no gráfico ilustram a sequência de pulsos utilizada no experimento. Cada estágio na sequência de pulsos é detalhadamente representado nos esquemas, onde a cor rosa simboliza os prótons e o verde representa os átomos de nitrogênio.



Fonte: Figura adaptada da referência (117).

A sequência de pulsos fundamental de uma ressonância magnética nuclear bidimensional heteronuclear acoplada por correlação de *spin*-Hidrogênio-Nitrogênio (HSQC), conforme ilustrado na **Figura 1.2.6**, compreende quatro blocos distintos de pulsos. Inicialmente, um bloco de pulso INEPT transfere a polarização do núcleo de hidrogênio (1H) para o núcleo X, menos sensível, mediante a interação $^1J_{(XH)}$. A magnetização anti-fásica do ^{15}N evolui durante o intervalo de evolução t_1 , influenciada pelo deslocamento químico de X. Durante esse processo, os acoplamentos heteronucleares ^1H-X são seletivamente focalizados por um pulso de 180° aplicado nos núcleos de hidrogênio durante a evolução t_1 . Subsequentemente, um pulso retro-INEPT converte a magnetização do núcleo X em magnetização do hidrogênio, agora em fase. A aquisição dos sinais de prótons é então realizada com desacoplamento do núcleo X. Em virtude da complexidade desta sequência de pulsos, a configuração de um experimento HSQC demanda cuidados especiais, exigindo ajustes específicos na sonda e sua combinação com a amostra. É imperativo determinar o parâmetro do pulso de prótons para cada amostra individualmente (111,112).

Como previamente abordado, o acoplamento escalar J_{HN} resulta no desdobramento dos picos no espectro. Assim, para cada resíduo de aminoácido de uma proteína, observam-se quatro picos distintos em um espectro bidimensional. Entretanto, ao empregar a sequência de pulsos descrita, o desacoplamento proporciona a observação de apenas um pico no espectro bidimensional. Adicionalmente, a transferência eficiente da magnetização para a detecção no núcleo de hidrogênio amplifica a sensibilidade, resultando em uma maior razão sinal-ruído (111,112).

2.2.1.3. Perturbação do Deslocamento Químico

A técnica experimental conhecida como Perturbação do Deslocamento Químico (CSP) é amplamente empregada na caracterização da interação entre proteínas e ligantes. Em um procedimento típico, uma proteína marcada com ^{15}N é utilizada em conjunto com um ligante não marcado. O ligante é gradualmente titulado na amostra contendo a proteína, sendo monitorado em cada etapa da titulação por meio da aquisição de um espectro de HSQC (118). A sensibilidade da mudança no deslocamento químico a alterações estruturais permite medições

precisas, de modo que praticamente qualquer interação de ligação específica resulta em perturbações do deslocamento químico. A análise é conduzida pela observação do deslocamento químico em cada ponto da titulação, sendo que os picos que apresentam maior movimentação correspondem ao sítio de interação da proteína (119).

Existem duas abordagens principais para o cálculo dos deslocamentos químicos em proteínas. A primeira delas utiliza a mecânica quântica, na qual são realizados cálculos das densidades eletrônicas das moléculas. Isso possibilita a obtenção de cálculos da blindagem dos núcleos em relação ao campo magnético externo devido aos elétrons, os quais são responsáveis pelos deslocamentos químicos observados. O segundo método é empírico, modelando os deslocamentos químicos como uma soma de vários efeitos. Equações são formuladas para cada efeito, com base em teorias sobre as possíveis origens dos deslocamentos químicos, incluindo fatores geométricos. Os parâmetros dessas equações são ajustados de maneira a alcançar o melhor ajuste entre as mudanças experimentais e as observadas (120,121).

Em relação aos deslocamentos dos prótons, diferentes ambientes químicos do ^1H ocasionam diferentes mudanças químicas primárias. Por exemplo, o grupo HN da amida principal ressoa na faixa de 7 a 9 ppm, enquanto grupos CH_3 geralmente ressoam na faixa de 0 a 2,5 ppm. Esses deslocamentos são em grande parte influenciados por efeitos indutivos de ligação direta, resultantes das cargas parciais dos átomos pesados. Satisfatoriamente, esses efeitos podem ser desconsiderados ao se analisarem apenas os deslocamentos secundários, definidos como a diferença entre o deslocamento observado e o deslocamento do ligante não estruturado (122,123).

Através desta definição, torna-se viável caracterizar o deslocamento secundário (σ) como a soma dos seguintes efeitos:

$$\sigma = \sigma^p + \sigma^{ani} + \sigma^{ring} + \sigma^E \quad (1.2.8)$$

sendo que σ^p deriva de efeitos paramagnéticos, σ^{ani} resulta da anisotropia magnética nas ligações, σ^{ring} provém de correntes em anéis aromáticos, e σ^E surge de campos elétricos gerados por átomos carregados. Em geral, σ^p pode ser negligenciado, a

menos que a proteína em estudo possua um centro paramagnético. Dos restantes, σ^{ring} pode ter efeitos significativos, especialmente quando um próton está próximo de um anel aromático. O σ^{ani} é predominantemente um efeito das carbonilas e grupos amidas, que apresentam as distribuições mais anisotrópicas de elétrons na proteína. Dado que muitos prótons estão próximos a esses grupos, um grande número de prótons experimenta efeitos de deslocamento químico secundário. σ^{E} é um efeito indutivo devido aos átomos carregados adjacentes, que modificam a nuvem eletrônica do átomo em questão. Átomos totalmente ou parcialmente carregados podem causar efeitos relativamente substanciais, no entanto, a soma total de todos os átomos carregados adjacentes é pequena devido à distribuição uniforme de cargas locais dentro da proteína, resultando assim no menor efeito entre os discutidos (120).

A **Equação 1.2.8** foi aplicada em diversas proteínas, proporcionando ajustes com deslocamentos experimentais e diferenças quadráticas médias de aproximadamente 0,25 ppm para $^1\text{H-C}$ e 0,5 ppm para $^1\text{H-N}$. Existem outros métodos que podem oferecer ajustes mais precisos, dependendo da proteína em questão (124). O mau ajuste para H-N possui diversas razões. Os maiores deslocamentos de H-N geralmente decorrem de interações do tipo pontes de hidrogênio. Geralmente, não é possível determinar com precisão quais interações de pontes de hidrogênio são formadas com o solvente, e, até o momento, não há uma abordagem adequada para calcular esse efeito. Em segundo lugar, as pontes de hidrogênio tendem a ser de curto alcance, e o efeito no deslocamento químico H-N acaba sendo substancial. Assim, qualquer variação no deslocamento químico H-N provavelmente está associada a alterações na ponte de hidrogênio (120). Em resumo, em relação aos deslocamentos do próton, esses deslocamentos são predominantemente influenciados por efeitos de corrente de anel e pontes de hidrogênio.

No que diz respeito aos deslocamentos dos núcleos de carbono alfa (C_α) e beta (C_β), semelhantes ao deslocamento do próton, estes resultam da blindagem do núcleo por elétrons. A distinção neste contexto reside no fato de que o carbono possui elétrons distribuídos nos orbitais s e p , cuja hibridização varia conforme a geometria das ligações ao redor do átomo de carbono. Dessa forma, os deslocamentos dos núcleos de carbono são influenciados pelos ângulos diedros. Embora os efeitos de longo alcance mencionados para o próton (^1H) tenham impacto semelhante no carbono, a faixa total de deslocamento do carbono é maior. Além

disso, os átomos de carbono geralmente estão menos expostos à superfície, minimizando interferências de efeitos externos (120).

Os núcleos de C_α e C_β ocupam uma posição central em um aminoácido, resultando em deslocamentos químicos secundários pouco afetados pelos aminoácidos adjacentes. Os efeitos sobre esses deslocamentos são principalmente atribuídos à conformação da cadeia principal do próprio aminoácido, com contribuições menores provenientes da orientação da cadeia lateral e de pontes de hidrogênio nas ligações amida. A conformação da cadeia principal pode contribuir com até aproximadamente 4 ppm para o deslocamento químico, enquanto a conformação da cadeia lateral contribui com até 0,6 ppm e as pontes de hidrogênio com até 0,9 ppm. Isso implica que possíveis efeitos da interação com ligantes nos deslocamentos de C_α e C_β são provavelmente devido a rearranjos estruturais locais, em vez de interações diretas através do espaço (120).

Quanto ao deslocamento do ^{15}N , este é um dos mais complexos de calcular devido a vários fatores influentes. A conformação estrutural da cadeia lateral do aminoácido precedente pode ocasionar deslocamentos de até 22 ppm, sendo que até 8 ppm podem ser atribuídos exclusivamente à conformação da cadeia lateral. Similar aos casos de C_α e C_β , onde há uma contribuição de até 13 ppm dos ângulos diedros da cadeia principal dentro do mesmo aminoácido, para o ^{15}N o ângulo ψ do resíduo anterior também desempenha um papel crucial. Por fim, as pontes de hidrogênio exercem um efeito de até 8 ppm. No entanto, o deslocamento químico de um nitrogênio amida é mais impactado pela ligação de hidrogênio com o grupo carbonila diretamente ligado do que pela ligação de hidrogênio ao próprio nitrogênio amida. Em resumo, diversos fatores contribuem significativamente para as alterações observadas, e cada caso requer uma análise cuidadosa (120).

Num experimento destinado a analisar a interação entre uma proteína P e um ligante L , representada pela equação $P + L \rightleftharpoons PL$, as constantes de velocidade (k_{on} e k_{off}) para as reações direta e inversa desempenham um papel crucial. A constante de dissociação (K_d) é definida como:

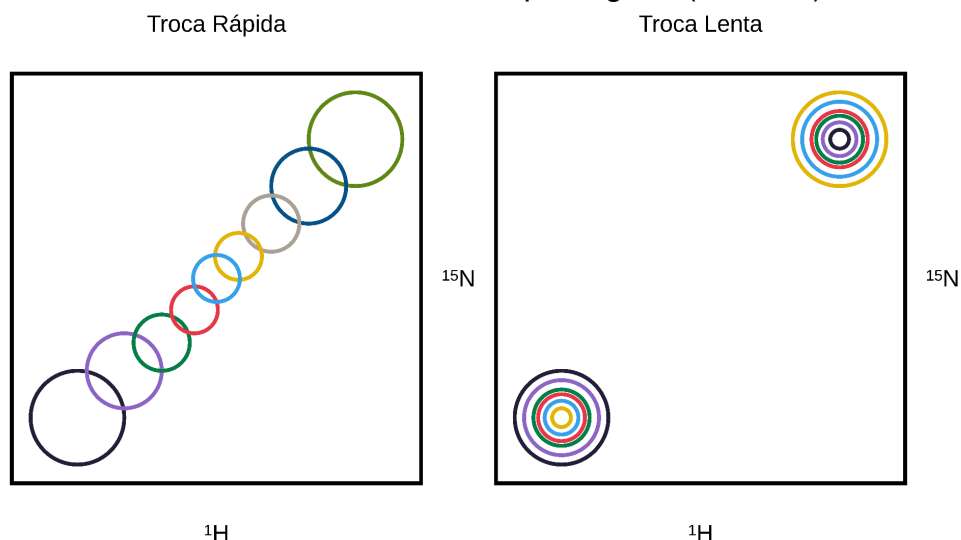
$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (1.2.9)$$

sendo que $[P]$, $[L]$ e $[PL]$ denotam as concentrações de proteína livre, ligante livre e complexo, respectivamente. A constante K_D é interpretada como a concentração de ligante e proteína necessária para saturar o sistema.

Esse equacionamento desempenha um papel crucial nos espectros de RMN durante experimentos de interação. Ao considerar o espectro HSQC de uma proteína durante a titulação com um ligante, a taxa de troca assume importância. Quando a troca é lenta em relação à escala de tempo do deslocamento químico (ou seja, quando k_{off} é significativamente mais lento que a diferença em Hz entre os deslocamentos químicos da proteína livre e ligada), o sinal livre desaparece gradualmente à medida que o ligante é titulado, e o sinal ligado emerge. As intensidades dos picos refletem as concentrações de proteína livre e ligada. Por outro lado, na troca rápida (quando k_{off} é muito maior que a diferença de deslocamento químico), os sinais movem-se suavemente da posição inicial para a posição de sinal ligado. A frequência do sinal em qualquer ponto da titulação é a média ponderada dos deslocamentos livre e ligado (**Figura 1.2.7**). Quando a taxa de troca se assemelha à diferença de deslocamentos, os sinais ampliam-se e deslocam-se simultaneamente (120). Regimes de troca rápida e lenta fornecem uma melhor compreensão da interação entre a proteína e o ligante, identificando quais resíduos estão envolvidos na interação.

Figura 1.2.7: Dependência do Pico de RMN Bidimensional com a Taxa de Troca.

No segmento esquerdo, observa-se o regime de Troca Rápida, onde os picos apresentam transições suaves do estado livre (representado em roxo escuro) para o estado ligado (em verde-azeitona). No segmento direito, encontra-se o regime de Troca Lenta, caracterizado pelo declínio da intensidade do pico livre (roxo escuro) concomitante ao aumento da intensidade do pico ligado (amarelo).



Fonte: Autoria própria.

Para realizar a avaliação dos deslocamentos químicos, conforme a abordagem convencional (considerando um espectro ^{15}N -HSQC), é convencional mensurar as alterações nos deslocamentos químicos em ^1H e ^{15}N em ppm. Posteriormente, procede-se à multiplicação das variações nos deslocamentos de ^{15}N por um fator escalar α predefinido. Em seguida, é efetuado o cálculo da distância euclidiana média.

$$CSP = \sqrt{\frac{1}{2} \left[\delta_H^2 + (\alpha \cdot \delta_N)^2 \right]} \quad (1.2.10)$$

ou de modo geral para vários núcleos:

$$CSP = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\alpha_i \delta_i)^2} \quad (1.2.11)$$

Não há um protocolo normatizado para a aplicação da **Equação 1.2.10**. Conforme já discutido anteriormente, as origens dos deslocamentos ^1H e ^{15}N divergem, sendo que determinadas interações podem ocasionar alterações significativas em um deles sem afetar o outro. Embora seja viável analisar os deslocamentos de ^1H e ^{15}N de forma isolada, para uma investigação mais precisa, é preferível combiná-los. Os valores adotados para o parâmetro α variam entre 0,1 e 0,45 (125–127). Para fundamentar a escolha de um valor específico de α , diversos grupos empregaram a faixa de deslocamento químico para ^1H e ^{15}N como referência. Por exemplo, ao considerar uma taxa de deslocamento ^{15}N da cadeia principal de 22,0 ppm e uma taxa de deslocamento $^1\text{H-N}$ de 3,12 ppm, o valor de α seria calculado como 3,12 dividido por 22,0, resultando em aproximadamente 0,14 (128). Contudo, é importante ressaltar que cada proteína apresenta um α distinto, inexistindo, portanto, uma escala única fundamentada em experimentos. Uma abordagem alternativa consiste em empregar mudanças de deslocamento químico em *Hz*, ao invés de ppm, o que, para dados $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -HSQC, corresponde a $\alpha = 0,1$ (129). Entretanto, carece-se de uma justificativa teórica específica para esse tratamento. Adicionalmente, é possível empregar valores diferenciados de α para cada resíduo de aminoácido. Como exemplificação, observou-se que a propagação do deslocamento químico para a glicina difere dos demais resíduos, validando $\alpha = 0,14$ para a maioria deles, mas $\alpha = 0,2$ para a glicina (128,130,131).

Diante da considerável variabilidade que o parâmetro α pode apresentar, torna-se imprescindível analisar cada situação de maneira individual, adotando o valor mais apropriado de α para o experimento em questão. No contexto desta pesquisa, optou-se por $\alpha = 0,1$, simplificando assim a **Equação 1.2.10** para:

$$d = \sqrt{\frac{1}{2} \left[\delta_H^2 + \frac{1}{10} \delta_N^2 \right]} \quad (1.2.12)$$

sendo que δ_H e δ_N representam as perturbações no deslocamento químico (em ppm) dos núcleos de hidrogênio (H) e nitrogênio (N), respectivamente.

2.2.2. DOCKING MOLECULAR

A biologia molecular e as ciências genômicas têm desempenhado um papel significativo na investigação relacionada a medicamentos, química, farmacologia e ciências clínicas, com o objetivo de impulsionar o avanço e o desenvolvimento da medicina. A descoberta e o desenvolvimento de medicamentos são processos intrinsecamente complexos e exigentes. Como resultado, a aplicação de recursos computacionais no domínio químico e biológico está sendo extensivamente explorada por meio de pesquisas abrangentes. O *docking* molecular, um método computacional e procedimento de simulação, é utilizado para examinar o reconhecimento molecular, interação molecular e conformação de um complexo receptor-ligante. Geralmente, a proteína ou ácido nucleico desempenha o papel de receptor, enquanto o ligante pode ser outra proteína ou uma molécula pequena, como a cumarina, a aspirina e o metamizol (dipirona). Recentemente, o *docking* também tem sido empregado na previsão do modo de ligação entre duas macromoléculas, como no caso do docking proteína-proteína (132).

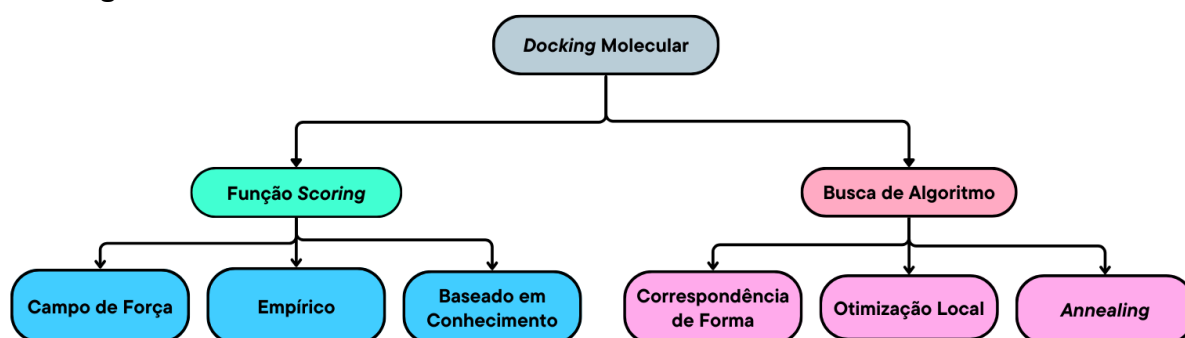
A descoberta de medicamentos auxiliada por computador visa acelerar os processos de identificação de compostos promissores, seleção e otimização de líderes, bem como análise da absorção, distribuição, metabolismo, excreção e perfil de toxicidade (ADMET) para um composto que demonstre maior potencial para se tornar um novo medicamento. Ferramentas de bioinformática, em conjunto com as ciências genômicas, proporcionam uma compreensão mais profunda da base genética de doenças multifatoriais. Essas abordagens revelam alvos mais apropriados para o *design* de futuros medicamentos, ampliando assim as opções terapêuticas. Para validar os dados experimentais, simulações de *docking* molecular são frequentemente empregadas, envolvendo algoritmos que comparam as conformações proteína-ligante *in silico* com a estrutura do complexo proteína-ligante obtida por cristalografia de raios X ou RMN. Alvos potenciais de medicamentos e milhares de estruturas proteicas encontram-se acessíveis em bancos de dados estruturais como o *Protein Data Bank* (PDB) e o *Worldwide Protein Data Bank* (wwPDB) (132,133).

Dados tridimensionais experimentais de estrutura e afinidade desempenham um papel crucial como fonte de informação para o desenvolvimento e validação de algoritmos de *docking*. Atualmente, a mecânica molecular serve como base para a

maioria dos programas de *docking*, descrevendo sistemas poliatômicos por meio da física clássica. Campos de força molecular, como o *Assisted Model Building and Energy Refinement* (AMBER), *Groningen Molecular Simulation* (GROMOS), *Merck Molecular Force Field 94* (MMFF), *Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics* (CHARMM) e *Universal Force Field* (UFF), são exemplos proeminentes (133). No contexto da ligação proteína-ligante, duas metodologias gerais foram desenvolvidas: (1) a abordagem de corpo rígido, relacionada ao modelo clássico de Emil Fischer, onde ligante e receptor são considerados como entidades independentes que se reconhecem mutuamente com base em forma e volume; (2) a abordagem de *docking* flexível, que considera um efeito recíproco do reconhecimento proteína-ligante na conformação de cada parte (133,134).

O procedimento de *docking* pode ser fragmentado em três etapas primordiais: (1) a preparação do ligante e da macromolécula, na qual é realizada com base em campos de força que possibilitam a representação de superfícies e cavidades como potenciais sítios de ligação para o ligante; (2) a determinação do tipo de acoplamento, seja ele rígido ou flexível; e (3) a definição da estratégia de busca para conformações do ligante, podendo ser sistemática ou estocástica, conforme descrito por *Guedes et al.* (135). Na **Figura 1.2.8**, são destacadas distintas funções de pontuação e algoritmos de busca aplicados no contexto do acoplamento molecular.

Figura 1.2.8: Algoritmos de pesquisa e métricas de pontuação empregados em *docking* molecular.



Fonte: Figura adaptada da referência (133).

A seleção e preparação de proteínas e ligantes constituem processos cruciais em qualquer cálculo científico. O primeiro passo consiste em obter uma estrutura tridimensional da proteína com alta resolução. A atribuição de diversos parâmetros para o *docking* implica a escolha do método de parametrização, que varia de acordo

com o *software* utilizado. Por exemplo, tanto o AutoDock (136) quanto o SwissDock (137) empregam um campo de força interno, enquanto o MOE (138) e o LeDock (139) utilizam cargas e tipos de átomos AMBER (140) e CHARMM (141), respectivamente. Portanto, é essencial aplicar o mesmo protocolo de preparação em todas as análises de acoplamento. No que se refere à preparação do ligante, o primeiro passo frequentemente envolve a extração deste da estrutura da proteína (por exemplo, de repositórios públicos como PubChem, síntese orgânica ou compostos virtuais) ou a construção da molécula a partir do seu formato simplificado de entrada de linha molecular (SMILES) ou esboço da molécula. Este processo inclui diversas otimizações, como geometria e/ou atribuição de carga, utilizando métodos *ab initio* ou semi empíricos, bem como a minimização de energia ou busca conformacional/tautomérica (134,135).

Proteínas podem ser preparadas de maneira análoga às estruturas mencionadas, sendo que a otimização complexa e a utilização de parâmetros detalhados contribuem significativamente para aprimorar os resultados e a modelagem das interações. Após a preparação tanto do ligante quanto da proteína, é necessário selecionar e delimitar o sítio de ligação. Este processo pode ser realizado manualmente, com a especificação das coordenadas, ou automaticamente, fazendo uso das coordenadas de qualquer ligante previamente vinculado. Além disso, alguns programas possuem a capacidade de calcular cavidades ou sítios de ligação prováveis, o que se revela especialmente útil em situações em que o sítio de ligação não é previamente conhecido. Adicionalmente, certos programas podem realizar o chamado "*docking* às cegas", onde o espaço de busca abrange toda a macromolécula. O mapeamento do sítio de ligação é conduzido através da metodologia *GRID*, sendo que estudos indicam a influência do tamanho da caixa na identificação de *hits* e no tempo de triagem virtual. Exemplos de programas que requerem o pré-cálculo do *GRID* para o *docking* molecular incluem AutoDock e AutoDock Vina (132,135).

A definição de parâmetros distintos, como a geração do tamanho da caixa de *GRID*, intervalo de energia e exaustividade, configura uma tarefa fundamental e essencial antes da execução do *docking* molecular. Nesse contexto, é possível gerar o tamanho da caixa de *GRID* com base nos resíduos de aminoácidos localizados na cavidade do sítio de ligação, propiciando uma pontuação e previsão precisas da natureza da ligação do ligante. Adicionalmente, a definição do intervalo de energia e

exaustividade, especialmente no caso do AutoDock Vina, revela-se útil para investigar a conformação correta com uma probabilidade substancial (133).

Na problemática do *docking* de moléculas rígidas, referimo-nos a estas moléculas como corpos rígidos, incapazes de alterar a sua forma espacial tridimensional durante o processo de *docking*. Em contraste, no *docking* flexível, as moléculas possuem a flexibilidade de se rearranjar dentro de uma região definida em resposta ao receptor. Após a ligação do ligante, a flexibilidade no receptor pode variar desde pequenas reorganizações nas cadeias laterais até rearranjos em larga escala na estrutura principal. O *docking* rígido contribui para o desenvolvimento de diversos conceitos computacionais que desempenham papéis cruciais no *docking* flexível e no design: (a) descritores de forma, (b) minimização local, (c) potenciais suaves, (d) avaliação de energia baseada em *GRID* e (e) técnicas de múltiplas cópias (132,133,135).

A interação molecular engloba diversos algoritmos de busca, como os fundamentados em fragmentação, algoritmo genético, Monte Carlo e algoritmos dinâmicos. Ferramentas essenciais, a exemplo de FlexX, DOCK, GOLD e mecânica de coordenadas internas (ICM), são empregadas de maneira específica para simulações de acoplamento de alta eficiência. Conforme os propósitos das simulações de acoplamento, os diferentes procedimentos moleculares abrangem uma abordagem de acoplamento rígido ou flexível. A suavização do potencial de interação consiste na alteração dos parâmetros de interação, incluindo o potencial de Lennard-Jones (132). Os algoritmos de *docking* desempenham um papel fundamental no processo de conformação e posicionamento de ligantes, desencadeando uma busca conformacional que pode ser sistemática ou aleatória, seguida pela seleção da solução ótima por meio de uma função de pontuação. Na busca sistemática, os conformadores são avaliados individualmente, cobrindo uma ampla gama de conformações por meio da manipulação de parâmetros estruturais. Já na busca estocástica, a geração de conformações ocorre aleatoriamente, utilizando-se dois algoritmos distintos: o Método de Monte Carlo (MC) ou os algoritmos genéticos (GA). Cada um desses métodos gera conformações diversas, baseando-se em rotações de ligações como graus de liberdade. Posteriormente, as estruturas resultantes são submetidas à função *scoring*, que realiza a seleção e filtragem das poses mais adequadas (132,134).

As funções *scoring* desempenham um papel crucial na discriminação entre diferentes soluções, ao avaliarem uma ampla gama de propriedades, que incluem, mas não se limitam a, interações intermoleculares, efeitos de solvatação, efeitos eletrostáticos e entrópicos. Tais funções podem ser categorizadas como baseadas em campo de força, empíricas e baseadas no conhecimento. Do ponto de vista do desempenho operacional, dois aspectos teóricos da função de pontuação merecem destaque. O primeiro aspecto refere-se ao grau em que uma função *scoring* apresenta um extremo global dentro do contexto da pose do ligante no local apropriado. Em seguida, o segundo aspecto aborda o quanto a magnitude da função no referido extremo é precisa. Essa função tem a capacidade de prever a afinidade de ligação absoluta entre a proteína e o ligante. Uma função *scoring* ideal seria aquela que classifica o modo de ligação experimentalmente determinado como o mais elevado. Uma vez que o modo de ligação do ligante tenha sido identificado, o mapa de interação resultante pode ser empregado para compreender as modificações necessárias no ligante, visando alcançar uma afinidade de ligação aprimorada. Além disso, tal abordagem pode contribuir para a representação precisa de todas as modificações, como inserções, extensões, deleções e substituições (134,135).

Os conceitos subjacentes à função *scoring* abrangem terminologias específicas, como complementaridade hidrofóbica, complementaridade polar e entropia. Quatro equações fundamentais, referentes ao *score* estérico, *score* polar, *score* de repulsão polar e *score* de entropia, são empregadas para definir essa função essencial. As variáveis envolvidas na determinação do *score* estérico e *score* polar têm sua base na distância superficial de Van der Waals entre pares de átomos acoplados. Tal determinação inclui informações acerca do estado dos átomos, se são doadores ou aceitadores de ligações de hidrogênio, carga e tipo de elemento. As interações polar e hidrofóbica são influenciadas pela distância e caracterizadas por termos sigmoidais gaussianos. O termo de repulsão polar, por sua vez, quantifica a penalidade decorrente da proximidade de átomos com polaridades semelhantes, sendo sua intensidade ajustada conforme a orientação relativa. O componente entrópico da função de pontuação codifica os graus de liberdade perdidos pelo ligante em termos de rotação e translação durante a formação da ligação. Dessa maneira, a abordagem científica adotada neste contexto busca uma compreensão detalhada das interações moleculares, utilizando parâmetros

criteriosamente definidos e equações específicas para quantificar diferentes aspectos do processo (133,135).

Em resumo, a aplicação de métodos computacionais, como o *docking* molecular, desempenha uma função crucial no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, proporcionando uma compreensão detalhada das interações moleculares no contexto da biologia molecular e ciências genômicas. A integração de recursos computacionais no estudo da ligação proteína-ligante, aliada a dados experimentais e técnicas de bioinformática, contribui para acelerar os processos de identificação de compostos promissores, seleção de lideranças e análise de propriedades farmacológicas.

A diversidade de algoritmos, métodos e ferramentas empregados no *docking* molecular reflete a complexidade das interações moleculares envolvidas, possibilitando avanços significativos na compreensão das bases genéticas de doenças multifatoriais e no *design* de fármacos mais eficazes. Nesse contexto, a conjugação de dados tridimensionais experimentais e simulações computacionais proporciona uma abordagem abrangente e integrada, potencializando estratégias de pesquisa e fomentando inovações na busca por terapias mais eficientes e personalizadas.

2.2.3. DINÂMICA MOLECULAR

Até o momento, não é possível antecipar com exatidão a dinâmica conformacional biomolecular detalhada *in vitro*. Técnicas como a cristalografia de raios-X (X-ray), a ressonância magnética nuclear (RMN) e os métodos recentes de criomicroscopia eletrônica (cryo-EM) têm proporcionado avanços na área da biologia estrutural (142–144). No entanto, subsiste uma lacuna notável entre o número de sequências de proteínas disponíveis e as estruturas proteicas conhecidas. Até 02/02/2024, o *Protein Data Bank* (PDB) registra apenas 186.574 estruturas proteicas, evidenciando que somente uma pequena fração das sequências totais possui estruturas conhecidas. As estatísticas do PDB, em 02/02/2024, são detalhadas na **Tabela 1.2.2**.

Tabela 1.2.2: Estatísticas do *Protein Data Bank*. Número de estruturas de proteínas registradas no PDB, com data referente a 02/02/2024 (145).

Método	Quantidade de Estruturas
X-ray	161.509
cryo-EM	12.533
RMN	12.333
Múltiplos Métodos	199
Total	186.574

Fonte: Adaptado da referência (145).

A maioria dos métodos experimentais em laboratório fornece informações estruturais de proteínas em forma estática, enquanto na prática as proteínas são altamente dinâmicas (133). O *docking* molecular fornece apenas uma pose estática e não consegue ilustrar a dinâmica do complexo proteína-ligante. Além da previsão do comportamento dinâmico de sistemas biológicos, simulações de dinâmica molecular também podem auxiliar na exploração do comportamento cinético e na montagem de moléculas em nível atômico. A dinâmica conformacional em proteínas abrange grandes intervalos tanto em magnitude quanto em escala de tempo, e devido às mudanças conformacionais, as proteínas podem desempenhar funções diversas, incluindo atuar como transportadores, moléculas sinalizadoras, sensores e efetores mecânicos, além de interagir com substratos, medicamentos e hormônios por meio de mudanças conformacionais. A dinâmica estrutural nas conformações proteicas é rápida, abrangendo uma magnitude de 10^{-11} a 10^{-6} m, dentro de uma escala de tempo entre 10^{-12} s e 10^5 s. Os movimentos locais, como os movimentos de alça e de cadeia lateral, levam de 10^{-15} s a 10^{-1} s para serem concluídos, enquanto os movimentos de hélice, domínio e subunidade levam de 10^{-9} s a 1 s. Processos como transições hélice-alça, associação/dissociação e enovelamento/desenovelamento se enquadram em movimentos em larga escala e podem levar de 10^{-7} s a 10^4 s para serem concluídos. Na prática, é desafiador estudar tais mudanças, pois ocorrem em um tempo muito curto. No entanto, ao simular computacionalmente as condições *in vivo*, esses processos podem ser examinados, visualizados e analisados (146).

Na simulação de Dinâmica Molecular (DM), uma molécula pode ser concebida como uma sucessão de pontos carregados (átomos) interligados por molas

(ligações). Para descrever a evolução temporal dos comprimentos de ligação, ângulos de ligação, torções e também as interações não ligadas entre átomos, emprega-se o conceito de campo de força. No contexto da simulação de DM, cria-se um ambiente semelhante ao *in vivo* por meio da incorporação de moléculas de proteína e água. Os átomos de proteína e água são submetidos a deslocamentos em um curto intervalo de tempo, da ordem de femtossegundos, durante os quais as forças atuantes em cada átomo são calculadas e registradas em um arquivo, utilizando um campo de força específico. Este campo de força consiste em uma compilação de equações e constantes associadas, englobando as funções de energia potencial com termos referentes a ligações e não ligações. Ele reproduz a geometria molecular e determinadas propriedades de estruturas de referência. A primeira simulação de DM de macromoléculas biológicas foi conduzida por Cammon et al. em 1977 (147), abordando inibidores de tripsina pancreática bovina e estendendo-se por 9,2 picossegundos. Antes dos avanços significativos na área de simulações de DM, fenômenos experimentais, como a troca de ligações de hidrogênio, já eram objeto de estudo. Naquela época, investigou-se o papel do fator térmico (B) nos movimentos internos de proteínas (148).

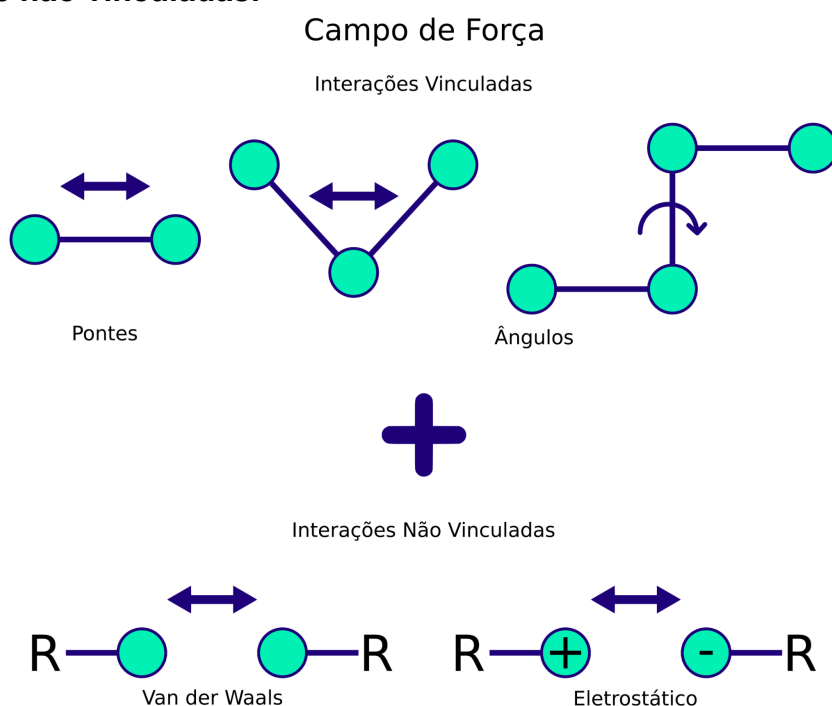
A partir dos dados provenientes das simulações de DM, é possível deduzir e calcular os Componentes Principais (CPs), realizando, assim, sua análise. Os CPs calculados são organizados com base em suas contribuições para a flutuação total no conjunto de conformações. Movimentos globais e correlacionados podem ser previstos utilizando tais dados. Além disso, a simulação de DM oferece informações sobre a flexibilidade conformacional de macromoléculas, contribuindo para a compreensão de resultados experimentais, tais como análise de despolarização de fluorescência, dinâmica de parâmetros de Ressonância Magnética Nuclear e o impacto de solventes e temperatura na estabilidade de proteínas. O *annealing* simulado emerge como uma abordagem amplamente empregada para o refinamento de estruturas obtidas por difração de raios-X e para a determinação de estruturas via RMN (133,146).

2.2.3.1. Princípios da Dinâmica Molecular

O fundamento subjacente à simulação de Dinâmica Molecular (DM) repousa na aplicação da lei de Newton à mecânica molecular. No âmbito do estudo

computacional da dinâmica biomolecular, a simulação de DM emerge como a técnica preeminente. Nesse contexto, a interação entre átomos e moléculas é minuciosamente examinada ao longo de um intervalo temporal, mediante a utilização de aproximações de atributos físicos conhecidos. É notável o avanço significativo alcançado na simulação de biomoléculas. Atualmente, temos a capacidade de analisar o movimento atômico, a conformação das cadeias laterais de resíduos, além de prever a estrutura secundária e os domínios de uma proteína. Da mesma forma, é possível antecipar o padrão de ligação de ácidos nucleicos e membranas lipídicas. A simulação de DM possibilita, ainda, a previsão da energia livre de ligação e das mudanças conformacionais nos sistemas, fundamentando-se nos princípios da mecânica estatística. Essa abordagem tem sido extensivamente aplicada no campo do *design* de medicamentos. Através do emprego de um campo de força, realiza-se o cálculo do deslocamento das partículas e dos valores de energia em cada passo temporal, viabilizando a determinação da nova posição dos átomos. No contexto da simulação de DM clássica, são incorporadas as contribuições ligadas (ângulos e ligações atômicas) e não ligadas no campo de força, sendo tratadas como funções de energia (**Figura 1.2.9**) (148,149).

Figura 1.2.9: Os elementos de um campo de força, que denotam interações vinculadas e não vinculadas.



Fonte: Autoria própria.

As contribuições subsequentes são predominantemente originadas pela interação de van der Waals, fundamentada no potencial Lennard-Jones. A lei de Coulomb é empregada para calcular a interação eletrostática. Diversos algoritmos envolvendo simulações de Monte Carlo, dinâmica de Langevin e dinâmica molecular, cada um com suas particularidades e vantagens correspondentes, têm sido documentados. Os parâmetros do campo de força proposto e as equações associadas são meticulosamente ajustados, possibilitando a reprodução precisa de dados provenientes de cálculos e/ou experimentos de ordens superiores. A maioria das biomoléculas, abrangendo proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e açúcares, encontra-se devidamente parametrizada no campo de força para aplicações gerais. Os parâmetros do campo de força para novos ligantes podem ser determinados por meio de abordagens de química quântica, em conjunto com serviços online, tais como *PRODRG*, *ATP topology builder* e *SwissParam*, os quais são capazes de gerar a topologia do ligante. Os comprimentos de ligação, ângulos diédricos de ligação, ângulos de valência de ligação e interações não vinculadas, como van der Waals e interações eletrostáticas, contribuem para a energia total dos sistemas. Diversos campos de força, como *AMBER*, *GROMOS* e *CHARMM*, foram desenvolvidos, cada qual apresentando propriedades únicas. A escolha do campo de força é determinada pelo usuário, alinhada com os objetivos específicos do estudo. Uma vez estabelecidos o campo de força e a solvatação das proteínas em uma simulação de dinâmica molecular, diversos parâmetros adicionais são definidos pelos usuários, conforme detalhado a seguir (149,150).

2.2.3.2. Condições Periódicas de Contorno

A condição periódica de contorno (PBC) constitui uma abordagem pela qual se torna possível estabelecer um conjunto de diretrizes para delimitar uma caixa de simulação, de modo a restringir o deslocamento dos átomos dentro dos limites definidos durante as simulações de Dinâmica Molecular. No caso em que o usuário não delimita a PBC, a caixa de simulação é replicada infinitamente em todas as direções, resultando na formação de uma rede cristalina. Para otimização da eficiência computacional, a maioria das simulações de DM adota essa condição. Cada partícula interage com imagens adjacentes de outras partículas em todos esses esquemas de corte. As interações de longo alcance são calculadas no

contexto da modelagem e simulação molecular através do método de soma periódica isotrópica (IPS). Quatro vantagens notáveis do emprego dos métodos IPS incluem: (1) eliminação de artefatos de simetria desnecessários, originados na condição de PBC, (2) aplicação a qualquer forma funcional do potencial, (3) facilidade de implementação em sistemas computacionais multiprocessadores paralelizados, denotando uma eficiência computacional aprimorada, e (4) estimativa precisa do coeficiente de auto-difusão em um raio de corte superior a 2,2 nm. Nesse contexto, as interações de longo alcance são calculadas com base na homogeneidade dos sistemas de simulação no método IPS. Tais interações são representadas por meio de interações com imagens do IPS de uma região local definida, podendo ser reduzidas a potenciais do IPS de curto alcance (148,149).

2.2.3.3. Termostato e Modelos de Solventes

A simulação biomolecular por dinâmica molecular envolve a utilização de diversos procedimentos termostáticos no contexto do sistema de simulação. Esses procedimentos são aplicados para inserção e retirada de energia das fronteiras, seguindo uma abordagem comparativamente racional com o objetivo de se aproximar do *ensemble* clássico. No *ensemble* canônico, são preservadas grandezas físicas como o número de partículas (N), o volume constante (V) e a temperatura estabelecida (T). Um método termostático específico destaca-se pela ocorrência de transferência de energia entre processos endotérmicos e exotérmicos. Esta abordagem é fundamental para manter as condições do ensemble canônico durante a simulação. Além disso, para garantir um ambiente realista, a simulação incorpora moléculas explícitas de água. Essas moléculas são representadas por modelos de solvente, como SPC/E, TIP3P, TIP4P e TIP5P, todos minuciosamente otimizados para reproduzir propriedades físicas específicas da água, como anomalia de densidade, difusividade e função de distribuição radial. Essa escolha de modelos de água visa reproduzir fielmente o ambiente celular na simulação biomolecular por dinâmica molecular (150).

2.2.3.4. Minimização de Energia em Simulações de Dinâmica Molecular

Diversas abordagens de minimização de energia são empregadas na análise de dados estruturais provenientes da Dinâmica Molecular. A utilização de métodos de busca em GRID viabiliza a identificação de regiões de baixa energia por meio da aplicação da função de energia no método de ordem zero. No contexto de funções de energia dependentes do gradiente, as técnicas de primeira derivada compreendem o método do gradiente conjugado e o método do declive mais íngreme. Por outro lado, o algoritmo de Newton-Raphson, um método de segunda derivada, emprega a função Hessiana para localizar os mínimos de energia (150,151).

Os dois principais métodos de minimização de energia são o método do declive mais íngreme e o método do algoritmo do gradiente conjugado. O método do declive mais íngreme é amplamente empregado para remover contatos indesejados e corrigir geometrias inadequadas. Notavelmente útil quando o sistema molecular está distante do estado de energia mínimo, este método direciona-se para a inclinação mais acentuada na superfície de energia potencial, resultando em alterações estruturais mínimas. O gradiente é calculado a partir da posição inicial, movendo-se em direção oposta para atingir o estado mínimo. O processo, repetido para todos os átomos, conduz a uma nova posição descendente na superfície de energia, seguindo passos perpendiculares entre si. Este procedimento ocorre em incrementos pequenos até que uma condição de valor de limiar pré-determinado seja alcançada (151).

O método do declive mais íngreme serve como uma execução inicial, seguido por uma subsequente minimização. Por sua vez, o método do algoritmo do gradiente conjugado constitui uma abordagem de minimização de energia de ordem primária. Diferenciando-se do método do declive mais íngreme, este método converge mais rapidamente ao calcular a direção de busca com base no histórico de minimização. A taxa de mudança da primeira derivada da energia total em relação às posições atômicas é expressa em unidades de gradiente ($\text{kcal.mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$). Múltiplas direções são geradas para superar oscilações nos vales estreitos do método do declive mais íngreme. Em cada etapa, o cálculo do gradiente é realizado para prever a nova direção, tornando-se crucial para sistemas maiores, apesar do maior espaço de armazenamento e esforços computacionais necessários. A eficiência na convergência para o mínimo compensa o custo computacional e o tempo prolongado por iteração (146,150).

É importante destacar que existem vários procedimentos de minimização para estruturas moleculares, sendo os minimizadores não baseados em gradiente avaliados por meio de aumentos na energia e nas coordenadas. Todos os minimizadores baseados em gradiente utilizam gradientes atômicos.

2.2.3.5. Análises RMSD e RMSF

A simulação de dinâmica molecular produz um conjunto de dados na forma de uma trajetória, a qual registra os parâmetros gerados durante cada movimento dos átomos em cada fase da simulação. Diversos parâmetros estruturais, como o RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) e o RMSF (*Root-Mean-Square Fluctuation*), podem ser empregados na análise dos resultados obtidos.

O RMSD destaca-se como o parâmetro primordial e inicial na análise de trajetórias em Dinâmica Molecular. Essencial para avaliar a evolução estrutural de uma proteína desde sua conformação inicial até sua posição final, o RMSD torna-se instrumental na mensuração das disparidades ocorridas ao longo da simulação. A estabilidade da proteína, relacionada à sua conformação, pode ser discernida através das variações manifestadas durante o processo de Dinâmica Molecular. O cálculo do RMSD é executado em relação à conformação nativa de referência (r_{ref}), empregando a seguinte equação:

$$RMSD(t) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i |r_i(t) - r_i^{ref}|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1.2.13)$$

em que $M = \sum m_i$ e $r_i(t)$ denotam o átomo na posição i no instante temporal t , após a aplicação do método dos quadrados mínimos para ajuste da estrutura em relação a uma estrutura de referência, torna-se possível calcular o RMSD para todos os resíduos, *backbone*, a cadeia lateral e os átomos C α . O cálculo do RMSD é realizado em relação ao tempo de simulação, sendo que desvios menores indicam uma estrutura de proteína mais estável, e vice-versa. Em linhas gerais, é desejável que o valor de RMSD para uma macromolécula seja inferior a 2 Å, a fim de obter dados significativos (152).

O RMSF constitui a abordagem mais eficaz para analisar a flutuação dos resíduos de uma proteína ao longo da trajetória de Dinâmica Molecular. Essa métrica descreve minuciosamente a variação de cada resíduo ou domínio presente na estrutura proteica. Graficamente, o RMSF pode ser apresentado como a relação entre RMSF (Å) e o número do resíduo correspondente. A determinação do RMSF de uma proteína baseia-se na disparidade entre a posição da partícula i e sua posição de referência, onde T representa o tempo e r_i^{ref} denota a posição de referência da partícula i .

$$RMSF_i = \left[\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T \left| r_i(t_j) - r_i^{ref} \right|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1.2.14)$$

A exploração das estruturas biológicas por meio de simulações de Dinâmica Molecular proporciona uma perspectiva minuciosa e dinâmica dos sistemas moleculares, permitindo a apreensão das interações atômicas e dos rearranjos estruturais ao longo do tempo. No presente estudo, constatamos que as estruturas de natureza organizada e rígida, exemplificadas por α -hélices e folhas- β , demonstram baixos valores de RMSF, evidenciando a estabilidade dessas regiões moleculares. Em contrapartida, estruturas mais flexíveis, como as alças, apresentam valores de RMSF mais elevados, indicando uma flutuação maior dos átomos e, por conseguinte, uma dinâmica conformacional mais intensa (152).

A integração dos dados provenientes de simulações de Dinâmica Molecular com experimentos de Ressonância Magnética Nuclear é de suma importância para a elaboração de modelos confiáveis e abrangentes dos sistemas biológicos sob investigação. Tal sinergia entre abordagens experimentais e computacionais viabiliza uma compreensão mais abrangente das propriedades estruturais e dinâmicas das macromoléculas.

Ademais, as simulações de Dinâmica Molecular têm o potencial de orientar o planejamento de futuros experimentos, identificando conformações ou complexos mais prováveis que merecem uma investigação experimental mais aprofundada. Esse direcionamento não apenas otimiza os recursos disponíveis, reduzindo os custos associados aos experimentos, mas também focaliza os esforços em áreas de

maior relevância biológica, maximizando, assim, o impacto das pesquisas realizadas.

Portanto, ao integrar os dados gerados pela Dinâmica Molecular com experimentos em laboratório, é possível obter uma compreensão mais ampla e detalhada dos sistemas biológicos, impulsionando, dessa forma, o avanço do conhecimento científico e o desenvolvimento de terapias mais eficazes e precisas.

2.3. OBJETIVOS

É de conhecimento que a proteína GRB2 desempenha uma função crucial como reguladora em vias de sinalização no citosol (70). Contudo, descobertas recentes revelaram um papel significativo da GRB2 nas vias de reparo de DNA, onde interage com a proteína MRE11 para direcionar o complexo MRN ao DNA danificado e desempenhar suas funções (47). Esta interação ocorre por meio do domínio SH2 da proteína GRB2. Desta forma, o presente estudo visa obter informações estruturais sobre a interação entre o domínio GRB2-SH2 e fosfopeptídeos derivados da proteína MRE11. Além disso, investigamos a interação entre peptídeos não fosforilados derivados da proteína MRE11 e o domínio GRB2-SH2 como controle, buscando identificar possíveis diferenças entre os peptídeos fosforilados e não fosforilados. Também analisamos a interação entre o domínio GRB2-SH2 e fosfopeptídeos derivados da histona H2AX, uma vez que a H2AX apresenta tirosina fosforilada na via de reparo de DNA e o domínio GRB2-SH2 tem afinidade por tirosinas fosforiladas. Tais informações são cruciais para fazer uma caracterização compreensiva a respeito da adaptação da proteína GRB2 no contexto da via de reparo de DNA.

2.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

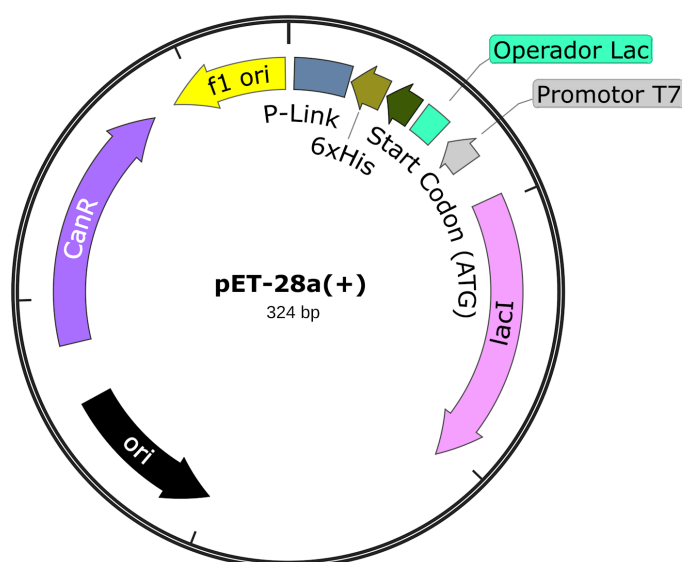
- ❖ Realizar a clonagem e expressão do domínio GRB2-SH2 em *E.coli*;
- ❖ Purificar o domínio GRB2-SH2;
- ❖ Analisar a interação entre o domínio GRB2-SH2 e peptídeos (fosforilados e não fosforilados) derivados de MRE11 por meio de RMN;
- ❖ Realizar *docking* e dinâmica molecular entre o domínio GRB2-SH2 e os peptídeos de MRE11 para inferir o mecanismo de interação;
- ❖ Analisar a interação entre o domínio GRB2-SH2 e o fosfopeptídeo derivado de H2AX através de RMN;
- ❖ Realizar *docking* e dinâmica molecular entre o domínio GRB2-SH2 e os fosfopeptídeos de H2AX para inferir o mecanismo de interação.

2.4. METODOLOGIA

2.4.1. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO

O gene de interesse foi clonado no vetor de expressão pertencente à série pET (GenScript): pET-28a(+). Os vetores pertencentes à série pET são plasmídeos que possibilitam uma eficiente produção em larga escala da proteína de interesse. Esses plasmídeos contêm componentes fundamentais, como o gene *lac1*, responsável pela codificação da proteína repressora *lac*; o promotor *T7*, específico para a *T7* RNA polimerase; o operador *lac*, utilizado para reprimir a transcrição; um sítio de policlonagem; um sítio *f1* de origem de replicação; e um gene de resistência a um antibiótico (153), sendo a canamicina neste plasmídeo em particular (**Figura 1.4.1**).

Figura 1.4.1: Diagrama do vetor pET-28a(+). O plasmídeo incorpora o gene conferidor de resistência à canamicina (coloração púrpura), o gene *lac1* (tonalidade rosa), o promotor de transcrição *T7* (coloração cinza), a região do operador *lac* (matiz aquamarina), um sítio de policlonagem (coloração marrom) e uma *tag* de 6xHis (nuance ocre).



Fonte: Autoria própria.

O gene é replicado no local de policlonagem. Uma característica fundamental do sistema de expressão pET reside no fato de que a transcrição do gene de interesse não se realiza a menos que esteja presente a *T7* RNA polimerase. Dado que os procariotos não sintetizam esse RNA, torna-se necessário introduzi-lo

no plasmídeo. Em geral, esses plasmídeos são inseridos em bactérias previamente modificadas geneticamente, as quais possuem em seu sistema o promotor *lac*, o gene *T7* RNA polimerase e o operador *lac*. Quando o IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) está presente no interior da célula, ocorre a ativação da *T7* RNA polimerase, iniciando assim o processo de expressão da proteína de interesse. Comumente, para plasmídeos do tipo pET, utiliza-se a célula hospedeira *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Na construção adquirida, o gene codificador da enzima é precedido por uma sequência codificadora que viabiliza a expressão do domínio fusionado a uma cauda de seis histidinas (6xHis) na região N-terminal, facilitando assim o processo de purificação.

2.4.2. TRANSFORMAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE EM CÉLULAS DE ESCHERICHIA COLI LINHAGEM DH5 α

O plasmídeo recombinante, identificado como vetor pET-28a(+), que contém a codificação para o domínio GRB2-SH2, foi adquirido por intermédio da empresa FastBio e sintetizado pela empresa GenScript.

A introdução do plasmídeo recombinante ocorreu por meio da transformação de células competentes de *E.coli* da linhagem DH5 α , utilizando-se um método químico conforme delineado no protocolo apresentado no **Anexo A**. Essa etapa teve como objetivo amplificar a quantidade do plasmídeo recombinante. Para tal, 2 μ l do plasmídeo foram incubados nas células competentes durante 30 minutos, mantendo-se em condições de gelo. Após esse período, realizou-se um choque térmico a 42 °C por 30 segundos, seguido por um resfriamento em gelo por 2 minutos. Posteriormente, procedeu-se à adição de 300 μ l de meio de cultura líquido LB (*Luria-Bertani* - L3022 Sigma-Aldrich®), seguido de incubação a 37 °C, sob agitação a 90 rpm, por uma hora. Em seguida, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm por um minuto, descartando-se o sobrenadante e ressuspensando o *pellet* em 20 μ l de meio LB líquido. Essa solução foi então adicionada a uma placa de *Petri* contendo meio de cultura LB sólido acrescido de antibiótico canamicina. A placa foi incubada *overnight* a 37 °C, e subsequentemente, colônias foram selecionadas para o isolamento do plasmídeo. O plasmídeo foi purificado a partir das colônias selecionadas utilizando o *kit* GenCatch™ *Plasmid DNA Mini-Prep*,

seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, conforme detalhado no **Anexo B**.

2.4.3. TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *ESCHERICHIA COLI* LINHAGEM BL21 (DE3)

Para possibilitar o início do processo de expressão e purificação do domínio GRB2-SH2, foi necessário realizar a transferência do DNA plasmidial para células quimicamente competentes da linhagem BL21 (DE3) de *E.coli*.

O procedimento iniciou-se com a incubação de 4 µl do plasmídeo juntamente com células competentes, mantidas em gelo por um período de 30 minutos. Após essa etapa, aplicou-se um choque térmico a 42 °C, com duração de 45 segundos, seguido por retorno imediato ao gelo por dois minutos. Posteriormente, foram adicionados 300 µl de meio de cultura líquido LB, seguido de incubação por uma hora a 37 °C, sob agitação constante a 100 rpm. Concluída a incubação, a amostra foi submetida a uma centrifugação de 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante resultante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensionado em 15 µl de meio de cultura LB líquido. Esta suspensão foi então inoculada em uma placa de *Petri* contendo meio de cultura LB sólido acrescido do antibiótico canamicina (50 mg/ml). A placa foi incubada por um período de 14 horas a 37 °C. Ao término deste período, duas colônias bacterianas foram selecionadas para a subsequente expressão do domínio GRB2-SH2.

2.4.4. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO ¹⁵N-GRB2-SH2

As colônias foram ressuspensionadas em 50 ml de meio de cultura LB líquido contendo 50 µl do antibiótico de resistência canamicina (50 mg/ml) e incubadas a 37 °C por 14 horas sob agitação a 100 rpm. Após a incubação, adicionou-se 30 ml da cultura de bactérias cultivadas em 200 ml de pré-meio-mínimo de cultura M9 (**Anexo G**), com uma densidade óptica inicial (DO_{600}) de 0,2. O sistema foi mantido sob agitação a 37 °C até atingir $DO_{600} \approx 0,8$. Após atingir a DO final desejada, o meio de cultura foi centrifugado a 5.000xg a 20 °C por 20 minutos, e o *pellet* resultante foi ressuspensionado em um litro de meio-mínimo de cultura M9 enriquecido com ¹⁵NH₄Cl (cloreto de amônia marcada com ¹⁵N). Com a DO_{600} necessária alcançada, a

temperatura foi reduzida para 20 °C, e as culturas bacterianas foram induzidas com 0,4 mM de IPTG, permanecendo incubadas a 100 rpm *overnight*, por 16 horas. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 3.500xg a 4 °C por 40 minutos. As células foram então incubadas com tampão Tris-HCl (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,5 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF), e após 30 minutos, a amostra foi submetida à lise celular por meio de sonicação pulsada em dez ciclos (dois segundos ligado e um segundo desligado). O extrato resultante foi centrifugado a 35.000xg a 4 °C por 90 minutos, e o sobrenadante foi filtrado através de membrana de 0,45 µm Minisart®. Amostras foram coletadas antes e após a indução para verificação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 15%.

Na etapa de purificação, inicialmente foi empregado o sistema de purificação por afinidade manual com resina IMAC HiTrap® HP previamente carregada com cloreto de cobalto. A resina foi lavada com água destilada e equilibrada com tampão Tris-HCl (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 5 mM Imidazol). O sobrenadante filtrado (da etapa de expressão) foi aplicado à coluna, seguido por lavagens com tampão Tris-HCl, variando a concentração de imidazol de 20 mM a 1 M (20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM e 1 M), com a eluição do domínio ocorrendo entre 100 mM e 1 M.

A amostra foi concentrada por meio de porções retiradas da etapa de purificação por afinidade, e posteriormente, submetida à purificação por exclusão molecular utilizando a coluna Superdex 75 (GE Life Science®) para remoção de contaminantes e troca da solução tampão da amostra. O tampão utilizado foi o Fosfato (20 mM Fosfato de Sódio pH 7,0; 100 mM NaCl; 0,5 mM PMSF). A pureza da amostra após a purificação por exclusão molecular foi avaliada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 15%.

2.4.5. PEPTÍDEOS DERIVADOS DE MRE11 E H2AX

Os peptídeos empregados no decorrer deste estudo foram gentilmente cedidos pelo colaborador, Prof. Dr. Zamal Ahmed, do MD Anderson Cancer Center, Texas-USA.

Os peptídeos fornecidos derivam-se de duas proteínas distintas, MRE11 e H2AX, cada uma contribuindo com três peptídeos específicos. A tabela apresentada a seguir elucida as informações dos peptídeos.

Tabela 1.4.1: Peptídeos Utilizados no Estudo.

Peptídeos	Número de AA	Resíduos	Sequência
MRE11-07	7	108-114	WVNYQDG
MRE11-22	22	107-128	PWVNYQDGNLNISIPVFSIHGN
MRE11-pY	7	108-114	WVN{pY}QDG
H2AX-pSpY	7	136-142	TQA{pS}QE{pY}
H2AX-pS	7	136-142	TQA{pS}QEY
H2AX-pY	7	136-142	TQASQE{pY}

Fonte: Autoria própria.

2.4.6. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS

Com o propósito de determinar a concentração do domínio GRB2-SH2 e dos peptídeos, foram conduzidas medidas de absorção UV-Vis por meio do espectrofotômetro Varian Cary®₃E Uv-Visible.

As leituras foram realizadas na faixa de 250 a 500 nm, em temperatura ambiente, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Para o cálculo da concentração, procedeu-se à subtração do espectro da linha de base do tampão, empregando o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280} = 13.980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o domínio GRB2-SH2. O fosfopeptídeo derivado de MRE11 (MRE11-pY) foi diluído em H₂O com adição de 3% de NH₄Cl, e a concentração foi calculada utilizando $\epsilon_{280} = 6.970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os peptídeos não fosforilados derivado de MRE11 (MRE11-22 e MRE11-07) foram diluídos em uma solução contendo 50% de DMSO e 50% de H₂O, e a concentração foi calculada utilizando $\epsilon_{280} = 6.970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Quanto aos fosfopeptídeos derivados de H2AX (H2AX-pSpY, H2AX-pS e H2AX-pY), estes foram diluídos em H₂O, e a concentração foi calculada empregando $\epsilon_{280} = 1.280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para todos (154,155).

2.4.7. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN foram registrados no espectrômetro Bruker Avance III HD de 600 MHz, equipado com criossonda, localizado no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB/UNESP/IBILCE), possibilitando a realização de estudos em proteínas em concentrações mais reduzidas.

Os experimentos de titulação foram acompanhados por meio de HSQC conforme detalhado na **Tabela 1.4.2**. Foram empregados 40 μM de ^{15}N -GRB2-SH2, com incrementos do peptídeo MRE11-pY nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 300 μM . Além disso, utilizou-se 100 μM de ^{15}N -GRB2-SH2 para interações com os peptídeos MRE11-22 (exclusivamente 300 μM), MRE11-07 (50, 100, 200, 300 e 400 μM), H2AX-pYpS (150, 300, 400 e 500 μM), H2AX-pS (50, 100 e 200 μM) e H2AX-pY (50, 100, 200, 300 μM). Em todos os experimentos conduzidos, foi necessário a obtenção de espectros HSQC do domínio não ligado para avaliar sua integridade e determinar as posições originais de cada resíduo de aminoácido. Isso foi realizado através da transferência do assinalamento do domínio GRB2-SH2, previamente resolvido pelo grupo (88).

Tabela 1.4.2: Relação dos experimentos de HSQC das titulações dos peptídeos. As medidas foram realizadas em 600 MHz e 25 °C.

Experimento	Complexo	Nº de Scans	Matriz de Dados (^{15}N)	Matriz de Dados (^1H)
^1H , ^{15}N -HSQC	Domínio livre	258	2048 x 256	1024 x 128
^1H , ^{15}N -HSQC	MRE11-pY	258	2048 x 256	1024 x 128
^1H , ^{15}N -HSQC	MRE11-22	258	2048 x 256	1024 x 128
^1H , ^{15}N -HSQC	MRE11-07	258	2048 x 256	1024 x 128
^1H , ^{15}N -HSQC	H2AX-pYpS	258	2048 x 256	1024 x 128
^1H , ^{15}N -HSQC	H2AX-pS	258	2048 x 256	1024 x 128
^1H , ^{15}N -HSQC	H2AX-pY	258	2048 x 256	1024 x 128

Fonte: Autoria própria.

Todos os espectros coletados foram analisados utilizando os *softwares* NMRDraw e NMRPipe que se encontram na máquina virtual NMRbox (156,157).

2.4.8. DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR

A simulação do *docking* dos peptídeos ao domínio GRB2-SH2 foi conduzida por meio do servidor HADDOCK (158). A estrutura cristalina do GRB2-SH2 (PDB ID: 1BMB (159)) foi adotada como ponto de partida para o processo de *docking*. As coordenadas dos peptídeos foram determinadas com base nos deslocamentos químicos observados em cada interação durante os experimentos e na análise do HSQC. A construção das estruturas dos peptídeos foi realizada por meio do *software* PyMOL (160), enquanto a identificação dos resíduos fosforilados foi efetuada utilizando o servidor CHARMM-GUI (141).

Na simulação HADDOCK, os resíduos proteicos que sofrem diretamente as influências das interações com o ligante são designados como "resíduos ativos", ao passo que os demais resíduos são denominados "resíduos passivos". O protocolo de *docking* HADDOCK compreende três etapas consecutivas: (i) randomização de orientações seguida pela minimização da energia do corpo rígido, (ii) *annealing* simulada semiflexível no espaço de ângulo de torção e (iii) refinamento final no espaço cartesiano com solvente explícito, durante o qual as cadeias laterais e o *backbone* na interface têm liberdade de movimento. Na etapa (i), mil estruturas foram geradas, das quais as 200 melhores foram selecionadas para a etapa (ii). Cada estrutura refinada foi submetida à etapa (iii) em água explícita. Todos os parâmetros para as minimizações de energia foram mantidos inalterados em relação às configurações padrão.

As soluções obtidas foram categorizadas por meio da aplicação do algoritmo proposto por *Daura et al.* (161), utilizando valores de corte correspondentes a desvios padrão da estrutura complexa total de 9,5 Å para o Sítio I e 7,5 Å para o Sítio II. Os resultados de *docking* referentes aos Sítios I e II foram subdivididos em 10 e 5 agrupamentos, respectivamente, sendo estes classificados com base no número de membros participantes em cada agrupamento.

Os refinamentos do complexo GRB2-SH2/Peptídeos foram simulados por meio de dinâmica molecular, utilizando como estrutura inicial a conformação que apresentava o menor *score* no HADDOCK (158). As simulações foram conduzidas com o pacote GROMACS na versão 2020.3 (152). Empregou-se o campo de força AMBER99SB-ILDN (162), seguindo a configuração padrão para os resíduos de proteínas, com exceção dos resíduos fosforilados, para os quais o campo de força

foi adaptado (140,163,164). O modelo de água utilizado foi o TIP3P (165). A minimização da dinâmica molecular compreendeu 50.000 passos de descida mais íngreme e 5.000 passos de gradiente conjugado, ambos realizados sem restrições de posição. A equilibrção foi realizada em duas etapas de 100 ps cada, inicialmente com e, posteriormente, sem restrições de posição para os átomos da proteína e do ligante. As velocidades iniciais dos átomos foram determinadas pela distribuição de Maxwell-Boltzmann. As simulações de dinâmica molecular estenderam-se por 500 ns, com um passo de integração de 2 fs, mantendo uma temperatura de 298 K, uma concentração de sal de 0,1 M e 1 atm. Registrou-se a posição e energia da trajetória a cada 100 ps. A simulação foi conduzida utilizando o barostato de Parrinello-Rahman (166) e o termostato de Berendsen (167). A caixa de simulação foi construída com as bordas a 10 Å da superfície da proteína, adotando Condições Periódicas de Contorno. A análise da dinâmica molecular foi realizada por meio de ferramentas disponíveis no pacote GROMACS (152). A conformação que apresentou a menor energia de ligação de curto alcance ao longo de toda a simulação de dinâmica molecular foi selecionada como a mais provável para o complexo GRB2-SH2/Peptídeo.

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.5.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO DOMÍNIO GRB2-SH2 E DOS PEPTÍDEOS

Foi utilizado os servidores *online ProtParam* (154) e *Pep-Calc* (155) para obter as informações físico-químicas teóricas do domínio GRB2-SH2 e dos peptídeos através de suas respectivas sequência de resíduos de aminoácidos. Alguns destes parâmetros estão descritos abaixo (**Tabela 1.5.1**):

Tabela 1.5.1: Propriedades físico-químicas teóricas. Dados obtidos através dos servidores *ProtParam* e *Pep-Calc*.

	Nº AA	MM (kDa)	pI	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹)
SH2	96	11,18	9,63	13.980
MRE11-pY	7	0,96	0,68	5.960
MRE11-07	7	0,88	0,68	6.970
MRE11-22	22	2,48	4,87	6.970
H2AX-pSpY	7	1,02	0,95	1.280
H2AX-pS	7	0,92	0,95	1.280
H2AX-pY	7	0,92	0,95	1.280

Fonte: Autoria própria.

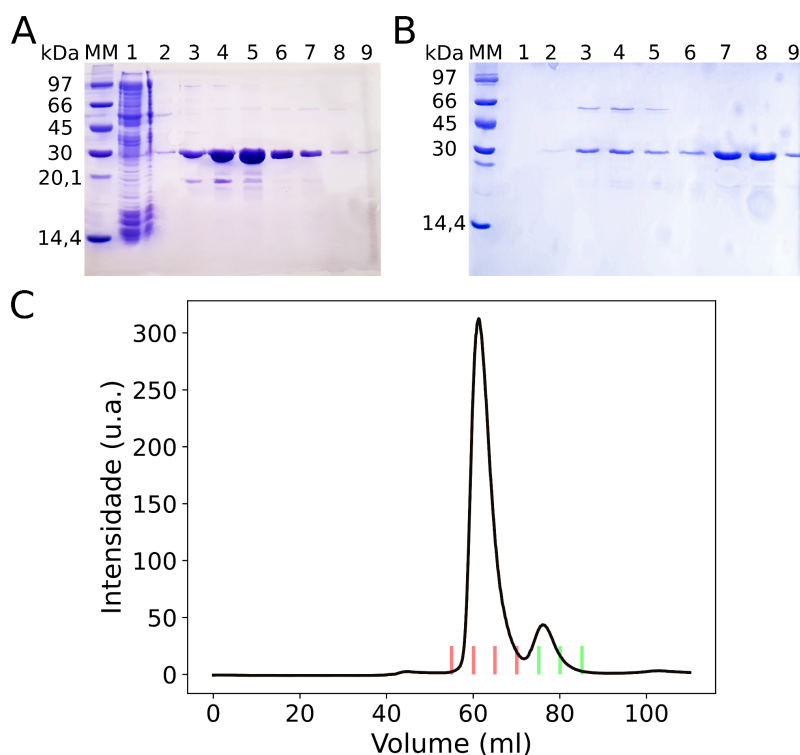
Os valores obtidos foram fundamentais para orientar as estratégias relacionadas à expressão, purificação e preparo de tampões, assim como para todos os procedimentos conduzidos no âmbito deste estudo.

2.5.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO ¹⁵N-GRB2-SH2

Após o cultivo, sonicação e filtração, o meio de cultura foi purificado por afinidade ao cobalto. A eluição foi realizada empregando uma concentração de imidazol variando de 80 mM a 1 M, conforme evidenciado na **Figura 1.5.1A**. Com o intuito de aprimorar a pureza da amostra e realizar a troca do tampão, procedeu-se à purificação por exclusão molecular, cujo resultado é apresentado no gel de SDS-PAGE 15%, conforme ilustrado na **Figura 1.5.1B**. O cromatograma

apresentado na **Figura 1.5.1C** ilustra a purificação do domínio GRB2-SH2. Observa-se claramente um pico pronunciado em torno de 60 ml, bem como um pico menor próximo a 77 ml. Estas discrepâncias refletem as distintas populações presentes no domínio GRB2-SH2, uma complexada (pico maior) e outra na forma monomérica (pico menor). Para os propósitos de nossa pesquisa, optou-se pela utilização do domínio em sua forma monomérica. Os resultados obtidos indicam uma purificação do domínio com alto grau de pureza, viabilizando a condução apropriada dos experimentos biofísicos propostos.

Figura 1.5.1: Purificação do domínio GRB2-SH2. **A)** SDS-PAGE 15% corado com azul brilhante *coomassie*[®] referente à purificação por afinidade a cobalto. MM) Marcador Molecular; 1) Extrato bruto; 2) 20 mM; 3) 40 mM; 4) 60 mM; 5) 80 mM; 6) 100 mM; 7) 200 mM; 8) 500 mM; 9) 1M de imidazol. **B)** De 1 à 8 referente à purificação por exclusão molecular com eluição em tampão 20 mM Fosfato de Sódio (11,5 mM Na₂HPO₄; 8,5 mM NaH₂PO₄) pH 7,0 com 100 mM NaCl. **C)** Cromatograma associado à purificação por exclusão molecular, conduzida através do sistema *ÄKTA Purifier* utilizando a coluna *Superdex 75* (GE Life Science[®]). As barras destacadas em vermelho indicam a não utilização da respectiva amostra nos estudos conduzidos, enquanto as barras destacadas em verde indicam sua utilização no estudo em questão.



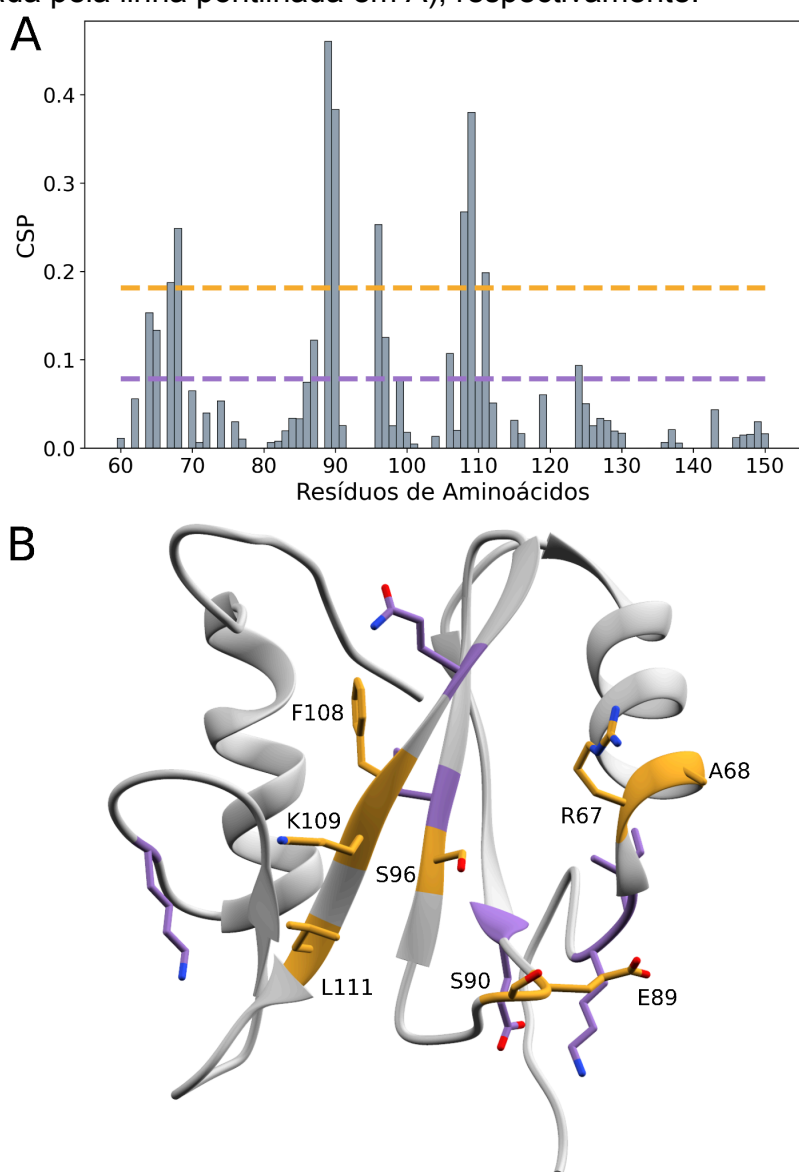
Fonte: Autoria própria.

2.5.3. INTERAÇÃO ENTRE MRE11-pY E GRB2-SH2

Para investigar a interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-pY, foram conduzidos experimentos de RMN ^{15}N -HSQC, mantendo o domínio em pH 7,0, tanto na presença quanto na ausência do fosfopeptídeo. A viabilidade desses experimentos foi assegurada pela prévia resolução estrutural da GRB2-SH2 realizada pelo nosso grupo e registrado no banco de dados (BMRB: 27781 (88)). No âmbito dos estudos por RMN, o domínio GRB2-SH2 foi concebido com base na estrutura primária da proteína GRB2 completa (13), sendo a construção iniciada no resíduo M55 e estendendo-se até o resíduo D150. Em seguida, procedeu-se à comparação dos espectros ^{15}N -HSQC do domínio GRB2-SH2 livre (40 μM) em relação a quantidades crescentes do fosfopeptídeo MRE11-pY (25, 50, 100, 200 e 300 μM). As amplitudes das perturbações de deslocamento químico entre os picos cruzados foram calculadas empregando a **Equação 1.2.12**.

Os valores de CSP foram representados graficamente para cada resíduo de aminoácido no domínio GRB2-SH2 (**Figura 1.5.2A**). Foram considerados os resíduos que apresentaram perturbações de CSP superiores à média de CSP e acima da média de CSP somada ao desvio padrão. Esses resíduos foram destacados nas cores lilás e amarela, respectivamente, na representação em *cartoon* do domínio GRB2-SH2 (**Figura 1.5.2B**). A partir desses resultados, tornou-se possível analisar a região específica no domínio onde ocorre a interação peptídica, bem como identificar quais resíduos desempenham papel mediador nessa interação. Os resíduos foram explicitados na **Tabela 1.5.2**.

Figura 1.5.2: Análise dos principais CSP na interação entre GRB2-SH2 e MRE11-pY. **A)** Avaliação das alterações no deslocamento químico em relação à posição do resíduo na estrutura primária, mediante a titulação de quantidades progressivas de MRE11-pY no domínio GRB2-SH2 a 298 K. **B)** Representação em *cartoon* do domínio GRB2-SH2 (PDB id: 6VK2 (88)). Os resíduos destacados em tonalidades lilás e amarelas são aqueles que apresentam CSP superior à média (representada pela linha contínua em A) e superior à média acrescida do desvio padrão (indicada pela linha pontilhada em A), respectivamente.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1.5.2: Resíduos que apresentaram CSP maiores que a média e maiores que a média mais desvio padrão. Resíduos relacionados com a interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-pY.

Resíduos			
Maiores que a Média	K64	I65	E87
	L97	Q106	K124
Maiores que a Média + Desvio Padrão	R67	A68	E89
	S90	S96	F108
	K109	L111	

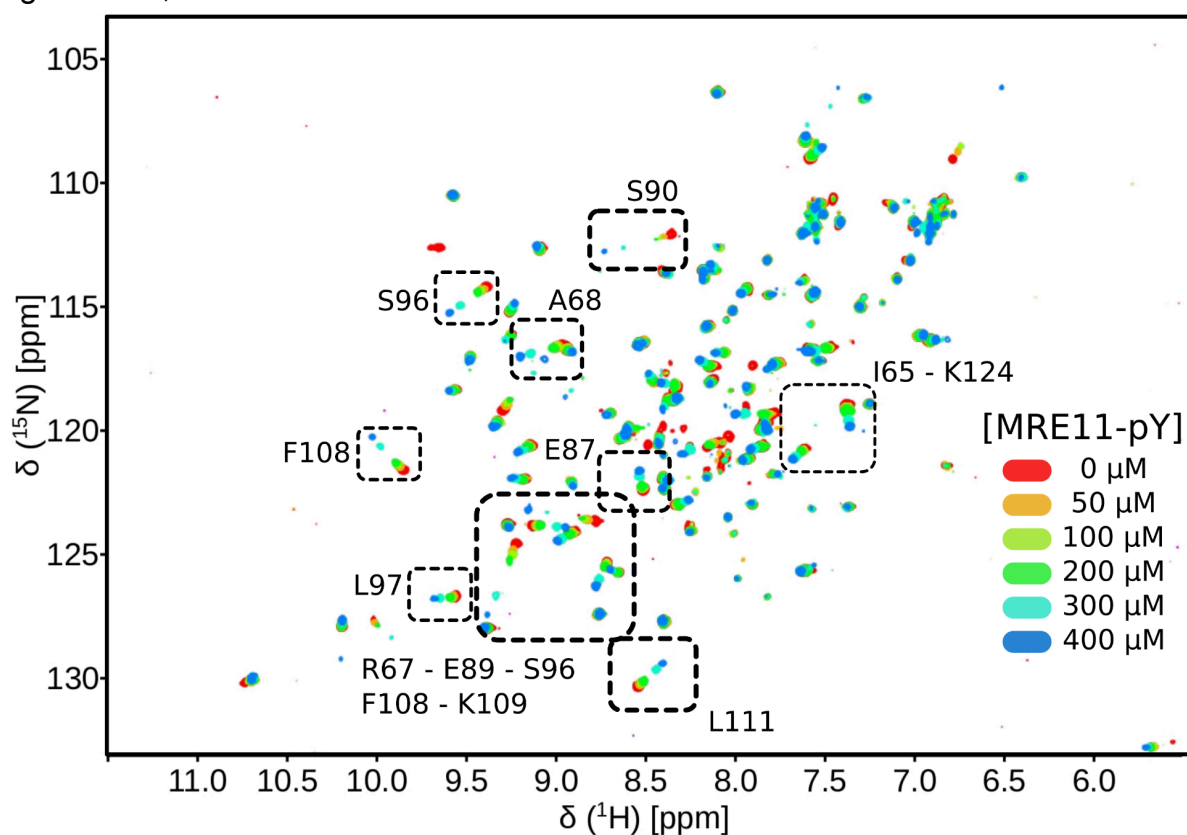
Fonte: Autoria própria.

Revisando a disposição dos sítios I e II no domínio GRB2-SH2 (**Figura 1.1.5 e 1.1.6**) (79), observou-se que os resíduos LYS64, ILE65, ARG67, ALA68 e SER90 apresentaram significativas mudanças na perturbação do deslocamento químico. Estes resíduos estão predominantemente localizados no sítio I do domínio. Tais resultados são previsíveis, uma vez que o sítio I de interação desempenha um papel crucial no reconhecimento de resíduos de tirosinas fosforiladas (**Figura 1.5.2B**). Contrariamente, a ausência inesperada de alterações do CSP no sítio II do domínio GRB2-SH2 sugere que o fosfopeptídeo MRE11-pY interage com o domínio por meio de um mecanismo não-canônico (84,168,169).

Um mapeamento das alterações do CSP foi elaborado para monitorar a dinâmica de interação entre o fosfopeptídeo MRE11-pY e o domínio GRB2-SH2, destacando quais resíduos apresentam deslocamento mais relevantes em relação à sua região de origem. Conforme previamente mencionado, a concentração do domínio GRB2-SH2 foi mantida em 40 μ M, enquanto a quantidade crescente do fosfopeptídeo foi titulada de 0 a 300 μ M. Os espectros HSQC do GRB2-SH2 foram adquiridos (**Figura 1.5.3**) à medida que a concentração de MRE11-pY aumentou. Algumas posições de picos cruzados evidenciaram alterações significativas, indicando a ocorrência da interação entre o domínio e o fosfopeptídeo. Em determinados deslocamentos, a mudança foi gradual (**Figura SIV.1 - Anexo D**), sugerindo um regime de troca rápida entre os estados livre e complexado, enquanto outros resíduos (**Figura SIV.1 - Anexo D**) apresentaram deslocamentos abruptos a cada titulação, indicando um regime de troca intermediária entre os estados livre e ligado (120,170). Ao comparar os valores de CSP (**Figura 1.5.2A**) com os

deslocamentos observados no espectro de HSQC (**Figura 1.5.3**), observou-se que os resíduos com maiores deslocamentos δ em ppm também possuíam maiores valores de CSP, permanecendo em um regime de interação de troca intermediária. Em contraste, os resíduos com deslocamentos δ menores em ppm exibiram CSP inferior. Tais resultados sugerem que a interação ocorre de maneira moderada e com baixa afinidade (171).

Figura 1.5.3: Titulação de MRE11-pY no domínio GRB2-SH2 monitorado por experimento de HSQC. A representação espectral apresenta a sobreposição dos HSQC em diferentes concentrações de MRE11-pY. Destaca-se que os quadrados pontilhados correspondem aos resíduos que manifestaram deslocamento significativo, conforme detalhado no **Anexo D**.



Fonte: Autoria própria.

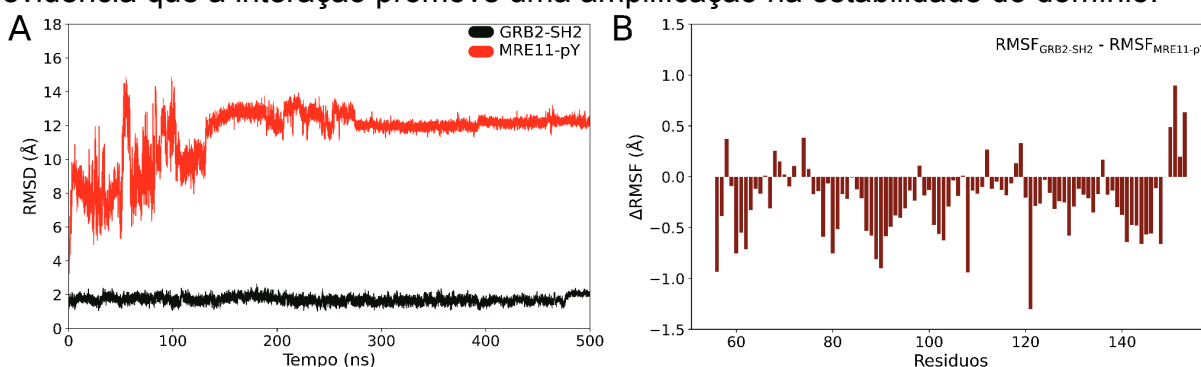
O peptídeo fosforilado, além de portar uma tirosina fosforilada, exibe uma carga líquida negativa. No que diz a respeito aos sítios de interação do domínio GRB2-SH2, é sabido que o sítio I é predominantemente positivo, e o resíduo R86 desempenha um papel crucial no reconhecimento da fosfotirosina (79). Importante destacar que a maioria significativa dos deslocamentos químicos observados nos resíduos apresentou um deslocamento linear, indicando um único modo de ligação (120,172). As informações obtidas tanto para o fosopeptídeo quanto para o domínio,

corroboradas pelos resultados experimentais, indicam que a interação ocorre no sítio I (79).

No intuito de compreender a interação entre o MRE11-pY e o sítio de ligação do domínio GRB2-SH2, foi realizado *docking* molecular utilizando o servidor HADDOCK (158). A construção do fosfopeptídeo foi efetuada por meio do *software* VMD (173), enquanto a estrutura do domínio GRB2-SH2 foi obtida do *RCSB Protein Data Bank* (PDB id: 1BMB (159)). A partir das contribuições derivadas dos cálculos de CSP (**Figura 1.5.2A**), os resíduos cujo δ é superior a 0,078 ppm, conforme listados na **Tabela 1.5.2**, foram identificados como "ativos". Estes resíduos desempenham uma função crítica na ligação entre o domínio e o peptídeo. Por outro lado, os resíduos com deslocamento químico inferior a esse valor foram classificados como "passivos", uma vez que, devido à ausência de mudança significativa no deslocamento químico, seu papel na interação não é conhecido. Posteriormente, procedeu-se ao cálculo de minimização de energia nos sítios I e II no local de interação do GRB2-SH2 (79).

Para a simulação da interação, considerando que a fosfotirosina interage no sítio I, efetuou-se um cálculo com a tirosina nesse sítio, observando-se, por meio de dinâmica molecular (**Figura 1.5.4**), que o fosfopeptídeo alcança uma conformação mais estável após 150 ns, indicando uma associação duradoura e possivelmente funcional entre o peptídeo e o domínio.

Figura 1.5.4: RMSD da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-pY. A) A curva representada em preto corresponde ao RMSD do domínio. Por outro lado, a curva em vermelho ilustra o RMSD do fosfopeptídeo. **B)** A análise do Δ RMSF revela a discrepância no RMSF entre o domínio SH2 quando em complexo e o domínio SH2 em sua forma não ligada. Os resíduos localizados na região positiva demonstram maior instabilidade durante a interação, enquanto os resíduos na região negativa exibem maior estabilidade ao longo da simulação. Isso evidencia que a interação promove uma amplificação na estabilidade do domínio.

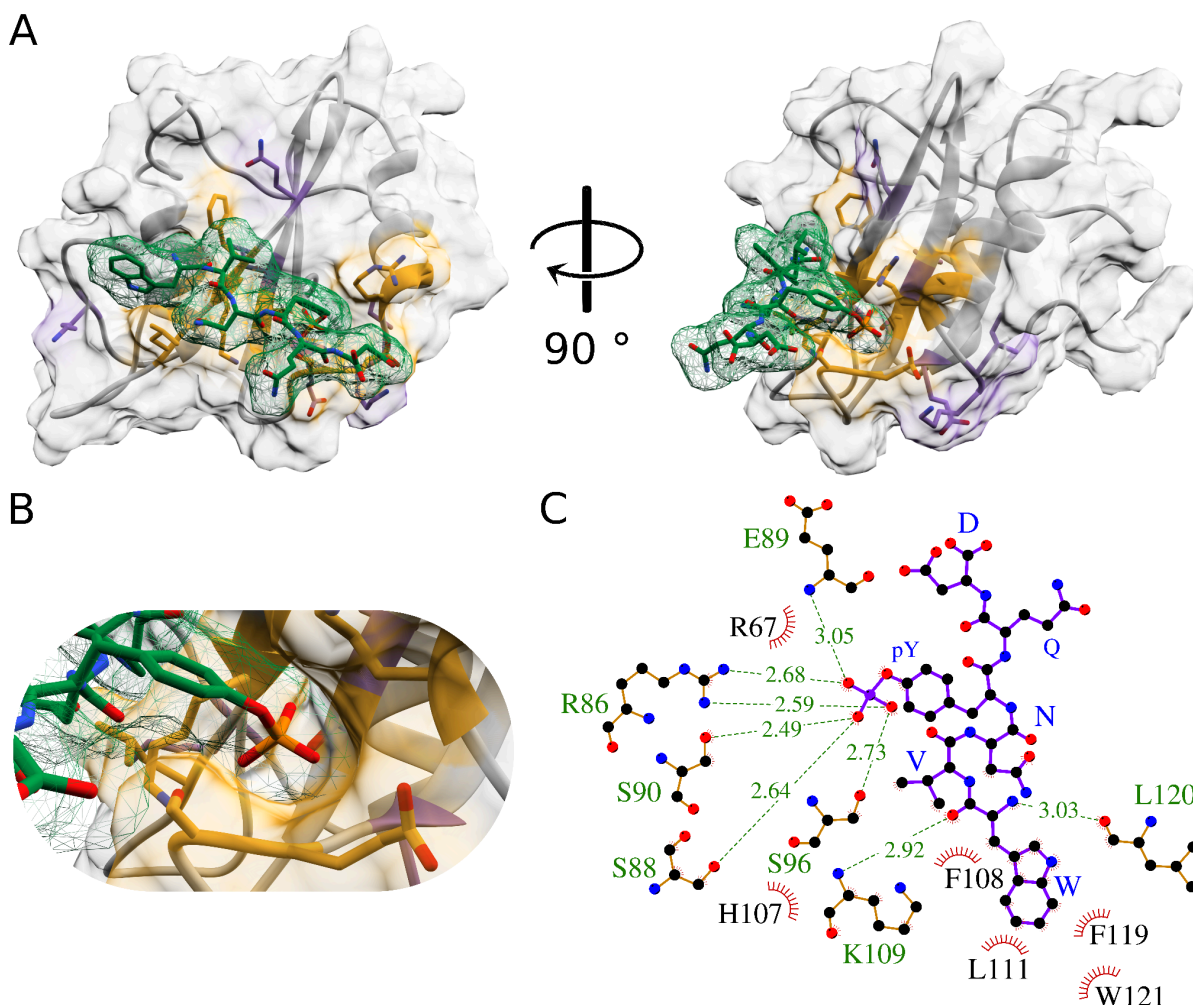


Fonte: Autoria própria.

Ao observar o gráfico de RMSD representado na **Figura 1.5.4A**, é evidente que o domínio SH2 se apresenta estável ao longo de toda a simulação. Isto indica que a interação com o peptídeo não exerce influência na estabilidade global do domínio. No que diz respeito ao peptídeo MRE11-pY (**Figura 1.5.4A**), observa-se que ele adota uma conformação mais estável por volta dos 150 ns, permanecendo inalterado durante o restante da simulação. No contexto do RMSF (**Figura 1.5.4B**), realizou-se uma análise da diferença de RMSF entre o domínio SH2 quando complexado com o peptídeo e o SH2 em seu estado livre. Os resíduos localizados na porção positiva demonstraram-se mais instáveis durante a interação com o peptídeo, enquanto aqueles na porção negativa revelaram maior estabilidade com a interação. Nesse contexto, é relevante destacar que as diferenças não ultrapassaram 1 Å (exceto pelo W121), indicando que a interação teve um impacto limitado na estabilidade do domínio. Contudo, vale ressaltar que uma predominância de resíduos na porção negativa sugere que a interação pode contribuir para um aumento na estabilidade do domínio.

A análise dos resultados de dinâmica molecular (**Figura 1.5.5A**) revelou que a pose mais amostrada obtida na interação GRB2-SH2/MRE11-pY indica que a tirosina fosforilada do peptídeo em estudo (**Figura 1.5.5B**) está inserida no sítio I de interação, enquanto os demais resíduos de aminoácidos permanecem fora do sítio II de interação. Na **Figura 1.5.5C**, é observável a presença de resíduos envolvidos na interação, destacando-se a tirosina fosforilada que interage com os resíduos presentes no sítio I. Esta interação é caracterizada pela formação de pontes de hidrogênio com os resíduos R86, S88, E89, S90 e S96, além de contatos hidrofóbicos com os resíduos R67 e H107. É relevante ressaltar que os resíduos envolvidos na interação por meio da dinâmica molecular estão em concordância com aqueles que apresentaram maior perturbação no deslocamento químico, conforme descrito na **Tabela 1.5.2**. É importante observar que, ao analisar a conformação do fosfopeptídeo em sua pose mais amostrada, esta não corresponde à conformação clássica adotada nas interações fosfopeptídeo/SH2 (84,87,159,168).

Figura 1.5.5: Representação em *cartoon* do complexo GRB2-SH2 ligado ao fosfopeptídeo MRE11-pY, acompanhado de uma visualização esquemática da interação através do LigPlot (174). Nas figuras A e B, o domínio é apresentado em tons de cinza, com resíduos específicos destacados em tons de roxo e amarelo, representando, respectivamente, os resíduos acima e abaixo da média, com adição do desvio padrão. O fosfopeptídeo é representado em verde. **A)** A visualização destaca a representação em dois ângulos: 0° e 90° à esquerda, para proporcionar uma perspectiva completa. **B)** A visualização enfatiza a fosfotirosina no sítio I de interação. **C)** A visualização esquemática destaca o peptídeo (em roxo) interagindo com os resíduos do domínio, com linhas tracejadas verdes representando pontes de hidrogênio, as distâncias (em angstrom) são destacadas, os semi-arcos em vermelho indicam contatos hidrofóbicos, enquanto as esferas vermelhas, azuis e pretas simbolizam, respectivamente, oxigênio, nitrogênio e carbono.



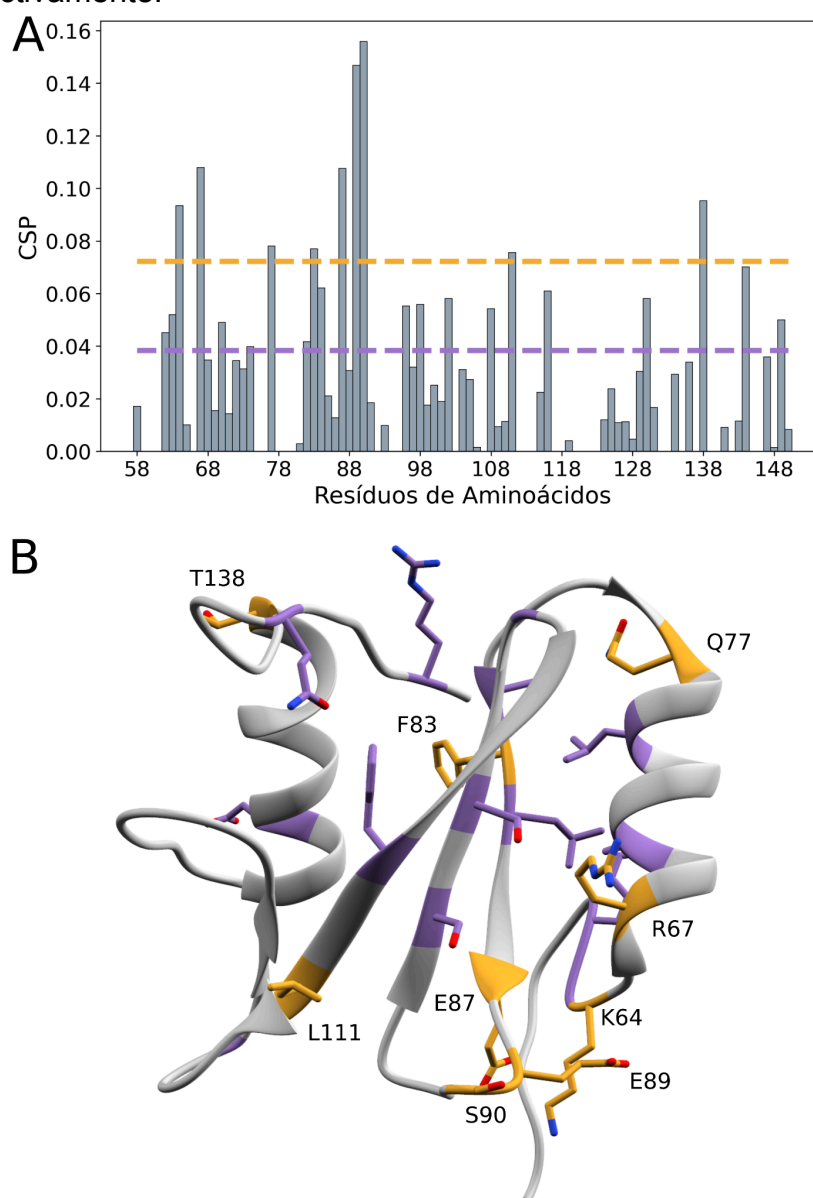
Fonte: Autoria própria.

2.5.4. INTERAÇÃO ENTRE MRE11-22 E GRB2-SH2

Com o objetivo de analisar a interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-22, vide que Z. *Ahmed* e colaboradores (47) identificaram uma potencial ligação entre a proteína GRB2 e a proteína MRE11 na falta de fosforilação, foram conduzidos experimentos de ^{15}N -HSQC, empregando o domínio em pH 7,0, tanto na presença quanto na ausência do peptídeo. Os espectros ^{15}N -HSQC do domínio GRB2-SH2 não ligado (100 μM) foram registrados em função do peptídeo MRE11-22 (300 μM). Nesta etapa, foram encontrados desafios durante a titulação do peptídeo, ocasionados pela agregação do sistema, decorrente da natureza hidrofóbica do peptídeo, o qual foi dissolvido em DMSO. As amplitudes de perturbações de deslocamento químico entre os picos cruzados foram recalculadas utilizando a **Equação 1.2.12** (120).

Os valores de CSP foram representados graficamente para cada resíduo de aminoácido do domínio GRB2-SH2 (**Figura 1.5.6A**). Foram consideradas as mesmas informações discutidas no início da **seção 5.3**, em que os resíduos com CSP acima da média e/ou da média mais desvio padrão foram identificados. Tais resíduos são destacados em tons de roxo e amarelo, respectivamente, na representação em *cartoon* de GRB2-SH2 (**Figura 1.5.6B**).

Figura 1.5.6: Análise dos CSP mais proeminentes na interação entre GRB2-SH2 e MRE11-22. A) Avaliação da perturbação no deslocamento químico em relação à posição do resíduo na estrutura primária, ocasionada pela titulação de quantidades progressivas de MRE11-22 no domínio GRB2-SH2 a 298 K. **B)** Representação em *cartoon* do domínio GRB2-SH2 (PDB id: 6VK2 (88)). Os resíduos destacados em tonalidades lilás e amarelo correspondem àqueles que exibem CSP superior à média (linha lilás em A) e superior à média somada ao desvio padrão (linha amarela em A), respectivamente.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1.5.3: Resíduos que apresentaram CSP maiores que a média e maiores que a média mais desvio padrão. Resíduos relacionados com a interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-22.

Resíduos			
Maiores que a Média	F62	G63	A70
	L74	A82	L84
	S96	S98	G102
	F108	G116	E130
	Q144	R149	
Maiores que a Média + Desvio Padrão	K64	R67	Q77
	F83	E87	E89
	S90	L111	T138

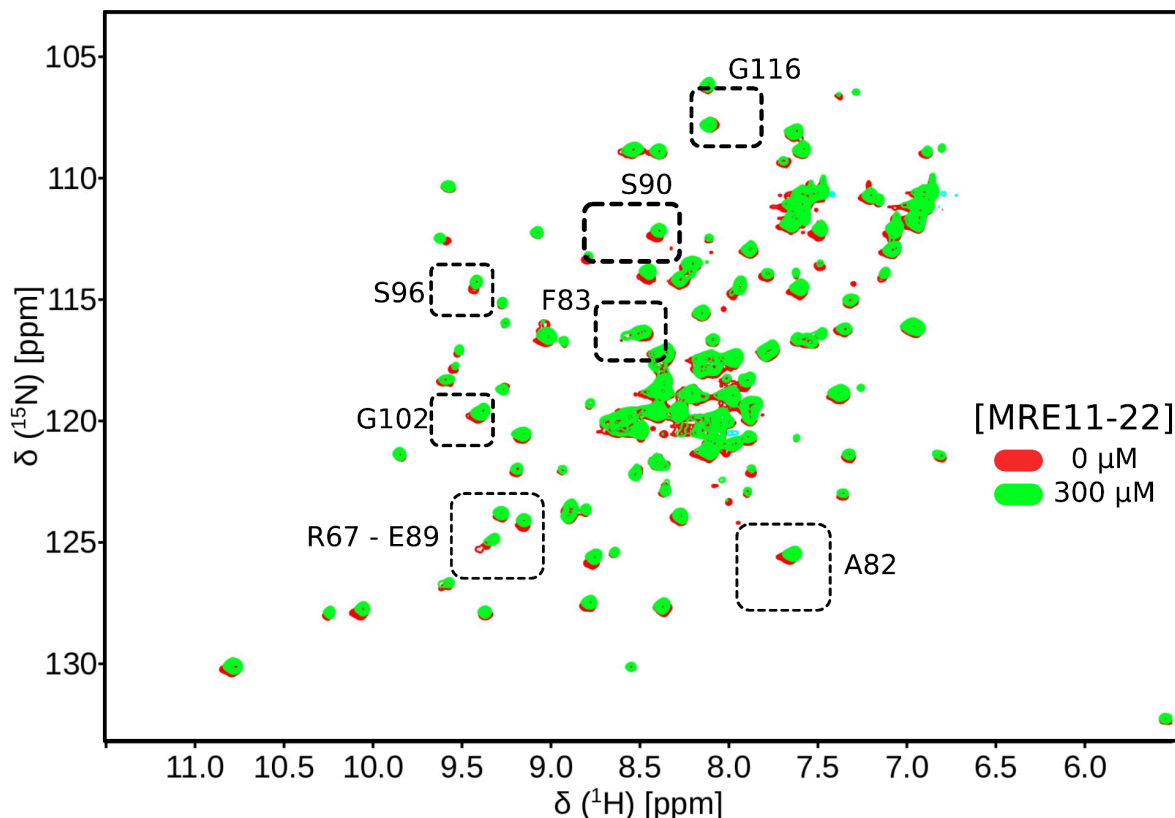
Fonte: Autoria própria.

Assim como nos resultados obtidos na **seção 5.3**, os resíduos LYS64, ARG67, GLU87, GLU89 e SER90 obtiveram mudanças de CSP. Esses resíduos estão localizados principalmente no sítio I do domínio (**Figura 1.5.6B**), sendo um ponto interessante vide que este peptídeo em questão não possui nenhum resíduo fosforilado. Vale ressaltar que houveram mais resíduos sendo perturbados quando comparado com o fosfopeptídeo MRE11-pY, e esses resíduos estão espalhados globalmente no domínio, o que indica que a interação está ocorrendo nos dois sítios (79,175,176).

Um mapa de mudança de CSP foi realizado para acompanhar o modo de interação do peptídeo MRE11-22 com o domínio GRB2-SH2, no qual destaca quais resíduos apresentam maior deslocamento da região inicial. Como reportado anteriormente, a concentração do domínio GRB2-SH2 foi fixada em 100 μ M, enquanto a peptídeo foi analisado em apenas uma titulação, pois, ocorreram problemas de agregação durante o processo.

Os espectros HSQC de GRB2-SH2 foram coletados (**Figura 1.5.7**) com o domínio livre e complexado com o peptídeo MRE11-22. As posições de alguns picos cruzados tiveram mudanças mas não tão significativas, provavelmente pelo fato da falta de possibilidade de prosseguir com a titulação. Os resíduos estão destacados no **Anexo E**.

Figura 1.5.7: Titulação de MRE11-22 no domínio GRB2-SH2 monitorado por experimento de HSQC. A figura detalha a superposição dos espectros de HSQC do domínio livre e ligado com MRE11-22. Os quadrados pontilhados são os resíduos que apresentaram maior deslocamento e estão destacados no **Anexo E**.

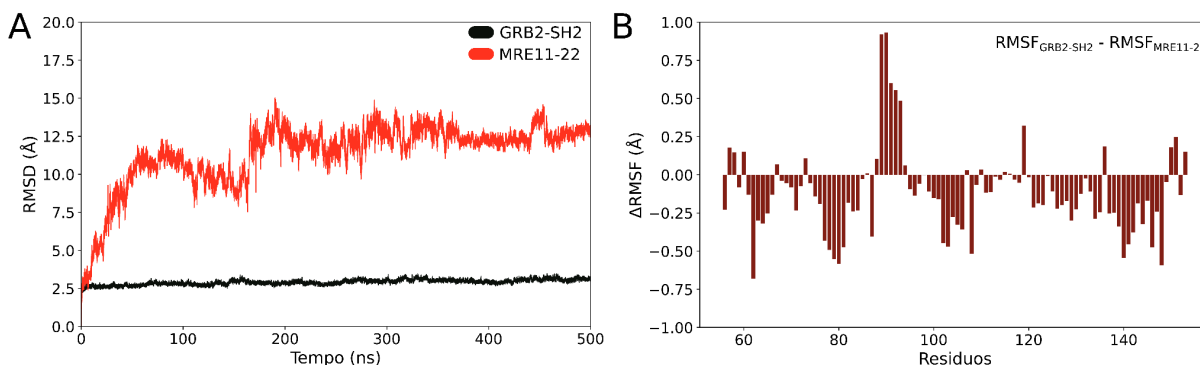


Fonte: Autoria própria.

Por ser um peptídeo longo (22 resíduos de aminoácidos) e possuir carga líquida negativa, o espectro indica uma possível interação com o domínio GRB2-SH2 e, tal interação, está ocorrendo inicialmente no sítio I pelo fato de ser uma região de interação preeminentemente positiva (79,175). Não foi possível observar se os deslocamentos químicos sofridos pelos resíduos deslocaram de forma linear ou não, impossibilitando distinguir o modo de ligação (120).

Em razão da precipitação da amostra devido ao solvente do peptídeo e da escassez de peptídeo adicional, a condução de experimentos mais aprimorados de HSQC para analisar a interação tornou-se inviável. Contudo, embora tenha sido possível observar alguns resíduos (**Figura 1.5.6** e **Figura 1.5.7**), optamos por realizar experimentos de dinâmica molecular como alternativa para elucidar os padrões de interação nesse complexo, dada a impossibilidade experimental anteriormente mencionada.

Figura 1.5.8: Análise da dinâmica molecular entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-22. A) A curva em preto retrata o RMSD do domínio, enquanto a curva em vermelho ilustra o RMSD do peptídeo. **B)** Δ RMSF evidencia a variação no RMSF entre o domínio SH2 quando complexado e o domínio SH2 em sua forma livre.



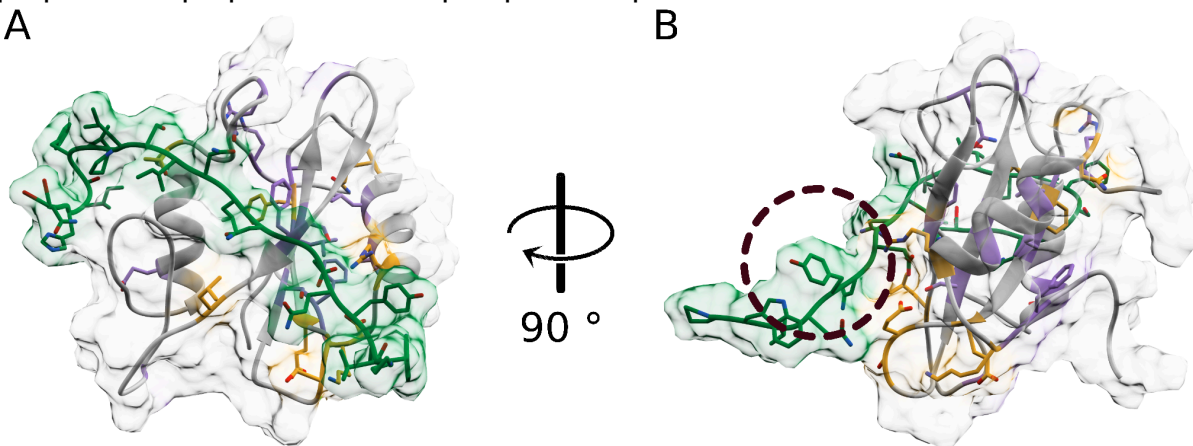
Fonte: Autoria própria.

Ao analisar o gráfico de RMSD conforme apresentado na **Figura 1.5.8A**, é evidente que o domínio SH2 mantém uma estabilidade consistente ao longo de toda a simulação. Tal constatação sugere que, mesmo após interagir com um peptídeo de comprimento considerável, não ocorreram alterações significativas em sua estrutura. Em relação ao peptídeo MRE11-22, observa-se, na mesma figura, que ele assume uma conformação particularmente estável aproximadamente aos 200 ns, permanecendo invariável durante o restante da simulação. Este comportamento sugere que a interação entre o peptídeo e o domínio ocorre e é estável. Em relação ao RMSF (**Figura 1.5.8B**), realizou-se uma análise da diferença de RMSF entre o domínio SH2 quando complexado com o peptídeo e o SH2 em seu estado livre. Os resíduos localizados na porção positiva mostraram-se mais instáveis durante a interação com o peptídeo, ao passo que aqueles na porção negativa revelaram maior estabilidade com a interação. Nesse contexto, destaca-se que as diferenças não ultrapassaram 1 Å, indicando que a interação teve um impacto limitado na estabilidade do domínio. No entanto, é digno de nota que uma predominância de resíduos na porção negativa sugere que a interação pode contribuir para um aumento na estabilidade do domínio.

A análise dos resultados provenientes da dinâmica molecular (**Figura 1.5.9A**) revelou que a pose mais frequentemente amostrada na interação entre GRB2-SH2/MRE11-22 apresenta uma conformação semelhante àquela observada na simulação com o fosfopeptídeo MRE11-pY. Contudo, neste cenário, a tirosina

(que não está fosforilada) permanece fora do sítio I (**Figura 1.5.9B**), indicando que a tirosina desempenha um papel mais ativo no sítio I quando encontra-se fosforilada.

Figura 1.5.9: Representação em *cartoon* do domínio GRB2-SH2 complexado com o peptídeo MRE11-22. O domínio é apresentado em tons de cinza, com resíduos específicos destacados em tonalidades de roxo e amarelo, representando, respectivamente, os resíduos que excedem a média e aqueles que estão acima da média acrescidos do desvio padrão. Simultaneamente, o peptídeo é representado em tonalidade verde. **A)** A visualização enfatiza a representação em um ângulo de 0°. **B)** Na visualização o sistema foi rotacionado 90° para a esquerda, com o propósito de proporcionar uma perspectiva aprimorada.



Fonte: Autoria própria.

Para efeito de comparação, procedeu-se a uma análise de CSP entre o fosfopeptídeo MRE11-pY e o peptídeo MRE11-22. Através da **Tabela 1.5.4**, observou-se que os resíduos de aminoácidos LYS64, ARG67, GLU87, GLU89, SER90, SER96, PHE108 e LEU111 (os quais representam 57,14% do fosfopeptídeo) presentes na interação entre o domínio GRB2-SH2 e o fosfopeptídeo MRE11-pY também são identificados na interação com o peptídeo MRE11-22. Isso corrobora a ocorrência da interação GRB2-SH2/MRE11-22. No entanto, é pertinente salientar que, conforme mencionado anteriormente, na interação com MRE11-22, há uma maior quantidade de resíduos participando da interação, os quais estão espacialmente distribuídos globalmente na proteína. Esta observação pode indicar que a interação está ocorrendo em dois sítios distintos, uma conclusão corroborada pelos resultados da dinâmica molecular apresentados na **Figura 1.5.9**.

Tabela 1.5.4: Resíduos mais proeminentes na interação GRB2-SH2/MRE11-pY e GRB2-SH2/MRE11-22. Os resíduos de aminoácidos mais notáveis na interação GRB2-SH2/MRE11-pY e GRB2-SH2/MRE11-22 foram identificados com base nos resultados de experimentos de HSQC, nos quais se evidenciaram CSP superiores à média e/ou à média acrescida do desvio padrão. Aqueles resíduos destacados em coloração vermelha são os que participam de ambos os mecanismos de interação.

	MRE11-pY			MRE11-22		
Maiores que a Média	K64	I65	E87	F62	A70	A82
	L97	Q106	K124	L84	S96	S98
				G102	F108	G116
				E130	Q144	R149
Maiores que a Média + Desvio Padrão	R67	A68	E89	K64	R67	Q77
	S90	S96	F108	F83	E87	E89
	K109	L111		S90	L111	T138

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar os sítios de interação no domínio GRB2-SH2 (conforme ilustrado na **Figura 1.1.6**), é possível observar que esses locais estão acessíveis, facilitando a ocorrência da interação. Este fenômeno pode indicar que, mesmo na ausência de uma tirosina fosforilada no peptídeo, o domínio demonstra uma afinidade pelo mesmo. Nota-se, de maneira evidente, uma maior concentração de resíduos destacados em amarelo na região do sítio I, sugerindo uma participação mais significativa desse *pocket*. Uma vez estabelecida a interação, os dados apontam que o peptídeo se acomoda no sítio II, evidenciado por alguns resíduos na região com perturbações relevantes no deslocamento químico.

Estes resultados delineiam novas possibilidades para o padrão de interação do domínio GRB2-SH2 na via de reparo de DNA, indicando a capacidade de interação com a proteína MRE11 independentemente da presença ou ausência de tirosina fosforilada.

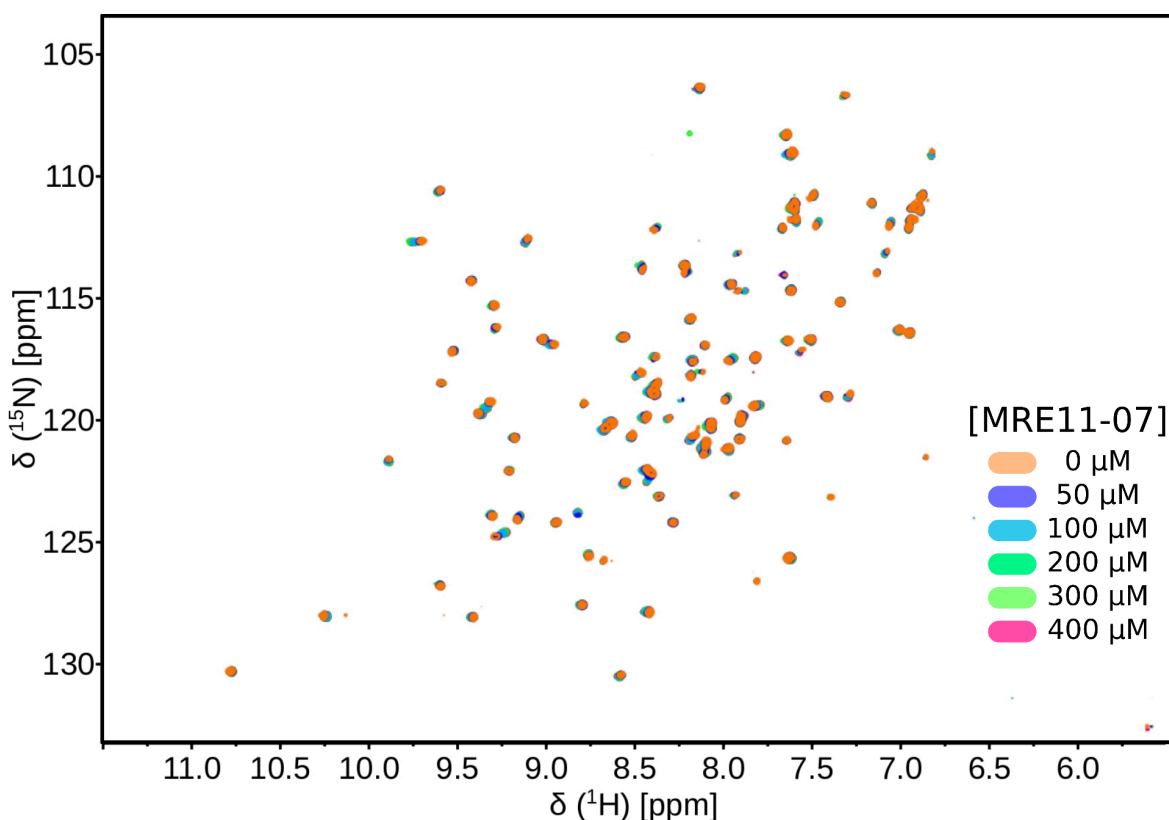
2.5.5. INTERAÇÃO ENTRE MRE11-07 E GRB2-SH2

Para investigar a interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-07, foram conduzidos experimentos de ¹⁵N-HSQC sob condições de pH 7,0,

tanto na presença quanto na ausência do peptídeo. Os espectros ^{15}N -HSQC do domínio GRB2-SH2 livre (100 μM) foram adquiridos em resposta a incrementos graduais da concentração do peptídeo MRE11-07 (50, 100, 200, 300 e 400 μM).

Com o propósito de monitorar o mecanismo de interação GRB2-SH2/MRE11-07, elaborou-se um mapa de mudança de CSP, identificando os resíduos que apresentaram os maiores deslocamentos em relação à região de origem. Como já mencionado, a concentração do domínio GRB2-SH2 foi mantida constante em 100 μM , enquanto a quantidade crescente do peptídeo foi titulada de 0 a 400 μM . Os espectros HSQC de GRB2-SH2 foram coletados conforme a concentração de MRE11-07 foi progressivamente aumentada (**Figura 1.5.10**).

Figura 1.5.10: Titulação de MRE11-07 no domínio GRB2-SH2 monitorado por experimento de HSQC. A figura apresenta a sobreposição dos espectros de HSQC do domínio em sua forma livre e ligado ao MRE11-07. Cabe ressaltar que não foram identificadas perturbações significativas nos deslocamentos químicos durante a análise.



Fonte: Autoria própria.

Os experimentos conduzidos não evidenciaram a presença de perturbação no deslocamento químico, sugerindo a ausência de interação. Cabe salientar que o peptídeo MRE11-07 também demonstrou características hidrofóbicas,

assemelhando-se ao MRE11-22. Contudo, neste contexto, observou-se mínimas alterações em poucos resíduos, indicando uma possível precipitação do sistema em detrimento da ocorrência de interações. É importante ressaltar que experimentos anteriores foram conduzidos com o peptídeo MRE11-22 não fosforilado, resultando em interações. Entretanto, é pertinente mencionar que o peptídeo utilizado anteriormente consistia em 22 resíduos de aminoácidos, ao passo que o atual é composto por apenas 7 resíduos. A discrepância no número de resíduos pode representar um fator determinante para as variações observadas nos resultados.

Ao compararmos os peptídeos MRE11-07 e MRE11-pY, observa-se que ambos compartilham a mesma sequência de aminoácidos, divergindo apenas pela presença de tirosina fosforilada no MRE11-pY. Em termos de carga líquida, sabe-se que os resíduos de triptofano, valina, asparagina, glutamina e glicina são neutros, enquanto o ácido aspártico apresenta um grupo carboxila com um pKa de 3,90, resultando em uma carga de -1 em pH 7,0 devido à desprotonação do resíduo. Essas características são comuns a ambos os peptídeos, sendo a principal distinção a presença da tirosina fosforilada. Quando a tirosina não está fosforilada, seu grupo fenol possui um pKa de 10,46, resultando em um estado neutro em pH 7,0. No entanto, quando a tirosina está fosforilada, o resíduo adquire uma carga de -2 devido ao grupo fosfato. Em relação à hidrofobicidade, tanto o triptofano quanto a valina são considerados hidrofóbicos, enquanto a asparagina, a glutamina, o ácido aspártico e a glicina são hidrofílicos. Por sua vez, a tirosina, quando fosforilada, apresenta uma maior hidrofilicidade. Destaca-se que as diferenças entre os peptídeos MRE11-07 e MRE11-pY, principalmente a presença da tirosina fosforilada, resultam em alterações significativas na carga líquida e na hidrofobicidade, influenciando assim a interação do peptídeo MRE11-07 com o domínio SH2.

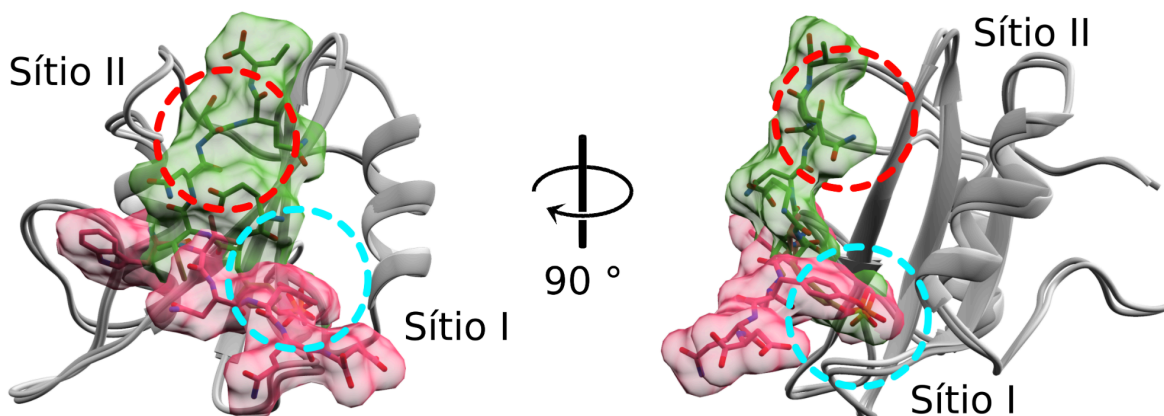
2.5.6. MODO DE INTERAÇÃO ENTRE OS PEPTÍDEOS DERIVADOS DE MRE11 E O DOMÍNIO GRB2-SH2

A primeira estrutura cristalina de um domínio SH2 a ser elucidada foi aquela da proteína Src complexada com um fosfopeptídeo de alta afinidade, revelando as principais características estruturais do domínio SH2 e o modo de interação com fosfopeptídeos. Diversos grupos de pesquisa, ao trabalharem com domínios SH2 de diferentes proteínas, obtiveram conformações semelhantes no estudo da interação

domínio/fosfopeptídeo. Em todos os casos, a tirosina fosforilada foi localizada próxima à primeira α -hélice e ao último resíduo da primeira fita- β da estrutura, enquanto o restante do fosfopeptídeo estendeu-se em direção à outra α -hélice, perpendicular a todas as folhas- β do domínio. Este padrão de reconhecimento emergiu como uma característica distintiva do modo como o domínio SH2 interage com os fosfopeptídeos (28,87,95).

Em uma pesquisa anterior conduzida pelo grupo (79), foi realizado um estudo de interação com um fosfopeptídeo derivado da proteína Receptora do Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor* - EGFR). Durante essa investigação, observou-se que o fosfopeptídeo, durante a interação, também adotou a conformação clássica. A fosfotirosina posicionou-se de maneira semelhante em ambos os casos (**Figura 1.5.11**); contudo, o fosfopeptídeo da proteína MRE11 apresentou uma disposição diferente da descrita na literatura. Enquanto o fosfopeptídeo do EGFR (representado em verde) interage em um sítio e se estende até o outro sítio perpendicular à folha- β , o fosfopeptídeo da MRE11 (representado em rosa) interage no sítio I e permanece fora do sítio II.

Figura 1.5.11: Representação em *cartoon* da interação dos fosfopeptídeos derivado de EGFR e de MRE11. O fosfopeptídeo proveniente de EGFR (colorido em verde) inicia sua interação no sítio I e se estende até o sítio II, ao passo que o fosfopeptídeo derivado de MRE11 (colorido em rosa) interage com o sítio I, mantendo-se fora do sítio II.



Fonte: Autoria própria.

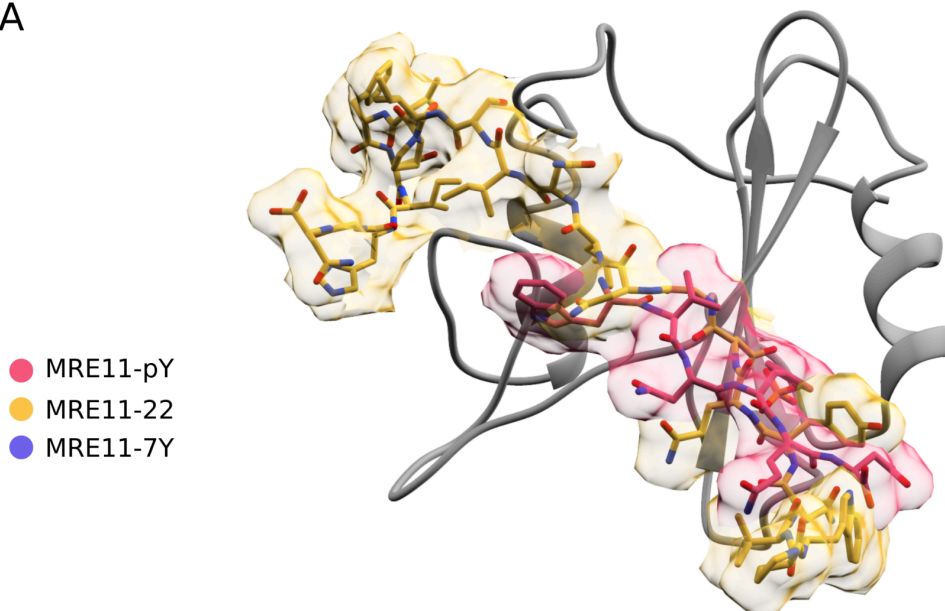
Ao analisar os resultados provenientes da dinâmica molecular, tanto para o peptídeo MRE11-pY quanto para o peptídeo MRE11-22 (conforme ilustrado na **Figura 1.5.12A**), observa-se uma notável semelhança na conformação predominante em ambas as simulações. Entretanto, é relevante ressaltar que as

tirosinas assumem posições distintas. O sítio I permanece como o elemento mais proeminente na interação, enquanto o sítio II não demonstra uma participação ativa significativa no processo interativo.

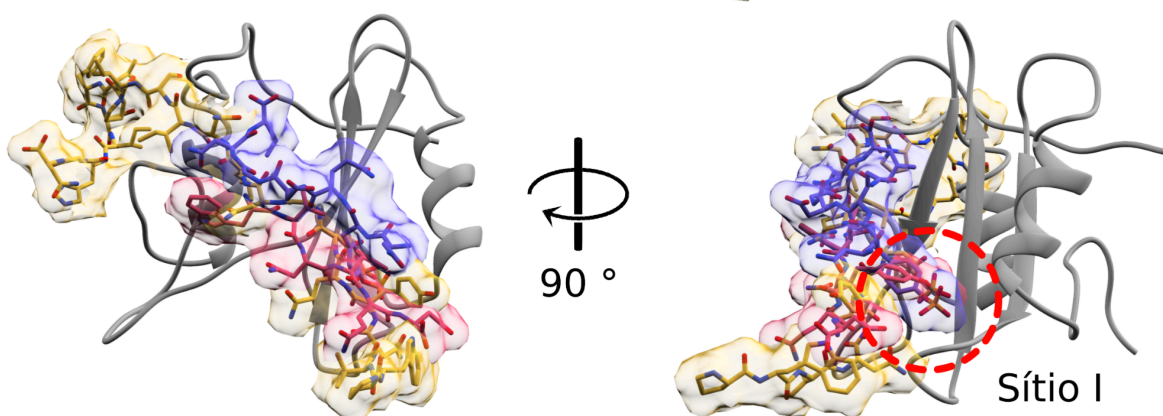
Surge, então, a indagação acerca da possibilidade de a pose mais frequentemente amostrada do peptídeo MRE11-pY representar uma conformação real ou se trata de um artefato de medida. Isso se deve ao fato de que a maioria dos fosfopeptídeos associados aos domínios SH2 exibe uma estrutura primária do tipo XpYXXXXX, onde X representa qualquer resíduo, e a tirosina fosforilada ocupa a segunda posição do peptídeo. No entanto, o peptídeo MRE11-pY (conforme indicado na **Tabela 1.4.1**) possui a tirosina fosforilada no meio do peptídeo, limitando a liberdade conformacional. Diante da impossibilidade financeira de construir um novo peptídeo e realizar experimentos de ressonância magnética nuclear para validar essa hipótese, optou-se por conduzir um estudo exclusivamente computacional nesta fase. Foi elaborado um fosfopeptídeo denominado **MRE11-7Y**, com estrutura primária de **N{pY}QDGNL**. Os resíduos listados na **Tabela 1.5.3**, provenientes da interação do domínio GRB2-SH2 com o peptídeo MRE11-22, foram utilizados como parâmetro para o *docking* molecular, devido à maior quantidade de resíduos participantes na interação. Uma dinâmica molecular foi realizada com o peptídeo MRE11-7Y, e ao determinar a pose mais frequentemente amostrada na simulação, constatou-se que o peptídeo ainda mantém uma conformação semelhante aos peptídeos MRE11-pY e MRE11-22 (**Figura 1.5.12B**). Esses resultados corroboram com os dados previamente obtidos, indicando que os peptídeos derivados da proteína MRE11 adotam uma conformação não-canônica na interação com o domínio GRB2-SH2.

Figura 1.5.12: Representação em *cartoon* da interação dos peptídeos derivados de MRE11. **A)** Comparação das configurações de interação dos peptídeos MRE11-pY (rosa) e MRE11-22 (amarelo). **B)** Inclusão do peptídeo MRE11-7Y (azul), revelando uma configuração semelhante às outras conformações.

A



B



Fonte: Autoria própria.

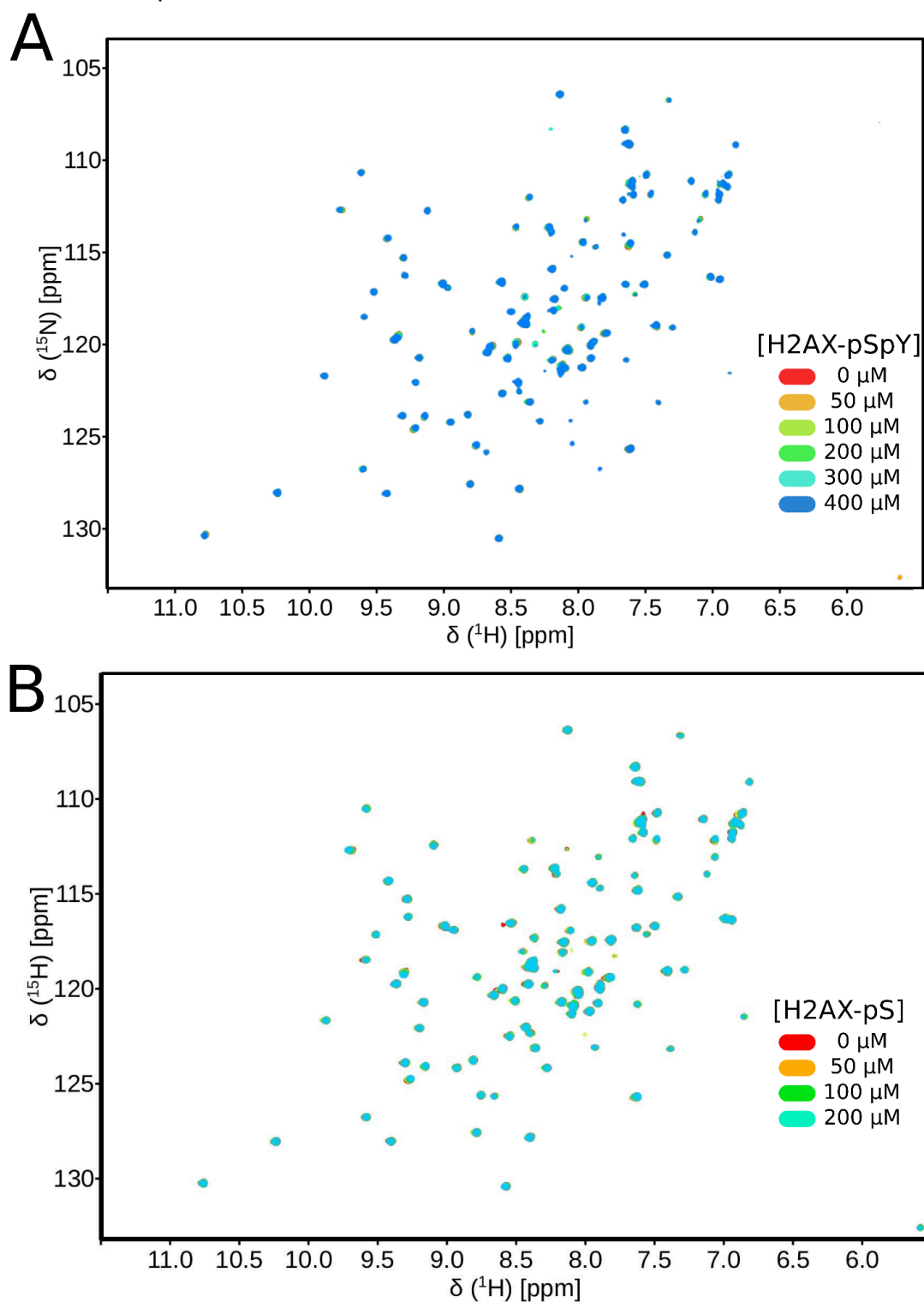
Em resumo, a informação estrutural da interação entre o domínio GRB2-SH2 e os peptídeos derivados da proteína MRE11 elucidada aqui revela uma nova maneira pela qual o domínio SH2 possa interagir com um potencial ligante. Embora as estruturas dos domínios SH2 sejam conservadas de uma proteína para outra, o fato de também estar presente em uma proteína adaptadora como a GRB2 faz com que o domínio adapte seu modo de interação para que a proteína desenvolva seu papel na via de ação que está presente.

2.5.7. INTERAÇÕES ENTRE H2AX-pSpY E GRB2-SH2 E ENTRE H2AX-pS E GRB2-SH2

Para investigar a interação entre o domínio GRB2-SH2 e os peptídeos H2AX-pSpY e H2AX-pS, procedemos com experimentos de ^{15}N -HSQC em um ambiente de pH 7,0, tanto na presença quanto na ausência dos fosfopeptídeos. Os espectros ^{15}N -HSQC do domínio GRB2-SH2 não ligado (100 μM) foram adquiridos em função de quantidades progressivamente crescentes dos peptídeos H2AX-pSpY (50, 100, 200, 300 e 400 μM) e H2AX-pS (50, 100 e 200 μM).

Com o intuito de elucidar o mecanismo de interação GRB2-SH2/H2AX-pSpY e GRB2-SH2/H2AX-pS, foi gerado um mapa de mudança de CSP. Este mapa revela quais resíduos apresentam deslocamento significativo em relação à sua posição original. Vale destacar que a concentração do domínio GRB2-SH2 foi mantida constante em 100 μM , enquanto a quantidade de fosfopeptídeo foi gradualmente titulada de 0 a 400 μM para H2AX-pSpY e de 0 a 200 μM para H2AX-pS. Os espectros HSQC de GRB2-SH2 foram registrados (**Figura 1.5.13**) à medida que a concentração dos peptídeos aumentava.

Figura 1.5.13: Titulação dos fosfopeptídeos derivados de H2AX no domínio GRB2-SH2 monitorada por meio do experimento de HSQC. A) Sobreposição dos espectros de HSQC do domínio livre e do domínio ligado com H2AX-pSpY. **B)** Sobreposição dos espectros de HSQC do domínio livre e do domínio ligado com H2AX-pS. Em ambos os cenários, não foram observadas perturbações nos deslocamentos químicos.



Fonte: Autoria própria.

Os experimentos não revelaram nenhum CSP, indicando que a interação não estava ocorrendo. Este dado vai de encontro com os obtidos por Ahmed, entretanto, é interessante que o peptídeo H2AX-pSpY possua uma tirosina fosforilada e mesmo assim não ocorra a interação. Como mencionado anteriormente, é amplamente conhecida a interação do domínio SH2 com tirosinas fosforiladas, contudo, existem domínios SH2 que reconhecem serinas fosforiladas. Tendo em vista isso, o que poderia estar acontecendo seria uma disputa entre a serina e a tirosina para se ligar no sítio de interação, porém, na literatura não existe nada mencionando que o domínio SH2 da proteína GRB2 reconheça serinas fosforiladas, sendo uma suposição por hora fraca e que necessita de mais experimentos para averiguar. Outra hipótese seria que, na verdade, a serina atue como um bloqueador, impedindo que a tirosina se ligue ao domínio, sendo essa ideia corroborada pelo fato do peptídeo H2AX-pS não ter mostrado interação também.

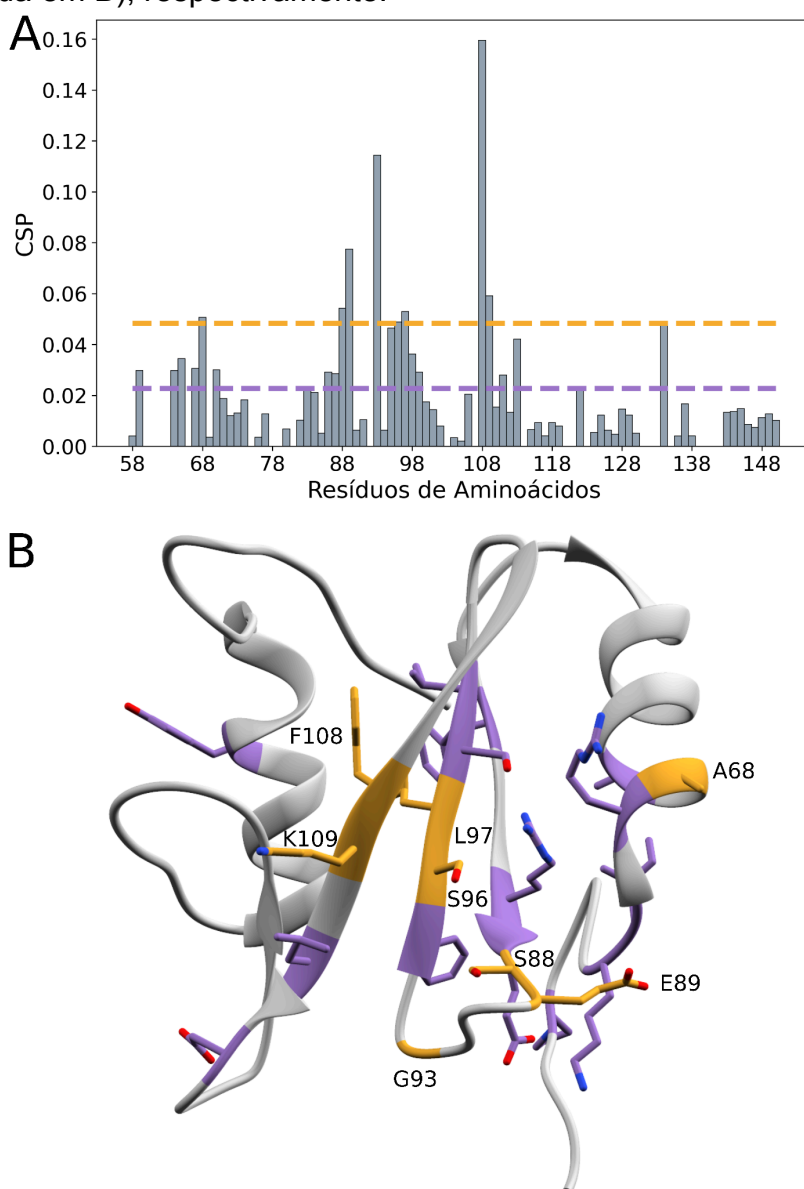
2.5.8. INTERAÇÃO ENTRE H2AX-pY E GRB2-SH2

Com o propósito de investigar a interação entre o domínio GRB2-SH2 e o fosfopeptídeo H2AX-pY, foram conduzidos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear ^{15}N -HSQC, mantendo o domínio em pH 7,0, tanto na presença quanto na ausência do fosfopeptídeo. Subsequentemente, procedeu-se à comparação dos espectros ^{15}N -HSQC do domínio GRB2-SH2 livre (100 μM) em relação a quantidades crescentes do fosfopeptídeo H2AX-pY (50, 100, 200 e 300 μM). As amplitudes das perturbações de deslocamento químico entre os picos cruzados foram calculadas utilizando a **Equação 1.2.12**.

Os valores das perturbações nos deslocamentos químicos foram representados graficamente para cada resíduo de aminoácido no domínio GRB2-SH2 (**Figura 1.5.14A**). Foram considerados os resíduos que apresentaram perturbações de CSP superiores à média de CSP e acima da média de CSP somada ao desvio padrão. Estes resíduos foram destacados nas cores lilás e amarela, respectivamente, na representação em *cartoon* do domínio GRB2-SH2 (**Figura 1.5.14B**). A partir desses resultados, tornou-se possível analisar a região específica no domínio onde ocorre a interação peptídica, bem como identificar quais

resíduos desempenham papel mediador nessa interação. Os resíduos estão detalhados na **Tabela 1.5.5**.

Figura 1.5.14: Análise dos principais CSP na interação entre GRB2-SH2 e H2AX-pY. **A)** Variações no CSP relativo à posição do resíduo na estrutura primária, por meio da titulação com incremento progressivo de H2AX-pY no domínio GRB2-SH2 a 298 k. **B)** Representação em *cartoon* do domínio GRB2-SH2 (PDB id: 6VK2). os resíduos destacados em tonalidades lilás e amarelas correspondem àqueles que exibem deslocamento químico superiores à média (representada pela linha contínua em A) e acima da média acrescida do desvio padrão (indicada pela linha pontilhada em B), respectivamente.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1.5.5: Resíduos que demonstraram CSP superiores à média e que excederam a média acrescida do desvio padrão. Esses resíduos estão associados à interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo H2AX-pY.

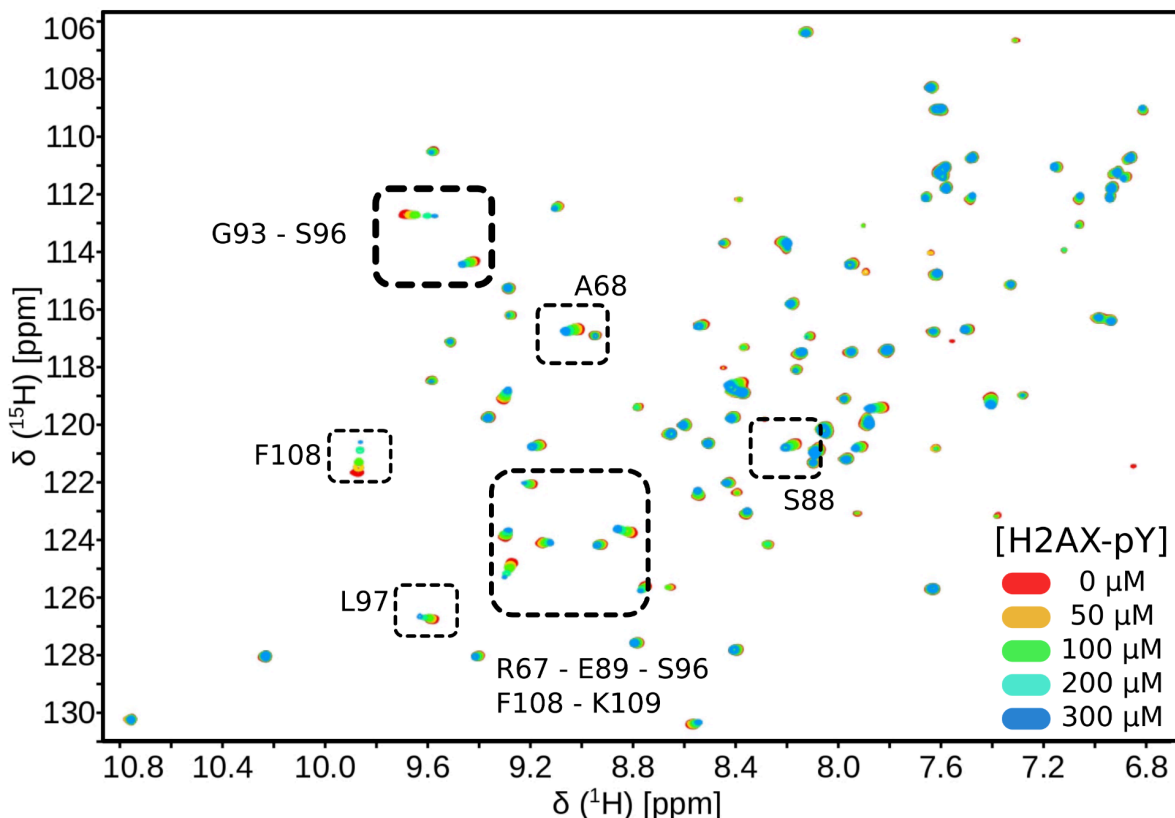
Resíduos		
Maiores que a Média	P59	K64
	R67	A70
	R86	E87
	S98	V99
	D113	Y134
Maiores que a Média + Desvio Padrão	A68	S88
	G93	S96
	F108	K109

Fonte: Autoria própria.

Neste caso, os resíduos cujos valores de CSP ultrapassam a média acrescida do desvio padrão estão predominantemente localizados no sítio I de interação (**Figura 1.5.14B**). No entanto, é válido notar que os resíduos L97 e F108, os quais também exibem valores de CSP superiores à média somada ao desvio padrão, são encontrados no sítio II de interação. Ademais, observa-se a presença de resíduos com valores de CSP acima da média distribuídos por todo o domínio, sugerindo a participação de ambos os sítios de interação nesse processo. Considerando que o peptídeo em questão apresenta apenas tirosina fosforilada e serina não fosforilada, esses resultados corroboram a hipótese de que a serina fosforilada interfere na interação.

Um mapeamento das variações de CSP foi conduzido para monitorar o padrão de interação entre o peptídeo H2AX-pY e o domínio GRB2-SH2, destacando os resíduos que apresentam maior deslocamento em relação à região inicial. Conforme relatado previamente, a concentração do domínio GRB2-SH2 foi mantida em 100 μ M, enquanto a concentração do peptídeo foi variada de 50 a 300 μ M. Os espectros HSQC de GRB2-SH2 foram registrados (**Figura 1.5.15**) tanto no estado livre quanto no complexo com o peptídeo H2AX-pY. Os resíduos afetados estão destacados no **Anexo F**.

Figura 1.5.15: Titulação de MRE11-pY no domínio GRB2-SH2 monitorado por experimento de HSQC. A representação espectral apresenta a sobreposição dos HSQC em diferentes concentrações de MRE11-pY. Destaca-se que os quadrados pontilhados correspondem aos resíduos que manifestaram deslocamento significativo, conforme detalhado no **Anexo F**.



Fonte: Autoria própria.

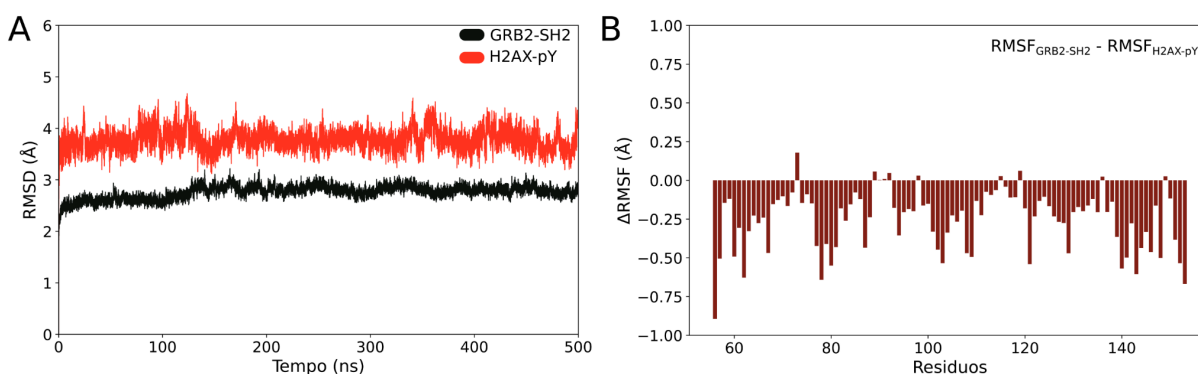
O peptídeo fosforilado, além de carregar uma tirosina fosforilada, manifesta uma carga líquida negativa. No que concerne aos sítios de interação do domínio GRB2-SH2, é conhecido que o sítio I é predominantemente positivo, sendo que o resíduo R86 desempenha um papel crucial no reconhecimento da fosfotirosina. É relevante salientar que a grande maioria dos deslocamentos químicos observados nos resíduos apresentou um deslocamento linear, indicando um único modo de ligação. As informações obtidas tanto para o fosfopeptídeo quanto para o domínio, validadas pelos resultados experimentais, apontam que a interação ocorre tanto no sítio I quanto no sítio II.

Com o objetivo de compreender a interação entre o H2AX-pY e o sítio de ligação do domínio GRB2-SH2, procedeu-se à realização de *docking* molecular, conforme previamente descrito. A partir das contribuições derivadas dos cálculos de CSP (vide **Figura 1.5.14A**), os resíduos cujo δ excede 0,0227 ppm, conforme detalhado na **Tabela 1.5.5**, foram identificados como "ativos". Estes resíduos

desempenham uma função crítica na ligação entre o domínio e o peptídeo. Por outro lado, os resíduos com deslocamento químico inferior a esse limiar foram categorizados como "passivos", uma vez que, devido à ausência de mudança significativa no deslocamento químico, seu papel na interação não é elucidado. Subsequentemente, procedeu-se ao cálculo de minimização de energia nos sítios I e II no local de interação do GRB2-SH2.

Para a simulação da interação, considerando que a fosfotirosina interage no sítio I, realizou-se um cálculo com a tirosina nesse sítio. Por meio da dinâmica molecular (**Figura 1.5.16A**), observou-se o comportamento do fosfopeptídeo durante a interação, constatando que o peptídeo adota uma conformação mais estável ao longo de toda a simulação.

Figura 1.5.16: RMSD da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo H2AX-pY. A) A curva em preto representa o RMSD do domínio, enquanto a curva em vermelho ilustra o RMSD do fosfopeptídeo. **B)** A análise do Δ RMSF revela discrepâncias no RMSF entre o domínio SH2 quando em complexo e o domínio SH2 em sua forma livre. Os resíduos localizados na região positiva demonstram maior instabilidade durante a interação, enquanto os resíduos na região negativa exibem maior estabilidade ao longo da simulação. Isso evidencia que a interação promove uma amplificação na estabilidade do domínio.



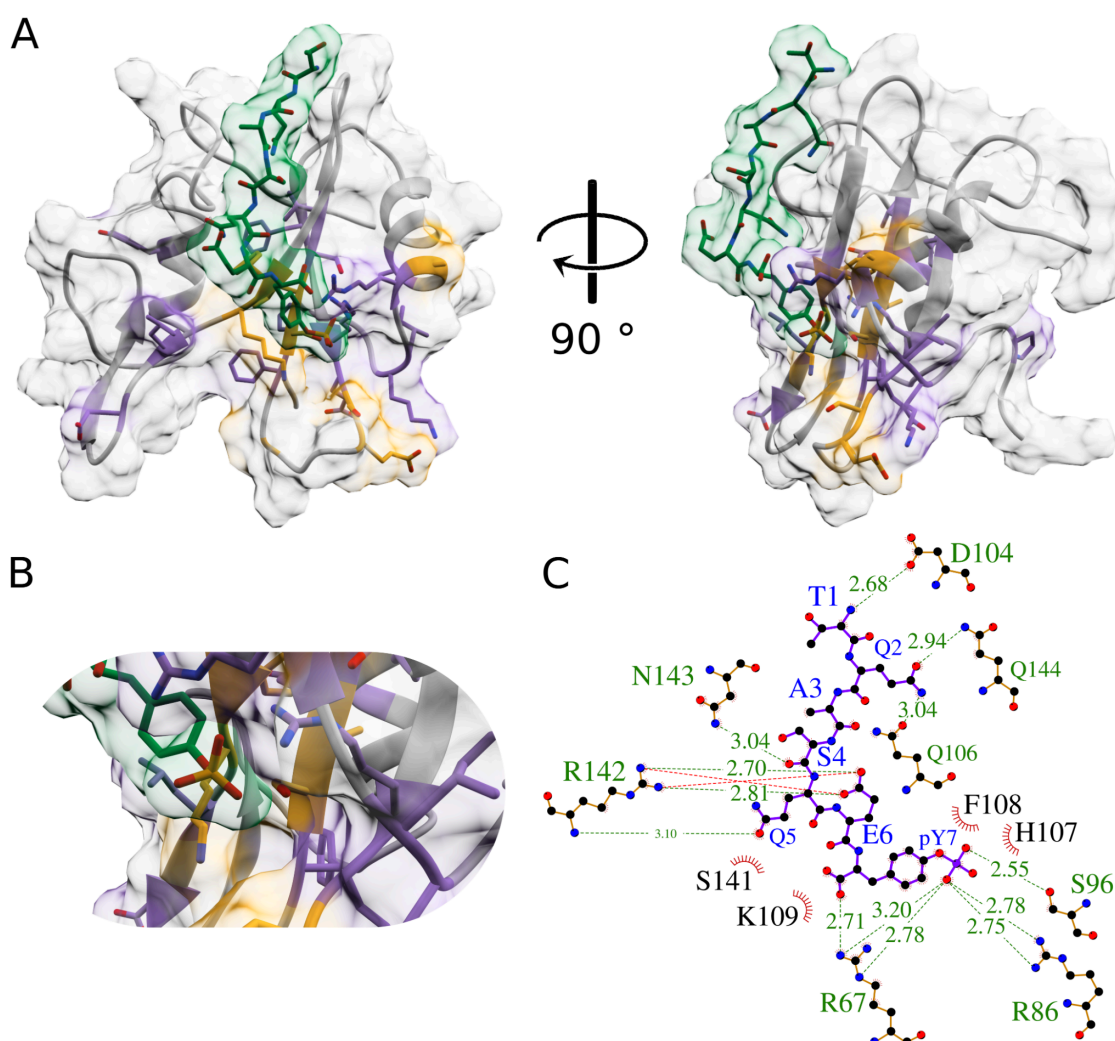
Fonte: Autoria própria.

Ao examinar o gráfico de RMSD apresentado na **Figura 1.5.16A**, observa-se claramente que o domínio SH2 mantém estabilidade ao longo de toda a simulação. Quanto ao peptídeo H2AX-pY, também representado na **Figura 1.5.16A**, nota-se que ele adota uma conformação mais estável desde o início da simulação. No que diz respeito ao RMSF, conforme ilustrado na **Figura 1.5.16B**, foi conduzida uma

análise das diferenças de RMSF entre o domínio SH2 quando complexado com o peptídeo e o SH2 em seu estado livre. Os resíduos localizados na porção positiva mostraram-se mais instáveis durante a interação com o peptídeo, enquanto aqueles na porção negativa revelaram maior estabilidade com a interação. Importante destacar que tais diferenças não ultrapassaram 1 Å, indicando que a interação teve um impacto limitado na estabilidade do domínio. Contudo, merece destaque o fato de uma predominância de resíduos na porção negativa sugerir que a interação pode contribuir para um aumento na estabilidade do domínio.

A análise dos resultados provenientes da dinâmica molecular (representada na **Figura 1.5.17A**) revelou que a pose mais frequentemente amostrada, obtida na interação entre GRB2-SH2/H2AX-pY, indica que a tirosina fosforilada do peptídeo em estudo (**Figura 1.5.17B**) está localizada no sítio I de interação, enquanto os demais resíduos de aminoácidos estão alocados dentro do sítio II de interação, apresentando uma conformação similar à forma canônica. Na **Figura 1.5.17C**, é visível a presença de resíduos envolvidos na interação, notavelmente a tirosina fosforilada que interage com os resíduos presentes no sítio I. Esta interação é caracterizada pela formação de pontes de hidrogênio com os resíduos R67, R86, S96, D104, Q106, R142, N143 e Q144, além de contatos hidrofóbicos com os resíduos H107, F108, K109 e S141, e interações eletrostáticas com o resíduo R142. É importante salientar que os resíduos envolvidos na interação, identificados por meio da dinâmica molecular, estão em conformidade com aqueles que demonstraram maior perturbação no deslocamento químico, conforme descrito na **Tabela 1.5.5** (84,87,159,168).

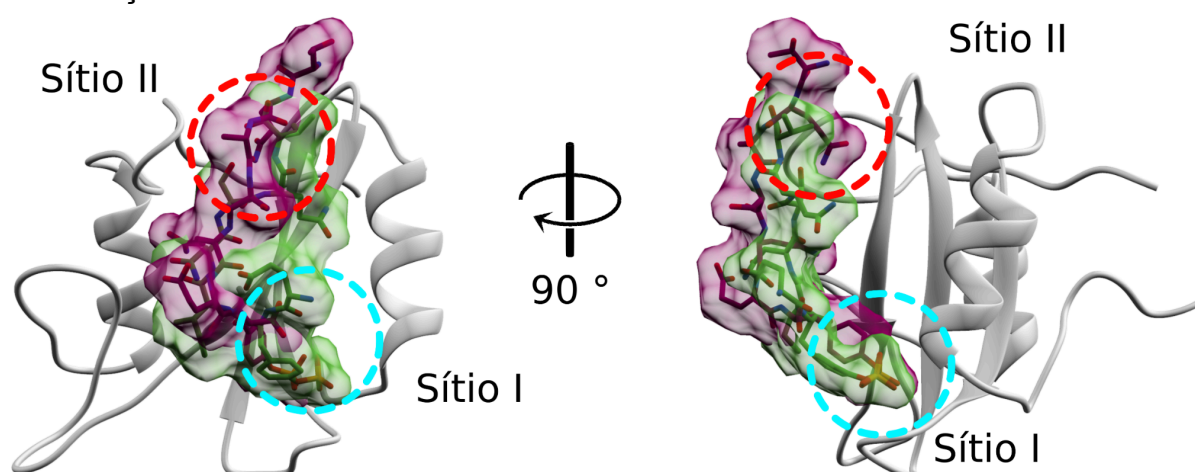
Figura 1.5.17: Representação em *cartoon* do complexo GRB2-SH2 ligado ao fosfopeptídeo H2AX-pY, acompanhado de uma representação esquemática da interação através do LigPlot (174). Nas representações A e B, o domínio é delineado em tons de cinza, com resíduos específicos destacados em tons de roxo e amarelo, denotando, respectivamente, resíduos acima e abaixo da média, com adição do desvio padrão. O fosfopeptídeo é representado em verde. **A)** A visualização apresenta a representação em dois ângulos: 0° e 90° à esquerda, oferecendo uma perspectiva abrangente. **B)** A representação realça a fosfotirosina no sítio I de interação. **C)** A visualização esquemática enfatiza o peptídeo (em roxo) interagindo com os resíduos do domínio, onde as linhas tracejadas verdes indicam pontes de hidrogênio, as linhas tracejadas vermelhas simbolizam interações eletrostáticas, as distâncias (em angstroms) são evidenciadas, os semi-arcos em vermelho indicam contatos hidrofóbicos, enquanto as esferas vermelhas, azuis e pretas representam, respectivamente, oxigênio, nitrogênio e carbono.



Fonte: Autoria própria.

Conforme previamente abordado, o grupo de pesquisa investigou um peptídeo derivado da proteína EGFR, o qual assumiu uma conformação de pose de maneira canônica, assemelhando-se ao já descrito na literatura. Neste contexto, realizamos uma comparação entre o modo de interação do peptídeo H2AX-pY e o peptídeo derivado do EGFR (**Figura 1.5.18**). Observa-se de maneira evidente que o peptídeo H2AX-pY também adota uma conformação canônica durante a interação. Esses resultados indicam que, mesmo no ambiente do núcleo celular, a proteína GRB2 possui a capacidade de desempenhar diferentes modos de interação, destacando sua natureza adaptadora.

Figura 1.5.18: Representação em *cartoon* da interação dos fosfopeptídeos derivado de EGFR e de H2AX. O fosfopeptídeo originado do EGFR, destacado em verde, inicia sua interação no sítio I e se estende até o sítio II. Paralelamente, o fosfopeptídeo proveniente de H2AX, colorido em roxo, segue um padrão semelhante de interação.



Fonte: Autoria própria.

2.6. CONCLUSÕES

A caracterização das interações entre proteínas e peptídeos é essencial para a compreensão dos mecanismos de ação das proteínas nas vias biológicas. Tais estudos proporcionam uma compreensão molecular do microambiente no qual o peptídeo se une e como essa interação pode influenciar a proteína.

No presente trabalho, foi investigada a interação entre o domínio GRB2-SH2 e o fosfopeptídeo MRE11-pY, derivado da proteína MRE11, com uma tirosina fosforilada. À medida que a titulação progredia, perturbações nos deslocamentos químicos foram observadas, sendo que os resíduos mais afetados estavam localizados no sítio I de interação. Análises de *docking* e dinâmica molecular revelaram que, em seu estado de menor energia, o fosfopeptídeo adotava uma conformação diferente da descrita na literatura. Nesta configuração identificada, a fosfotirosina se ligava no sítio I de interação, entretanto, os resíduos pY+1 à pY+5 permaneciam fora do sítio II, configurando um estado de interação não canônico. Este novo modo de interação origina-se das adaptações que a proteína sofreu para desempenhar uma nova função dentro da célula.

A interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-22, derivado da proteína MRE11 e isento de resíduos fosforilados, foi investigada. Optou-se por uma titulação de peptídeo na proporção de 1:3 devido à ocorrência de agregação no sistema. As perturbações nos deslocamentos químicos da proteína foram discretas, demandando uma análise mais aprofundada em trabalhos futuros. Contudo, os resultados preliminares indicam a possível existência de uma interação entre GRB2-SH2 e MRE11-22. Ao contrário do fosfopeptídeo MRE11-pY, a interação com o peptídeo em questão resultou em uma perturbação global da proteína. A comparação com o modo de interação do peptídeo MRE11-pY revelou uma conformação semelhante adotada por ambos os peptídeos. Experimentos computacionais utilizando um peptídeo hipotético denominado MRE11-7Y corroboraram essa observação, indicando que, para a interação entre as proteínas GRB2 e MRE11, um novo modo de interação está presente nessa função recém-identificada.

Conduziram-se experimentos utilizando o peptídeo MRE11-07, o qual é semelhante ao MRE11-22, porém possui uma quantidade reduzida de resíduos.

Contudo, neste contexto, não foi possível identificar quaisquer interações, possivelmente devido à escassez de resíduos e à ausência de tirosina fosforilada.

A interação entre o domínio GRB2-SH2 e os fosfopeptídeos H2AX-pSpY e H2AX-pS, derivados da histona H2AX, foi investigada. No primeiro caso, o peptídeo continha uma tirosina fosforilada e uma serina fosforilada, enquanto no segundo, havia apenas uma serina fosforilada. Após várias titulações, não foram observadas perturbações nos deslocamentos químicos em ambos os casos. Notavelmente, em relação ao H2AX-pSpY, destaca-se a ausência de interações, considerando a presença de resíduos de interesse para o domínio SH2. Duas possibilidades foram consideradas para essa não-interação: (i) uma competição entre a fosfotirosina e a fosfoserina, na qual nenhum resíduo consegue interagir com o domínio; (ii) a fosfoserina atua impedindo o reconhecimento da tirosina fosforilada pelo domínio, evitando a interação. A segunda possibilidade parece mais plausível, dada a falta de interação entre GRB2 e H2AX no núcleo, sugerindo um mecanismo que permite a ligação específica da GRB2 com a MRE11. No caso do peptídeo H2AX-pS, também não foram observadas interações, indicando que a presença de serina fosforilada de fato compromete a interação.

Experimentos foram conduzidos empregando o fosfopeptídeo H2AX-pY, revelando uma notável interação. Destaca-se que, quando um peptídeo apresenta exclusivamente tirosina fosforilada, ele se torna propício ao reconhecimento por domínios SH2. Perturbações nos deslocamentos químicos tornaram-se evidentes durante a titulação, sendo que os resíduos com maiores deslocamentos químicos se localizavam nos sítios I e II de interação. Análises conduzidas por meio de *docking* e dinâmica molecular indicaram que, em seu estado de menor energia, o fosfopeptídeo adota uma pose semelhante àquela documentada na literatura. Os experimentos com este peptídeo demonstraram que a GRB2 só poderia interagir com a histona H2AX quando esta apresentava exclusivamente tirosina fosforilada. No entanto, a presença adicional de uma serina fosforilada na histona impede essa interação. A constatação de que o peptídeo H2AX-pY adota uma conformação canônica reforça a ideia de que os experimentos com os peptídeos derivados da proteína MRE11 de fato assumem uma nova conformação para a interação.

A reparação do DNA e a estabilidade genômica dependem de maneira crucial do recrutamento adequado de proteínas parceiras. No caso de quebras de dupla fita (DSB), foi identificado que a proteína GRB2 desempenha um papel

fundamental ao recrutar a MRE11, liberando-a para eficiente reparo por meio de homologia dirigida (HDR). Surpreendentemente, o papel citoplasmático da GRB2 na ativação das vias RAS/MAPK/ERK é complementado por sua função nuclear, direcionando a MRE11 para o reparo de DSB. A ligação do domínio GRB2-SH2 à MRE11 ocorre por meio de uma interface de interação exclusiva, adaptada à sua função na via de resposta a danos no DNA.

Em resumo, as funções nucleares da GRB2, juntamente com a ligação específica do domínio GRB2-SH2 a peptídeos, proporcionam informações moleculares cruciais sobre o recrutamento da MRE11 para locais de DSB, com implicações funcionais significativas para o reparo por HDR e para o desenvolvimento do câncer humano. Nossos resultados revelam uma interação inovadora e única do domínio GRB2-SH2, que, ao contrário de interações com fosfo-serinas, apresenta implicações relevantes para a compreensão da biologia do câncer.

2.7. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar novos experimentos de HSQC com o peptídeo MRE11-22 com o intuito de obter resultados mais precisos;
- ❖ Realizar experimentos utilizando todos os peptídeos, porém, neste contexto, empregando a proteína GRB2 monomérica com o intuito de esclarecer a interação na totalidade da proteína;
- ❖ Efetuar experimentos envolvendo todos os peptídeos, contudo, utilizando a proteína GRB2 dimérica neste caso específico, a fim de avaliar se tal interação ocorre e, em caso afirmativo, verificar se ela provoca alterações na dimerização da proteína GRB2.

3. CAPÍTULO 2

REVELANDO ESTADOS METAESTÁVEIS DE ENOVELAMENTO DE GRB2 E A RELEVÂNCIA DA COMUNICAÇÃO INTERDOMÍNIOS DURANTE O ENOVELAMENTO

3.1. PREÂMBULO E CONTEXTUALIZAÇÃO

A pesquisa apresentada neste capítulo resulta de uma colaboração entre diversos membros da comunidade acadêmica, envolvendo a contribuição essencial de estudantes de doutorado, pós-doutorado e professores. A parceria interdisciplinar entre os doutorandos Murilo N. Sanches e Giovana C. Moreira, aliada à participação do doutor Raphael V. R. Dias, estabeleceu a base fundamental deste trabalho. Esta colaboração foi potencializada pela experiência e orientação dos docentes Leandro C. de Oliveira, Vitor B. P. Leite, Ícaro P. Caruso e Fernando A. de Melo, cuja expertise nas áreas correlatas enriqueceu substancialmente os fundamentos deste estudo.

O desfecho desta pesquisa conjunta foi submetido e aceito para publicação na revista ***Journal of Chemical Information and Modeling***, disponível em doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00955. Ao longo deste capítulo, a ênfase será direcionada para a parte específica da pesquisa conduzida por mim, Renan Pereira Pedro.

3.2. INTRODUÇÃO

Domínios proteicos são regiões compactas e modulares altamente conservadas em termos de estrutura e função. Esses módulos constituem a maior parte do repertório de proteínas, sendo recombinaados de diversas maneiras para criar proteínas com funções completamente novas (177,178). Assim, as proteínas multidomínio desempenham um papel crucial na manutenção da vida, sendo essenciais para muitos complexos macromoleculares envolvidos na transdução de sinais, na integridade estrutural e na organização de células e tecidos (179). Apesar de os domínios possuírem estruturas terciárias bem definidas, o comportamento de um domínio isolado pode diferir daquele de uma proteína de comprimento total. Portanto, a combinação desses domínios resulta em diferentes vias de enovelamento das proteínas (180,181). Adicionalmente, é importante destacar que o mal enovelamento pode levar a condições patológicas, como catarata (182), fenilcetonúria (183), fibrose cística (184), doenças de Parkinson (185) e Alzheimer (186).

Os mecanismos de enovelamento de proteínas multidomínio estão intrinsecamente relacionados à sua topologia. Domínios adjacentes podem estar covalentemente ligados ou separados por segmentos flexíveis, e essa organização topológica pode influenciar diretamente as vias de enovelamento, afetando estabilidade, cinética e interações entre domínios. Um dos mecanismos elucidados na literatura é a estratégia "dividir e conquistar", na qual os domínios enovelam-se independentemente e, posteriormente, se montam, reduzindo os graus de liberdade e diminuindo a escala de tempo de enovelamento (187). No entanto, diversas descobertas indicam que as interações entre domínios muitas vezes são necessárias para o enovelamento adequado, evidenciando uma relação entre independência e cooperação (188–190). Outro mecanismo relatado envolve a presença de estados intermediários dentro do funil de energia livre, desempenhando um papel fundamental na formação das vias e trajetórias de enovelamento (191,192). Para investigar esses mecanismos complexos, é necessário utilizar uma combinação de abordagens experimentais e modelos computacionais, sendo que simulações podem fornecer conhecimentos valiosos e esclarecer potenciais mecanismos observados experimentalmente (187–193).

Ademais, a compreensão do processo de enovelamento das proteínas multidomínio em suas estruturas funcionais apresenta relevância para o avanço no desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras, bem como para outras investigações científicas. A *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* (GRB2) figura como um exemplar de proteína multidomínio que tem despertado considerável interesse na comunidade científica, em virtude de sua participação em diversas vias celulares, incluindo reparo de DNA, proliferação celular e diferenciação (47,194).

Conforme discutido no **Capítulo 1**, a estrutura da GRB2 consiste em 217 aminoácidos e apresenta uma organização composta por um domínio SH2, flanqueado por dois domínios SH3. Estes domínios encontram-se interconectados por meio de alças desordenados, os quais conferem flexibilidade à proteína (13,195). Os domínios SH3 compreendem os primeiros 58 resíduos de aminoácidos (N-terminal) e os últimos 57 resíduos de aminoácidos (C-terminal) da sequência GRB2. Cada um desses domínios é constituído por uma hélice-3₁₀ e quatro ou cinco fitas- β enoveladas em duas folhas- β ou um barril- β . Ambos têm a especialização em facilitar interações proteína-proteína por meio do reconhecimento de motivos ricos em prolina (14). Por outro lado, o domínio SH2 tem afinidade por resíduos de tirosina fosforilada em proteínas-alvo, como quinases do receptor de fator de crescimento, sendo representado pelos resíduos entre 59 e 153 da sequência (196). Este domínio adota uma estrutura que se enovela em uma folha- β central com cinco fitas- β antiparalelas, circundadas por duas α -hélices, uma em cada lado (79).

Embora os domínios desempenhem funções similares, cada domínio SH3 do GRB2 exerce papéis distintos na regulação de complexos de sinalização precoce e a jusante. O domínio SH3N é crucial para a interação principal proteína-proteína com o SOS1, uma proteína de Fator de Troca de Guanina (GEF) citoplasmática responsável pela ativação de RAS e, conseqüentemente, da via de sinalização MAPK a jusante (197). Em contraste, o domínio SH3C está associado tanto à promoção quanto à inibição da sinalização, envolvendo-se não apenas na ligação com SOS1, mas também na homodimerização de proteínas e na interação com a FGFR2 (198). Ainda que estudos tenham indicado que um domínio isolado pode se enovelar com um funil de energia minimamente frustrado, em sistemas multi domínio, interações interdomínio podem alterar o padrão de frustração, aumentando a probabilidade de estados mal enovelados (199–201). Pesquisas recentes destacam o papel essencial do domínio SH3N na manutenção da estrutura e

estabilidade nativas da proteína, enquanto a exclusão do domínio SH3C não interfere nesse processo. Contudo, a exclusão do domínio SH3N resulta em um domínio SH2 instável e mal enovelado (202,203).

Tedesco et al. (204) enfatizam a importância da comunicação interdomínio e sua influência na estabilidade térmica da GRB2. Apesar de tais descobertas, a literatura atual carece de informações detalhadas sobre os mecanismos de enovelamento da GRB2, sua modulação da flexibilidade estrutural e a existência de possíveis estados intermediários de enovelamento funcional. Neste estudo, conduzimos experimentos de espectroscopia de Fluorescência e Dicroísmo Circular para completar resultados computacionais obtidos pelo grupo, a fim de compreender o comportamento do GRB2 durante a desnaturação térmica.

Com base nos resultados obtidos, empregamos técnicas computacionais para explorar a trajetória de enovelamento do GRB2, considerando mudanças estruturais, estados intermediários, flexibilidade multidomínio e o mecanismo de estabilidade termodinâmica. Destaca-se que identificamos duas possíveis trajetórias de enovelamento para o GRB2 e conjuntos metaestáveis que se desviam dos padrões convencionais de enovelamento descritos na literatura para proteínas multidomínio. Adicionalmente, nossos resultados confirmam a hipótese de que o domínio SH3N desempenha um papel crucial na promoção de contatos interdomínio, estabilizando a estrutura nativa da proteína.

3.3. OBJETIVOS

Investigar de maneira abrangente os mecanismos de enovelamento de proteínas multidomínio, com foco na proteína *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* (GRB2), visando a compreensão profunda dos processos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos envolvidos nesse fenômeno biológico.

3.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Expressar e Purificar a proteína GRB2 em sua forma monomérica;
- ❖ Desnaturar a proteína GRB2 via Espectroscopia de Fluorescência;
- ❖ Desnaturar a proteína GRB2 via Varredura Diferencial de Calorimetria (DSC).

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. PREPARO DE PROTEÍNA

A elaboração do vetor pET-28a(+) para a GRB2 fundamentou-se na estrutura completa da GRB2 (13); usualmente, a proteína GRB2 é expressa na conformação dimérica, e para possibilitar sua expressão na forma monomérica, procedeu-se com a mutação Y160F. Adicionalmente, uma *tag* 6xHis foi introduzida na porção N-terminal da proteína com o intuito de facilitar a purificação por meio de cromatografia de afinidade. A expressão da GRB2 ocorreu em *E.coli* BL21 (DE3), cultivada em meio Luria-Bertani (LB), sendo subsequentemente purificada através de uma coluna de afinidade IMAC HiTrap HP enriquecida com cobalto (*GE Life Sciences*). A purificação adicional da proteína foi realizada em uma coluna de exclusão de tamanho Superdex 75 (*GE Life Sciences*), acoplada ao sistema FPLC GE Akta, na qual a proteína foi eluída em um tampão composto por 20 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0), 50 mM de NaCl e 0,5 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF). A análise da pureza da amostra foi conduzida por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 15% (SDS-PAGE). A concentração da amostra foi determinada pela absorbância a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de $38.055 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O referido coeficiente foi obtido a partir da sequência de resíduos de aminoácidos, utilizando o *software* online ProtParam no servidor ExPasy (154).

3.4.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Realizamos medidas de espectroscopia de fluorescência em estado estacionário utilizando um espectrofluorímetro ISS PC1, equipado com uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e um banho refrigerado Neslab RTE-111. O comprimento de onda de excitação foi ajustado para 295 nm, escolhido devido à sua afinidade com o resíduo de triptofano da proteína. A coleta do espectro de emissão ocorreu na faixa de 305 a 500 nm, com correção para a fluorescência de fundo do tampão (205). O experimento foi conduzido em uma faixa de temperatura de 10 a 80 °C, com intervalos de 5 °C, exceto entre 45 e 61 °C, onde o intervalo de medição foi de 1 °C. A concentração da proteína foi mantida em 5 μM , em 2 mL de solução, utilizando um tampão de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ a 20 mM (pH 7,0) com 50 mM de NaCl.

Além dos espectros de emissão, o centro de massa espectral (CM) foi calculado conforme a **Equação 2.4.1**, onde F_i representa a emissão na posição de comprimento de onda λ_i . (206,207).

$$CM = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad (2.4.1)$$

3.4.3. ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

Foram conduzidas análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) por meio de um CSC 6300 Nano DSC III. Os dados foram obtidos mediante o aquecimento da amostra de 10 a 80 °C, a uma taxa de 0,5 °C min⁻¹. A concentração de proteína foi mantida em 80 µM, em 700 µL de solução contendo um tampão de 20 mM de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.0) com 50 mM de NaCl. A entalpia de van't Hoff (ΔH_{VH}) foi determinada por meio da aplicação da **Equação 2.4.2**, na qual R é a constante universal dos gases (8,31 J K⁻¹ mol⁻¹) (208).

$$\frac{d[\ln(K_{eq})]}{d(T^{-1})} = - \frac{\Delta H_{VH}}{R} \quad (2.4.2)$$

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.5.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA PROTEÍNA GRB2

Recorreu-se ao serviço *online ProtParam* para a obtenção das informações teóricas de natureza físico-química referentes à proteína GRB2. Alguns desses parâmetros são apresentados a seguir (conforme **Tabela 2.5.1**):

Tabela 2.5.1: Características Teóricas de Natureza Físico-Química da Proteína GRB2. Informações obtidas por meio do serviço *ProtParam*.

GRB2	
Nº de Resíduos	217
Massa Molecular (kDa)	25,1
Ponto Isoelétrico	5,89
ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)	38.055

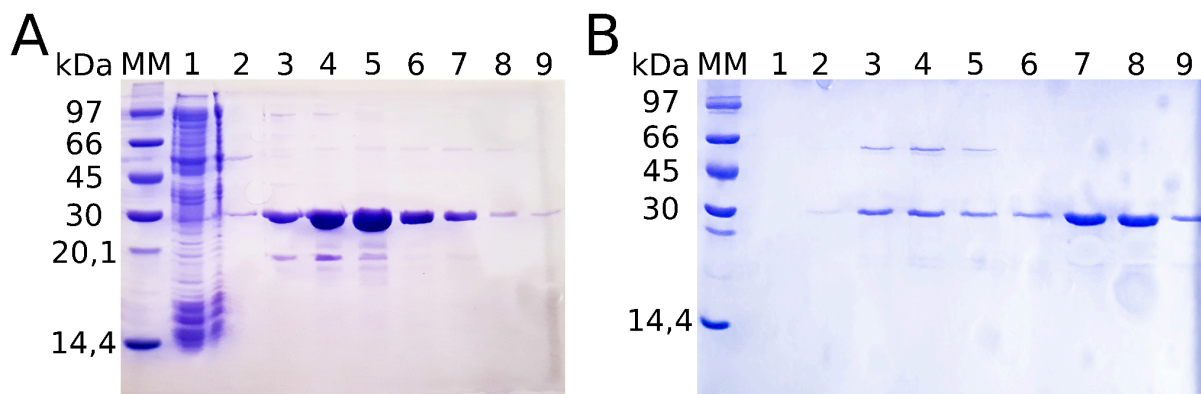
Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros obtidos desempenharam um papel crucial na orientação das estratégias relacionadas à expressão, purificação, preparo de tampões e todos os procedimentos conduzidos neste estudo.

3.5.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GRB2

O meio de cultura, após ser submetido à sonicação e filtração, passou pelo processo de purificação por afinidade ao cobalto, sendo eluído com uma concentração de imidazol variando entre 40 mM e 200 mM, conforme apresentado na **Figura 2.5.1A**. Com o intuito de aprimorar a pureza da amostra e realizar a troca do tampão, procedeu-se à purificação por exclusão molecular, cujo resultado é evidenciado no gel de SDS-PAGE 15%, conforme ilustrado na **Figura 2.5.1B**. Os resultados obtidos indicam que a proteína foi purificada com elevado grau de pureza, viabilizando a condução adequada dos experimentos biofísicos propostos.

Figura 2.5.1: Processo de Purificação da Proteína GRB2. **A)** Gel de SDS-PAGE 15%, corado com azul brilhante Coomassie®, representativo da purificação por afinidade ao cobalto. MM) Marcador Molecular; 1) Extrato bruto; 2) 20 mM; 3) 40 mM; 4) 60 mM; 5) 80 mM; 6) 100 mM; 7) 200 mM; 8) 500 mM; 9) 1M de imidazol. **B)** De 1 a 9, relacionado à purificação por exclusão molecular, com eluição em tampão de 20 mM de Fosfato de Sódio (11,5 mM Na_2HPO_4 ; 8,5 mM NaH_2PO_4) a pH 7,0, contendo 100 mM de NaCl.

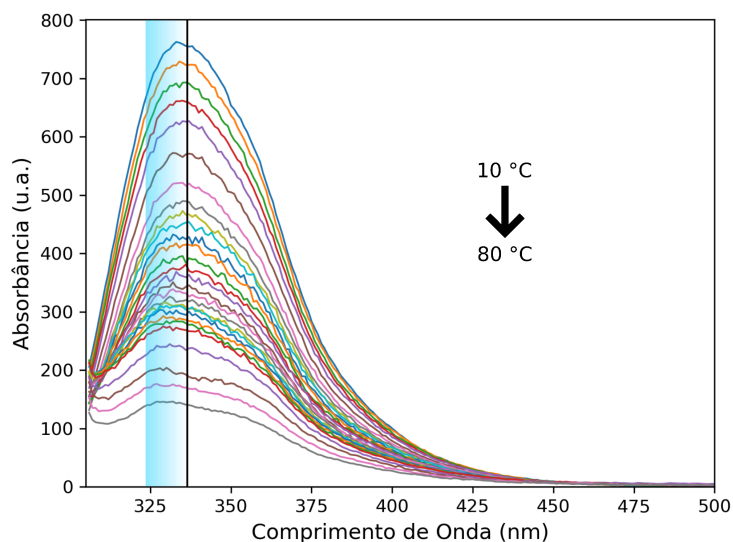


Fonte: Autoria própria.

3.5.3. PERFIL DE DESENOVELAMENTO DA PROTEÍNA GRB2 VIA FLUORESCÊNCIA

Para investigar o perfil termodinâmico da proteína GRB2, foram conduzidos experimentos de espectroscopia de fluorescência, nos quais foram registrados espectros em diferentes faixas de temperatura, variando de 10°C a 80°C, conforme evidenciado na **Figura 2.5.2**. A análise dos espectros revela uma diminuição na intensidade e um prolongamento do pico de intensidade à medida que a temperatura aumenta, indicando um processo de desnaturação em andamento.

Figura 2.5.2: Análise do espectro de emissão de fluorescência da proteína GRB2 em variações de temperatura. Os espectros foram adquiridos ao longo de um intervalo térmico compreendido entre 10 °C (representado pela linha azul superior) e 80 °C (indicado pela linha preta inferior).

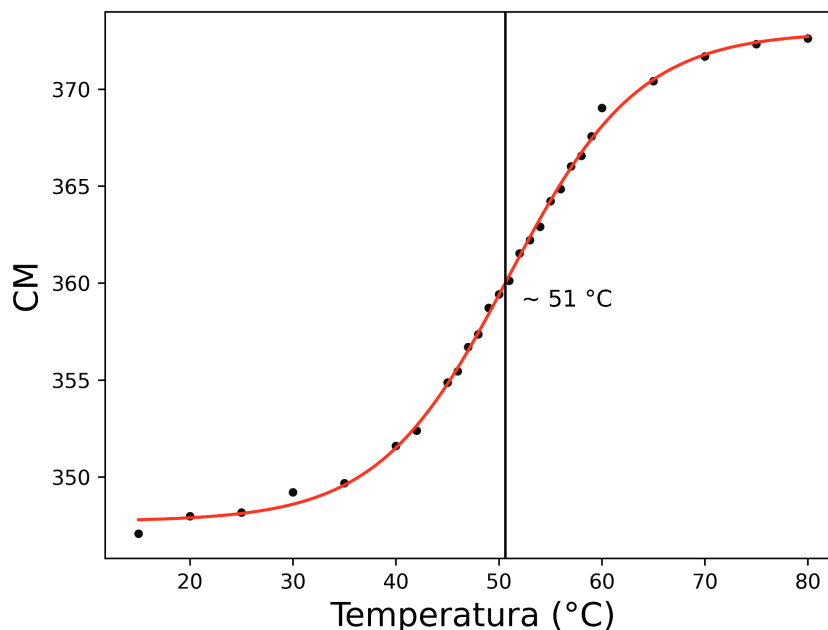


Fonte: Adaptada da referência (209).

É possível observar um deslocamento do pico espectral para regiões de comprimento de onda menor, caracterizado como um *blueshift*, denotando a exposição do triptofano ao solvente (210). Esse fenômeno corrobora a hipótese de desnaturação da proteína. A alteração na posição do pico espectral sugere mudanças conformacionais, possivelmente relacionadas à exposição de resíduos hidrofóbicos durante a desnaturação térmica (205).

A análise dos espectros possibilita uma investigação aprofundada das mudanças conformacionais ao longo do perfil térmico da proteína GRB2. No entanto, a simples observação dos espectros na **Figura 2.5.2** não oferece uma determinação precisa sobre a presença de estruturas intermediárias durante o processo de desnaturação da proteína. Para explorar essa possibilidade, conduziu-se o cálculo do centro de massa espectral (conforme a **Equação 2.4.1**).

Figura 2.5.3: Determinação do Centro de Massa Espectral (CM). Efetuada por meio da análise dos dados obtidos na espectroscopia de fluorescência, em que os círculos pretos denotam os dados experimentais, e a curva vermelha representa o ajuste teórico.



Fonte: Adaptada da referência (209).

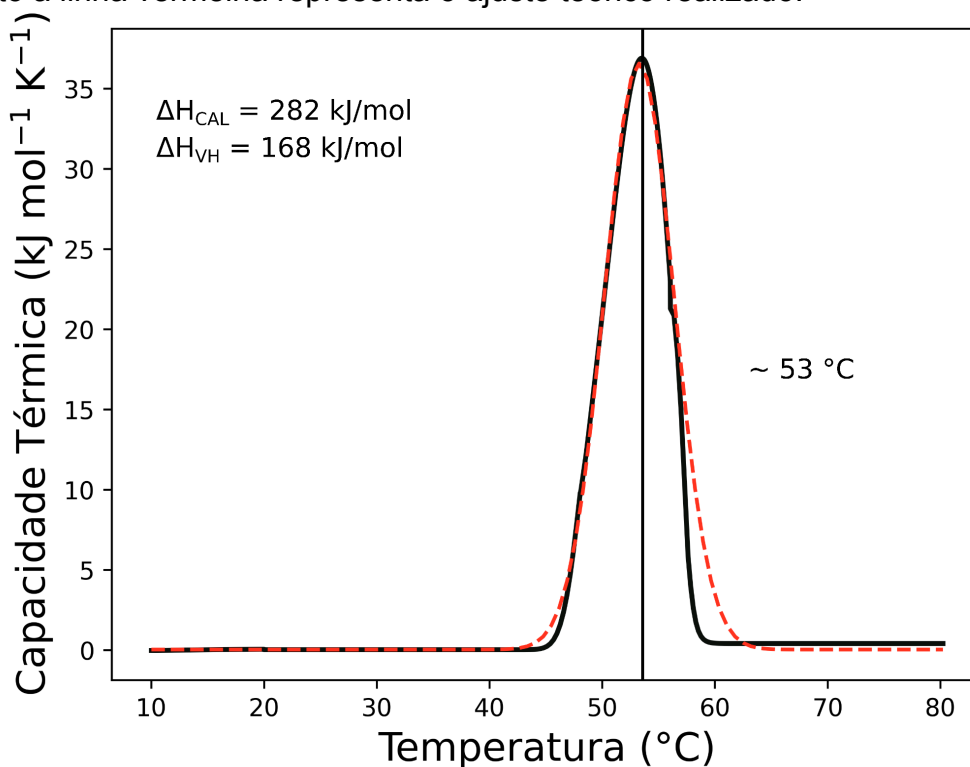
Ao analisar a **Figura 2.5.3**, os pontos pretos representam os dados experimentais de cada espectro de fluorescência para diferentes temperaturas, enquanto a curva em vermelho representa o ajuste teórico realizado por meio de um fit sigmoidal. Notavelmente, o ajuste teórico revelou uma forma sigmoidal, indicando a ocorrência de apenas dois estados, enovelado e desenovelado. Não foi possível identificar estados intermediários por meio desta técnica, contudo, foi possível determinar que a temperatura de *melting*, onde a proteína apresenta populações tanto enovelada quanto desenovelada, está próxima de 51°C, indicando uma considerável estabilidade da proteína.

Para enriquecer nossas análises, optamos por realizar experimentos de Calorimetria de Varredura Diferencial, tema que será abordado na próxima seção, visando uma compreensão mais abrangente do comportamento térmico da proteína GRB2.

3.5.4. PERFIL DE DESENOVELAMENTO DA PROTEÍNA GRB2 VIA CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL

Os experimentos de DSC foram conduzidos registrando termogramas em diversas faixas de temperatura, abrangendo de 10°C a 80°C, conforme apresentado na **Figura 2.5.4**. A análise do termograma revela uma distribuição gaussiana de dois estados, sinalizando um processo de desnaturação com a presença de estados enovelados e desnaturados.

Figura 2.5.4: Termograma da Proteína GRB2 obtido por meio de Calorimetria Diferencial de Varredura. A linha preta corresponde aos resultados experimentais, enquanto a linha vermelha representa o ajuste teórico realizado.



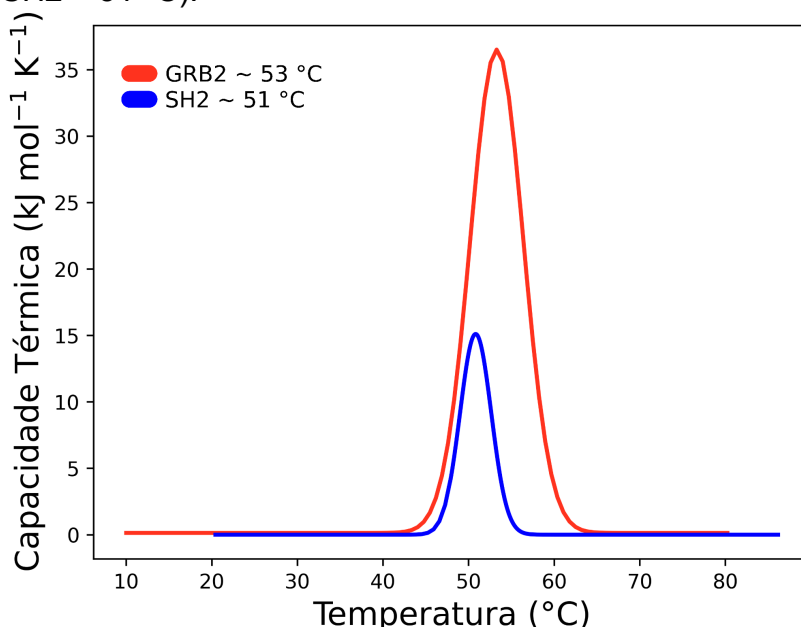
Fonte: Adaptada da referência (209).

Os resultados obtidos por meio do DSC revelaram curvas distintivas de desdobramento conforme a temperatura aumentava, indicando um processo de desnaturação bem definido na proteína GRB2. A temperatura de *melting* determinada a partir das medidas de DSC foi aproximadamente 53 °C, um valor consistente com aquele obtido por meio do cálculo do centro de massa espectral, reforçando a robustez dos resultados.

Ao analisar a discrepância entre a entalpia calorimétrica calculada (282 kJ/mol) a partir do termograma completo e a entalpia de van't Hoff (168 kJ/mol), observa-se que a proteína GRB2 provavelmente transita por estados intermediários durante a desnaturação térmica. Essa observação pode ser explicada pela independência de domínio.

Dando continuidade à investigação, repetiu-se o experimento isoladamente para o domínio GRB2-SH2 (**Figura 2.5.5**). Os resultados revelaram uma diferença de aproximadamente 2 °C na temperatura de dobramento em comparação com os experimentos monoméricos completos de GRB2. Essa discrepância sugere que, apesar da aparente independência na desnaturação quando considerado como um todo, os domínios individuais ainda podem interagir, exercendo influência nas propriedades termodinâmicas da estrutura monomérica de GRB2.

Figura 2.5.5: Análises Termodinâmicas dos Perfis da Proteína GRB2 e do Domínio GRB2-SH2 Conduzidas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Os dados experimentais revelam que ambos os perfis, representados pela curva vermelha para GRB2 e pela curva azul para GRB2-SH2, exibem similaridades marcantes, incluindo valores de temperatura de transição térmica próximos (GRB2 $\approx$ 53 °C; GRB2-SH2 $\approx$ 51 °C).



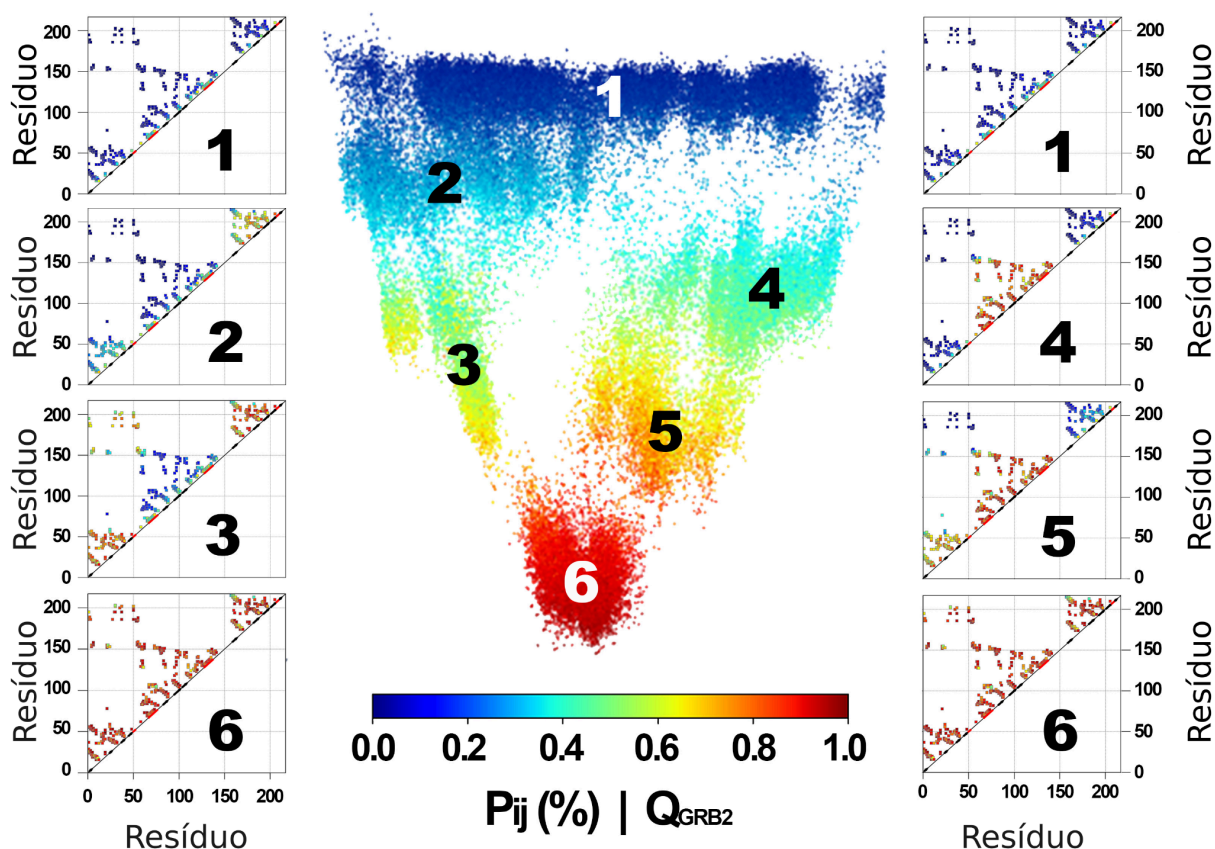
Fonte: Adaptada da referência (209).

Essa constatação ressalta a complexidade das interações dentro da proteína, indicando que, embora apresente independência de domínio durante o processo de desnaturação global, as interações locais desempenham um papel crucial na

estabilidade estrutural do GRB2 monomérico. Essa abordagem experimental, incluindo a análise de domínios isolados, oferece uma compreensão mais abrangente dos mecanismos subjacentes à desnaturação térmica da proteína GRB2.

Em síntese, este capítulo ressalta a variabilidade e a comunicação interdomínios da proteína GRB2, aspectos de grande relevância biológica que possibilitam à proteína desempenhar suas funções como adaptadora e reguladora. A parte computacional (descrita no artigo publicado (209)) demonstrou por meio da análise do perfil de energia livre e do termograma que existem estados intermediários de enovelamento, uma vez que seus três domínios distintos não se enovelam simultaneamente. Adicionalmente, empregando nossa metodologia, construímos o funil de energia livre, revelando as diversas possibilidades de e as diferentes rotas de enovelamento dos domínios GRB2 (**Figura 2.5.6**). Esta informação é crucial, uma vez que cada domínio apresenta características e funções específicas; por exemplo, enquanto o GRB2-SH3 atua como domínio de reconhecimento para proteínas contendo sequências ricas em prolina, o GRB2-SH2 interage com outras moléculas e proteínas fosforiladas, sendo também responsável pela oligomerização da GRB2. A complexidade no arranjo e funcionamento dos domínios evidencia a importância de distintas rotas e estados parcialmente enovelados, os quais podem se adaptar ao ambiente conforme as exigências para o adequado funcionamento das vias de sinalização.

Figura 2.5.6: Correlação Estrutural entre o Funil de Energia e os Mapas de Contato é Destacada, Evidenciando os Conjuntos Correspondentes a cada Mapa. Os mapas laterais são coloridos conforme a probabilidade de formação de contatos (P_{ij}), variando de poucos contatos formados (0,1%) associados a domínios desdobrados (azul) até contatos formados (1%) e domínios dobrados (vermelho). Os pontos de cada conformação no funil são coloridos pela fração normalizada de contatos nativos (Q_{GRB2}). A probabilidade de contatos é calculada utilizando o cluster de estruturas obtido pelo ELViM, correspondente aos números destacados no funil (1–6).



Fonte: Adaptada da referência (209).

3.6. CONCLUSÕES

Na conclusão deste estudo acerca da proteína GRB2, emerge uma perspectiva abrangente das complexidades termodinâmicas e estruturais subjacentes ao seu comportamento em diferentes condições térmicas. A exploração do perfil termodinâmico, conduzida por meio de experimentos de espectroscopia de fluorescência e calorimetria de varredura diferencial, proporcionou conhecimentos cruciais sobre a resposta da proteína a variações de temperatura.

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência revelaram, mediante a observação de alterações nos espectros e do deslocamento do centro de massa espectral para regiões de comprimento de onda menores (*blueshift*), indícios do processo de desnaturação da proteína GRB2. A análise desses dados possibilitou a construção do perfil térmico da proteína, indicando a presença de estados enovelados e desnaturados e culminando em uma temperatura de *melting* de aproximadamente 51°C, ressaltando a considerável estabilidade da proteína.

A complementaridade dos resultados foi reforçada pelos experimentos de calorimetria de varredura diferencial, cujos termogramas evidenciaram curvas distintivas de desdobramento, delineando um processo de desnaturação bem definido na proteína GRB2. A temperatura de *melting*, corroborada pelos dados do centro de massa espectral, convergiu para um valor aproximado de 53°C, validando a robustez das conclusões.

A observação da independência de domínio durante a desnaturação global da proteína foi enriquecida pelos experimentos isolados do domínio SH2, destacando uma interação significativa entre os domínios individuais e ressaltando a importância das interações locais na estabilidade estrutural do GRB2 monomérico. Essa abordagem experimental proporciona uma compreensão mais abrangente dos mecanismos subjacentes à desnaturação térmica da proteína GRB2.

Dessa forma, este estudo não apenas esclarece os fenômenos termodinâmicos e estruturais da proteína GRB2, mas também estabelece uma base sólida para investigações futuras e aplicações práticas, especialmente na compreensão das vias de sinalização envolvidas em processos biológicos e patológicos. A complexidade revelada nesta pesquisa destaca a necessidade contínua de investigações aprofundadas para explorar plenamente o potencial da proteína GRB2 em contextos biomédicos.

3.7. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar a desnaturação térmica dos domínios NSH3 e CSH3 por meio de espectroscopia de fluorescência e calorimetria exploratória diferencial;
- ❖ Realizar a desnaturação química da proteína GRB2 e de seus domínios utilizando calorimetria exploratória diferencial, calorimetria exploratória diferencial e dicroísmo circular;
- ❖ Realizar o assinalamento da proteína GRB2 e dos domínios NSH3 e CSH3 por meio de ressonância magnética nuclear;
- ❖ Realizar a desnaturação da proteína GRB2 e seus domínios via ressonância magnética nuclear.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise das interações entre proteínas e peptídeos é essencial para a compreensão dos mecanismos de ação das proteínas nas vias biológicas, fornecendo uma perspectiva molecular do ambiente de ligação e seu impacto na função proteica. Este estudo investigou a interação entre o domínio GRB2-SH2 e os peptídeos MRE11-pY, MRE11-22 e MRE11-07, derivados da proteína MRE11, bem como os fosfopeptídeos H2AX-pSpY, H2AX-pS e H2AX-pY, derivados da histona H2AX.

No caso do MRE11-pY, foi observada uma interação não convencional, com a fosfotirosina se ligando ao sítio de interação I, enquanto os resíduos pY+1 a pY+5 permaneceram fora do sítio II. O peptídeo MRE11-22 exibiu um comportamento semelhante ao peptídeo MRE11-pY. Experimentos com o MRE11-07 não revelaram interações, atribuídas à escassez de resíduos e à ausência de tirosina fosforilada.

Quanto aos fosfopeptídeos H2AX-pSpY e H2AX-pS, não foram observadas perturbações significativas nos deslocamentos químicos, sugerindo uma possível competição entre fosfotirosina e fosfoserina ou um efeito inibitório da fosfoserina na interação com o domínio SH2. No entanto, o fosfopeptídeo H2AX-pY demonstrou uma interação notável, indicando uma preferência do domínio GRB2-SH2 por tirosina fosforilada.

No que diz respeito aos estudos termodinâmicos, foi constatado que a proteína GRB2 mantém uma considerável estabilidade estrutural, com uma temperatura de desnaturação em torno de 51-53°C, evidenciando a complexidade dos processos de desnaturação térmica. Observou-se a independência de domínios durante a desnaturação global, destacando a interação significativa entre os domínios individuais e a importância das interações locais na estabilidade da proteína.

Este estudo não apenas contribui para a compreensão das interações moleculares da proteína GRB2 em diferentes contextos biológicos, mas também estabelece uma base sólida para investigações futuras.

REFERÊNCIAS

1. Angelou M. And Still I Rise. Hachette UK; 2013. 96 p.
2. Voet D. Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level. Wiley; 2019. 1184 p.
3. Alberts B. Molecular Biology of the Cell. Garland Science; 2017. 3413 p.
4. Watson JD. Molecular Biology of the Gene. Pearson; 2014. 872 p.
5. Karp G, Iwasa J, Marshall W. Karp's Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. John Wiley & Sons; 2015. 832 p.
6. Craig N, Green R, Cohen-Fix O, Greider C, Storz G, Wolberger C. Molecular Biology: Principles of Genome Function. OUP Oxford; 2014. 945 p.
7. Schlessinger J. Receptor Tyrosine Kinases: Legacy of the First Two Decades. Cold Spring Harb Perspect Biol. março de 2014;6(3):a008912.
8. Wheeler DL, Yarden Y, organizadores. Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 15 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-11888-8>
9. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Cell. 25 de junho de 2010;141(7):1117–34.
10. He Y, He G, He T. Specifically Targeted Transport of Plasma Membrane Transporters: From Potential Mechanisms for Regulating Cell Health or Disease to Applications. Membranes. 27 de setembro de 2021;11(10):736.
11. Flynn DC. Adaptor proteins. Oncogene. outubro de 2001;20(44):6270–2.
12. Tari AM, Lopez-Berestein G. GRB2: A pivotal protein in signal transduction. Semin Oncol. 1º de outubro de 2001;28:142–7.
13. Maignan S, Guilloteau JP, Fromage N, Arnoux B, Becquart J, Ducruix A. Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. Science. 14 de abril de 1995;268(5208):291–3.
14. Kurochkina N, Guha U. SH3 domains: modules of protein-protein interactions. Biophys Rev. março de 2013;5(1):29–39.
15. Gmeiner WH, Horita DA. Implications of SH3 domain structure and dynamics for protein regulation and drug design. Cell Biochem Biophys. 2001;35(2):127–40.
16. Kaneko T, Li L, Li SSC. The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. Front Biosci J Virtual Libr. 1º de maio de 2008;13:4938–52.
17. Mayer BJ. The discovery of modular binding domains: building blocks of cell signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. novembro de 2015;16(11):691–8.
18. Musacchio A, Wilmanns M, Saraste M. Structure and function of the SH3 domain. Prog Biophys Mol Biol. 1994;61(3):283–97.
19. Dalgarno DC, Botfield MC, Rickles RJ. SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. Biopolymers. 1997;43(5):383–400.
20. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. Science. 19 de fevereiro de 1993;259(5098):1157–61.
21. Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. Cell. 11 de março de 1994;76(5):933–45.
22. Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. Science. 18 de novembro de 1994;266(5188):1241–7.
23. Lim WA, Richards FM, Fox RO. Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. Nature. 24 de novembro de 1994;372(6504):375–9.
24. Kraskouskaya D, Duodu E, Arpin CC, Gunning PT. Progress towards the development of SH2 domain inhibitors. Chem Soc Rev. 21 de abril de 2013;42(8):3337–70.
25. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. Biochim Biophys Acta. 7 de junho de 1996;1287(2–3):121–49.
26. Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction

- domains. *Science*. 18 de abril de 2003;300(5618):445–52.
27. Kawata T, Shevchenko A, Fukuzawa M, Jermyn KA, Totty NF, Zhukovskaya NV, et al. SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell*. 13 de junho de 1997;89(6):909–16.
 28. Marengere LEM, Pawson T. Structure and function of SH2 domains. *J Cell Sci*. 1º de janeiro de 1994;1994(Supplement_18):97–104.
 29. Pawson T, Gish GD, Nash P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol*. 1º de dezembro de 2001;11(12):504–11.
 30. Nash PD. Why modules matter. *FEBS Lett*. 2012;586(17):2572–4.
 31. Jaber Chehayeb R, Boggon TJ. SH2 Domain Binding: Diverse FLVRs of Partnership. *Front Endocrinol*. 18 de setembro de 2020;11:575220.
 32. Belov AA, Mohammadi M. Grb2, a Double-Edged Sword of Receptor Tyrosine Kinase Signaling. *Sci Signal*. 6 de novembro de 2012;5(249):pe49–pe49.
 33. Kozier N, Barua D, Henderson C, Nice EC, Burgess AW, Hlavacek WS, et al. Recruitment of the Adaptor Protein Grb2 to EGFR Tetramers. *Biochemistry*. 29 de abril de 2014;53(16):2594–604.
 34. Ahmed Z, Lin CC, Suen KM, Melo FA, Levitt JA, Suhling K, et al. Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity. *J Cell Biol*. 18 de fevereiro de 2013;200(4):493–504.
 35. Ahmed Z, Timsah Z, Suen KM, Cook NP, Lee GR, Lin CC, et al. Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. *Nat Commun*. 24 de junho de 2015;6:7354.
 36. Ijaz M, Wang F, Shahbaz M, Jiang W, Fathy AH, Nesa EU. The Role of Grb2 in Cancer and Peptides as Grb2 Antagonists. *Protein Pept Lett*. 24(12):1084–95.
 37. Neumann K, Oellerich T, Urlaub H, Wienands J. The B-lymphoid Grb2 interaction code. *Immunol Rev*. novembro de 2009;232(1):135–49.
 38. Ding C, Tang W, Wu H, Fan X, Luo J, Feng J, et al. The PEAK1–PPP1R12B axis inhibits tumor growth and metastasis by regulating Grb2/PI3K/Akt signalling in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 1º de fevereiro de 2019;442:383–95.
 39. Robert J. MAP Kinase Pathway. Em: Robert J, organizador. *Textbook of Cell Signalling in Cancer: An Educational Approach* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 16 de janeiro de 2024]. p. 27–41. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-14340-8_2
 40. Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L, et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*. outubro de 2019;11(10):1618.
 41. Lin CC, Melo FA, Ghosh R, Suen KM, Stagg LJ, Kirkpatrick J, et al. Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2. *Cell*. 22 de junho de 2012;149(7):1514–24.
 42. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 10 de agosto de 2017;170(4):605–35.
 43. Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng MH, et al. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1º de fevereiro de 2002;80(2):239–56.
 44. Verbeek BS, Adriaansen-slot SS, Rijksen G, Vroom TM. Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J Pathol*. 1997;183(2):195–203.
 45. Yamazaki T, Zaal K, Hailey D, Presley J, Lippincott-Schwartz J, Samelson LE. Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization. *J Cell Sci*. 1º de maio de 2002;115(9):1791–802.
 46. Hou B, Xu S, Xu Y, Gao Q, Zhang C, Liu L, et al. Grb2 binds to PTEN and regulates its nuclear translocation to maintain the genomic stability in DNA damage response. *Cell Death Dis*. 18 de julho de 2019;10(8):1–14.
 47. Ye Z, Xu S, Shi Y, Bacolla A, Syed A, Moiani D, et al. GRB2 enforces homology-directed repair initiation by MRE11. *Sci Adv*. agosto de 2021;7(32):eabe9254.
 48. Nickoloff JA, Hoekstra MF. DNA Damage and Repair: Volume 2: DNA Repair in Higher

- Eukaryotes. Springer Science & Business Media; 1998. 928 p.
49. Spivak G. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair*. 1º de dezembro de 2015;36:13–8.
 50. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. janeiro de 2008;18(1):85–98.
 51. Krokan HE, Bjørås M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1º de abril de 2013;5(4):a012583.
 52. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*. 1º de julho de 2012;40(13):5795–818.
 53. Hefferin ML, Tomkinson AE. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair*. 8 de junho de 2005;4(6):639–48.
 54. Stracker TH, Petrini JHJ. The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol*. fevereiro de 2011;12(2):90–103.
 55. Paull TT, Deshpande RA. The Mre11/Rad50/Nbs1 Complex: recent insights into catalytic activities and ATP-driven conformational changes. *Exp Cell Res*. 15 de novembro de 2014;329(1):139–47.
 56. He J, Shi LZ, Truong LN, Lu CS, Razavian N, Li Y, et al. Rad50 Zinc Hook Is Important for the Mre11 Complex to Bind Chromosomal DNA Double-stranded Breaks and Initiate Various DNA Damage Responses *. *J Biol Chem*. 14 de setembro de 2012;287(38):31747–56.
 57. Desai-Mehta A, Cerosaletti KM, Concannon P. Distinct Functional Domains of Nibrin Mediate Mre11 Binding, Focus Formation, and Nuclear Localization. *Mol Cell Biol*. março de 2001;21(6):2184–91.
 58. Schiller CB, Lammens K, Guerini I, Coordes B, Feldmann H, Schlauderer F, et al. Structure of Mre11–Nbs1 complex yields insights into ataxia-telangiectasia-like disease mutations and DNA damage signaling. *Nat Struct Mol Biol*. julho de 2012;19(7):693–700.
 59. Xiao A, Li H, Shechter D, Ahn SH, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, et al. WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*. janeiro de 2009;457(7225):57–62.
 60. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 15 de junho de 2017;66(6):801–17.
 61. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*. 1º de agosto de 2000;10(15):886–95.
 62. Nikolova T, Dvorak M, Jung F, Adam I, Krämer E, Gerhold-Ay A, et al. The γ H2AX Assay for Genotoxic and Nongenotoxic Agents: Comparison of H2AX Phosphorylation with Cell Death Response. *Toxicol Sci*. 1º de julho de 2014;140(1):103–17.
 63. Kuo LJ, Yang LX. γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo*. 1º de maio de 2008;22(3):305–9.
 64. Kopp B, Khoury L, Audebert M. Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Arch Toxicol*. 1º de agosto de 2019;93(8):2103–14.
 65. Spycher C, Miller ES, Townsend K, Pavic L, Morrice NA, Janscak P, et al. Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11–RAD50–NBS1 complex to damaged chromatin. *J Cell Biol*. 14 de abril de 2008;181(2):227–40.
 66. Chapman JR, Jackson SP. Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep*. agosto de 2008;9(8):795–801.
 67. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Cell*. 29 de dezembro de 2005;123(7):1213–26.
 68. Lloyd J, Chapman JR, Clapperton JA, Haire LF, Hartsuiker E, Li J, et al. A Supramodular FHA/BRCT-Repeat Architecture Mediates Nbs1 Adaptor Function in Response to DNA Damage. *Cell*. 2 de outubro de 2009;139(1):100–11.
 69. Syed A, Tainer JA. The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of

- Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem.* 20 de junho de 2018;87:263–94.
70. Wang D, Liu G, Meng Y, Chen H, Ye Z, Jing J. The Configuration of GRB2 in Protein Interaction and Signal Transduction. *Biomolecules.* março de 2024;14(3):259.
 71. Chen CC, Feng W, Lim PX, Kass EM, Jasin M. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2018;2(1):313–36.
 72. De Sarkar N, Dasgupta S, Chatterjee P, Coleman I, Ha G, Ang LS, et al. Genomic attributes of homology-directed DNA repair deficiency in metastatic prostate cancer. *JCI Insight.* 6(23):e152789.
 73. Bodo S, Campagne C, Thin TH, Higginson DS, Vargas HA, Hua G, et al. Single-dose radiotherapy disables tumor cell homologous recombination via ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 1º de fevereiro de 2019;129(2):786–801.
 74. Winters IP, Chiou SH, Paulk NK, McFarland CD, Lalgudi PV, Ma RK, et al. Multiplexed in vivo homology-directed repair and tumor barcoding enables parallel quantification of Kras variant oncogenicity. *Nat Commun.* 12 de dezembro de 2017;8(1):2053.
 75. Ransburgh DJR, Chiba N, Ishioka C, Toland AE, Parvin JD. Identification of Breast Tumor Mutations in BRCA1 That Abolish Its Function in Homologous DNA Recombination. *Cancer Res.* 31 de janeiro de 2010;70(3):988–95.
 76. Sadowski I, Stone JC, Pawson T. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol.* dezembro de 1986;6(12):4396–408.
 77. Waksman G, Shoelson SE, Pant N, Cowburn D, Kuriyan J. Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell.* 12 de março de 1993;72(5):779–90.
 78. Waksman G, Kumaran S, Lubman O. SH2 domains: role, structure and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* janeiro de 2004;6(3):1–18.
 79. Sanches K, Caruso IP, Almeida FCL, Melo FA. The dynamics of free and phosphopeptide-bound Grb2-SH2 reveals two dynamically independent subdomains and an encounter complex with fuzzy interactions. *Sci Rep.* 3 de agosto de 2020;10(1):13040.
 80. Hu J, Hubbard SR. Structural Basis for Phosphotyrosine Recognition by the Src Homology-2 Domains of the Adapter Proteins SH2-B and APS. *J Mol Biol.* 4 de agosto de 2006;361(1):69–79.
 81. Matsuura Y. High-resolution structural analysis shows how different crystallographic environments can induce alternative modes of binding of a phosphotyrosine peptide to the SH2 domain of Fer tyrosine kinase. *Protein Sci.* 2019;28(11):2011–9.
 82. Chehayeb RJ, Stiegler AL, Boggon TJ. Crystal structures of p120RasGAP N-terminal SH2 domain in its apo form and in complex with a p190RhoGAP phosphotyrosine peptide. *PLOS ONE.* de dez de de 2019;14(12):e0226113.
 83. Morris R, Zhang Y, Ellyard JI, Vinuesa CG, Murphy JM, Laktyushin A, et al. Structural and functional analysis of target recognition by the lymphocyte adaptor protein LNK. *Nat Commun.* 20 de outubro de 2021;12(1):6110.
 84. Liu BA, Engelmann BW, Nash PD. The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction. *FEBS Lett.* 14 de agosto de 2012;586(17):2597–605.
 85. Vidal M, Gigoux V, Garbay C. SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1º de novembro de 2001;40(2):175–86.
 86. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 Domains: Elements that Control Interactions of Cytoplasmic Signaling Proteins. *Science.* 3 de maio de 1991;252(5006):668–74.
 87. Waksman G, Kominos D, Robertson SC, Pant N, Baltimore D, Birge RB, et al. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature.* 20 de agosto de 1992;358(6388):646–53.
 88. Sanches K, Caruso IP, Almeida FCL, Melo FA. NMR assignment of free ¹H, ¹⁵N and

- 13C-Grb2-SH2 domain. *Biomol NMR Assign.* 1º de outubro de 2019;13(2):295–8.
89. Machida K, Mayer BJ. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* 14 de fevereiro de 2005;1747(1):1–25.
 90. Matsuda M, Mayer BJ, Fukui Y, Hanafusa H. Binding of Transforming Protein, P47gag-crk, to a Broad Range of Phosphotyrosine-containing Proteins. *Science.* 22 de junho de 1990;248(4962):1537–9.
 91. Ladbury JE, Arold S. Searching for specificity in SH domains. *Chem Biol.* 1º de janeiro de 2000;7(1):R3–8.
 92. Scott JD, Pawson T. Cell Signaling in Space and Time: Where Proteins Come Together and When They're Apart. *Science.* 27 de novembro de 2009;326(5957):1220–4.
 93. Bray D. Signaling complexes: biophysical constraints on intracellular communication. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998;27:59–75.
 94. Pawson T. Specificity in Signal Transduction: From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems. *Cell.* 23 de janeiro de 2004;116(2):191–203.
 95. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature.* 16 de fevereiro de 1995;373(6515):573–80.
 96. Schlessinger J, Lemmon MA. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ.* 15 de julho de 2003;2003(191):RE12.
 97. Yaffe MB. Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* março de 2002;3(3):177–86.
 98. Park YB, Chae J, Kim YC, Cho Y. Crystal structure of human Mre11: understanding tumorigenic mutations. *Struct Lond Engl* 1993. 9 de novembro de 2011;19(11):1591–602.
 99. Jungmichel S, Stucki M. MDC1: The art of keeping things in focus. *Chromosoma.* 1º de agosto de 2010;119(4):337–49.
 100. Singh N, Basnet H, Wiltshire TD, Mohammad DH, Thompson JR, Héroux A, et al. Dual recognition of phosphoserine and phosphotyrosine in histone variant H2A.X by DNA damage response protein MCPH1. *Proc Natl Acad Sci.* 4 de setembro de 2012;109(36):14381–6.
 101. Bloch F. Nuclear Induction. *Phys Rev.* 1º de outubro de 1946;70(7–8):460–74.
 102. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys Rev.* 1º de janeiro de 1946;69(1–2):37–8.
 103. Emsley JW, Feeney J. Forty years of Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 30 de julho de 2007;50(4):179–98.
 104. Emsley JW, Feeney J. Milestones in the first fifty years of NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 1º de dezembro de 1995;28(1):1–9.
 105. Shoolery JN. The development of experimental and analytical high resolution NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 1º de dezembro de 1995;28(1):37–52.
 106. Scribd [Internet]. [citado 28 de fevereiro de 2024]. NMR Tables Bruker2012 | PDF. Disponível em: <https://www.scribd.com/document/362337110/NMR-Tables-Bruker2012>
 107. Macomber RS. A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy. Wiley; 1998. 404 p.
 108. Levitt MH. Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance. John Wiley & Sons; 2013. 885 p.
 109. Eisberg R, Eisberg RM, Resnick R. Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei, and Particles. Wiley; 1985. 864 p.
 110. Hornak JP. Basics of NMR. Rochester Institute of Technology, Center for Imaging Science; 2002. book.
 111. Günther H. NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry. John Wiley & Sons; 2013. 734 p.
 112. Keeler J. Understanding NMR Spectroscopy. John Wiley & Sons; 2011. 676 p.
 113. Karplus M. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J Chem Phys.* 13 de agosto de 2004;30(1):11.
 114. Bodenhausen G, Ruben DJ. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced

- heteronuclear spectroscopy. *Chem Phys Lett.* 1º de janeiro de 1980;69(1):185–9.
115. Cavanagh J, Skelton NJ, Fairbrother WJ, Rance M, III AGP. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice.* Elsevier; 2010. 915 p.
 116. Pascal SM. *NMR Primer: An HSQC-based Approach with Vector Animations.* IM Publications; 2008. 146 p.
 117. de la Vega-Hernández K, Antuch M. The heteronuclear single-quantum correlation (HSQC) experiment: vectors versus product operators. *J Chem Educ.* 2015;92(3):482–7.
 118. Zuiderweg ERP. Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 8 de janeiro de 2002;41(1):1–7.
 119. McCoy MA, Wyss DF. Spatial localization of ligand binding sites from electron current density surfaces calculated from NMR chemical shift perturbations. *J Am Chem Soc.* 2 de outubro de 2002;124(39):11758–63.
 120. Williamson MP. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* agosto de 2013;73:1–16.
 121. Kohlhoff KJ, Robustelli P, Cavalli A, Salvatella X, Vendruscolo M. Fast and accurate predictions of protein NMR chemical shifts from interatomic distances. *J Am Chem Soc.* 7 de outubro de 2009;131(39):13894–5.
 122. Arnold MR, Kremer W, Lüdemann HD, Kalbitzer HR. ¹H-NMR parameters of common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides Gly-Gly-X-Ala at pressures between 0.1 and 200 MPa. *Biophys Chem.* 2 de maio de 2002;96(2–3):129–40.
 123. Tamiola K, Acar B, Mulder FAA. Sequence-specific random coil chemical shifts of intrinsically disordered proteins. *J Am Chem Soc.* 29 de dezembro de 2010;132(51):18000–3.
 124. Han B, Liu Y, Ginzing SW, Wishart DS. SHIFTX2: significantly improved protein chemical shift prediction. *J Biomol NMR.* maio de 2011;50(1):43–57.
 125. Stevens SY, Sanker S, Kent C, Zuiderweg ER. Delineation of the allosteric mechanism of a cytidyltransferase exhibiting negative cooperativity. *Nat Struct Biol.* novembro de 2001;8(11):947–52.
 126. Allain FH, Yen YM, Masse JE, Schultze P, Dieckmann T, Johnson RC, et al. Solution structure of the HMG protein NHP6A and its interaction with DNA reveals the structural determinants for non-sequence-specific binding. *EMBO J.* 4 de maio de 1999;18(9):2563–79.
 127. Coggins BE, Li X, McClerren AL, Hindsgaul O, Raetz CRH, Zhou P. Structure of the LpxC deacetylase with a bound substrate-analog inhibitor. *Nat Struct Biol.* agosto de 2003;10(8):645–51.
 128. Williamson RA, Carr MD, Frenkiel TA, Feeney J, Freedman RB. Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. *Biochemistry.* 11 de novembro de 1997;36(45):13882–9.
 129. Terada T, Ito Y, Shirouzu M, Tateno M, Hashimoto K, Kigawa T, et al. Nuclear magnetic resonance and molecular dynamics studies on the interactions of the Ras-binding domain of Raf-1 with wild-type and mutant Ras proteins. *J Mol Biol.* 12 de fevereiro de 1999;286(1):219–32.
 130. Wishart DS, Sykes BD, Richards FM. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol.* 20 de novembro de 1991;222(2):311–33.
 131. Urbaniak MD, Muskett FW, Finucane MD, Caddick S, Woolfson DN. Solution structure of a novel chromoprotein derived from apo-neocarzinostatin and a synthetic chromophore. *Biochemistry.* 1º de outubro de 2002;41(39):11731–9.
 132. Roy K, organizador. *In silico drug design: repurposing techniques and methodologies.* London ; San Diego, CA: Academic Press; 2019. 1 p.
 133. Zhang W, organizador. *Computer-Aided Drug Discovery [Internet].* New York, NY: Springer; 2016 [citado 1º de fevereiro de 2024]. (Methods in Pharmacology and

- Toxicology). Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3521-5>
134. Green D. In Silico Drug Discovery and Design . Edited by Claudio N. Cavasotto. ChemMedChem. 2016;11(6):638–638.
 135. Guedes IA, de Magalhães CS, Dardenne LE. Receptor–ligand molecular docking. Biophys Rev. 1º de março de 2014;6(1):75–87.
 136. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. J Comput Chem. dezembro de 2009;30(16):2785–91.
 137. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. Nucleic Acids Res. 1º de julho de 2011;39(suppl_2):W270–7.
 138. Molecular Operating Environment (MOE). Chemical Computing Group ULC;
 139. Liu N, Xu Z. Using LeDock as a docking tool for computational drug design. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. janeiro de 2019;218(1):012143.
 140. Homeyer N, Horn AHC, Lanig H, Sticht H. AMBER force-field parameters for phosphorylated amino acids in different protonation states: phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine, and phosphohistidine. J Mol Model. 1º de fevereiro de 2006;12(3):281–9.
 141. Jo S, Cheng X, Lee J, Kim S, Park SJ, Patel DS, et al. CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation. J Comput Chem. 2017;38(15):1114–24.
 142. Vant JW, Sarkar D, Nguyen J, Baker AT, Vermaas JV, Singharoy A. Exploring cryo-electron microscopy with molecular dynamics. Biochem Soc Trans. 25 de fevereiro de 2022;50(1):569–81.
 143. Meisburger SP, Thomas WC, Watkins MB, Ando N. X-ray Scattering Studies of Protein Structural Dynamics. Chem Rev. 28 de junho de 2017;117(12):7615–72.
 144. Guo J, Zhou HX. Protein Allostery and Conformational Dynamics. Chem Rev. 8 de junho de 2016;116(11):6503–15.
 145. Bank RPD. PDB Statistics: PDB Data Distribution by Experimental Method and Molecular Type [Internet]. [citado 5 de março de 2024]. Disponível em: <https://www.rcsb.org/stats/summary>
 146. Decherchi S, Cavalli A, Tiwary P, Grisoni F. Molecular Dynamics and Machine Learning in Drug Discovery. Frontiers Media SA; 2021. 119 p.
 147. McCammon JA, Gelin BR, Karplus M. Dynamics of folded proteins. Nature. junho de 1977;267(5612):585–90.
 148. Wang L. Molecular Dynamics: Studies of Synthetic and Biological Macromolecules. BoD – Books on Demand; 2012. 448 p.
 149. Leimkuhler B, Matthews C. Molecular Dynamics: With Deterministic and Stochastic Numerical Methods. Springer International Publishing; 2015. 443 p.
 150. Liwo A. Computational Methods to Study the Structure and Dynamics of Biomolecules and Biomolecular Processes: From Bioinformatics to Molecular Quantum Mechanics. Springer International Publishing; 2019. 851 p.
 151. Fuxreiter M. Computational Approaches to Protein Dynamics: From Quantum to Coarse-Grained Methods. CRC Press; 2014. 458 p.
 152. Lindahl, Abraham, Hess, Spoel van der. GROMACS 2020.3 Manual. 9 de julho de 2020 [citado 5 de fevereiro de 2024]; Disponível em: <https://zenodo.org/records/3923644>
 153. Shilling PJ, Mirzadeh K, Cumming AJ, Widesheim M, Köck Z, Daley DO. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli. Commun Biol. 7 de maio de 2020;3(1):1–8.
 154. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Em: Walker JM, organizador. The Proteomics Protocols Handbook [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2005 [citado 26 de outubro de 2022]. p. 571–607. (Springer Protocols Handbooks). Disponível em: <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
 155. Lear S, Cobb SL. Pep-Calculator: a set of web utilities for the calculation of peptide and

- peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. *J Comput Aided Mol Des.* 1º de março de 2016;30(3):271–7.
156. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR.* novembro de 1995;6(3):277–93.
 157. Maciejewski MW, Schuyler AD, Gryk MR, Moraru II, Romero PR, Ulrich EL, et al. NMRbox: A Resource for Biomolecular NMR Computation. *Biophys J.* 25 de abril de 2017;112(8):1529–34.
 158. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AMJJ. HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *J Am Chem Soc.* 19 de fevereiro de 2003;125(7):1731–7.
 159. Ettmayer P, France D, Gounarides J, Jarosinski M, Martin MS, Rondeau JM, et al. Structural and Conformational Requirements for High-Affinity Binding to the SH2 Domain of Grb2. *J Med Chem.* 1º de março de 1999;42(6):971–80.
 160. Lill MA, Danielson ML. Computer-aided drug design platform using PyMOL. *J Comput Aided Mol Des.* 1º de janeiro de 2011;25(1):13–9.
 161. Daura X, Gademann K, Jaun B, Seebach D, van Gunsteren WF, Mark AE. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. *Angew Chem Int Ed.* 1999;38(1–2):236–40.
 162. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2010;78(8):1950–8.
 163. Steinbrecher T, Latzer J, Case DA. Revised AMBER Parameters for Bioorganic Phosphates. *J Chem Theory Comput.* 13 de novembro de 2012;8(11):4405–12.
 164. Khoury GA, Thompson JP, Smadbeck J, Kieslich CA, Floudas CA. Forcefield_PTM: Ab Initio Charge and AMBER Forcefield Parameters for Frequently Occurring Post-Translational Modifications. *J Chem Theory Comput.* 10 de dezembro de 2013;9(12):5653–74.
 165. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys.* 15 de julho de 1983;79(2):926–35.
 166. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys.* 1º de dezembro de 1981;52(12):7182–90.
 167. Berendsen HJC. Transport Properties Computed by Linear Response through Weak Coupling to a Bath. Em: Meyer M, Pontikis V, organizadores. *Computer Simulation in Materials Science: Interatomic Potentials, Simulation Techniques and Applications* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1991 [citado 5 de março de 2024]. p. 139–55. (NATO ASI Series). Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-011-3546-7_7
 168. Gan W, Roux B. Binding Specificity of SH2 Domains: Insight from Free Energy Simulations. *Proteins.* março de 2009;74(4):996–1007.
 169. Liu BA, Jablonowski K, Raina M, Arcé M, Pawson T, Nash PD. The Human and Mouse Complement of SH2 Domain Proteins—Establishing the Boundaries of Phosphotyrosine Signaling. *Mol Cell.* 23 de junho de 2006;22(6):851–68.
 170. Claridge TDW, organizador. *Front matter.* Em: *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry (Third Edition)* [Internet]. Boston: Elsevier; 2016 [citado 1º de junho de 2022]. p. iii. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080999869000154>
 171. Teilum K, Kunze MBA, Erlendsson S, Kragelund BB. (S)Pinning down protein interactions by NMR. *Protein Sci Publ Protein Soc.* março de 2017;26(3):436–51.
 172. Lee JH. Protein-ligand interaction investigated by HSQC titration study. *J Korean Magn Reson Soc.* 2018;22(4):125–31.
 173. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1º de fevereiro de 1996;14(1):33–8.
 174. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic

- diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng Des Sel*. 1º de fevereiro de 1995;8(2):127–34.
175. Lindfors HE, Drijfhout JW, Ubbink M. The Src SH2 domain interacts dynamically with the focal adhesion kinase binding site as demonstrated by paramagnetic nmr spectroscopy. *IUBMB Life*. 2012;64(6):538–44.
 176. McKercher MA, Wuttke DS. NMR Chemical Shift Mapping of SH2 Peptide Interactions. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1555:269–90.
 177. Basu MK, Poliakov E, Rogozin IB. Domain mobility in proteins: functional and evolutionary implications. *Brief Bioinform*. maio de 2009;10(3):205–16.
 178. Bashton M, Chothia C. The Generation of New Protein Functions by the Combination of Domains. *Structure*. 1º de janeiro de 2007;15(1):85–99.
 179. Lee MJ, Yaffe MB. Protein Regulation in Signal Transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. junho de 2016;8(6):a005918.
 180. Ajit Tamadaddi C, Sahi C. J domain independent functions of J proteins. *Cell Stress Chaperones*. 1º de julho de 2016;21(4):563–70.
 181. Schaeffer RD, Daggett V. Protein folds and protein folding. *Protein Eng Des Sel*. 1º de janeiro de 2011;24(1–2):11–9.
 182. Moreau KL, King JA. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol Med*. 1º de maio de 2012;18(5):273–82.
 183. Muntau AC, Gersting SW. Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis*. 1º de dezembro de 2010;33(6):649–58.
 184. Fraser-Pitt D, O'Neil D. Cystic fibrosis – a multiorgan protein misfolding disease. *Future Sci OA [Internet]*. setembro de 2015 [citado 18 de maio de 2023];1(2). Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/fso.15.57>
 185. Mehra S, Sahay S, Maji SK. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 1º de outubro de 2019;1867(10):890–908.
 186. Nussbaum JM, Seward ME, Bloom GS. Alzheimer disease. *Prion*. 1º de janeiro de 2013;7(1):14–9.
 187. Wang Y, Chu X, Suo Z, Wang E, Wang J. Multidomain Protein Solves the Folding Problem by Multifunnel Combined Landscape: Theoretical Investigation of a Y-Family DNA Polymerase. *J Am Chem Soc*. 22 de agosto de 2012;134(33):13755–64.
 188. Liu Z, Thirumalai D. Cooperativity and Folding Kinetics in a Multidomain Protein with Interwoven Chain Topology. *ACS Cent Sci*. 22 de junho de 2022;8(6):763–74.
 189. Gershenson A, Gosavi S, Faccioli P, Wintrobe PL. Successes and challenges in simulating the folding of large proteins. *J Biol Chem*. 3 de janeiro de 2020;295(1):15–33.
 190. Batey S, Nickson AA, Clarke J. Studying the folding of multidomain proteins. *HFSP J*. 1º de dezembro de 2008;2(6):365–77.
 191. Giri Rao VVH, Gosavi S. On the folding of a structurally complex protein to its metastable active state. *Proc Natl Acad Sci*. 27 de fevereiro de 2018;115(9):1998–2003.
 192. Chu X, Suo Z, Wang J. Confinement and Crowding Effects on Folding of a Multidomain Y-Family DNA Polymerase. *J Chem Theory Comput*. 11 de fevereiro de 2020;16(2):1319–32.
 193. Lu Y, Zhu B, Li Q, Du J, Chen T. The folding and misfolding mechanisms of multidomain proteins. *Med Drug Discov*. 1º de junho de 2022;14:100126.
 194. Jang IK, Zhang J, Gu H. Grb2, a simple adapter with complex roles in lymphocyte development, function, and signaling. *Immunol Rev*. 2009;232(1):150–9.
 195. Chardin P, Cussac D, Maignan S, Ducruix A. The Grb2 adaptor. *FEBS Lett*. 1995;369(1):47–51.
 196. Liu BA, Nash PD. Evolution of SH2 domains and phosphotyrosine signalling networks. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 19 de setembro de 2012;367(1602):2556–73.
 197. McDonald CB, Seldeen KL, Deegan BJ, Farooq A. SH3 Domains of Grb2 Adaptor Bind to PXXP Motifs Within the Sos1 Nucleotide Exchange Factor in a Discriminate

- Manner. *Biochemistry*. 19 de maio de 2009;48(19):4074–85.
198. Liao TJ, Jang H, Nussinov R, Fushman D. High-Affinity Interactions of the nSH3/cSH3 Domains of Grb2 with the C-Terminal Proline-Rich Domain of SOS1. *J Am Chem Soc*. 19 de fevereiro de 2020;142(7):3401–11.
 199. Gianni S, Freiburger MI, Jemth P, Ferreira DU, Wolynes PG, Fuxreiter M. Fuzziness and Frustration in the Energy Landscape of Protein Folding, Function, and Assembly. *Acc Chem Res*. 2 de março de 2021;54(5):1251–9.
 200. Tian P, Best RB. Structural Determinants of Misfolding in Multidomain Proteins. *PLOS Comput Biol*. de mai de de 2016;12(5):e1004933.
 201. Gautier C, Troilo F, Cordier F, Malagrino F, Toto A, Visconti L, et al. Hidden kinetic traps in multidomain folding highlight the presence of a misfolded but functionally competent intermediate. *Proc Natl Acad Sci*. 18 de agosto de 2020;117(33):19963–9.
 202. Ochi S, Iiyama M, Oda M. Interdomain interactions in Grb2 revealed by the conformational stability and CD28 binding analysis. *Biophys Chem*. 1º de maio de 2022;284:106792.
 203. Pagano L, Pennacchiotti V, Diop A, Santorelli D, Pietrangeli P, Marcocci L, et al. Exploring the effect of tethered domains on the folding of Grb2 protein. *Arch Biochem Biophys*. 30 de novembro de 2022;731:109444.
 204. Tedesco JA, Dias RVR, Casteluci G, Pedro RP, de Oliveira LC, Caruso ÍP, et al. The influence of pH on the structure and stability of the Grb2 dimer reveals changes in the inter-domain and molecular interaction: Could it be a modulation mechanism? *Biophys Chem*. 1º de abril de 2023;295:106973.
 205. Lakowicz JR, organizador. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2006 [citado 30 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-0-387-46312-4>
 206. Pérez HA, Disalvo A, Frías M de LÁ. Effect of cholesterol on the surface polarity and hydration of lipid interphases as measured by Laurdan fluorescence: New insights. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1º de junho de 2019;178:346–51.
 207. Pulavarti SVSRK, Maguire JB, Yuen S, Harrison JS, Griffin J, Premkumar L, et al. From Protein Design to the Energy Landscape of a Cold Unfolding Protein. *J Phys Chem B*. 17 de fevereiro de 2022;126(6):1212–31.
 208. Weber G. van't Hoff revisited: enthalpy of association of protein subunits. *J Phys Chem*. 1º de janeiro de 1995;99(3):1052–9.
 209. Dias RVR, Pedro RP, Sanches MN, Moreira GC, Leite VBP, Caruso IP, et al. Unveiling Metastable Ensembles of GRB2 and the Relevance of Interdomain Communication during Folding. *J Chem Inf Model*. 23 de outubro de 2023;63(20):6344–53.
 210. Vivian JT, Callis PR. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J*. maio de 2001;80(5):2093–109.
 211. Akitt JW, Mann BE. *NMR and Chemistry: An Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, Fourth Edition. CRC Press; 2017. Dimensions 19.1x24.8 cm, book.

ANEXO A

Preparo de Células Competentes - Protocolo RbCl.

Tabela AI.1: Solução RF1.

Reagente	125 ml
Cloreto de Rubídio	1,5 g
Cloreto de Manganês	1,25 g
Cloreto de Cálcio	0,19 g
Glicerol 15% (m/v)	18,75 g
Acetato de Potássio	3,75 ml

*ajustar pH em 5,8.

**filtrar em membrana de resolução de 0,22 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Tabela AI.2: Solução RF2.

Reagente	125 ml
MOPS 0,5 M	2,5 ml
Cloreto de Rubídio	0,15 g
Cloreto de Cálcio	1,37 g
Glicerol 15% (m/v)	18,75 g

*ajustar pH em 6,8.

**filtrar em membrana de resolução de 0,22 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Tabela AI.3: Meio SOB.

Reagente	50 ml
Meio LB	24,438 ml
KCl 2,5 mM	312 μ l
Solução de Magnésio	250 μ l

Fonte: Autoria própria.

1. Transferir 500 μ l de cada pré-inóculo para novos frascos do tipo *Erlenmeyers* contendo 25 ml de meio SOB;
2. Incubar por 2h à 37°C sob 80 rpm;
3. Transferir a cultura para 2 tubos do tipo *falcon* de 15 ml;
4. Incubar em gelo por 15 minutos;
5. Centrifugar a 3000 rpm por 10 min à 4°C;
6. Descartar o sobrenadante;
7. Ressuspender em $\frac{1}{3}$ do volume inicial em solução RF1;
8. Incubar em gelo por 15 min;
9. Centrifugar a 3000 rpm por 10 min à 4°C;
10. Descartar o sobrenadante;
11. Ressuspender em $\frac{1}{12}$ do volume inicial em solução RF2;
12. Incubar em gelo por 15 min;
13. Distribuir em alíquotas de 100 μ l em tubos previamente gelados;
14. Congelar em nitrogênio líquido;
15. Armazenar em -80°C;

ANEXO B

Purificação Plasmidial - Protocolo Miniprep:

1. Centrifugar o meio com bactéria a 8000 rpm por 3 min à 25°C;
2. Adicionar 250 µl de tampão P1 e agitar;
3. Adicionar 250 µl de tampão P2 e agitar até ficar límpido e esperar 4 min;
4. Adicionar 350 µl de tampão N3 e agitar invertendo o tubo;
5. Centrifugar por 10 min a 13000 rpm;
6. Coletar o sobrenadante e colocar na coluna;
7. Centrifugar por 1 min e descartar sobrenadante;
8. Adicionar 750 µl de tampão PE e centrifugar por 1 min;
9. Descartar o resíduo e centrifugar novamente.
10. Transferir a coluna para um novo tubo do tipo *ependorf*;
11. Adicionar 60 µl de tampão EB e esperar por 1 min e logo após centrifugar por 1 min;

ANEXO C

INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*):

INEPT é uma técnica utilizada em RMN para aumentar o sinal de um núcleo com baixa razão giromagnética (“S” para os núcleos ^{13}C e ^{15}N) por transferência de polarização de um núcleo com alta razão giromagnética (“I” para o núcleo ^1H). A amplificação sinal-ruído máxima é γ_I/γ_S , sendo γ_I e γ_S as razões giromagnéticas dos núcleos de alta e baixa sensibilidade, respectivamente. No experimento INEPT, a transferência de polarização I para S é obtida explorando o acoplamento escalar entre os *spins* I e S (J_{IS}) de acordo com a sequência de pulsos (211):

$$90^\circ_x(I) - \frac{\tau}{2} - 180^\circ_x(I), 180^\circ_x(S) - \frac{\tau}{2} - 90^\circ_y(S), 90^\circ_x(S)$$

sendo α_β (I ou S) referente a um pulso de radiofrequência no núcleo I ou S resultando em uma rotação total de graus α em torno do eixo β . No final do atraso *spin-eco* τ , a evolução do deslocamento químico do *spin* I é reorientada pelo pulso de $180^\circ(I)$, enquanto o hamiltoniano do acoplamento escalar J_{IS} evolui graças ao pulso adicional de $180^\circ(S)$. Quando $\tau=1/2J_{IS}$, a coerência em fase I_y gerada pelo primeiro pulso de $90^\circ_x(I)$ é quantitativamente convertida em coerência anti-fase I (ou seja, $2I_xS_z$) no final do atraso τ . Os dois últimos pulsos INEPT então implementam a transferência de coerência real na anti-fase S-coerência $2I_zS_y$, possuindo uma mudança de fase crítica de 90° entre os dois pulsos de $90^\circ(I)$ do INEPT (211).

A geração de coerência S anti-fásica $2I_zS_y$ a partir da polarização de Boltzmann de equilíbrio $\gamma_I I_z$ explica por que o aumento teórico máximo da relação sinal-ruído é γ_I/γ_S . Entretanto, a evolução das constantes de acoplamento passivo (ou seja, J_{1H1H}), bem como o relaxamento transversal durante o atraso τ leva a melhorias experimentais do sinal-ruído abaixo do valor esperado de γ_I/γ_S . Outro benefício da sequência INEPT é que a duração do atraso entre varreduras é definida de acordo com a taxa de relaxamento longitudinal (R_1) do núcleo I ao invés do núcleo S (211).

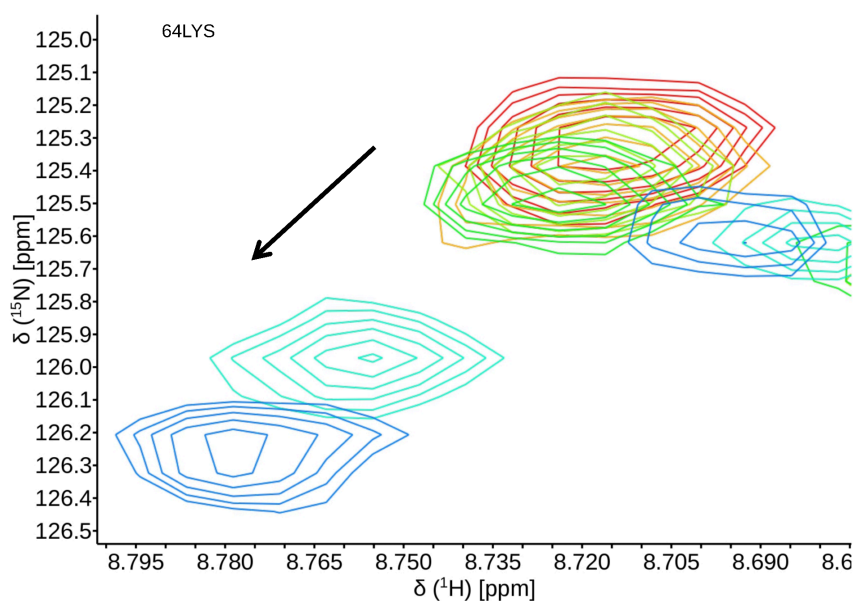
O aumento da polarização proporcionado pela sequência de pulsos INEPT é explorado em vários experimentos de RMN bi e tridimensionais, nos quais os

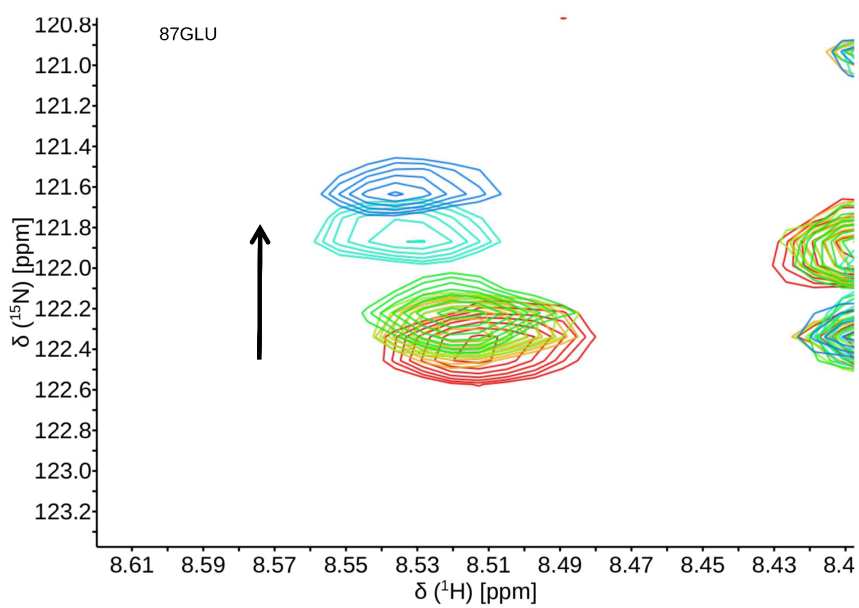
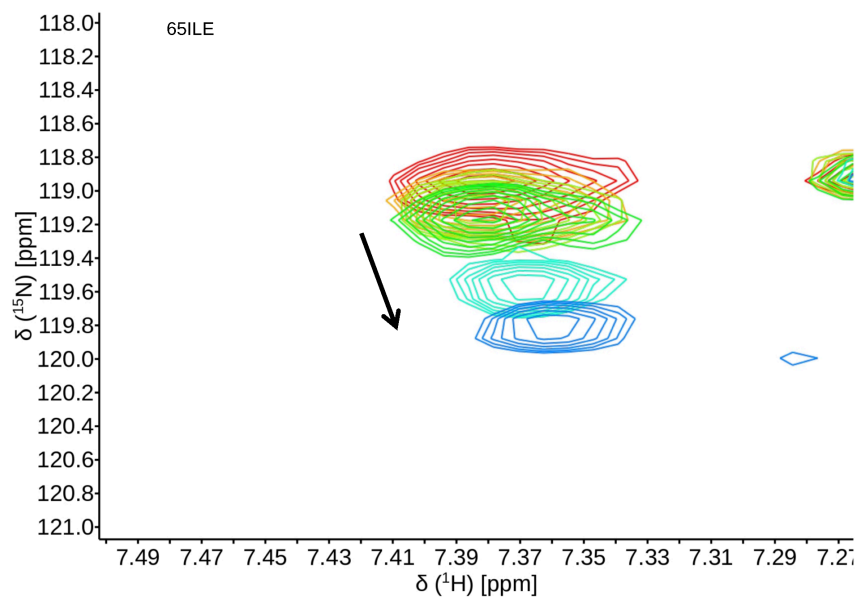
núcleos insensíveis (^{13}C e ^{15}N , por exemplo), são detectados indiretamente. Por exemplo, nos experimentos de HSQC o INEPT é seguido por um atraso de rotulagem de frequência para o núcleo S (ou seja, ^{13}C e ^{15}N), que é então reconvertido através de um esquema de retro-INEPT em um único quantum em fase I-coerência. Como resultado, a criação inicial e a detecção final da coerência aproveitam o núcleo I (^1H) com alta razão giromagnética, maximizando a sensibilidade (211).

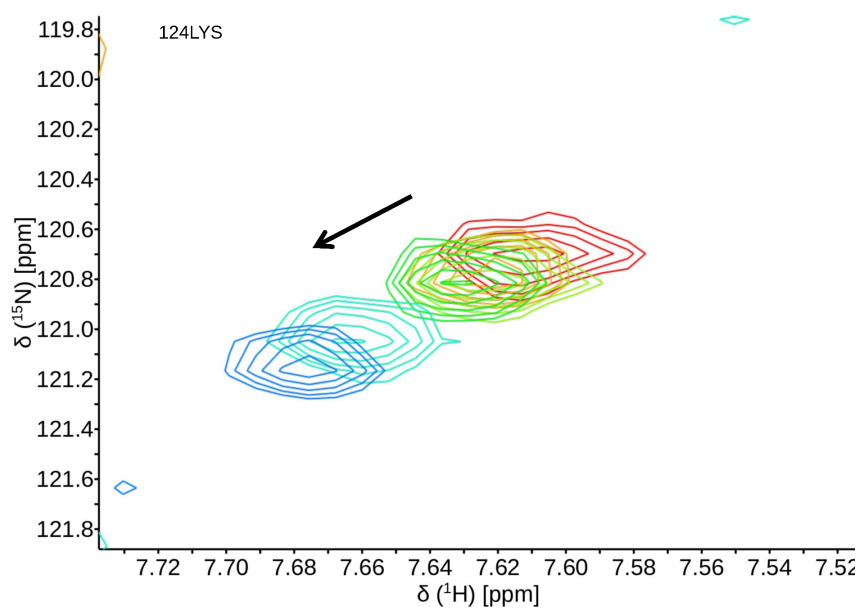
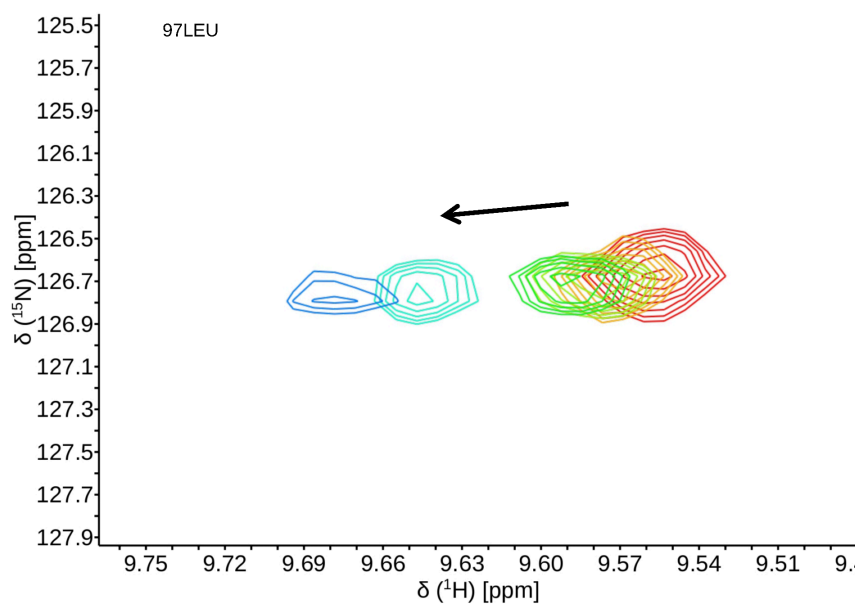
ANEXO D

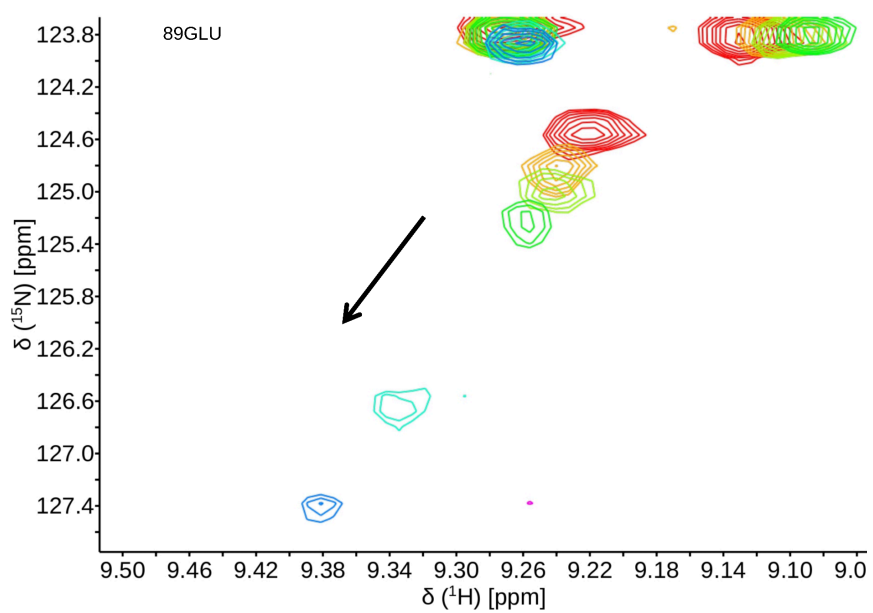
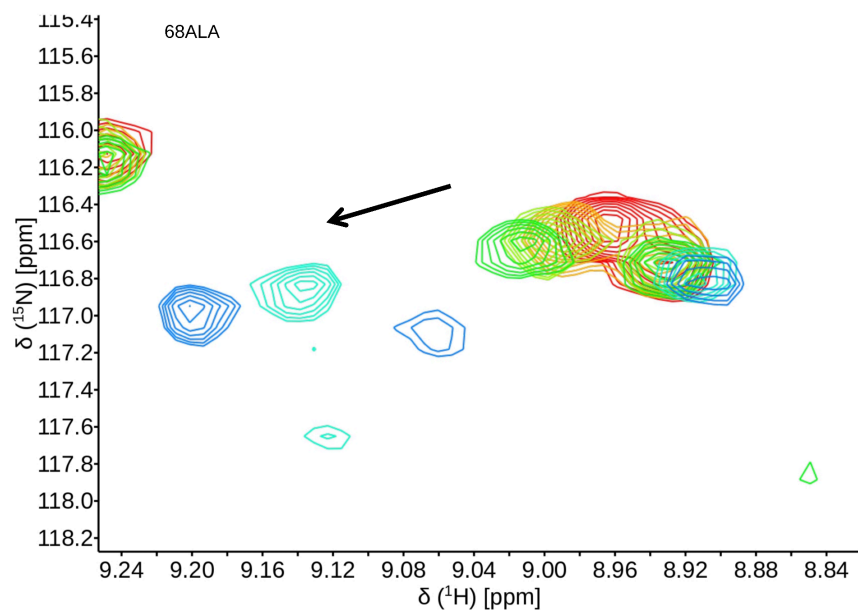
Através de experimentos de HSQC utilizando o domínio GRB2-SH2 livre, foram realizadas titulações para observar a interação entre o domínio e o peptídeo MRE11-pY. É possível observar alguns deslocamentos no espectro (**Figura 1.5.3**) e tais deslocamentos estão expostos abaixo (**Figura SIV.1**):

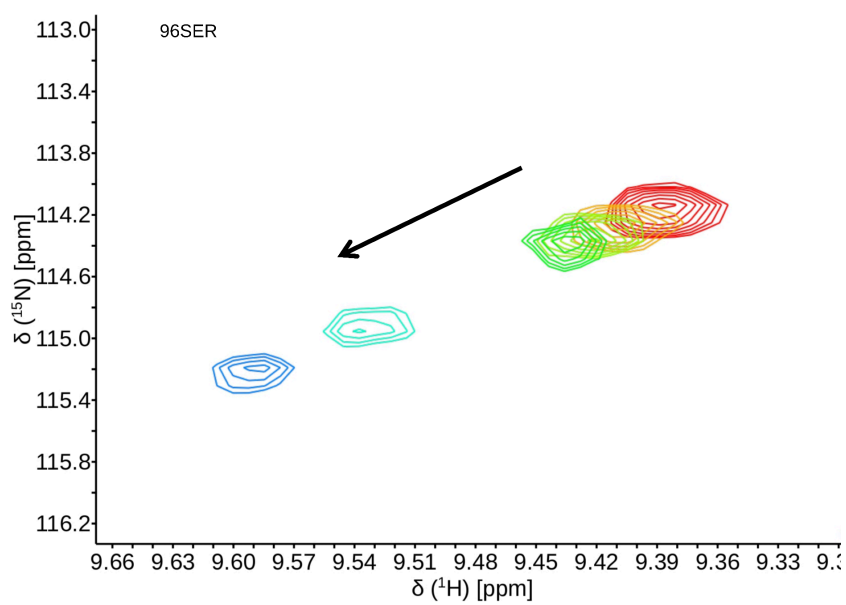
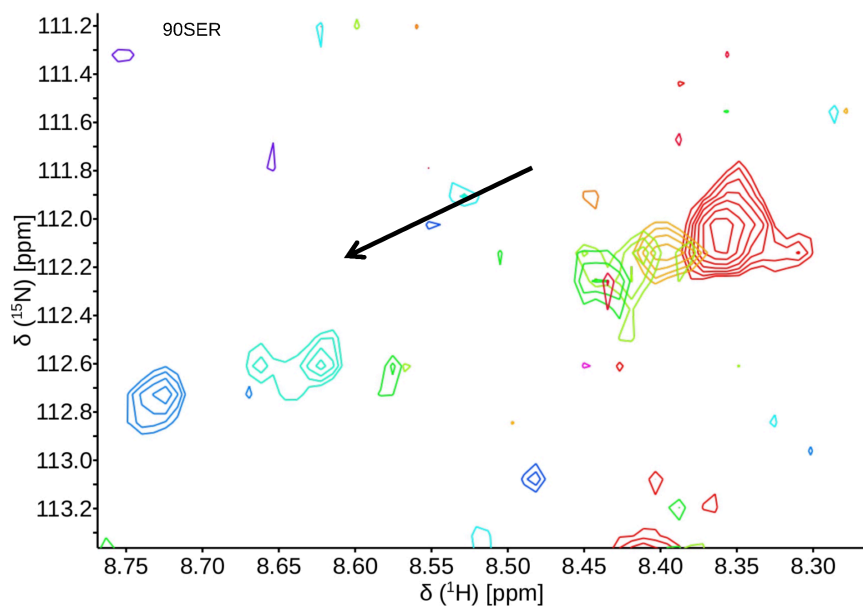
Figura SIV.1: Resíduos com *chemical shift* mais proeminentes da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-pY. Abaixo estão representados os resíduos de LYS64, ILE65, ARG67, ALA68, GLU87, GLU89, SER90, SER96, LEU97, PHE108, LYS109, GLN106, LEU111, LYS124. Os pontos vermelhos são do domínio GRB2-SH2 livre enquanto os pontos laranja, verde-claro, verde, azul-celeste e azul (25, 50, 100, 200 e 300 μ M, respectivamente) são do domínio GRB2-SH2 interagindo com o peptídeo MRE11-pY.

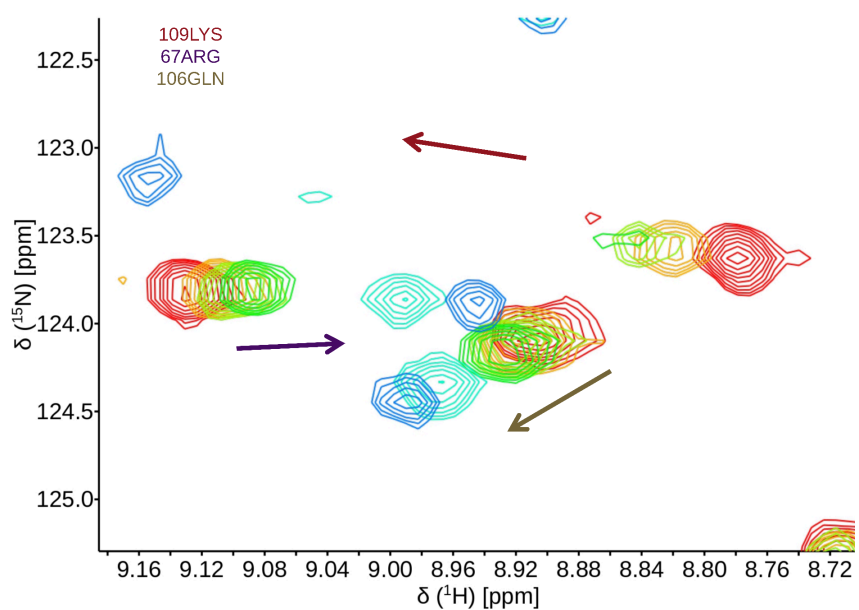
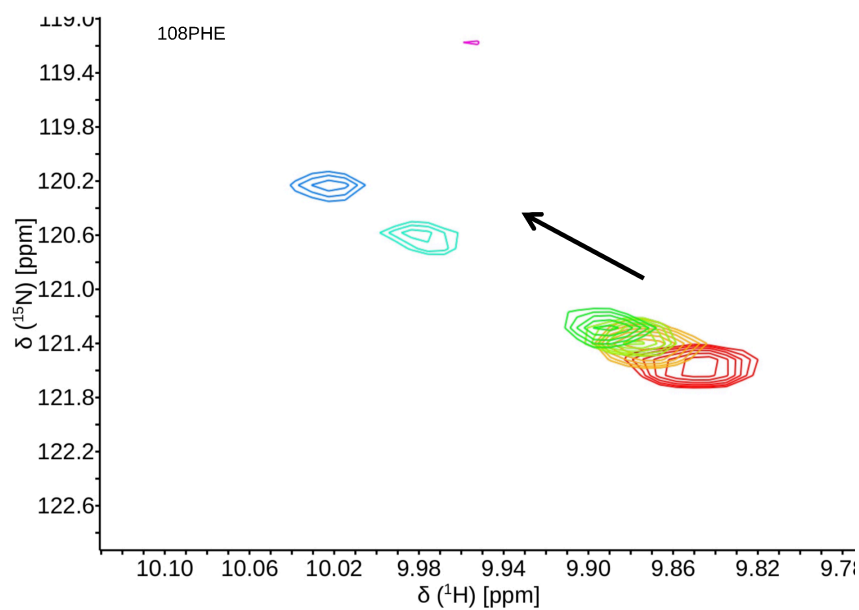


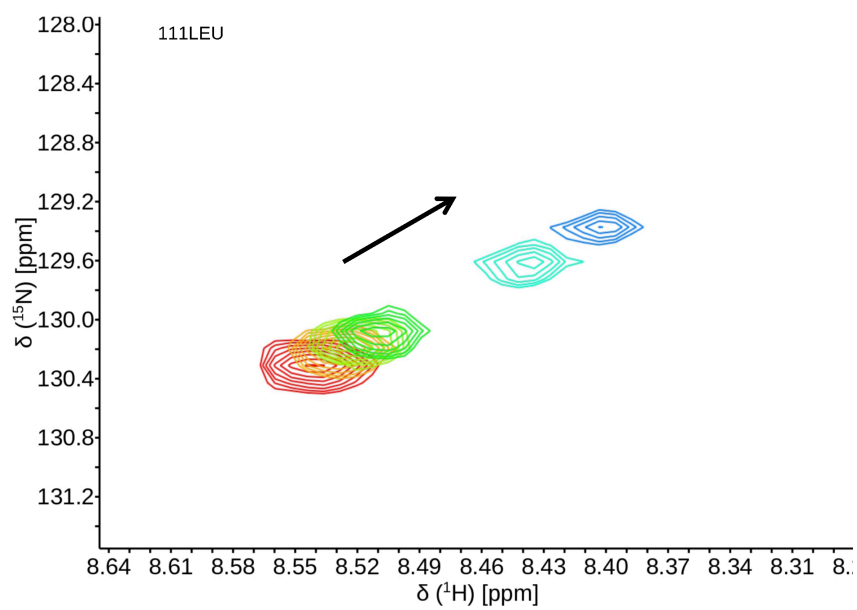










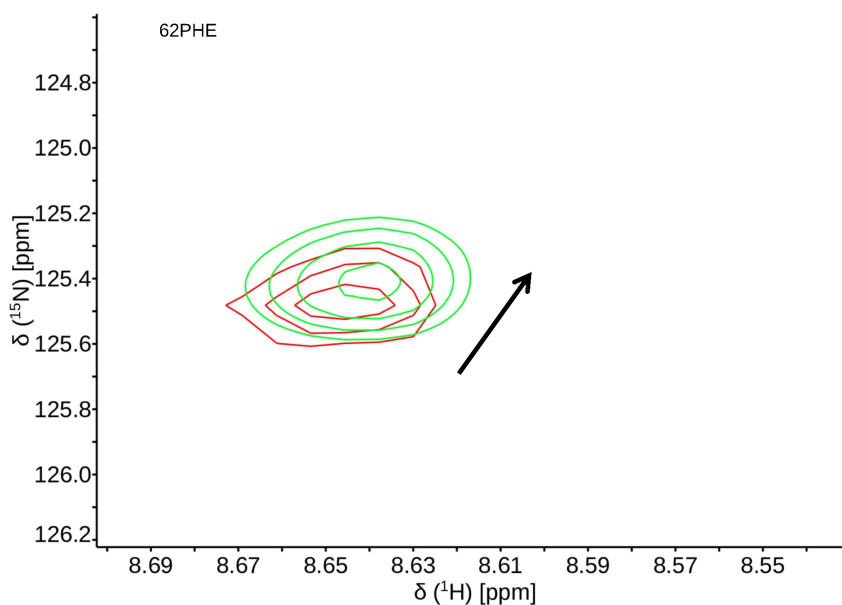


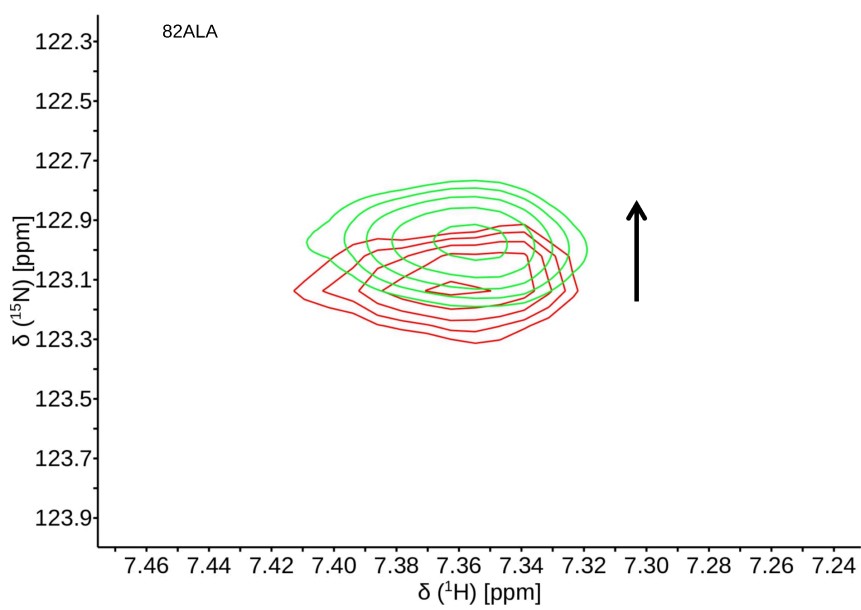
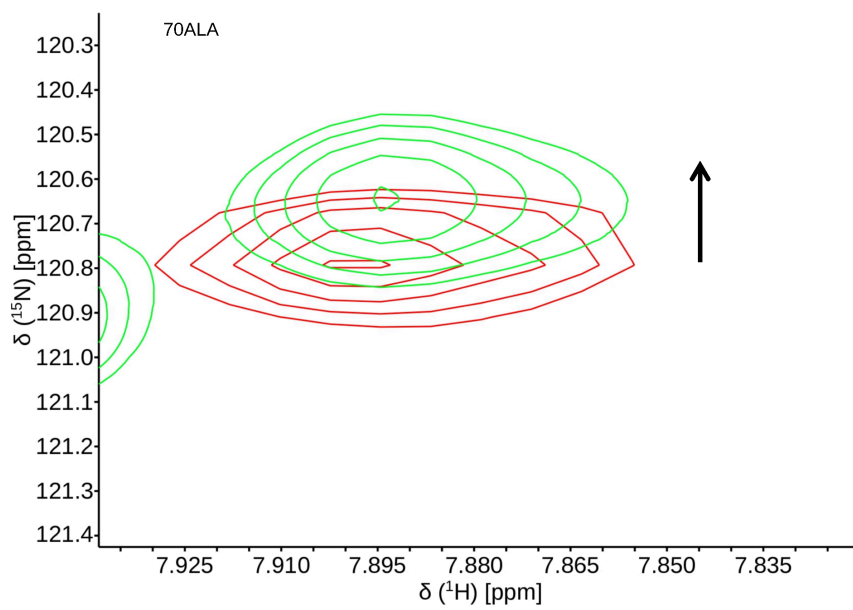
Fonte: Autoria própria.

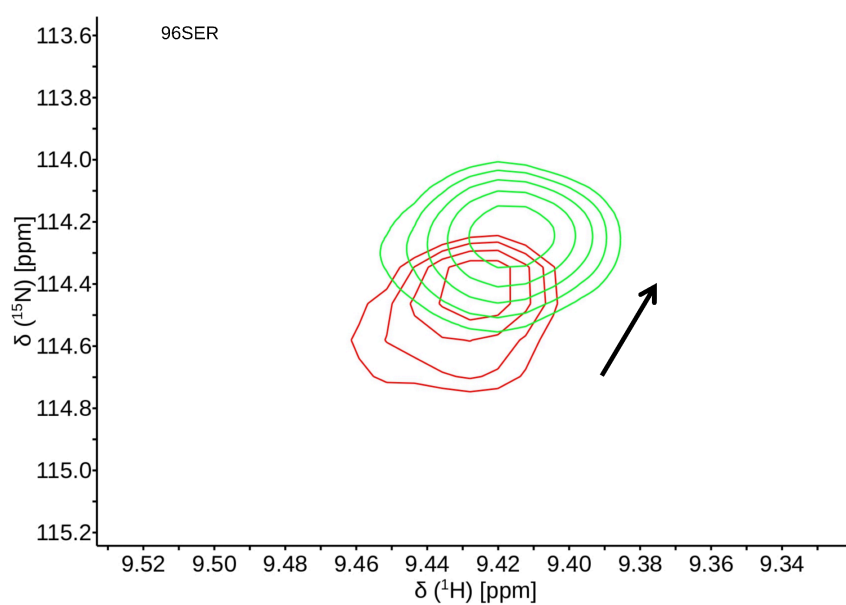
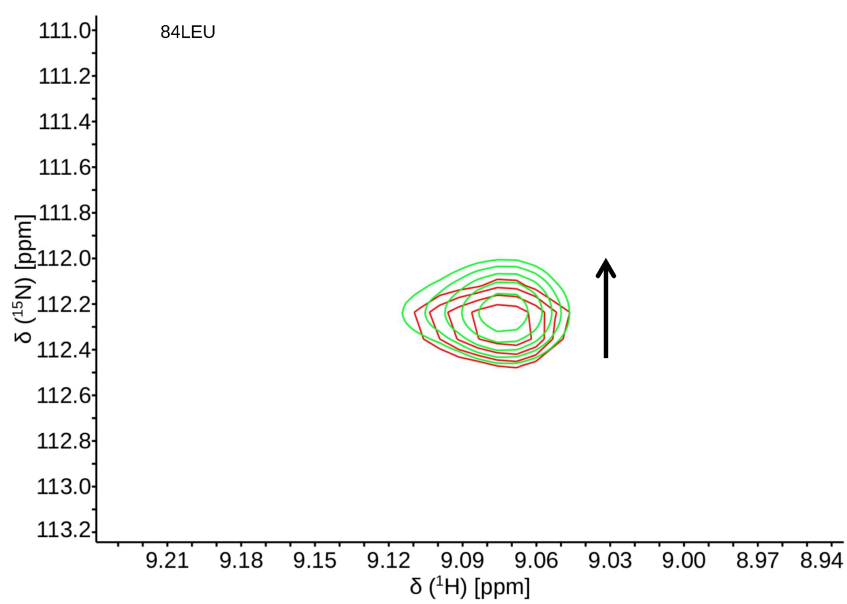
ANEXO E

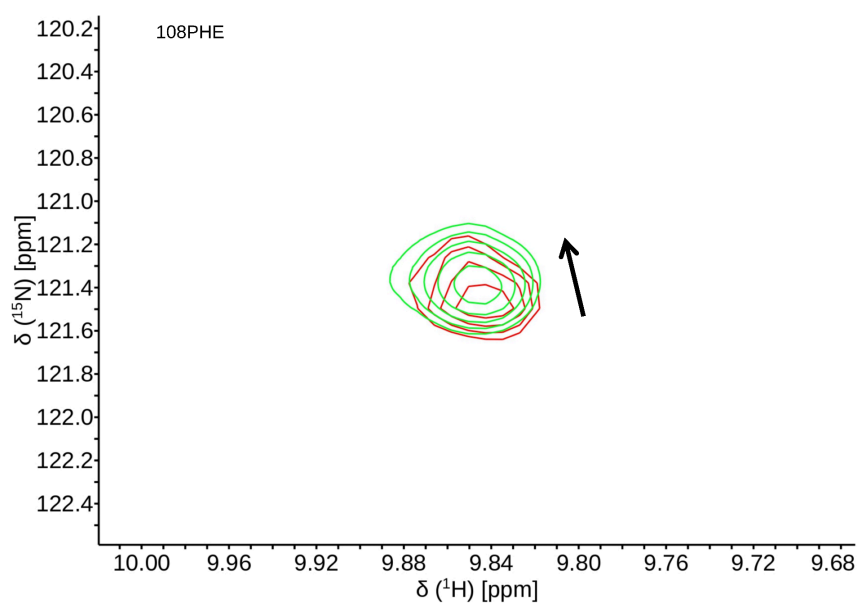
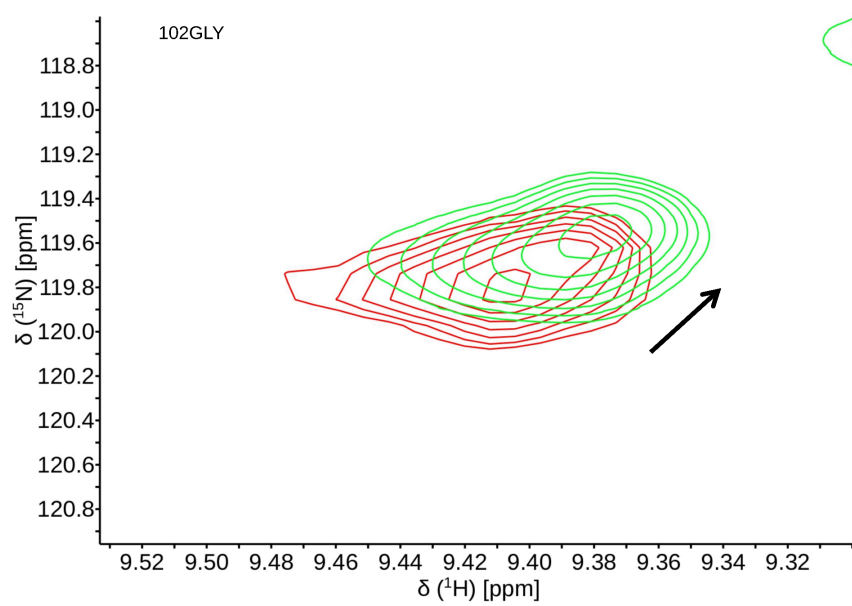
Através de experimentos de HSQC utilizando o domínio GRB2-SH2 livre, foram realizadas titulações para observar a interação entre o domínio e o peptídeo MRE11-22. É possível observar alguns deslocamentos no espectro (**Figura 1.5.7**) e tais deslocamentos estão expostos abaixo (**Figura SV.1**):

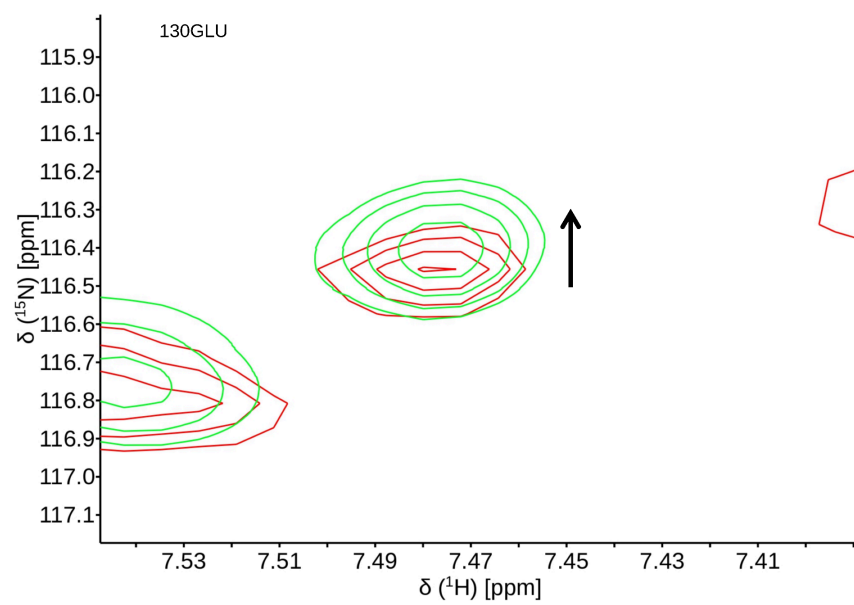
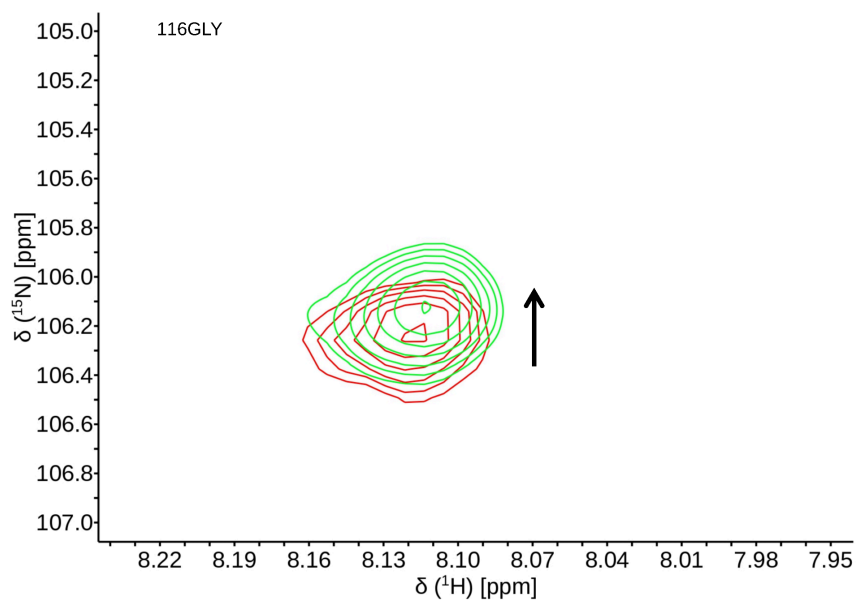
Figura SV.1: Resíduos com *chemical shift* mais proeminentes da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo MRE11-22. Abaixo estão representados os resíduos de PHE62, LYS64, ARG67, ALA70, ALA82, PHE83, LEU84, GLU87, GLU89, SER90, SER96, SER98, GLY102, PHE108, GLY116, GLU130, THE138, GLN144 e ARG149. Os pontos vermelhos são do domínio GRB2-SH2 livre enquanto os pontos verdes são do domínio GRB2-SH2 interagindo com o peptídeo MRE11-22.

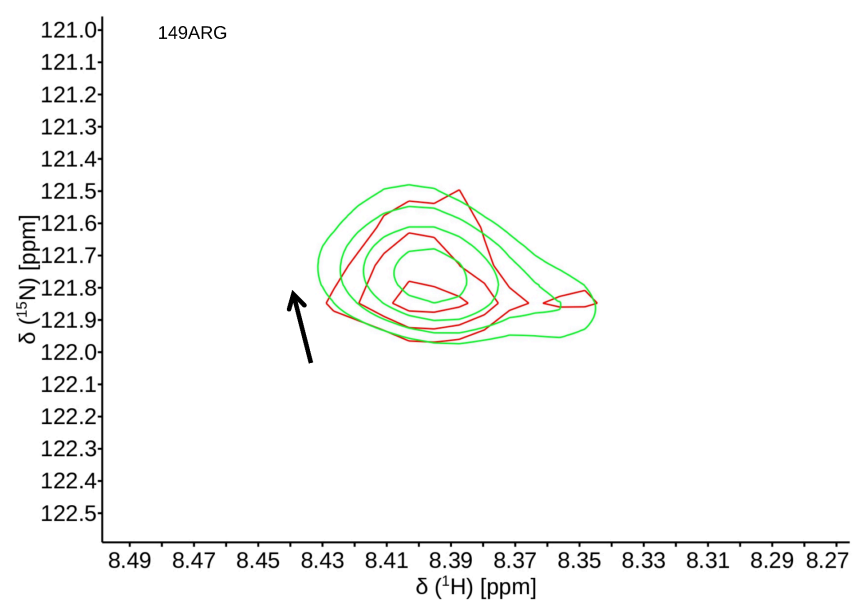
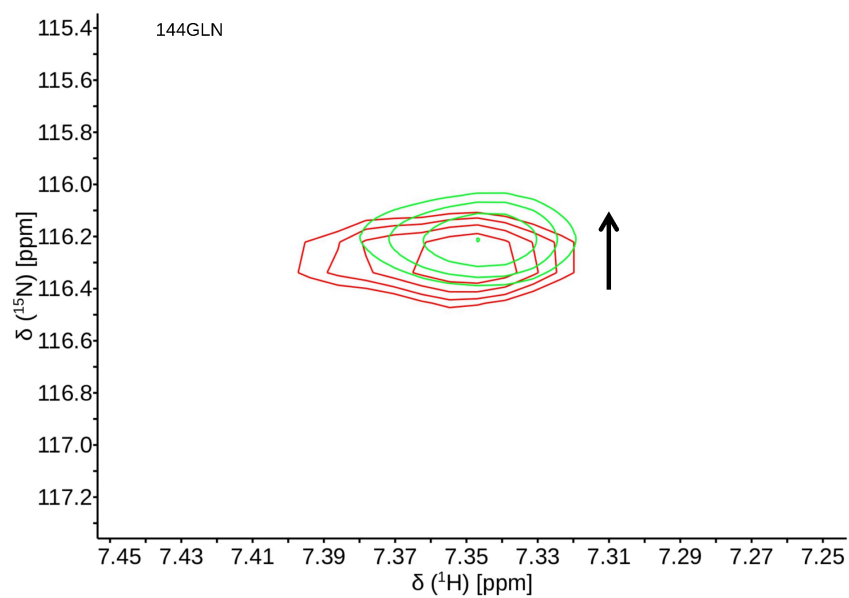


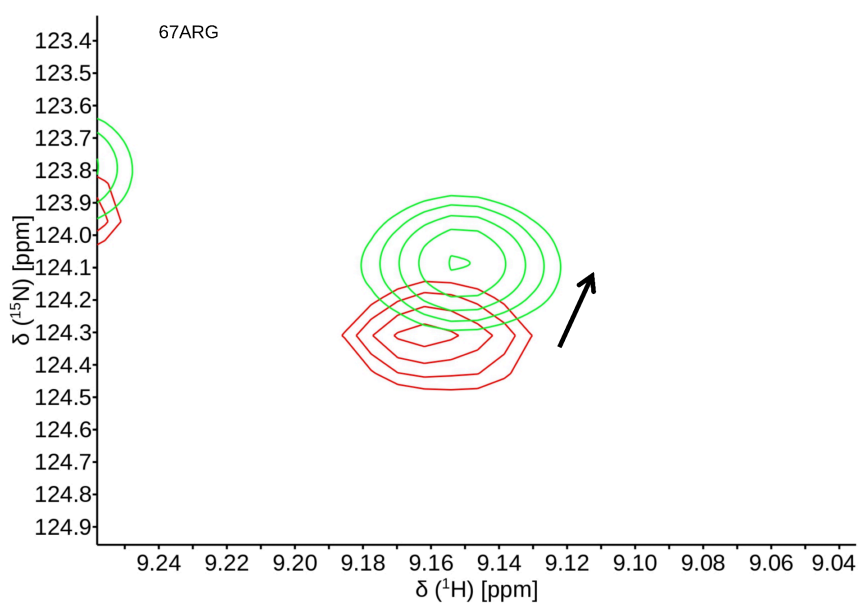
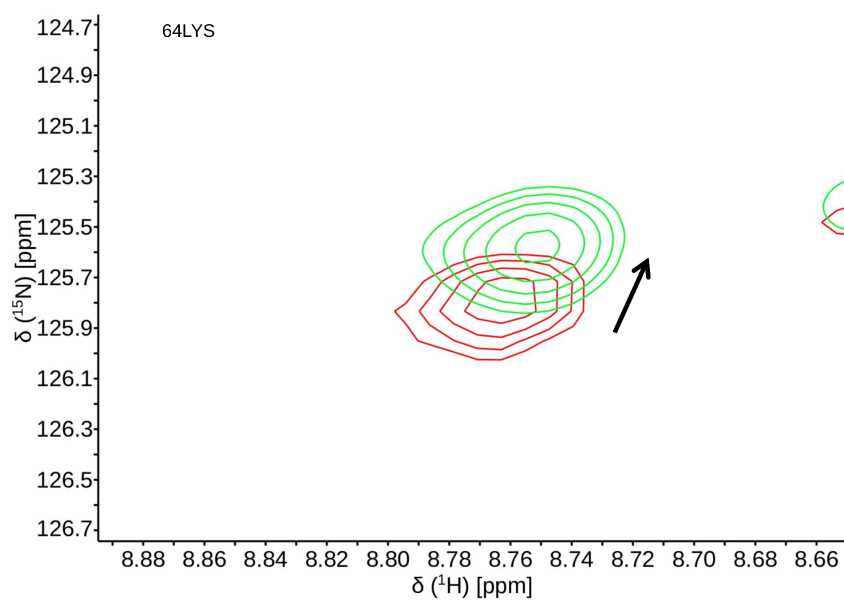


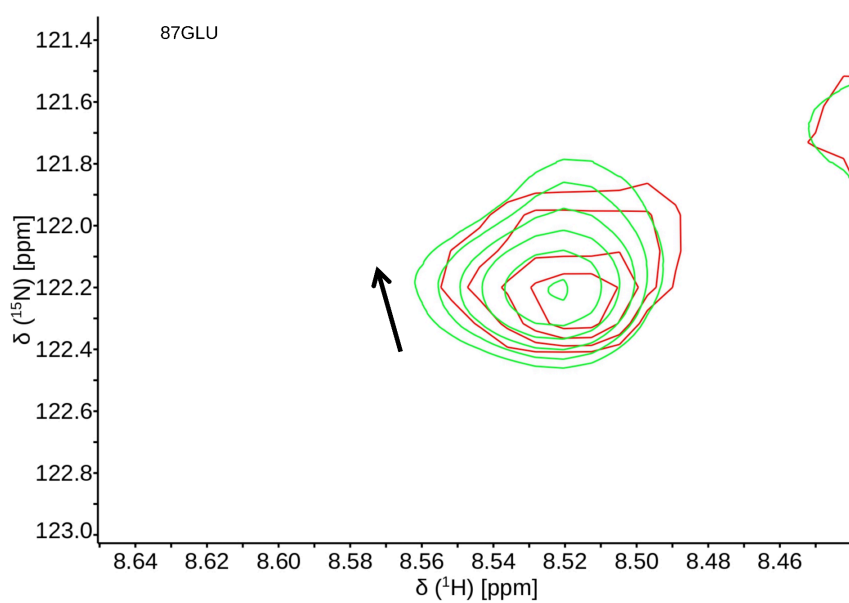
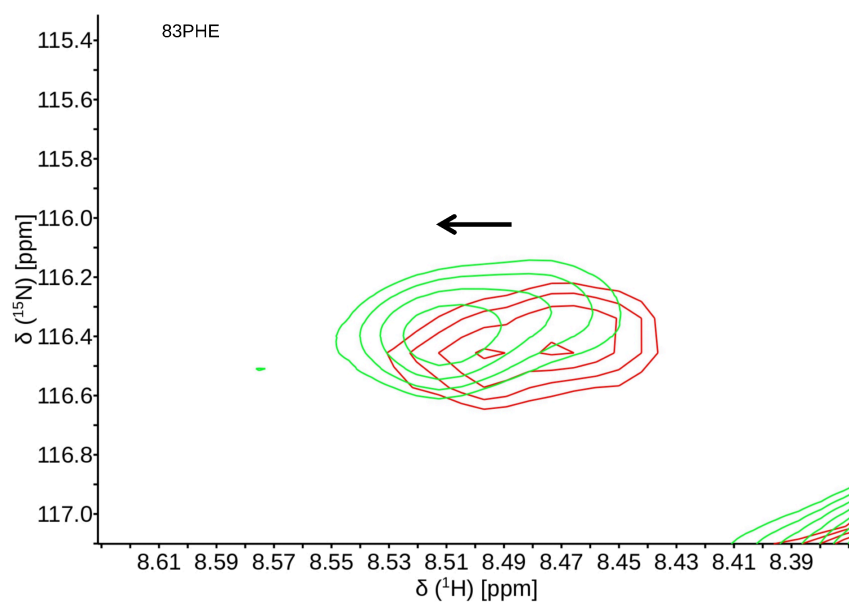


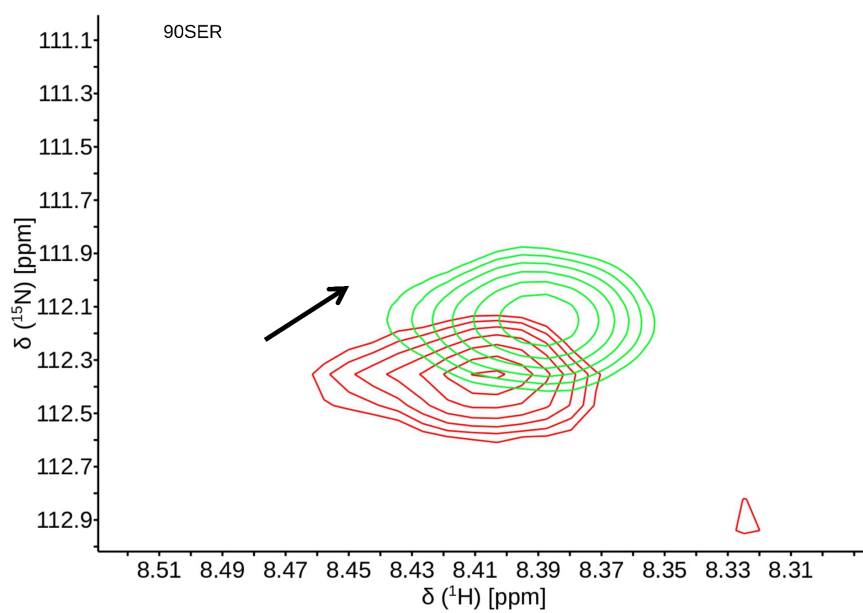
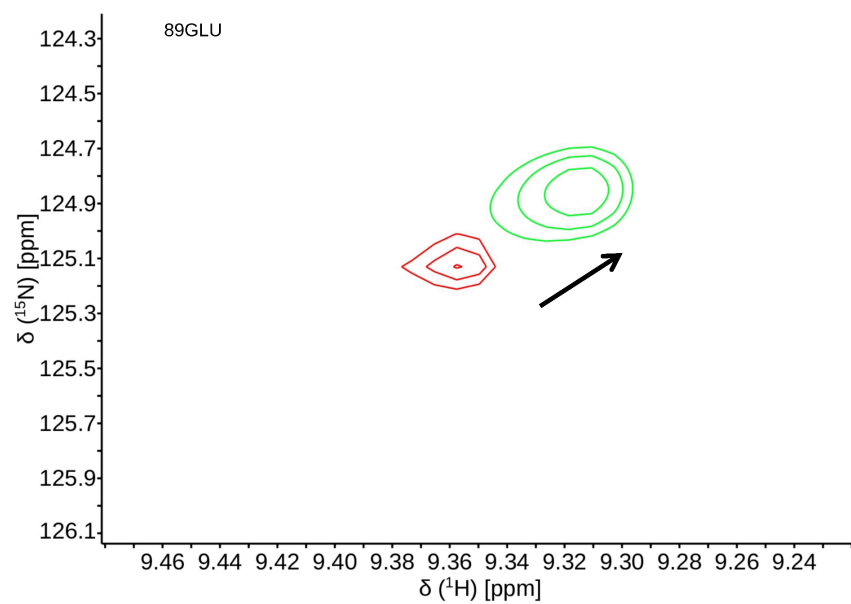


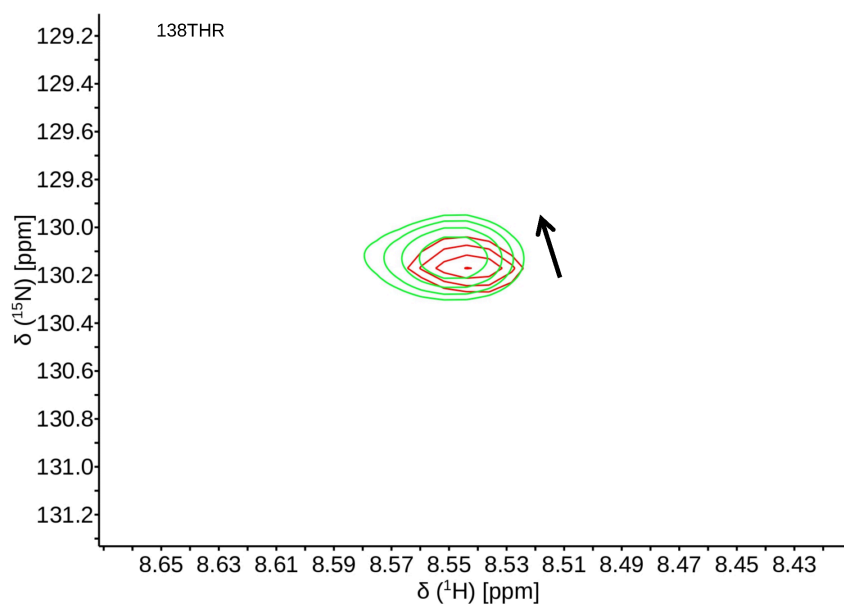










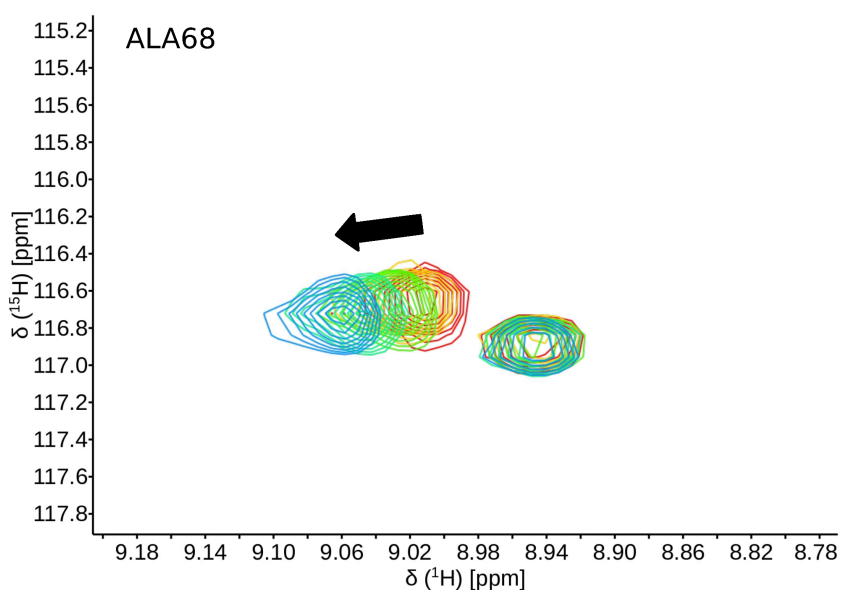


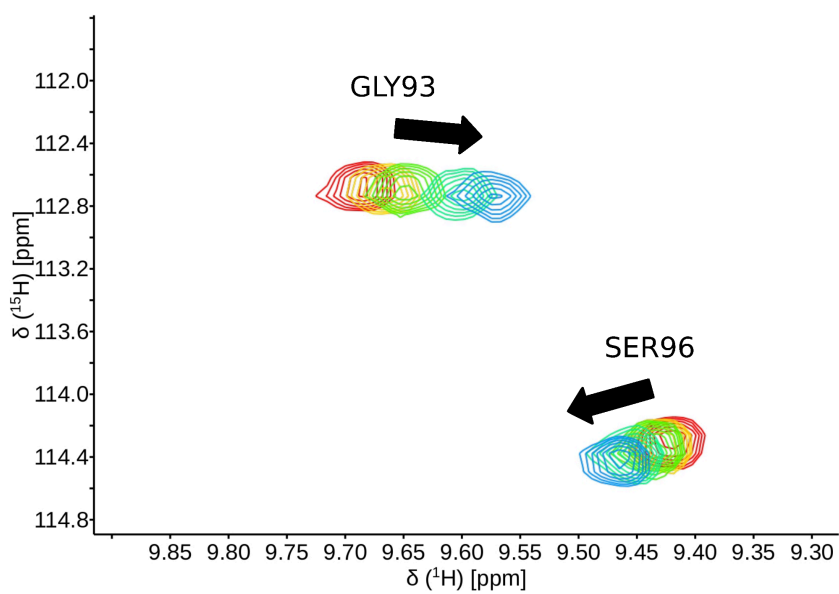
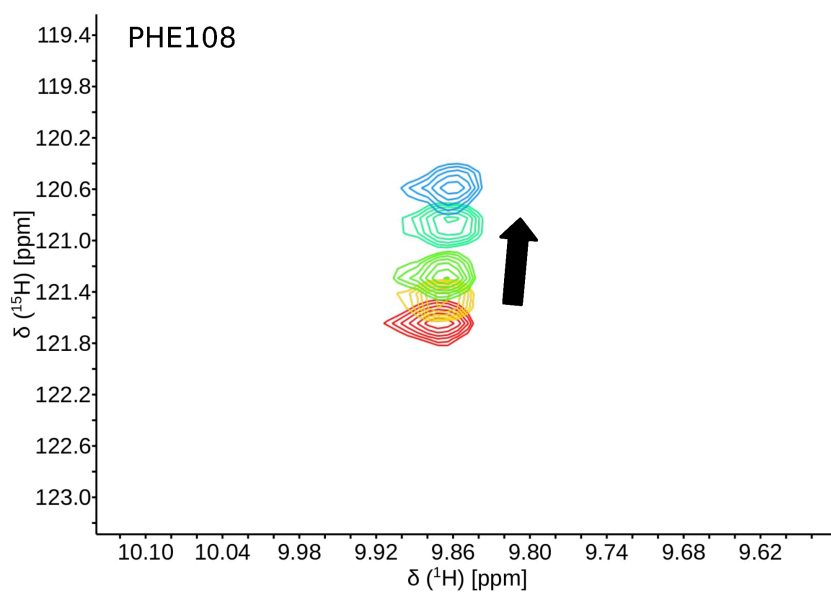
Fonte: Autoria própria.

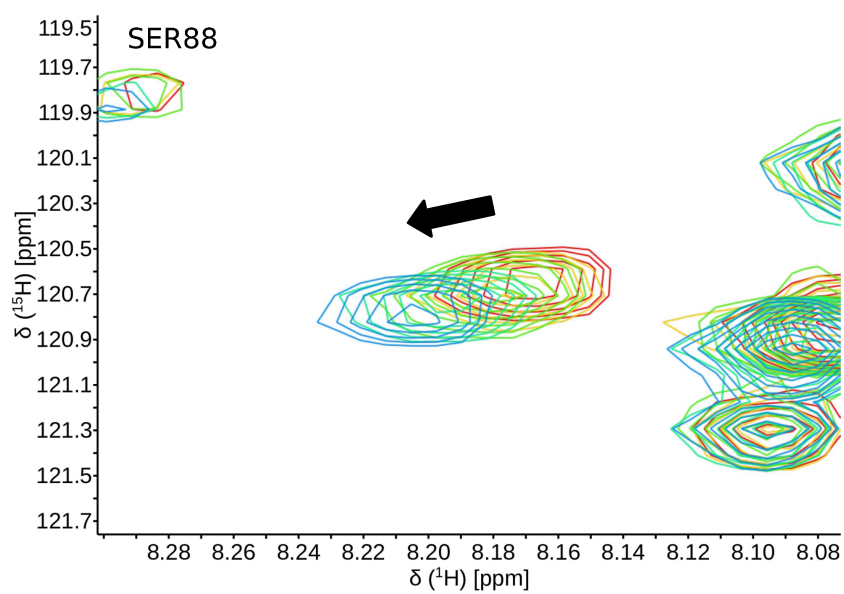
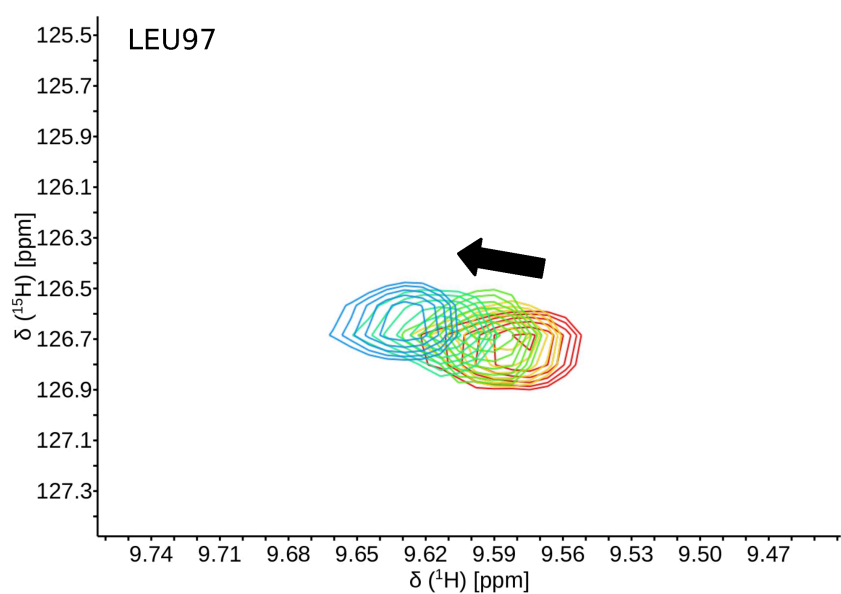
ANEXO F

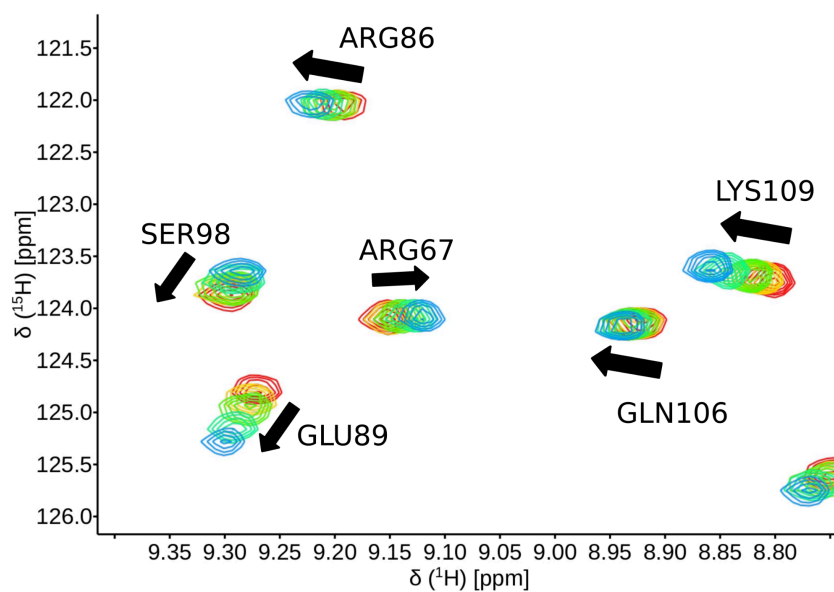
Através de experimentos de HSQC utilizando o domínio GRB2-SH2 livre, foram realizadas titulações para observar a interação entre o domínio e o peptídeo H2AX-pY. É possível observar alguns deslocamentos no espectro (**Figura 1.5.15**) e tais deslocamentos estão expostos abaixo (**Figura SVI.1**):

Figura SVI.1: Resíduos com *chemical shift* mais proeminentes da interação entre o domínio GRB2-SH2 e o peptídeo H2AX-pY. Abaixo estão representados os resíduos de ARG67, ALA68, ARG86, SER88, GLU89, GLY93, SER96, LEU97, SER98, GLN106, PHE108, LYS109. Os pontos vermelhos são do domínio GRB2-SH2 livre enquanto os pontos azuis são do domínio GRB2-SH2 interagindo com o peptídeo H2AX-pY.









Fonte: Autoria própria.

ANEXO G

Preparo de Meio Mínimo M9.

Tabela AVII.1: Pré-meio mínimo de 200 ml.

Quantidade (µl)	Reagente	Solução Estoque
50 ml	H ₂ O destilada	
20 µl	CaCl ₂	1 M
400 µl	TS2	0,1 g/l ZnSO ₄
		0,03 g/l MnCl ₂
		0,3 g/l H ₃ Bo ₃
		0,02 g/l NiCl ₂
		0,01 g/l CuCl ₂
		0,9 g/l Na ₂ MoO ₄
		0,02 g/l Na ₂ SeO ₃
200 µl	FeCl ₃	10 mM
200 µl	Antibiótico - Canamicina	50 mg/ml
200 µl	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-Pantotênico
		1 mg/l Hidrocloreto Piridoxal
200 µl	Vitamina B2	0,1 mg/l Riboflavina
200 µl	Vitamina B1	0,1 mg/l Tiamina
400 µl	MgSO ₄	1 M
5 ml	Glicose	20 %
0,2 g	NH ₄ Cl	
40 ml	M9 (5x)	46,6 mM Na ₂ HPO ₄
		22 mM KH ₂ PO ₄
		8,6 mM NaCl
Completar até 200 ml com H ₂ O destilada		

Fonte: Autoria própria.

Tabela AVII.2: Pré-meio mínimo de 1000 ml.

Quantidade (µl)	Reagente	Solução Estoque
200 ml	H ₂ O destilada	
100 µl	CaCl ₂	1 M
2 ml	TS2	0,1 g/l ZnSO ₄
		0,03 g/l MnCl ₂
		0,3 g/l H ₃ Bo ₃
		0,02 g/l NiCl ₂
		0,01 g/l CuCl ₂
		0,9 g/l Na ₂ MoO ₄
		0,02 g/l Na ₂ SeO ₃
1 ml	FeCl ₃	10 mM
1 ml	Antibiótico - Canamicina	50 mg/ml
1 ml	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-Pantotênico
		1 mg/l Hidrocloreto Piridoxal
1 ml	Vitamina B2	0,1 mg/l Riboflavina
1 ml	Vitamina B1	0,1 mg/l Tiamina
2 ml	MgSO ₄	1 M
25 ml	Glicose	20 %
1 g	¹⁵ NH ₄ Cl	
200 ml	M9 (5x)	46,6 mM Na ₂ HPO ₄
		22 mM KH ₂ PO ₄
		8,6 mM NaCl
Completar até 1000 ml com H ₂ O destilada		

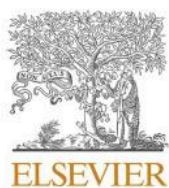
Fonte: Autoria própria.

ANEXO H

Este anexo apresenta os dois artigos publicados que contribuem para a compreensão da estrutura e estabilidade do dímero Grb2, bem como para a comunicação interdomínios durante seu processo de enovelamento.

O primeiro artigo, intitulado "***The influence of pH on the structure and stability of the Grb2 dimer reveals changes in the inter-domain and molecular interaction: Could it be a modulation mechanism?***", foi publicado na revista ***Biophysical Chemistry***. Este trabalho está disponível online no seguinte endereço: doi.org/10.1016/j.bpc.2023.106973.

O segundo artigo, intitulado "***Unveiling Metastable Ensembles of GRB2 and the Relevance of Interdomain Communication during Folding***", foi publicado na revista ***Journal of Chemical Information and Modeling***. Este trabalho pode ser acessado através do seguinte link: doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00955.



Contents lists available at ScienceDirect

Biophysical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biophyschem

The influence of pH on the structure and stability of the Grb2 dimer reveals changes in the inter-domain and molecular interaction: Could it be a modulation mechanism?

Jéssica A. Tedesco^{a,b,1}, Raphael V.R. Dias^{a,1}, Giovana Casteluci^{a,b}, Renan P. Pedro^{a,b}, Leandro C. de Oliveira^a, Ícaro P. Caruso^{a,b,c}, Fernando A. Melo^{a,b,*}

^a Department of Physics - Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Multiuser Center for Biomolecular Innovation (CMIB), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

^c Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis (IBqM) and National Center for Structural Biology and Bioimaging (CENABIO), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Grb2
Molecular interaction
The influence of pH
Flexibility
Inter-domain interaction
NMR

ABSTRACT

Cancer cells present an increased replicative potential as a hallmark. The increased replication leads to a higher intracellular pH. Grb2, an adapter protein, is mainly involved in several types of cancers due to its role in signaling pathways responsible for cell growth and proliferation. At pH 7, we observed a more compact structure, as seen by DLS and ¹H NMR relaxation experiments, with high cooperativity within domains. On the other hand, we observed an increase in disordered structures at pH 8, with relative independence between domains characterized by higher melting temperatures and enthalpy of unfolding. CD and DLS corroborate with these observations at pH 8, conferring more flexibility among the domains, followed by lower unfolding cooperativity and increased hydrodynamic diameter at higher pH. In addition, ¹⁵N-HSQC chemical shift perturbations experiments showed significant differences in the positions of several amino acids spread on the Grb2 structure when pH was changed, which agrees with the previous results. Finally, the molecular dynamic analysis demonstrates that Grb2 presents a movement pattern where both SH3 domains move toward the center of the protein at pH 7. On the contrary, the pattern changes its direction at pH 8, where domains move outside the center of the protein, conferring a more elongated structure at higher pH. So, Grb2 presents significant structural and dynamic changes modulated by pH. If considering the role of Grb2 in cell signaling upstream, these conformational changes could be a critical mechanistic behavior of this protein, preventing/disrupting the stability of the cell signaling pathways related to cancer.

1. Introduction

Growth factor receptor bound-protein 2 (Grb2) is an adapter protein involved with cellular signaling and transduction, which has been demonstrated to be a critical factor in regulating many cell events and working as a pivotal intermediate upon cell-surface and downstream signaling [1–3]. In addition, Grb2 is 271 amino acid residues long comprehended by a single SH2 domain sandwiched by two SH3 domains (C- and N-terminal) [1,2,4].

The SH2 domain of the Grb2 protein contains a central antiparallel beta-sheet flanked by two alpha-helices. The Y-x-N-x motif in all SH2 domains allows specific binding to phosphopeptides. The binding surface (Q105, F107, H108, L120, W121, Y134, L148) recognizes the phosphotyrosine sequence followed by 3–4 residues, determining each SH2's specificity [5,6]. On the other hand, the SH3 domains of Grb2 protein constitute a beta-barrel, as described previously for other SH3 domains, and at least one SH3 domain (cSH3) binds to short proline-rich motifs of P-x-x-P type [7]. The SH2 domain is separated from the SH3

* Corresponding author at: Department of Physics - Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

E-mail address: fernando.melo@unesp.br (F.A. Melo).

¹ The authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2023.106973>

Received 16 November 2022; Received in revised form 3 February 2023; Accepted 14 February 2023

Available online 16 February 2023

0301-4622/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

Unveiling Metastable Ensembles of GRB2 and the Relevance of Interdomain Communication during Folding

Raphael V. R. Dias, Renan P. Pedro, Murilo N. Sanches, Giovana C. Moreira, Vitor B. P. Leite, Icaro P. Caruso, Fernando A. de Melo,* and Leandro C. de Oliveira*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00955>

Read Online

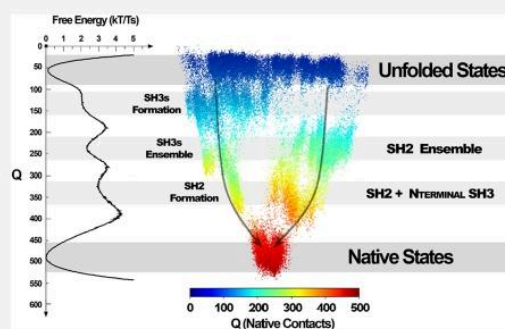
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The folding process of multidomain proteins is a highly intricate phenomenon involving the assembly of distinct domains into a functional three-dimensional structure. During this process, each domain may fold independently while interacting with others. The folding of multidomain proteins can be influenced by various factors, including their composition, the structure of each domain, or the presence of disordered regions, as well as the surrounding environment. Misfolding of multidomain proteins can lead to the formation of nonfunctional structures associated with a range of diseases, including cancers or neurodegenerative disorders. Understanding this process is an important step for many biophysical analyses such as stability, interaction, malfunctioning, and rational drug design. One such multidomain protein is growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), an adaptor protein that is essential in regulating cell survival. GRB2 consists of one central Src homology 2 (SH2) domain flanked by two Src homology 3 (SH3) domains. The SH2 domain interacts with phosphotyrosine regions in other proteins, while the SH3 domains recognize proline-rich regions on protein partners during cell signaling. Here, we combined computational and experimental techniques to investigate the folding process of GRB2. Through computational simulations, we sampled the conformational space and mapped the mechanisms involved by the free energy profiles, which may indicate possible intermediate states. From the molecular dynamics trajectories, we used the energy landscape visualization method (ELViM), which allowed us to visualize a three-dimensional (3D) representation of the overall energy surface. We identified two possible parallel folding routes that cannot be seen in a one-dimensional analysis, with one occurring more frequently during folding. Supporting these results, we used differential scanning calorimetry (DSC) and fluorescence spectroscopy techniques to confirm these intermediate states in vitro. Finally, we analyzed the deletion of domains to compare our model outputs to previously published results, supporting the presence of interdomain modulation. Overall, our study highlights the significance of interdomain communication within the GRB2 protein and its impact on the formation, stability, and structural plasticity of the protein, which are crucial for its interaction with other proteins in key signaling pathways.



INTRODUCTION

Protein domains are compact and modular regions that are highly conserved in structure and function.¹ These modules compose the majority of the protein repertoire and are recombined in a wide range of ways to build proteins with entirely new functions.^{1,2} Thus, multidomain proteins are essential to life and many macromolecular complexes rely on them to promote signal transduction, structural integrity, and the organization of cells and tissues.³ Although domains are well-defined tertiary structures, the behavior of an isolated domain can differ from a full-length protein; hence, a combination of them leads to different folding pathways in proteins.^{4,5} Moreover, misfolding can result in several pathological conditions, such as cataract,⁶ phenylketonuria,⁷ cystic fibrosis,⁸ Parkinson's,⁹ and Alzheimer's diseases.¹⁰

The folding mechanisms of multidomain proteins are intricately linked to their topology. Adjacent domains may be covalently linked or separated by flexible segments, and this topological organization can directly influence folding pathways, impacting stability, kinetics, and interdomain interactions. One of the mechanisms elucidated in the literature is the “divide and conquer” strategy, where domains fold independently and subsequently assemble, thereby diminishing the degrees of freedom and reducing the folding time scale.¹¹

Received: June 23, 2023