



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Câmpus de São José do Rio Preto

Karoline Sanches

Dinâmica estrutural da proteína adaptadora Grb2, seu domínio SH2 e
a interação com cumarina por ressonância magnética nuclear e
fluorescência

São José do Rio Preto
2019

Karoline Sanches

**Dinâmica estrutural da proteína adaptadora Grb2, seu domínio
SH2 e a interação com cumarina por ressonância magnética
nuclear e fluorescência**

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

Financiadora: CNPq PROC.:
131968/2017-3

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

Coorientadores:

Prof. Dr. Fábio Ceneviva L. Almeida

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto
2019

S211d Sanches, Karoline
Dinâmica estrutural da proteína adaptadora Grb2, seu domínio SH2 e a interação com cumarina por ressonância magnética nuclear e fluorescência / Karoline Sanches. -- São José do Rio Preto, 2019
102 p. : il., tabs.

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

1. biofisica molecular. 2. ressonancia magnetica nuclear. 3. dinamica estrutural. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Karoline Sanches

**Dinâmica estrutural da proteína adaptadora Grb2, seu domínio
SH2 e a interação com cumarina por ressonância magnética
nuclear e fluorescência**

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

Financiadora: CNPq PROC.:
131968/2017-3

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Gisele Cardoso de Amorim
UFRJ – Campus Duque de Caxias

Prof. Dr. Marcelo Andrès Fossey
UNESP – Campus São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
12 de Abril de 2019

A força não provém da capacidade física. Provém de uma vontade indomável.

(Mahatma Gandhi)

Agradecimentos

Diante da concretização deste trabalho, o que eu tenho de mais importante e especial a fazer é agradecer, a Deus pelo fôlego de vida diário que me trouxe e traz renovo para lutar e acreditar que algo novo pode acontecer na mesma proporção em que eu me dedicar para tal.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante o mestrado. A FAPERJ, PROPG e PROAP pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Alves de Melo e coorientadores Prof. Dr. Fábio Ceneviva L. Almeida, Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, o amor, dedicação e reponsabilidade que vocês têm com o saber me mostraram o verdadeiro significado e sentido de estar dentro de uma Universidade. Obrigada por toda bagagem pessoal e profissional proporcionada, por me instigar a aprender mais todos os dias e, principalmente, despertar a vocação que há dentro de mim. Muito obrigada por me passar, com muito cuidado, carinho e amor, a beleza que existe atrás de cada espectro. É imensamente gratificante e inspirador poder trabalhar ao lado de pessoas como vocês!

Ao Dr. Ícaro e Prof. Dr. Marcelo pela atenção e disponibilidade. Obrigada por todo conhecimento compartilhado comigo!

Obrigada a todos familiares e amigos que estiveram comigo durante esta caminhada, entendendo minhas renúncias e me apoiando em todo o tempo. A vida não tem o menor sentido sem vocês. Obrigada por tornarem mais dias mais leves! Amigos do departamento de Física, CMIB e IBILCE, eu sou grata por poder compartilhar com vocês momentos de alegria, tristeza e muito aprendizado. Obrigada pela amizade mais linda e sincera existente entre nós, por todas as risadas, ensinamentos e conselhos. Sem vocês, com certeza, esta jornada não teria a menor graça!

Aos colegas do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN), por me receberem com tanto carinho e proporcionar um ambiente saudável de muitas risadas e muita ciência.

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

Aos professores e funcionários do Departamento de Física, por todo auxílio e ensinamentos.

Ao CMIB e CNRMN pela infraestrutura proporcionada para a realização deste trabalho.

Unesp, obrigada por proporcionar a mim ensinamentos os quais levarei até o fim da minha vida!

*Dedico este trabalho a mais linda criação de Deus, a melhor parte de mim:
minha família.*

Resumo

As células são submetidas a um constante e preciso controle de sobrevivência, crescimento, diferenciação e apoptose. Durante o processo de proliferação celular, estas também estão sujeitas a erros que podem gerar perda de controle de crescimento celular dando início ao crescimento descontrolado, que por sua vez, pode ocasionar o surgimento de tumores. Uma das vias que sofrem alterações é a via *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK), que é mediada por proteínas como a adaptadora *Growth factor receptor bound protein 2* (Grb2). A Grb2 é composta por três domínios, sendo dois SH3 (C e N-terminal) e um SH2. A Grb2, além de atuar como adaptadora, também regula a via da MAPK através de suas formas monomérica/dimérica. Com o objetivo de se entender a dinâmica estrutural de Grb2 e seu domínio Grb2-SH2, as ressonâncias do domínio foram assinaladas através de experimentos de tripla-ressonância e a estrutura calculada por CS-Rosetta através dos deslocamentos químicos da cadeia principal. A Grb2 foi assinalada por comparação com assinalamentos da SH2 e C-SH3. Os parâmetros de relaxação mostraram que essa proteína apresenta um equilíbrio monômero/dímero mais complexo do que o reportado pela literatura. Além disso, os parâmetros de relaxação do Grb2-SH2 mostraram a presença de um sítio superficial em dinâmica conformacional lenta em escala de tempo de μ s a ms. Sítios em troca conformacional frequentemente estão envolvidos em reconhecimento molecular e alosteria. As perturbações nos deslocamentos químicos de Grb2-SH2 com a adição de cumarina no sistema vistos por RMN e a análise da supressão da intensidade por fluorescência, mostraram que a interação com o ligante compartilha o sítio II de reconhecimento de fosfopeptídeos em SH2, sugerindo que mudanças conformacionais podem estar ocorrendo no W60 para que cumarina tenha acesso ao sítio. Além do mais, a interação é entropicamente dirigida, ocorre em uma proporção 1:1 com constante de associação $K_D \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Palavras-chave: Grb2, cumarina, RMN, Fluorescência, interação, dinâmica, biofísica.

Abstract

The cells are subjected to a precise control of survival, growth, differentiation and apoptosis. During the process of cell proliferation it is also subject to errors which may lead to loss of cell growth control, initiating the growth above the necessity of the tissue which can cause tumors. One of the pathways that undergo changes is the Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK), which is mediated by some proteins such as the Growth factor receptor bound protein 2 (Grb2). The Grb2 is composed of three domains, two SH3 (C and N-terminal) and one SH2. The Grb2, besides being an adapter, it also regulates the MAPK pathway through its monomeric/dimeric forms. In order to understand the structural dynamics of Grb2 and its Grb2-SH2 domain, the domain resonances were assigned by triple resonance experiments and the structure was calculated by CS-Rosetta through the chemical shifts of the backbone. The Grb2 was assigned by comparison with the SH2 and C-SH3 assignment, and the relaxation parameters obtained showed that this protein presents monomer/dimer equilibrium more complex than the reported in the literature. Moreover, the relaxation parameters of Grb2-SH2 showed a presence of a superficial site in slow conformational dynamics in a time scale of μs to ms . Sites in conformational exchange are often involved in molecular recognition and allostery. The perturbations in Grb2-SH2 chemical shifts with coumarin addition in the system verified through NMR and analysis of fluorescence quenching showed that the interaction with the ligand shares the site II of phosphopeptide recognition in SH2, suggesting that conformational exchange can occur in W60 in order to coumarin access the site. Besides, the interaction is entropically driven, with 1:1 proportion and association constant of $K_b \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Key-words: interaction, protein-ligand, biophysics.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Estatística dos 15 tipos de cânceres com maior incidência e mortalidade em nível mundial..... 20
- Figura 2:** Estatística dos casos de câncer no Brasil em 2018 de acordo com o Instituto Nacional de Câncer. Pode-se verificar que os cânceres com maior número de casos é o de próstata entre os homens e o de mama entre as mulheres, atingindo sendo 31,7% e 29,5% respectivamente. 21
- Figura 3:** Representação da estrutura da proteína receptora tirosina quinase. Pode-se verificar a região extracelular, na qual ocorre o reconhecimento de fatores de crescimento, a transmembrana, e a citosólica onde se encontram a justamembrana, o domínio quinase e o *motif* PxxP junto dos últimos 58 resíduos da proteína em sua região C-terminal. 24
- Figura 4:** Estrutura tridimensional cristalográfica da proteína Grb2 em sua forma dimérica. As subunidades do dímero encontram-se colorido em cor de rosa e verde, e cada domínio está representado por tons diferentes de acordo com suas subunidades. 27
- Figura 5:** Representação do mecanismo de regulação da proteína quinase FGFR2 através da proteína adaptadora Grb2. (A) A proteína transmembrana FGFR2 (alaranjado) com seu domínio quinase na região citoplasmática (alaranjado oval) e Grb2 dimérica ligada através dos domínios C-SH3 (vermelho), onde um heterotetrâmero na proporção 2:2 é obtido; (B) Fatores de crescimento (azul escuro) se ligam na porção extracelular de FGFR2, induzindo mudanças conformacionais fazendo com que o domínio quinase de FGFR2 fosforile (grupos fosfato em cinano) domínios SH3 de Grb2; (C) Uma vez fosforilada, Grb2 se dissocia da proteína tirosina quinase. 28
- Figura 6:** Esquema representativo da ativação da cascata de sinalização MAPK. Após estímulos por fatores de crescimento, fosforilações são induzidas em Grb2 por FGFR2. Então, a proteína Grb2 se dissocia de FGFR2 e interage com Sos via domínios SH3. A Sos é responsável pela troca de GDP em GTP na proteína Ras. Assim, a proteína Ras se torna ativa e se desvincula da membrana celular, sendo capaz de se ligar a proteína Raf e ativar a cascata MAPK. 30

Figura 7: Representação do ciclo em que Grb2 atua regulando a atividade quinase de FGFR2 juntamente da fosfatase Shp2. A: A proteína FGFR2 num estado basal fosforilado não sinalizante (onde se encontra o círculo amarelo tracejado), pode recrutar a proteína Grb2. B: A fosfatase Shp2 desfosforila FGFR2. C: FGFR2 em seu estado basal de fosforilação pode fosforilar a fosfatase Shp2 (Shp2 fosforilada está representada pelo círculo amarelo). D: FGFR2 fosforila a adaptadora Grb2, que, neste estado fosforilado não é capaz de se ligar em FGFR2, perdendo a propriedade inibitória que esta interação proporciona. E: A fosfatase Shp2 desfosforila a adaptadora Grb2, tornando-a apta a se ligar a FGFR2 e estabelecer a regulação da mesma. 31

Figura 8: Estrutura tridimensional do domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2. A) Na estrutura tridimensional, as hélices- α estão coloridas em laranja, as fitas- β em azul e os *loops* em cinza. Os dois triptofanos que o SH2 apresenta estão coloridos em vermelho. É possível visualizar que o triptofano 121 (W121) bloqueia a entrada de possíveis ligantes no sítio de interação do domínio ($\alpha 3$). B) Estrutura tridimensional do SH2 onde a superfície encontra-se colorida por hidrofobicidade (Em azul encontra-se regiões hidrofílicas enquanto que em laranja as hidrofóbicas). 32

Figura 9: Domínio SH2 da proteína v-Src evidenciando os dois sítios de interação encontrados na maioria dos domínios SH2. A) Representação *cartoon* do domínio Src-SH2 com as fitas- β coloridas em azul, as hélices- α em vermelho e o fosfopeptídeo (pYLRVA) em verde. B) Representação *surface* do domínio Src-SH2 na qual em azul encontra-se o sítio I e em vermelho o sítio II. A especificidade na interação de fosfopeptídeos no sítio 1 é devido a presença de duas argininas e uma lisina, os quais fazem pontes de hidrogênio bem como interações eletrostáticas..... 33

Figura 10: Representação do efeito Zeeman para o núcleo de *spin* 12. O *spin* ajustado de forma anti-paralela com o campo magnético é o que corresponde ao maior nível energético e o *spin* ajustado paralelamente ao campo corresponde ao menor nível energético..... 39

Figura 11: Processo de relaxação longitudinal (A) e transversal (B) da magnetização. Quando o pulso de radiofrequência é interrompido, a magnetização tende a voltar para o equilíbrio de Boltzmann no eixo z, durante o processo de relaxação longitudinal caracterizado pela constante de tempo $T1$ o qual há perda de energia e no processo de relaxação transversal numa constante característica de tempo $T2$ no qual há perda de coerência no plano xy..... 41

Figura 12: Representação da sequência de pulsos para o experimento de ^{15}N , ^1H -HSQC. A magnetização dos núcleos H e N está, inicialmente, alinhada ao campo magnético em z (H_z , N_z). Um pulso de 90° é aplicado no próton na coordenada x, levando de H_z para $-H_y$. Após um tempo τ de evolução, aplica-se um novo pulso de 180° em H e N, levando as magnetizações para $-H_xN_z$. Finalizando este bloco, após o tempo de evolução τ o pulso de 90° em ambos os núcleos faz com que a magnetização do próton e nitrogênio seja $-H_zN_y$. O pulso de 180° no próton faz com que a magnetização seja refocada e somente a magnetização do nitrogênio evolua durante o tempo t_1 . Os pulsos de 90° em x leva a magnetização para H_yN_z seguido do pulso de 180° onde a magnetização do próton encontra-se em x e é então detectada. 44

Figura 13: Esquema representando o experimento de TROSY-HSQC. A) A sequência de pulsos do TROSY, assim como no HSQC, é composta por INEPT e INEPT reverso que são separados por um tempo de evolução $t1$. Ao final da sequência de pulsos não há o desacoplamento, o que ocasiona os 4 picos (B). Os picos mais alargados são provenientes de R_2 alto, e os picos mais finos de R_2 baixo. Então, o pico mais fino é selecionado durante o processo de aquisição do experimento..... 46

Figura 14: Representação do diagrama de Perrin-Jablonski no qual pode-se visualizar as transições eletrônicas acessíveis S_1 , S_2 , após a absorção de um fóton e os processos de emissão fluorescente no processo de retorno ao estado fundamental S_0 48

Figura 15: Purificação da proteína Grb2 e do domínio Grb2-SH2. A) 15% SDS-PAGE corado com azul de *coomassie* referente à purificação por afinidade a Cobalto da proteína Grb2. 1) *Flow through*; 2) 10 mM; 3) 80 mM; 4) 100 mM; 5 e

6) 200 mM de imidazol. B) De 1 a 4 referem-se à purificação por gel filtração com eluição em tampão 20 mM de NaPi pH 7 com 200 mM NaCl. C) Cromatograma referente à purificação por gel filtração em *AKTA Purifier* coluna *Sephacryl 100*. D) 20% SDS-PAGE referente a expressão e purificação do domínio Grb2-SH2; 1) Cultura de bactérias antes da indução com IPTG; 2) Após a indução; 3) *Flow through*; 4) 100 mM de imidazol; 5) 200 mM de imidazol; 6 a 8) os poços de 1 a 4 referem-se a purificação por gel filtração com eluições em tampão 20 mM de NaPi pH 7 com 200 mM NaCl. E) Cromatograma referente à purificação por gel filtração em *AKTA Purifier* coluna *Sephacryl 100*. 63

Figura 16: Espectro 2D ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC de 268 μM Grb2 em 20 mM NaPi pH 7 com 200 mM NaCl, 50 mM Ácido Glutâmico e 50 mM Arginina. A dispersão e a contagem dos picos revelam que a proteína encontra-se com estrutura secundária definida, sem presença de degradação. Os picos sobrepostos são esperados, uma vez que Grb2 é uma proteína relativamente grande e a região de 8.5 a 8.0 ppm em ^1H uma região onde existe grande parte das ressonâncias dos resíduos de aminoácidos. As diferentes intensidades nos picos podem estar associadas à flexibilidade da macromolécula em solução, envolvendo dinâmica e troca conformacional..... 65

Figura 17: Espectro 2D ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC de 268 μM Grb2 em 20 mM NaPi pH 7 com 200 mM NaCl, 50 mM Ácido Glutâmico e 50 mM Arginina. Sobreposto ao espectro encontram-se os assinalamentos referentes aos domínios SH2 e C-SH3. Dos 170 resíduos de aminoácidos que os domínios juntos apresentam, 115 foram sobrepostos, mostrando bom acordo com a literatura. 66

Figura 18: Comparação das taxas de relaxação R_2 e R_1 de ^2H , ^{15}N -Grb2 calculados teoricamente com os dados obtidos experimentalmente. Os cálculos teóricos foram feitos para a proteína monomérica e dimérica em 600 e 900 MHz. Para os experimentos em 600 MHz utilizou-se 102 μM ^2H , ^{15}N -Grb2 em 20 mM NaPi pH 7,0 com 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 5 mM azida e para 900 MHz utilizou-se 268 μM ^2H , ^{15}N -Grb2 em mesmo tampão com adição de 50 mM ácido glutâmico e 50 mM arginina. 68

Figura 19: Espectros de HNCACB (picos em azul e laranja) e CBCA(CO)NH (picos roxos) evidenciando o assinalamento sequencial utilizado para obter as ressonâncias dos resíduos de aminoácidos do domínio Grb2-SH2 em pH 7. Pode-se observar as conexões dos resíduos R67 até M73..... 75

Figura 20: Espectro 2D ^1H - ^{15}N -HSQC em espectrômetro 900 MHz do domínio ^{15}N - ^{13}C Grb2-SH2 em 25°C contendo 350 μM de Grb2-SH2 em 20 mM NaPi pH 7 com 200 mM NaCl e 10 % (v/v) D_2O . Todos os picos encontram-se marcados com abreviação de uma letra para cada resíduo de aminoácido. Os grupos NH_2 da cadeia lateral dos resíduos Q131 e Q106 estão indicados em linha tracejada. Nota-se dois picos para a cadeia lateral do W121, indicando troca conformacional para esse resíduo. 77

Figura 21: Predição de estrutura secundária realizada pelo software TalosN baseado no assinalamento dos deslocamentos químicos de Grb2-SH2. No gráfico pode-se verificar as probabilidades previstas pelo TalosN em função do número do resíduo de aminoácido, as barras pretas correspondem as fitas- β (flechas pretas) e as barras cinzas às hélices- α (retângulos cinzas)..... 78

Figura 22: Sobreposição das 10 estruturas de menor energia com A) mostrando a representação em *wires* e B) a representação em *cartoon*; C) Convergência do score de energia das 80.000 estruturas calculadas pelo CS-Rosetta; D) RMSD das 10 estruturas de menor energia. 80

Figura 23: Parâmetros de relaxação do vetor ^1H - ^{15}N da cadeia principal do domínio Grb2-SH2. A razão entre as taxas de relaxação $R2$ e $R1$ mostram que o domínio apresenta regiões próximas a hélice- $\alpha3$ e fita- $\beta8$ com maior dinâmica conformacional. Além disso, os resíduos de aminoácidos com $\text{hNOE} \leq 0.6$ apresentam maior flexibilidade. As linhas tracejadas referem-se aos valores médios e as linhas contínuas à soma da média e desvio padrão para cada parâmetro calculado. Os retângulos alaranjados e cor-de-rosa representam as estruturas secundárias do domínio, sendo os números de fitas- β e hélices- α contados a partir da estrutura secundária de Grb2 completa..... 81

Figura 24: Resíduos em troca conformacional lenta (colorido em cor-de-rosa) indicados na estrutura do domínio Grb2-SH2 (colorido em azul). Os resíduos de

aminoácido R86 e W121 fazem parte dos sítios I e II, responsáveis pelo reconhecimento de fosfotirosina e fosfopeptídeos (pY+2), respectivamente, encontram-se indicados em C coloridos em alaranjado. Em B verifica-se o dímero de Grb2, coloridos em azul são os domínios Grb2-SH2 e em cor de rosa os resíduos formando uma superfície em troca conformacional, voltados para os *linkers* entre SH2 e os domínios SH3. 83

Figura 25: A) Espectros ^{15}N , ^1H -HSQC de Grb2-SH2 na presença e na ausência de cumarina (azul e alaranjado, respectivamente). Os resíduos de aminoácidos W60, L84, K117, V122, L131 e Y134 mostraram perturbações significativas, sugerindo interação com o domínio. B) Região ampliada mostrando a perturbação de deslocamento químico para o resíduo L84. 84

Figura 26: Cálculo das perturbações nos deslocamentos químicos dos resíduos de aminoácidos do domínio Grb2-SH2. Os resíduos com perturbações significativas são aqueles que se encontram envolvidos na interação com cumarina, e estão coloridos em verde na estrutura. Os resíduos de aminoácidos em laranja mostram a R32, responsável pela interação com a fosfotirosina (pY) (Sítio I) e o W121, responsável pela interação pY+2 (Sítio II). 85

Figura 27: A) Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM do domínio Grb2-SH2 na ausência e na presença de diferentes concentrações do supressor cumarina com excitação em $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$ em 291 K. 87

Figura 28: A) Gráfico duplo-log do complexo Grb2-SH2 e cumarina em 291, 295 e 299 K sugere que a interação de uma molécula no domínio com constante de dissociação $K_b \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ o que é esperado para uma interação moderada. B) Gráfico de Vant' Hoff para as 3 temperaturas analisadas mostra uma inclinação positiva. 88

Figura 29: Perfil termodinâmico da interação de Grb2-SH2 com cumarina. A contribuição $\Delta G < 0$, $T\Delta S > 0$ e $\Delta H > 0$ sugerem que a interação é entropicamente dirigida, guiada por efeitos hidrofóbicos. 90

Figura 30: Cálculos teóricos de R_2 e R_1 de Grb2 monomérica e oblata. 102

Lista de Tabelas

Tabela 1: Exemplos de ligantes e receptores tirosina quinase e as respostas desencadeadas pela interação.	25
Tabela 2: Exemplos de cumarinas com suas respectivas estruturas básicas.	37
Tabela 3: Relação dos experimentos realizados para medidas dos parâmetros de relaxação R_2 e R_1 da proteína Grb2. Experimentos realizados em 25 °C com 102 μ M e 268 μ M Grb2 em 600 e 900 MHz respectivamente.	56
Tabela 4: Relação dos experimentos realizados para medidas dos parâmetros de relaxação R_2 , R_1 e hNOE do domínio Grb2-SH2 e HSQC para as titulações de cumarina. Experimentos realizados em 900 MHz, 25 °C com 93 μ M SH2 isotopicamente marcada com ^{15}N e ^{13}C	57
Tabela 5: Relação de experimentos 3D para o assinalamento completo do domínio SH2 em pH 7. Experimentos realizados em 700, 800 e 900 MHz, 25 °C com 300 μ M SH2 isotopicamente marcada com ^{15}N e ^{13}C	58
Tabela 6: Experimentos de titulação de cumarina em ^{15}N -SH2. Encontram-se na tabela, o volume de cumarina adicionada a cada titulação (ΔV), a concentração de cumarina e de Grb2-SH2, volume total no sistema a cada titulação.	60
Tabela 7: Parâmetros físico-químicos teóricos da proteína adaptadora Grb2 obtidos através da ferramenta <i>online</i> ProtParam.	62
Tabela 8: Parâmetros de relaxação R_2 e R_1 , e o tempo de correlação rotacional da proteína Grb2 em 14,04 T (600 MHz) e 21,14 T (900 MHz).	69
Tabela 9: Levantamento bibliográfico dos estados oligoméricos de Grb2 em diferentes condições experimentais.	72
Tabela 10: Valores do número de ligantes por proteína (n), constante de associação (K_b), e parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e $T\Delta S$) encontrados para a formação do complexo Grb2-SH2 e cumarina.	89

Lista de abreviações

CSP – *Chemical shift perturbation*

DO₆₀₀ – Densidade óptica em 600 nm

FGFs – *Fibroblast growth factors*

FGFR2 – *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*

FID – *Free induction decay*

GDP – Guanosina difosfato

Grb2 – *Growth factor receptor-bound protein 2*

GTP – Guanosina trifosfato

hNOE – *Heteronuclear Overhauser effect*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

INEPT – *Insensitive Nuclei Enhanced Polarization Transfer*

LW – *Line width*

MAPK – *Mitogen activated protein kinases*

RTKs – *Receptor tyrosine kinases*

PTKs – *Protein tyrosine kinases*

TROSY – *Transverse Relaxation – Optimized Spectroscopy*

Sumário

1. Introdução	20
1.1. A incidência do câncer na sociedade moderna.....	20
1.2. Sinalização celular.....	22
1.3. A proteína Grb2 e a sinalização MAPK.....	26
1.4. O domínio SH2 de Grb2.....	32
1.5. A molécula cumarina.....	36
2. Fundamentações teóricas	38
2.1. Fundamentos básicos de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	38
2.1.1. Deslocamento químico e acoplamento escalar J.....	42
2.1.2. ^{15}N , ^1H -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)	43
2.1.3. ^{15}N , ^1H TROSY-HSQC (Transverse Relaxation – Optimized Spectroscopy).....	45
2.1.4. $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE (Nuclear Overhauser Effect).....	47
2.2. Espectroscopia de fluorescência.....	47
2.2.1. Determinação da constante de associação.....	49
2.2.2. A termodinâmica da interação proteína-ligante	50
3. Objetivos gerais.....	51
3.1. Objetivos específicos.....	52
4. Metodologia	52
4.1. Transformação dos plasmídeos recombinantes em células de <i>Escherichia coli</i> linhagem DH5 α	52
4.2. Transformação em células <i>E. coli</i> linhagem BL21 (DE3)	53
4.3. Expressão do domínio Grb2-SH2.....	53
4.4. Expressão da proteína ^{15}N -Grb2 em D $_2$ O.....	54

4.5.	Purificação da proteína Grb2 e domínio Grb2-SH2	54
4.6.	Espectroscopia de absorção UV-Vis	55
4.7.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	55
4.8.	Titulação de Cumarina em SH2 por RMN	59
4.9.	Cálculo da Estrutura em Solução	60
4.10.	Espectroscopia de Fluorescência	61
5.	Resultados e discussões	62
5.1.	Parâmetros físico-químicos das proteínas através do servidor <i>online</i>	62
5.2.	Purificação da proteína Grb2 e do domínio Grb2-SH2	62
5.3.	Informações estruturais de Grb2	63
5.4.	Dinâmica estrutural de Grb2	67
5.5.	Assinalamento das ressonâncias do domínio Grb2-SH2.....	73
5.5.1.	Resumo do manuscrito	75
5.5.2.	Estrutura do domínio Grb2-SH2 pelo CS-Rosetta	78
5.6.	Dinâmica estrutural do domínio Grb2-SH2	80
5.7.	Interação entre o domínio SH2 e cumarina	84
5.8.	Espectroscopia de Fluorescência.....	87
6.	Conclusão.....	90
7.	Perspectivas.....	92
	Referências.....	93
	Anexo I.....	99
	Anexo II	101
	Anexo III	102

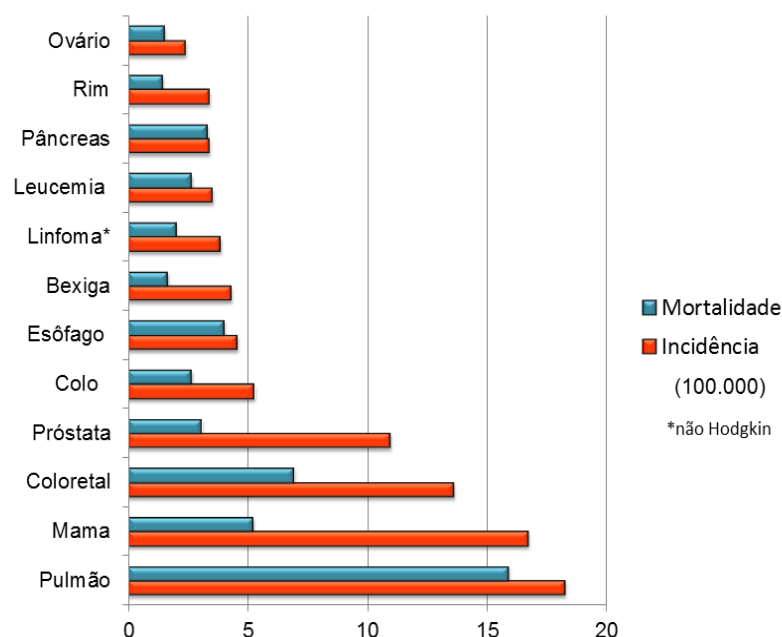
1. Introdução

1.1. A incidência do câncer na sociedade moderna

O câncer é uma das doenças que mais afeta pessoas em todo o mundo. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer estima que essa moléstia atinja cerca de 32,6 milhões da população mundial. O câncer é também uma das principais causas de morte no mundo, representando anualmente mais de 8 milhões de casos (*Internacional Agency for Research on Cancer*, 2016). Segundo o tratamento estatístico de dados realizados pela *International Union Against Cancer* (UICC), em 2020 o número de mortes já terá aumentado para 15 milhões de pessoas.

O câncer de mama, próstata, pulmão e colorretal estão entre os quatro mais incidentes no mundo (Figura 1), sendo a Dinamarca, França Bélgica e Noruega os países mais afetados (*Internacional Agency for Research on Cancer*, 2016). Estudos mostram que o aumento do câncer nesses países provavelmente se deve ao aumento do uso de tabaco, consumo de gorduras e alimentos calóricos bem como diminuição da prática de exercícios físicos [1].

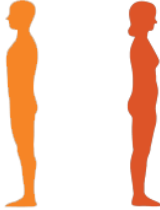
Figura 1: Estatística dos 15 tipos de cânceres com maior incidência e mortalidade em nível mundial.



Fonte: Globocan (2016) - adaptado.

No Brasil, mulheres e homens sofrem com o aumento da incidência dos casos de câncer, principalmente o de mama e próstata (Figura 2). Estes estão entre os 10 tipos de câncer com maior incidência entre a população brasileira. Para 2018, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou cerca de 59.700 novos casos de mulheres com câncer de mama e 68.220 novos casos de homens com câncer de próstata, ou seja, aproximadamente 30% dos homens e das mulheres podem adquirir a doença (INCA).

Figura 2: Estatística dos casos de câncer no Brasil em 2018 de acordo com o Instituto Nacional de Câncer. Pode-se verificar que os cânceres com maior número de casos é o de próstata entre os homens e o de mama entre as mulheres, atingindo sendo 31,7% e 29,5% respectivamente.

Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA).

O câncer de próstata é o mais incidente em todas as regiões do Brasil, o qual dentre os tipos de tumores aproximadamente 70% da população masculina com idade acima de 65 anos pode ser diagnosticada, sendo esperado um aumento de 58% até o ano de 2020. Uma situação semelhante ocorre avaliando o câncer de mama feminino nas regiões brasileiras de maior frequência do tumor: Sudeste, Sul e Nordeste. A idade, sedentarismo e alimentação são os fatores de risco mais importantes, observando-se que as taxas de incidência aumentam para mulheres com idade até 50 anos [2].

Câncer ou neoplasia (*neo* = novo; *plasia* = formação) é o nome dado ao grupo de doenças que apresentam proliferação celular excessiva e descontrolada pelo fato de perderem, de alguma forma, a função de inibição por contato

ocasionado por mutações em determinados genes [3,4]. Os tumores podem ser divididos em dois tipos: o benigno e o maligno. São tumores benignos os que crescem, normalmente de forma lenta, e permanecem envoltos por tecido conjuntivo, tais como verrugas e sinais escuros. Uma vez que esses tumores não se expandem em lugares de risco como cérebro, eles não ameaçam a vida do indivíduo portador. Nos tumores malignos, ou cânceres, as células se proliferam descontroladamente podendo invadir os vasos sanguíneos e linfáticos difundindo-se através da circulação para outros tecidos, gerando novos nódulos tumorais em um processo denominado metástase [5].

Processos biofísico-químicos como oxidação e redução, hidrólise, transferência de grupos funcionais, entre outros, ocorrem através de enzimas e são vitais para o funcionamento normal dos tecidos. Estes processos regulam a proliferação, divisão e sobrevivência celular através de sinalizações celulares mediadas por proteínas codificadas por genes chamados proto-oncogenes. Os proto-oncogenes são genes expressos desde a embriogênese até às células maduras. Quando há alterações genéticas nos proto-oncogenes, como mutações, amplificação gênica e rearranjo cromossômico, ocorre ativação dos oncogenes (causadores de câncer), causando, como consequência, o aumento do crescimento celular [6]. Uma vez que a comunicação celular é mantida por meio de sinalização, o entendimento de como a informação é transmitida é crucial tanto para a prevenção quanto para a cura de doenças.

1.2. Sinalização celular

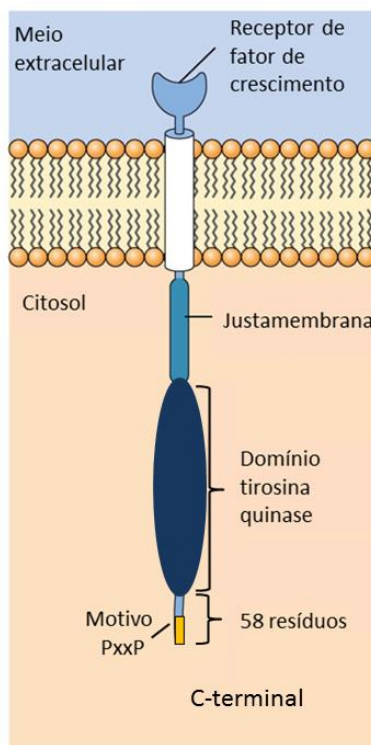
As vias de sinalização controlam respostas adequadas e específicas dentro da célula. A sinalização celular em eucariotos envolve moléculas sinalizadoras denominadas ligantes, os quais interagem com proteínas receptoras que podem se encontrar na membrana celular, solúveis no meio citoplasmático ou até mesmo na membrana nuclear da célula. No caso de proteínas receptoras na membrana citoplasmática, elas se encarregam de receber o sinal proveniente do ligante no meio extracelular e passá-lo para o meio intracelular e, assim, propagá-lo por meio de outras proteínas sinalizadoras encontradas no citosol até o núcleo. Estas

sinalizações envolvem processos regulados das células em que estímulos extracelulares são gerados por meio da interação de ligantes como hormônios, citocinas, fatores de crescimento entre outros, com proteínas receptoras [7].

As proteínas receptoras encontradas na membrana celular podem ser divididas de acordo com o seu mecanismo de transdução de sinal. Existem as proteínas receptoras que estão acopladas a canais iônicos, as receptoras acopladas à proteína G e as proteínas receptoras associadas a enzimas [5,8].

As proteínas receptoras que se encontram associadas a enzimas são geralmente quinases, e se organizam como proteínas hélice- α transmembrana com um sítio de interação com o ligante na porção extracelular e o sítio catalítico na região intracelular, como é o caso da *Fibroblast growth factor receptor 2* (FGFR2) representada na Figura 3 [5,9]. Em sua região extracelular encontra-se o a região de ligação de fatores de crescimento, na região intracelular logo abaixo da membrana plasmática encontra-se a região justamembrana, enquanto que subsequente o domínio quinase pode ser verificado na Figura 3. Nos últimos dez resíduos da região C-terminal da FGFR2 encontra-se o *motif* PxxP (P representando resíduo prolina e o duplo x qualquer outro resíduo de aminoácido) o qual é importante para interações específicas com proteínas parceiras que o reconhecem [10].

Figura 3: Representação da estrutura da proteína receptora tirosina quinase. Pode-se verificar a região extracelular, na qual ocorre o reconhecimento de fatores de crescimento, a transmembrana, e a citosólica onde se encontram a justamembrana, o domínio quinase e o *motif* PxxP junto dos últimos 58 resíduos da proteína em sua região C-terminal.



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

As quinases que catalisam a fosforilação de resíduos de serina e treonina são chamadas serinatreonina-quinases e aquelas que atuam em resíduos de tirosina são chamadas tirosina-quinases [3,11,12]. Existem 58 receptores tirosina quinase (RTKs) humanos divididos em 20 subfamílias [13,14]. Fatores de crescimento entre outros ligantes são exemplos de moléculas que interagem com RTKs proporcionando respostas específicas, alguns exemplos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de ligantes e receptores tirosina quinase e as respostas desencadeadas pela interação.

Ligante	Receptor	Algumas respostas
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Receptores de EGF	Estimula sobrevivência, crescimento, proliferação, ou diferenciação celular; sinal indutor no desenvolvimento;
Insulina	Receptor de insulina	Estimulam a utilização de carboidratos e síntese proteica;
Fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGF1 a IGF2)	Receptor IGF-1	Estimulam a sobrevivência e crescimento em muitos tipos celulares;
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF AA, BB, AB)	Receptores de PDGF (α e β)	Estimula a sobrevivência, o crescimento, a proliferação e a migração de vários tipos de células;
Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF1 a FGF24)	Receptores de FGF (FGFR1 a FGFR4)	Estimulam a proliferação de vários tipos celulares; inibem a diferenciação de algumas células precursoras; atuam como sinais indutores no desenvolvimento;
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Receptor de VEGF	Estimula a angiogênese;
Efrinas (tipos A e B)	Receptores Eph (tipos A e B)	Estimulam a angiogênese; guiam a migração de células e de axônios.

Fonte: [15]

Os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) induzem a sinalização celular através de quatro tipos de RTKs, sendo eles FGFR1-4 (*Fibroblast growth factor receptors 1 - 4*) [16]. A interação de FGFs induz autofosforilação da porção citosólica da tirosina quinase [10]. A fosforilação aumenta a atividade quinase em que tirosinas fosforiladas e sequências vizinhas criam sítios de ancoragem para outras proteínas, como as adaptadoras, que são indispensáveis para a propagação da sinalização celular [12,14]. As proteínas adaptadoras medeiam interações proteína-proteína através de fosforilações e do reconhecimento de resíduos específicos [7]. Essas proteínas adaptadoras contêm domínios específicos que permitem a interação proteína-proteína, como por exemplo, os domínios SH2 (*Src homology domain 2*) e SH3 (*Src homology domain 3*) [13].

Para o funcionamento normal das células de diferentes tecidos, a propagação das informações é mediada por sinalizações que, normalmente,

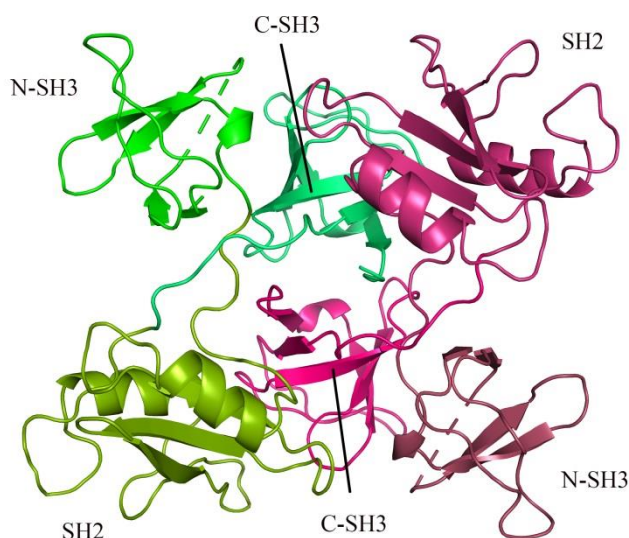
encontram-se submetidas a um constante e preciso controle de sobrevivência, crescimento, diferenciação e apoptose. Entretanto, durante o processo de proliferação celular, estas também estão sujeitas a erros que podem gerar perda de controle de crescimento celular, dando início ao crescimento acima das necessidades do tecido que, por sua vez, pode ocasionar o surgimento de tumores [5].

Um exemplo de via que pode sofrer alterações e desencadear o crescimento celular descontrolado é a via de sinalização MAPK, envolvida em processos celulares fundamentais como proliferação, diferenciação e apoptose [17]. Esta via é indiretamente ativada por algumas proteínas como quinase, fosfatase e a adaptadora Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), que em conjunto, desempenham papel fundamental para que a transdução de sinal ocorra [18].

1.3. A proteína Grb2 e a sinalização MAPK

As proteínas adaptadoras contêm domínios que fazem o reconhecimento de sequências específicas, permitindo interações proteína-proteína e facilitando a sinalização celular [19]. A proteína Grb2 é uma adaptadora citosólica ubiquamente expressa em eucariotos, atuando em diversas vias de sinalização de proteínas quinases nas células [20]. Esta proteína contém 217 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 25 kDa, sendo constituída por um domínio SH2 (*Src homology domain 2*) ligado em dois domínios SH3 (*Src homology domain 3*), sendo um C e um N terminal [21] (Figura 4, PDBid. 1GRI). Além da estrutura cristalográfica de Grb2, estudos utilizando ressonância magnética nuclear mostram o comportamento dinâmico dessa proteína em solução, no qual o *loop* entre o domínio SH2 e o domínio C-SH3 apresenta-se mais flexível que os outros [22].

Figura 4: Estrutura tridimensional cristalográfica da proteína Grb2 em sua forma dimérica. As subunidades do dímero encontram-se colorido em cor de rosa e verde, e cada domínio está representado por tons diferentes de acordo com suas subunidades.



Fonte: *Protein Data Bank* (PBD). PBDId: 1GRI.

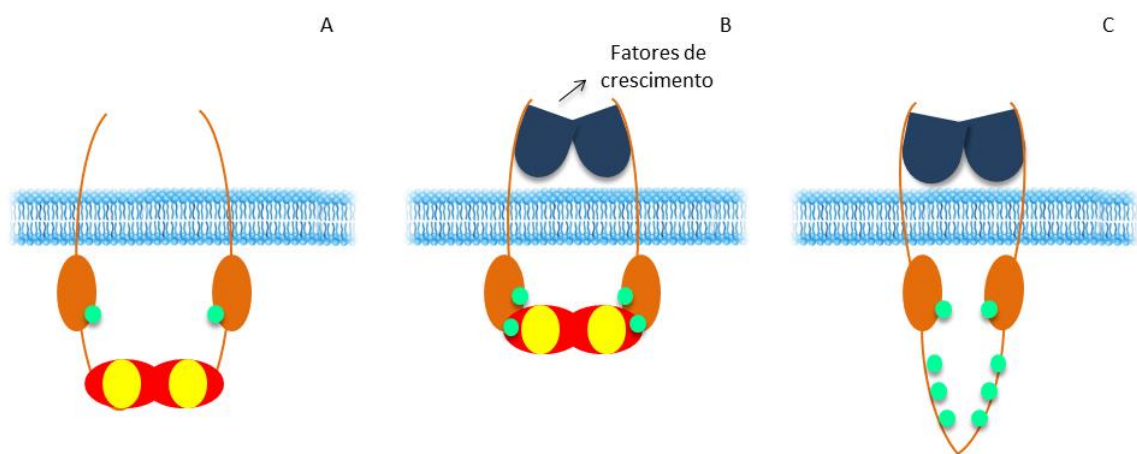
O domínio SH3 contém de 50 a 75 resíduos de aminoácidos e se liga em sequências de 9 ou 10 resíduos ricos em prolina (P), contendo o *motif* P-x-x-P (ou PxxP) sendo x-x quaisquer outros dois resíduos. Ele apresenta um enovelamento que é composto por fitas- β antiparalelas empacotadas uma contra a outra [5].

O domínio SH2 representa a maior classe de domínios que reconhecem fosfotirosinas no proteoma humano. Ele tem forma hemisférica e contém aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos com sequencias específicas que se ligam em resíduos de tirosinas fosforiladas localizadas na região citosólica de RTKs [23–25]. Este domínio está organizado em 5 fitas- β antiparalelas que se encontram entre duas hélices- α paralelas [25].

Estudos mostraram que a interação da proteína adaptadora Grb2 com a proteína tirosina quinase FGFR2 ocorre na ausência de estímulos extracelulares [26]. Este mecanismo está representado na Figura 5, no qual FGFR2 sofre fosforilação antes de estímulo extracelular que resulta em um chamado “nível de fosforilação basal”. Este nível não é capaz de ativar uma via de sinalização, mas

sim, um estado fosforilado e não sinalizador. Além do mais, neste estado Grb2 dimérica é capaz de ligar-se via domínio C-SH3 na região C-terminal de FGFR2 formando um complexo tetramérico basal FGFR2-Grb2. Quando fatores de crescimento se ligam na porção extracelular da receptora tirosina quinase, esta por sua vez fosforila a proteína Grb2 que consequentemente se desvincula de FGFR2, tornando-se livre para interagir com proteínas no citosol celular e ativar indiretamente a via de sinalização da MAPK (Figura 5) [18,27].

Figura 5: Representação do mecanismo de regulação da proteína quinase FGFR2 através da proteína adaptadora Grb2. (A) A proteína transmembrana FGFR2 (alaranjado) com seu domínio quinase na região citoplasmática (alaranjado oval) e Grb2 dimérica ligada através dos domínios C-SH3 (vermelho), onde um heterotetrâmero na proporção 2:2 é obtido; (B) Fatores de crescimento (azul escuro) se ligam na porção extracelular de FGFR2, induzindo mudanças conformacionais fazendo com que o domínio quinase de FGFR2 fosforile (grupos fosfato em cinano) domínios SH3 de Grb2; (C) Uma vez fosforilada, Grb2 se dissocia da proteína tirosina quinase.

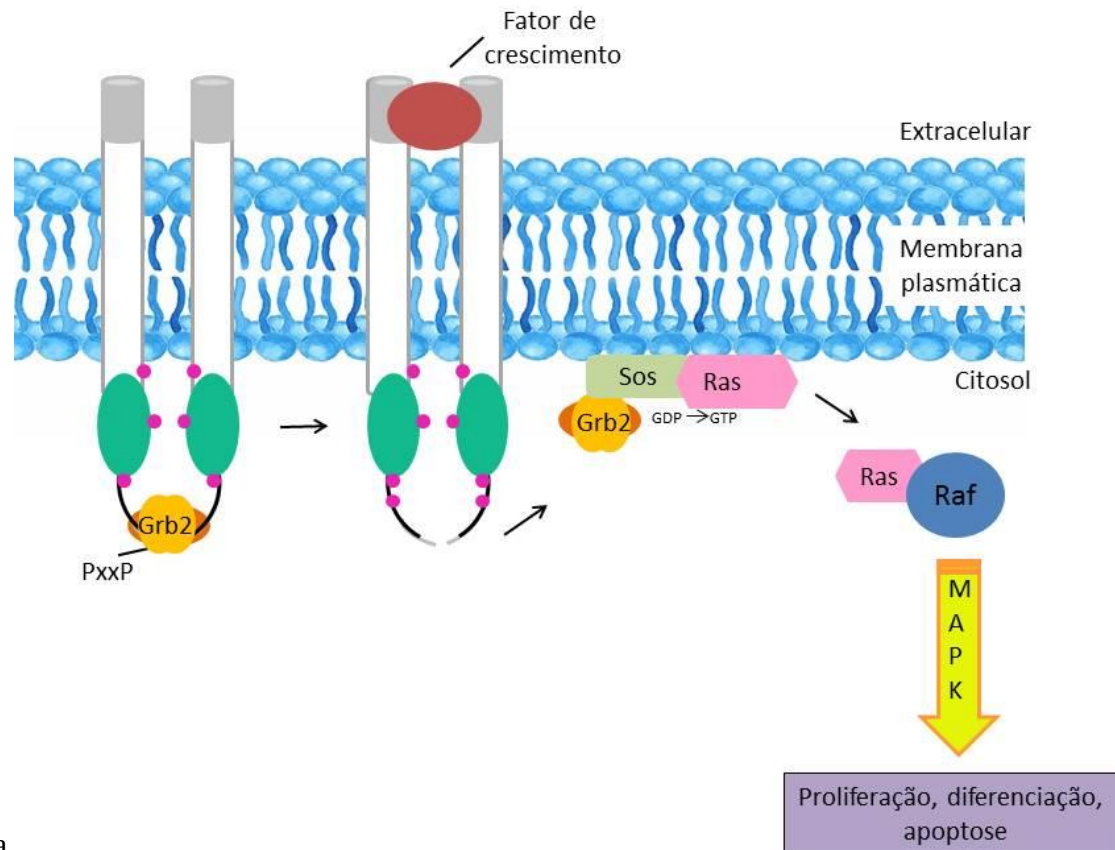


Fonte: Chi-Chuan Lin *et al.*; 2012 – adaptado.

Para compreender o papel de Grb2 na ativação indireta da via de sinalização da MAPK pode-se verificar a Figura 6, a qual representa um esquema com as sequências de eventos até que MAPK seja iniciada. Para isso, a ocorrência de FGFR2 dimérica na membrana leva à proximidade dos domínios quinase na região intracelular, permitindo que estes se transfosforilem. Esta transfosforilação aumenta a atividade quinase intrínseca de FGFR2, proporcionando eventos

secundários de fosforilação de tirosinas na região justamembrana, no domínio quinase e na cauda C-terminal de FGFR2. As tirosinas fosforiladas, bem como sequências vizinhas específicas proporcionam sítios de ancoragem para proteínas que contêm domínios SH2 e SH3. O domínio C-SH3 da proteína adaptadora Grb2 é responsável pelo reconhecimento do *motif* PxxP na região C-terminal da proteína quinase FGFR2, permitindo a interação Grb2-FGFR2 [10,26]. A adaptadora Grb2 recruta, através do domínio SH2, proteínas como a fosfatase Shp2 e a proteína Sos, a qual é responsável por promover a troca de GDP em GTP. Grb2 então se associa à proteína Sos que se encontra no citosol e, após esta ligação, Sos é reposicionada para a membrana onde se encontra a proteína Ras-GDP [24]. A proteína Ras-GDP é ativada por Sos tornando-se Ras-GTP, que posteriormente recruta a proteína Raf. A Raf é uma quinase serina/treonina que é ativada pela ligação de Ras-GTP em seu domínio N-terminal [24]. A proteína Ras-GTP fornece um grupo fosfato para Raf, tornando-a ativa e pronta para fosforilar e ativar a via de sinalização MAPK. Esta via (Figura 6), quando ativa e não regulada, leva a uma proliferação celular descontrolada, desencadeando alguns tipos de câncer, como o de mama e o de próstata, e má formação fetal [26,28].

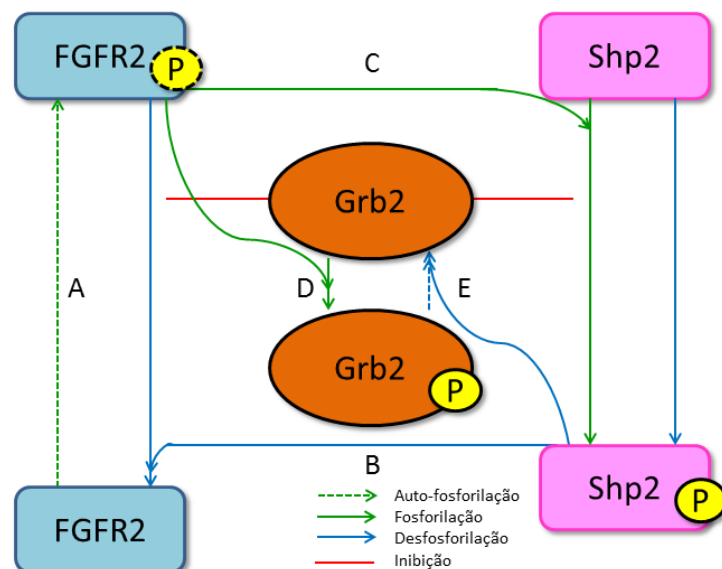
Figura 6: Esquema representativo da ativação da cascata de sinalização MAPK. Após estímulos por fatores de crescimento, fosforilações são induzidas em Grb2 por FGFR2. Então, a proteína Grb2 se dissocia de FGFR2 e interage com Sos via domínios SH3. A Sos é responsável pela troca de GDP em GTP na proteína Ras. Assim, a proteína Ras se torna ativa e se desvincula da membrana celular, sendo capaz de se ligar a proteína Raf e ativar a cascata MAPK.



Fonte: autoria própria.

Concomitantemente, a proteína Grb2 atua como reguladora da sinalização mediada por FGFR2 através da proteína Shp2, desempenhando um ciclo regulatório envolvendo fosforilações e desfosforilações (Figura 7), como recentemente verificado por Ahmed e colaboradores [18]. A proteína Shp2 é uma fosfatase altamente expressa dentro da célula, exercendo importante papel em vias de sinalização incluindo a via MAPK [29].

Figura 7: Representação do ciclo em que Grb2 atua regulando a atividade quinase de FGFR2 juntamente da fosfatase Shp2. A: A proteína FGFR2 num estado basal fosforilado não sinalizante (onde se encontra o círculo amarelo tracejado), pode recrutar a proteína Grb2. B: A fosfatase Shp2 desfosforila FGFR2. C: FGFR2 em seu estado basal de fosforilação pode fosforilar a fosfatase Shp2 (Shp2 fosforilada está representada pelo círculo amarelo). D: FGFR2 fosforila a adaptadora Grb2, que, neste estado fosforilado não é capaz de se ligar em FGFR2, perdendo a propriedade inibitória que esta interação proporciona. E: A fosfatase Shp2 desfosforila a adaptadora Grb2, tornando-a apta a se ligar a FGFR2 e estabelecer a regulação da mesma.



Fonte: Adaptado de Ahmed *et al.*, 2013.

Este ciclo envolvendo fosforilações e desfosforilações entre Shp2, Grb2 e FGFR2 proporciona a regulação da atividade quinase da proteína FGFR2. Uma vez que fatores de crescimento se ligam na receptora FGFR2 esta torna-se ativa para recrutar proteínas e iniciar cascatas de sinalização que, na ausência de regulação, podem causar danos no organismo. No caso da sinalização

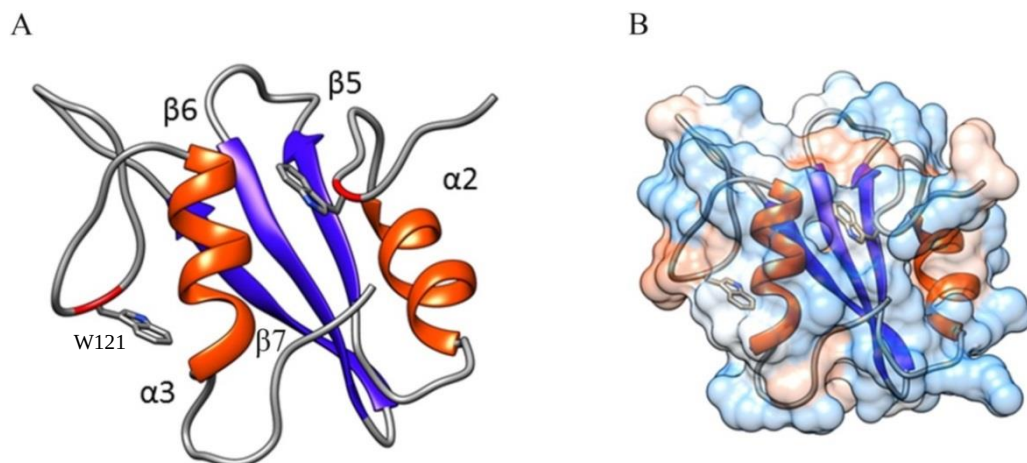
desempenhada por MAPK, a falta de regulação causa o crescimento celular descontrolado, podendo ocasionar o desenvolvimento de tumores e até mesmo má formação fetal [18].

1.4. O domínio SH2 de Grb2

Existem mais de 120 domínios SH2 distribuídos ao longo de 110 proteínas humanas, a incluir quinases, fatores de transcrição, proteínas adaptadoras, fatores de troca de nucleotídeos, fosfatases e supressores [30]. Sabe-se que esses domínios são responsáveis pelo reconhecimento de tirosinas fosforiladas (pY) no processo de interação entre proteínas, atuando em receptores tirosina quinase, transferindo informações para sinalizações no citosol. Ainda que este domínio tenha alta especificidade no reconhecimento de pY, a investigação para compreender como ocorre o controle deste mecanismo é vasta [19,31,32].

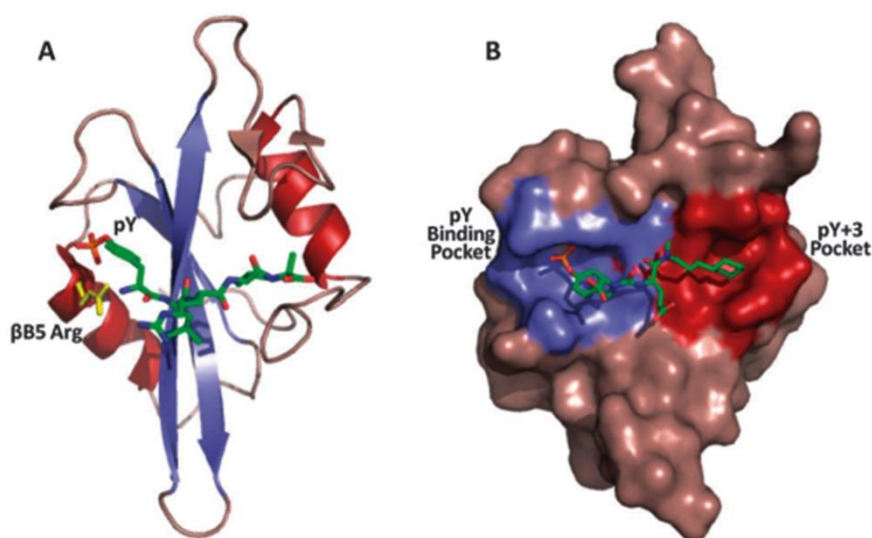
Os domínios SH2 apresentam uma estrutura bem conservada sendo uma folha- β central cercada por duas hélices- α (Figura 8).

Figura 8: Estrutura tridimensional do domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2. A) Na estrutura tridimensional, as hélices- α estão coloridas em laranja, as fitas- β em azul e os *loops* em cinza. Os dois triptofanos que o SH2 apresenta estão coloridos em vermelho. É possível visualizar que o triptofano 121 (W121) bloqueia a entrada de possíveis ligantes no sítio de interação do domínio ($\alpha 3$). B) Estrutura tridimensional do SH2 onde a superfície encontra-se colorida por hidrofobicidade (Em azul encontra-se regiões hidrofílicas enquanto que em laranja as hidrofóbicas).



Estudos da interação de peptídeos com domínio SH2 de diversas proteínas mostram que os fosfopeptídeos adotam uma conformação clássica alongada quando se ligam à superfície de SH2, onde a interação ocorre desde a extremidade de uma hélice- α até a outra, e perpendicular à fita- β (Figura 9). Além disso, dois sítios de interação bem definidos são encontrados nos domínios SH2. O sítio de interação 1 é composto por 3 resíduos positivamente carregados (R155, R175 e K203) que apresentam suas cadeias laterais estruturalmente próximas umas das outras, interagindo com fosfopeptídeos através de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas (Figura 9). Por outro lado, o sítio 2 localizado próximo a hélice- α_3 do domínio faz o reconhecimento de pY localizadas em posições pY+1 até pY+5 resíduos de aminoácidos. Ambos os sítios podem ser visualizados na Figura 9B, os quais encontram-se coloridos em azul e vermelho, sítio 1 e sítio 2 respectivamente [33].

Figura 9: Domínio SH2 da proteína v-Src evidenciando os dois sítios de interação encontrados na maioria dos domínios SH2. A) Representação *cartoon* do domínio Src-SH2 com as fitas- β coloridas em azul, as hélices- α em vermelho e o fosfopeptídeo (pYLRVA) em verde. B) Representação *surface* do domínio Src-SH2 na qual em azul encontra-se o sítio I e em vermelho o sítio II. A especificidade na interação de fosfopeptídeos no sítio 1 é devido a presença de duas argininas e uma lisina, os quais fazem pontes de hidrogênio bem como interações eletrostáticas



Fonte: PDBid.: 1SHB

Para o domínio SH2 de Grb2 (Grb2-SH2) foi verificado que fosfopeptídeos ao interagir nos sítios I e II do domínio não adotavam a clássica conformação estendida (ou linear) como a priori ocorre na maioria dos domínios dessa classe, mas ao contrário, para Grb2-SH2 os fosfopeptídeos tem uma conformação fita- β . Esse domínio faz o reconhecimento de *motif* pY-x-N-x, sendo N uma asparagina e x qualquer resíduo com cadeia lateral hidrofóbica [31,32,34].

Existe em aberto uma discussão a respeito da conformação fita- β adquirida exclusivamente em interações com o domínio Grb2-SH2. Acreditava-se que esta ocorria devido à presença do Triptofano 121 (Trp121) que se encontra numa região de *loop* no sítio de reconhecimento de pY, propondo que possivelmente este levava os fosfopeptídeos adotarem essa conformação fita- β [30,35]. Isso foi proposto através de um estudo utilizando o domínio Src-SH2, o qual sabe-se que faz o reconhecimento de *motif* pYEEI, e que esses fosfopeptídeos adotam estruturas estendidas/lineares quando ligados ao domínio de Src-SH2, seguindo o padrão dos domínios SH2. Entretanto, Kimber e colaboradores (2000) realizaram a mutação de Treonina por Triptofano (Thr→Trp) em Src-SH2 na posição do sítio de reconhecimento deste domínio a fim de verificar a importância do Trp para o reconhecimento, bem como a estruturação linear estendida dos peptídeos quando ligados ao SH2. Notou-se que a presença do Trp em Src-SH2 mutado diminuiu cerca de 20 vezes a especificidade na interação com peptídeos contendo *motif* pYEEI (*motif* altamente reconhecido por Src-SH2 em sua forma selvagem), enquanto que para a interação com pYVNV (*motif* altamente reconhecido em Grb2-SH2 selvagem) obteve-se um aumento de 60 vezes na afinidade de interação. Além do mais, a sobreposição das estruturas de Src-SH2 mutada (Thr→Trp) e Grb2-SH2, selvagem ambas complexadas com peptídeos pYVNV, mostraram interações idênticas e ainda a formação de fita- β , o que não ocorria em Src-SH2 selvagem [35].

Para verificar essa suposição, estudo recente realizado por Papaioannou e colaboradores (2016) com uma mutação do Trp121 por Glicina (Gly) demonstra que o Trp pode não ser o fator mais importante para a especificidade no reconhecimento de pY do domínio Grb2-SH2 [34]. Neste estudo, a estrutura

cristalográfica do complexo Grb2-SH2 mutada (Trp→Gly) e o fosfopeptídeo SpYVNVQ mostrou que este adquire uma conformação fita-β, ou seja, o triptofano nesta posição não é o responsável pela formação de β na interação com Grb2-SH2. Além disso, foi verificado que a presença de Glicina proporcionou um aumento na afinidade da interação cerca de 6 vezes maior quando comparado com Grb2-SH2 selvagem. Estes estudos conduzem ao entendimento de que possivelmente a capacidade de movimentação do ligante seja mais importante na formação da estrutura fita-β bem como alta especificidade da interação do que a presença do resíduo de aminoácido triptofano no domínio [34].

Outro estudo interessante realizado por Zamal e colaboradores (2015) mostrou a respeito da atuação, bem como a importância de Grb2 nos estados dimérico e monomérico. Até 2015 sabia-se que esta proteína além de ser ubiquamente expressa dentro da célula, atuava em suas formas monomérica e dimérica. Entretanto não era conhecida a importância biológica dessas duas formas de Grb2 para desempenhar sua função em sinalizações. Neste trabalho, Zamal analisou células cancerígenas e pode verificar uma alta concentração de Grb2 em sua forma monomérica, sugerindo que o equilíbrio existente entre monômero e dímero é o ponto chave para a regulação da via de sinalização da MAPK. Quando Grb2 encontra-se em sua forma monomérica esta é ativa para a via de sinalização, enquanto que sua forma dimérica tende a inativá-la. Neste sentido, o domínio SH2 exerce um papel crucial, pois o dímero de Grb2 pode ser perturbado quando pequenas moléculas interagem em seu sítio de reconhecimento de fosfotirosinas e a tirosina 160 localizada no domínio SH3 C-terminal é fosforilada [36].

Apesar da alta especificidade encontrada na interação entre fosfopeptídeos e domínios SH2 através de experimentos extracelulares, dentro das células esses fosfopeptídeos são de difícil absorção pela membrana citoplasmática, além de serem predispostos a degradação devido à ação de fosfatases e peptidases [30]. Diante disso, busca-se por pequenas moléculas que possam atuar, assim como os fosfopeptídeos, inibindo vias de sinalização aberrante a partir da interação com o domínio Grb2-SH2. A cumarina é um exemplo de molécula natural que é

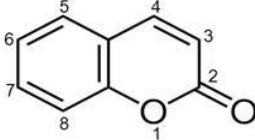
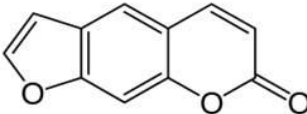
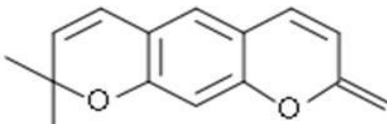
amplamente estudada devido aos seus benefícios para a saúde humana [37]. Uma breve introdução desta molécula encontra-se na subseção 1.5.

1.5. A molécula cumarina

A utilização de moléculas naturais como fármacos é um dos recursos mais antigos utilizados na cura de doenças, sendo estes apresentados das mais variadas formas, desde chá até compressas. Visando a síntese de fármacos para inibir a proliferação descontrolada das células tumorais, a procura por moléculas naturais que apresentam propriedades anticarcinogênica e que possam interagir com proteínas em cascatas de sinalizações aberrantes vem sendo uma alternativa a se explorar. As cumarinas são uma classe de moléculas com importantes propriedades farmacológicas como bactericida, anti-inflamatório, anticoagulante, antitrombótico, vasodilatador e atividade anticancerígena verificada em células [38,39].

Cumarinas (do francês *Coumarou*) são membros da família dos compostos benzopirenos, que consistem em um anel benzeno ligado a um pirano. A classificação das cumarinas ocorre de acordo com as substituições nos anéis benzeno e pirano [37], e podem ser classificadas em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, e biscumarinas (Tabela 2).

Tabela 2: Exemplos de cumarinas com suas respectivas estruturas básicas.

Cumarina simples	
 1,2 – benzopirona	- Apresentam substituições nos anéis benzeno e pirano;
Furanocumarinas	
 6,7 – furanocumarina	- Apresentam anel furano junto a estrutura de cumarina simples;
Piranocumarinas	
 6,7 – piranocumarina	- Apresentam anel pirano junto a estrutura de cumarina simples;

Fonte: [40,41] - adaptado

As cumarinas são metabólitos secundários, atuando principalmente na defesa das plantas [42]. Elas foram primeiramente encontradas em sementes de *Dipteryx odorata* selvagem, uma árvore popularmente conhecida como Cumaru, nativa no Brasil, Colômbia, Peru e Guiana [37].

As cumarinas encontram-se amplamente distribuídas nos frutos, sementes, raízes e folhas de plantas, principalmente em angiospermas e dicotiledôneas como em cenouras, aipo, salsa, chicória e frutas como toranja (*grapefruit*). Podem ser encontradas também em óleos de cássia (canela-chinesa) e óleo de casca de canela [40,42].

Os estudos utilizando cumarinas têm aumentado uma vez que sua função em atividades biológicas é ampla. Foi verificada por Mohler e colaboradores (1994) a atividade anticarcinogênica da cumarina em células prostáticas, onde ratos tiveram o câncer regredido quando tratados com a molécula [43]. López-González (2004) verificou a eficácia da cumarina *in vitro* na apoptose de adenocarcinoma pulmonar [44]. A cumarina também apresentou atividade

inibitória semelhante ao efeito do tratamento quimioterápico tamoxifeno quando analisada para o câncer de mama [45,46]. Estas, entre outras, revelam o grande potencial da molécula cumarina, o que torna seu estudo fundamental em áreas multidisciplinares.

2. Fundamentações teóricas

2.1. Fundamentos básicos de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

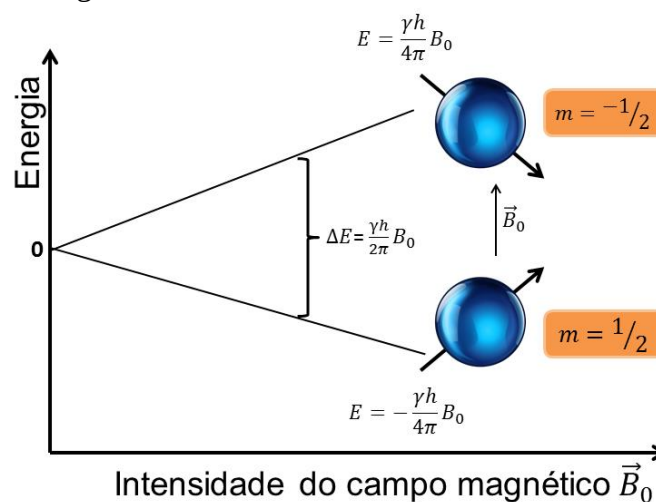
As técnicas espectroscópicas baseiam-se na interação de radiação eletromagnética com a matéria. A ressonância magnética nuclear envolve absorção e emissão de radiofrequência, através da transição entre estados quânticos de spin nucleares.

A matéria é composta por átomos os quais apresentam um núcleo, constituído por prótons e nêutrons, o qual é envolto por uma nuvem eletrônica. Sabemos que, a partir da resolução da equação de Schrödinger para o átomo de hidrogênio, os elétrons são caracterizados por 3 números quânticos, sendo eles o número quântico principal n , secundário ou azimutal l , e magnético m ou m_l . Para elétrons, o número quântico principal n indica o nível ou camada que este se encontra. O número quântico secundário ou azimutal l indica o subnível que o elétron ocupa. O número quântico magnético indica a orientação do orbital. O elétron possui, ainda, uma propriedade intrínseca chamada *spin*, representado por s . Os três primeiros números descrevem informações a respeito da energia, forma e orientação, ou seja, órbita que o elétron ocupa no espaço. O número quântico de *spin* está relacionado à propriedades magnéticas do elétron, apresentando números $\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$ [47,48]. Pelo princípio de exclusão de Pauli, os quatro números quânticos de dois elétrons em um átomo não podem ser os mesmos, de maneira que se dois elétrons ocupam o mesmo orbital com os três primeiros números quânticos iguais, eles terão diferentes número quântico de *spin*, estando então emparelhados. Devido à carga e ao movimento de rotação do elétron, tem-se outra propriedade importante que é o comportamento de um dipolo magnético, ocasionando um momento de dipolo magnético μ . Na presença de um campo magnético estático

B_0 , o vetor momento de dipolo magnético poderá se orientar em $(2l + 1)$ estados quânticos, para o caso do elétron tem-se duas orientações possíveis. Na ausência de B_0 , esses dois estados de *spin* apresentam a mesma energia, ou seja, estão degenerados [47,48].

De forma similar aos elétrons, os núcleos também apresentam momento magnético associado ao spin nuclear. Dois números quânticos descrevem o spin nuclear: número quântico de spin (I) e o número quântico magnético (m), sendo que o vetor dipolo magnético pode adquirir $2I+1$ estados quânticos. Este é o caso do núcleo do ^1H , no qual o *spin* nuclear é $I = \frac{1}{2}$ e pode se orientar em $(2I + 1)$ estados, ou seja, $m = \frac{1}{2}$ ou $m = -\frac{1}{2}$ estados com níveis de energia degenerados na ausência de um campo magnético externo B_0 [47]. Se B_0 é aplicado, a degenerescência dos níveis de energia dos estados é removida e consequentemente as projeções do vetor momento dipolo magnético nuclear tendem a se alinhar paralelamente ou anti-paralelamente com o campo magnético externo B_0 , tendo assim as duas projeções possíveis igualmente espaçadas devido ao efeito Zeeman [47,49] (Figura 10).

Figura 10: Representação do efeito Zeeman para o núcleo de *spin* $\frac{1}{2}$. O *spin* ajustado de forma anti-paralela com o campo magnético é o que corresponde ao maior nível energético e o *spin* ajustado paralelamente ao campo corresponde ao menor nível energético.



Fonte: Autoria própria.

Esta energia de interação entre $\vec{\mu}$ e $\vec{B}$ é dada pela equação 1.

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (1)$$

no qual $\vec{\mu}$ representa vetor momento dipolo magnético e $\vec{B}$ o vetor campo magnético e a diferença de energia entre os dois estados na presença do campo magnético é dada por

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

sendo γ a razão giromagnética que é intrínseca de cada núcleo e h a constante de Planck. O mesmo princípio é válido para outros núcleos magneticamente ativos como ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P ($I = 1/2$), entre outros.

Quando o núcleo está na ausência de um campo magnético externo, o momento dipolo magnético de *spin* se orienta aleatoriamente. Entretanto, quando submetido a um campo magnético externo, ele tende a se alinhar com o campo, rotacionando em torno de $\vec{B}_0$ (paralelo ao eixo z das coordenadas do laboratório) e mantendo constante o ângulo entre o campo magnético B_0 e o momento dipolo magnético no movimento chamado de precessão. A frequência de Larmor de rotação é proporcional ao campo magnético e a razão giromagnética γ (equação 3, Figura 10) [47–49].

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (3)$$

Logo, observando a Figura 10, pode-se visualizar que devido ao campo magnético aplicado, tem-se dois diferentes estados energéticos que precessam com frequência ω_0 . As densidades populacionais de estado dos *spins* variam de acordo com o aumento da frequência aplicada, seguindo a distribuição de Boltzmann (equação 4), no qual o estado quântico de menor energia será mais povoado.

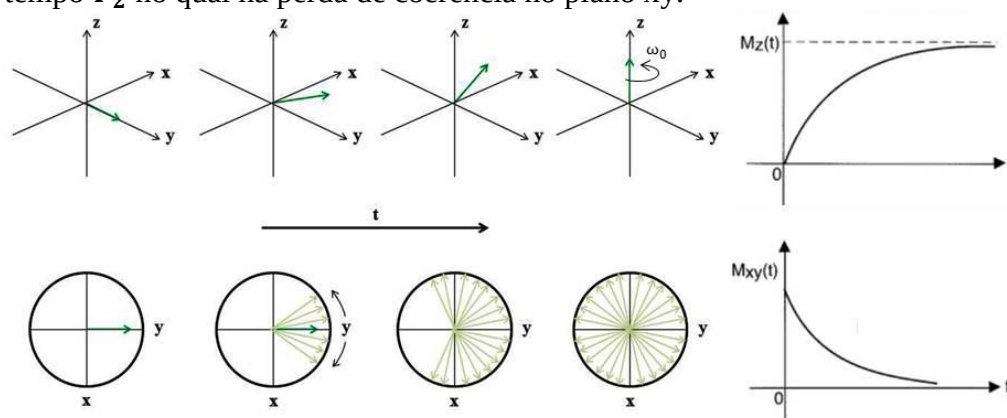
$$\frac{P_{m=-1/2}}{P_{m=1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (4)$$

sendo ΔE a diferença de energia entre os dois estados de *spin*, T a temperatura em Kelvin e k a constante de Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$).

Tratando-se de um número elevado de núcleos presentes em uma amostra, é conveniente analisar os núcleos de maneira macroscópica. Esta análise permite somar o momento dipolo magnético dos *spins* individualmente, obtendo um momento dipolo magnético total, ou seja, a magnetização macroscópica resultante que será denominada $\vec{M}$. A falta de coerência no movimento de precessão dos núcleos faz com que as projeções no plano xy sejam canceladas, e a magnetização resultante seja na direção de z. Assim, para o estado de equilíbrio termodinâmico na presença de um campo magnético B_0 , temos $|M_z| > 0$ e $M_x = M_y = 0$

Para perturbar a magnetização M_0 em z de modo a retirá-la do equilíbrio, um campo magnético oscilante B_1 perpendicular a B_0 é aplicado por meio de pulsos de rádio frequência (rf), com frequência de Larmor ω_0 . Quando o pulso é interrompido, a magnetização retorna para o equilíbrio de Boltzmann no eixo z através de processos de relaxação longitudinal (em z) e transversal (x e y) (Figura 11).

Figura 11: Processo de relaxação longitudinal (A) e transversal (B) da magnetização. Quando o pulso de radiofrequência é interrompido, a magnetização tende a voltar para o equilíbrio de Boltzmann no eixo z, durante o processo de relaxação longitudinal caracterizado pela constante de tempo T_1 o qual há perda de energia e no processo de relaxação transversal numa constante característica de tempo T_2 no qual há perda de coerência no plano xy.



Fonte: autoria própria

A relaxação longitudinal é caracterizada pelo realinhamento da magnetização no eixo z para recuperar o equilíbrio de Boltzmann original. Esta

envolve troca de energia com o meio (rede) e está associada à constante de tempo T_1 ou taxa de relaxação R_1 . Já a relaxação transversal está intrinsecamente associada ao desaparecimento da magnetização no plano xy devido a interações entre os dipolos magnéticos, fazendo com que a frequência de precessão dos *spins* nucleares perca a coerência de fase ao longo do tempo. Esta relaxação é caracterizada pela constante de tempo T_2 ou taxa de relaxação R_2 . A relaxação de núcleos com $I=1/2$ pode ocorrer por três principais mecanismos, sendo eles não homogeneidade do campo magnético, anisotropia (deslocamento químico e acoplamento escalar) e acoplamento dipolar. O acoplamento dipolar é bastante sensível à dinâmica da molécula e desempenha importante papel no caso de estudos estruturais de proteínas. Logo, analisando os parâmetros de relaxação pode-se obter informações em escalas de tempo de ps – ns referentes à dinâmica interna do vetor entre nitrogênio e hidrogênio (N-H) e difusão rotacional global da macromolécula, e movimentos lentos em escalas de tempo de μ s – ms, referentes a troca conformacional [48–50].

Os tempos de relaxação T_1 e T_2 , portanto, dependem do ambiente químico que os *spins* estão inseridos ao se reorganizar em solução. Por isso, experimentos para medir o tempo de relaxação são extremamente úteis para obter informações a respeito da dinâmica de moléculas em solução [48–51].

2.1.1. Deslocamento químico e acoplamento escalar J

Devido à blindagem do momento magnético provocada pela nuvem eletrônica, a frequência de ressonância dos núcleos é sensível ao seu microambiente químico. A presença do campo externo B_0 induz uma corrente elétrica ao redor do núcleo, gerando um dipolo magnético induzido (B^{ind}). Então, o núcleo estará sob ação de um campo magnético local (B^{loc}) o qual define o ambiente químico.

$$B^{loc} = B_0 + B^{ind} \quad (5)$$

O efeito do deslocamento químico é uma das propriedades mais importantes da ressonância magnética nuclear, pois diferencia os núcleos de acordo com a sua

identidade química. A frequência de evolução do *spin* no eixo *xy* dependerá do campo local (B^{loc}) seguindo a equação 3.

Além do deslocamento químico, outro importante fenômeno é o acoplamento escalar. Este fenômeno ocorre pela interação do momento magnético nuclear com os elétrons envolvidos em uma ligação química, ou seja, uma interação indireta entre dois *spins* que não se anula com a rotação da molécula, manifestando-se no espectro com a separação do sinal em multipletos. Uma ligação C-H em uma molécula, por exemplo, o *spin* do próton polariza o elétron do átomo de carbono, alterando seu campo magnético local. Uma vez que o *spin* do próton pode apresentar dois estados, o campo magnético local no carbono pode aumentar ou diminuir proporcionando desdobramento de picos mais e/ou menos intensos. A constante de acoplamento J corresponde à frequência de separação entre os multipletos e é especificada em Hertz. Para o etanol, o CH_2 apresenta $J_{CH} = 140,4 \text{ Hz}$ e o CH_3 apresenta $J_{CH} = 124,9 \text{ Hz}$.

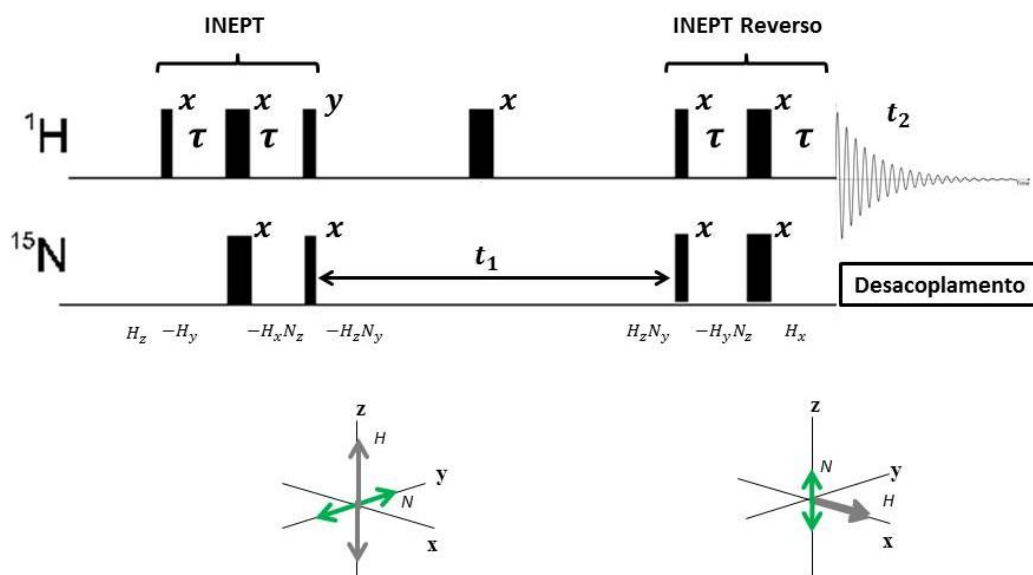
O fenômeno de acoplamento escalar é muito útil para estudar estrutura de pequenas e macromoléculas. Através de pulsos de rádio frequência específicos, a magnetização pode ser transferida entre os núcleos, como é o caso do experimento de *HSQC* utilizado neste trabalho para o estudo de proteínas. Uma breve introdução a respeito deste experimento será descrita na seção 2.1.2.

2.1.2. ^{15}N , ^1H -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

Os núcleos ^{13}C , ^{15}N e ^1H tem uma importância especial para o estudo de proteínas por RMN. Através da equação 2 pode-se notar que ΔE está relacionada com a razão giromagnética, que é intrínseca de cada núcleo. Portanto, diante da baixa sensibilidade que os núcleos de ^{13}C ($\gamma = 6,728 \cdot 10^7 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e ^{15}N ($\gamma = -2,713 \cdot 10^7 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$) apresentam, quando comparados com a do ^1H ($\gamma = 2,6752 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$), existem diversas sequências de pulsos específicos para se trabalhar com esses núcleos. O experimento de *HSQC* é o mais comumente utilizado para proteínas, consistindo basicamente da detecção indireta em ^1H através da transferência da magnetização do próton para heteronúcleo de estudo. Após um

tempo de evolução t_1 retorna-se a magnetização para o próton onde a coleta do FID é feita (Figura 12) [52].

Figura 12: Representação da sequência de pulsos para o experimento de ^{15}N , ^1H -HSQC. A magnetização dos núcleos H e N está, inicialmente, alinhada ao campo magnético em z (H_z , N_z). Um pulso de 90° é aplicado no próton na coordenada x, levando de H_z para $-H_y$. Após um tempo τ de evolução, aplica-se um novo pulso de 180° em H e N, levando as magnetizações para $-H_xN_z$. Finalizando este bloco, após o tempo de evolução τ o pulso de 90° em ambos os núcleos faz com que a magnetização do próton e nitrogênio seja $-H_zN_y$. O pulso de 180° no próton faz com que a magnetização seja refocada e somente a magnetização do nitrogênio evolua durante o tempo t_1 . Os pulsos de 90° em x leva a magnetização para H_yN_z seguido do pulso de 180° onde a magnetização do próton encontra-se em x e é então detectada.



Fonte: NMR Primer: An HSQC-based Approach - adaptado

A sequência pode ser dividida em 4 partes, sendo elas INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced Polarization Transfer*) que é o bloco responsável pela transferência da magnetização do ^1H para ^{15}N , período de evolução e marcação da magnetização com deslocamento químico do ^{15}N , INEPT reverso, transferindo a magnetização de volta para o ^1H e aquisição em ^1H . Então, o primeiro pulso de 90° em ^1H converte a magnetização H_z para $-H_y$. Posteriormente, o pulso de 180° aplicado em ambos nitrogênio e hidrogênio ao longo de x leva a magnetização para $-H_xN_z$. E para finalizar este bloco INEPT, um pulso de 90° simultâneo em H

e N é aplicado, a qual a magnetização do H estará agora anti-fase com N, como pode ser visto no diagrama na Figura 12B. Após, aplica-se um pulso de 180° a fim de a magnetização do ^{15}N em $-N_y$ e do ^1H em $-H_z$. Os pulsos de 180° no meio do INEPT são aplicados a fim de refocar a magnetização no eixo z. Após o tempo de evolução t_1 o primeiro pulso de 90° no INEPT reverso leva $-N_y$ para N_z e H_z para H_y . Posteriormente a magnetização desacoplada é detectada em x. Pode-se verificar no esquema da Figura 12B que ao final do INEPT reverso a magnetização de N encontra-se precessionando ao longo de z, enquanto que a magnetização do H encontra-se em fase ao longo do eixo x.

Como visto na seção 3.1.1 o acoplamento escalar J_{HN} ocasiona o desdobramento dos picos. Portanto, para cada resíduo de aminoácido de uma proteína (ligação HN com exceção da prolina) em um espectro bidimensional, teríamos 4 picos para cada resíduo de aminoácido. Ao utilizar uma sequência de pulsos como mostrado, o desacoplamento faz com que observemos um pico em um espectro bidimensional. Além disso, a transferência da magnetização para ser coletada no próton faz com que a sensibilidade seja maior, proporcionando uma razão sinal ruído maior [52].

2.1.3. ^{15}N , ^1H TROSY-HSQC (Transverse Relaxation – Optimized Spectroscopy)

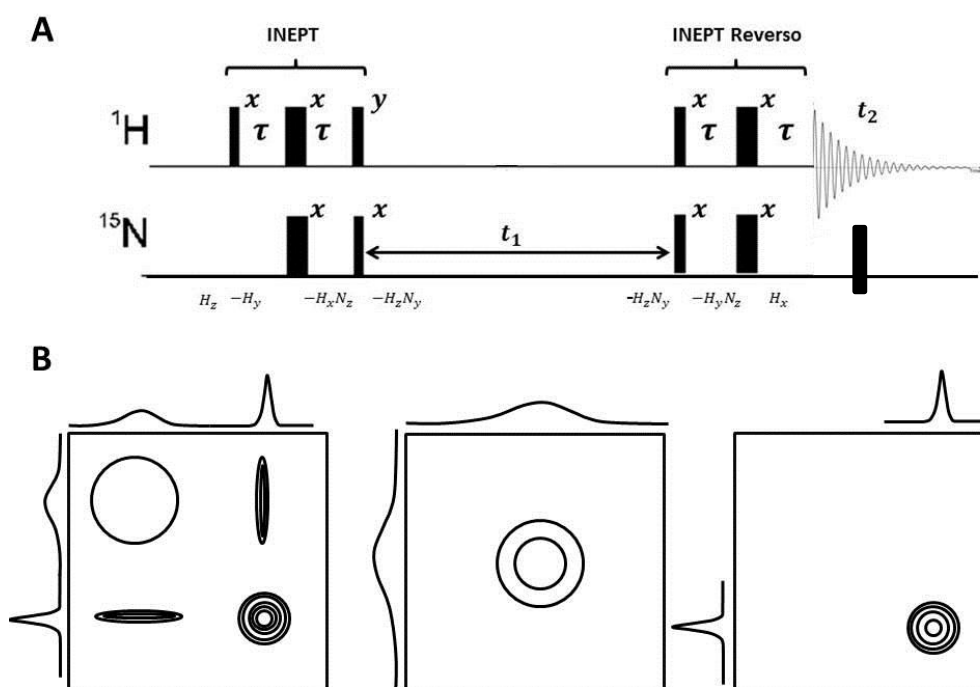
O experimento de TROSY é basicamente um HSQC com melhor sensibilidade para moléculas maiores. Como mencionado anteriormente, quando acoplado, o experimento de HSQC fornece 4 picos para cada NH amídico da proteína, os quais são provenientes do acoplamento escalar J. No experimento de TROSY, um único pico é selecionado durante o processo de aquisição do experimento, sendo este pico mais fino e intenso e com melhor resolução (Figura 13) [52,53].

O espectro de TROSY se justifica a partir da correlação cruzada entre os mecanismos que levam a relaxação de ^1H e ^{15}N na relaxação dos núcleos. No caso, para cada NH amídico tem-se um dubleto para o núcleo de ^{15}N e outro para o núcleo ^1H . Devido à correlação cruzada (fenômeno de interferência) entre o

mecanismo dipolar e a anisotropia do deslocamento químico do ^{15}N , cada componente do dubleto apresenta relaxação diferente, onde os componentes com linhas finas apresentam taxa de relaxação R_2 baixa e as linhas alargadas, R_2 alto. Então, a sequência de pulso de TROSY seleciona o componente fino de correlação no núcleo de ^1H e no núcleo de ^{15}N (Figura 13B).

Como este componente fino apresenta menor valor de R_2 , ele é adequado para as transferências de magnetização de sequências de tripla-ressonância e ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY. A aplicação do TROSY em sequências de pulsos de tripla ressonância para o assinalamento de proteínas com massa molecular ≥ 20 kDa permitiu trabalhar com macromoléculas maiores em RMN. Utilizaremos este método para estudar a proteína Grb2 inteira.

Figura 13: Esquema representando o experimento de TROSY-HSQC. A) A sequência de pulsos do TROSY, assim como no HSQC, é composta por INEPT e INEPT reverso que são separados por um tempo de evolução t_1 . Ao final da sequência de pulsos não há o desacoplamento, o que ocasiona os 4 picos (B). Os picos mais alargados são provenientes de R_2 alto, e os picos mais finos de R_2 baixo. Então, o pico mais fino é selecionado durante o processo de aquisição do experimento.



Fonte: NMR Primer: An HSQC-based Approach e Glenn Facey - University of Ottawa NMR facility blog – adaptado

2.1.4. $\{^1\text{H}\} - ^{15}\text{N}$ NOE (Nuclear Overhauser Effect)

O experimento de NOE heteronuclear (hNOE) consiste em aplicar pulsos de rádio frequência de maneira que os prótons amídicos se tornem saturados e com estados quânticos de *spin* igualmente povoados. Através do processo de saturação, a magnetização do ^1H é transferida para o ^{15}N diretamente ligado devido ao forte acoplamento dipolar (NOE). Consequentemente, a população de *spin* do ^{15}N ligado aos prótons também é saturada através do NOE heteronuclear, até alcançar o estado estacionário, onde a magnetização no eixo z será decaída. Para verificar esse efeito, outro espectro é realizado, porém com sem a saturação. Posteriormente, para se analisar o NOE, faz-se a razão entre os experimentos saturado e não saturado, e os resíduos de aminoácidos que apresentam maior flexibilidade NH terão $\text{hNOE} \leq 0,6$ [54].

2.2. Espectroscopia de fluorescência

O fenômeno de luminescência define-se pela emissão de luz por substâncias que se encontram em estados excitados. Por apresentar uma dependência com a natureza do estado excitado do elétron, a luminescência é dividida em fosforescência e fluorescência [55] (Figura 14).

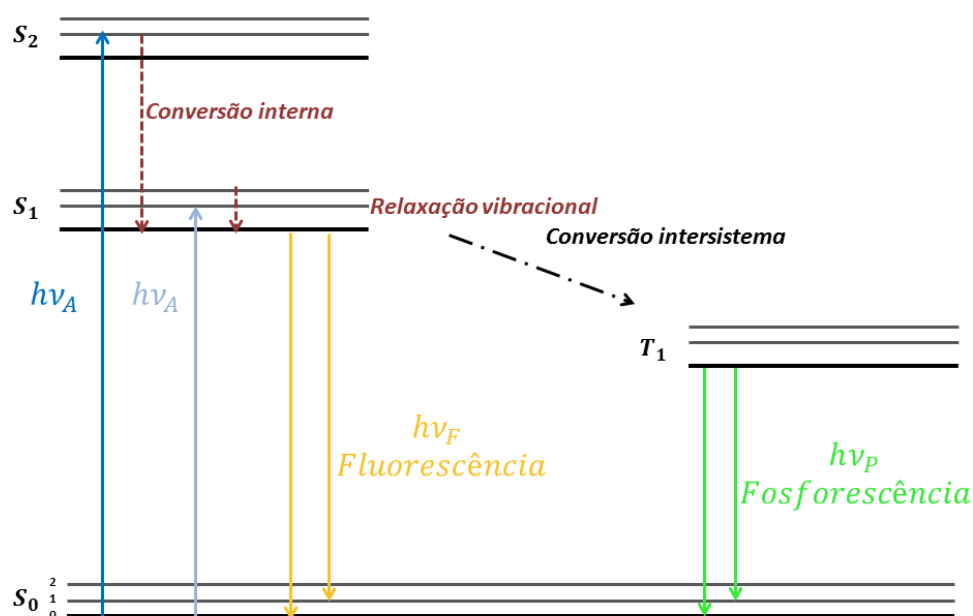
A fosforescência é o fenômeno de emissão de luz a partir de um estado eletronicamente excitado, onde o elétron excitado inverte a orientação do *spin* tornando-se emparelhado (estado excitado tripleto) com o elétron que permaneceu no orbital fundamental. Uma vez que transições para o estado fundamental entre spins emparelhados são proibidas, as taxas de emissão são mais lentas, entre 10^3 e 10^0 s^{-1} . Sendo assim, o tempo de vida da fosforescência é da ordem de milissegundos a segundos [55].

A fluorescência é caracterizada pela emissão de radiação devido à perda de energia de uma molécula que se encontrava em um estado energético excitado singleto e retorna para o estado fundamental [55,56]. No estado excitado singleto não ocorre mudança na orientação do *spin*, o qual o retorno para o estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente com a emissão de um fóton. A taxa de emissão de fluorescência é da ordem de 10^8 s^{-1} e o tempo de vida de

fluorescência da ordem de 10^{-9} s [55]. O fenômeno de fluorescência foi primeiramente observado por Sir G. G. Stokes em 1852 (Universidade de Cambridge) que visualizou a emissão de radiação do fluoróforo quinina presente na água tônica. As moléculas aromáticas denominadas fluoróforos compõem um grupo químico fluorescente quando perturbado por radiação em determinados comprimentos de onda.

A fluorescência é largamente utilizada no estudo de propriedades biofísicas de proteínas. Essas moléculas são divididas em duas classes, fluoróforos intrínsecos e extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos são o triptofano, a tirosina e a fenilalanina que são encontrados nas proteínas. Já os fluoróforos extrínsecos, como a família das sondas cianinas, são adicionados à amostra e são também denominados de biomarcadores [55].

Figura 14: Representação do diagrama de Perrin-Jablonski no qual pode-se visualizar as transições eletrônicas acessíveis S_1 , S_2 , após a absorção de um fóton e os processos de emissão fluorescente no processo de retorno ao estado fundamental S_0 .



Fonte: Lakowicks, 2006 – adaptado.

Quando uma molécula absorve radiação eletromagnética na forma de fóton, um elétron é promovido de um estado energético fundamental S_0 para estados excitados S_1 , S_2 e posteriormente, retorna ao estado de menor energia através de alguns mecanismos como conversão interna, relaxação vibracional, conversão intersistema e fluorescência e fosforescência que inclui a emissão de luz. Estes mecanismos podem ser visualizados na Figura 14 [55,56].

O diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 14) descreve os processos que ocorrem entre a absorção e emissão de luz. Uma vez que houve a absorção de luz, o fluoróforo pode acessar níveis vibracionais mais altos dos seus estados singletos S_1 e S_2 e alguns processos ocorrem até que eles retornem ao estado fundamental. A conversão interna de energia, por exemplo, é um tipo de transição não radiativa e ocorre quando algumas moléculas acessam estados vibracionais S_2 e relaxam rapidamente para o estado vibracional de menor energia S_1 . Este processo ocorre em aproximadamente 10^{-12} segundos ou menos, sendo completado antes da emissão [55]. Outro processo é a conversão intersistema, que é uma transição não radiativa de um estado eletrônico S_1 para o estado tripleto T_1 .

2.2.1. Determinação da constante de associação

O processo de supressão da fluorescência (em inglês *quenching*) é aquele pelo qual ocorre a diminuição da intensidade de fluorescência de uma molécula [56]. Diversos tipos de interações moleculares podem ocasionar a supressão, dentre elas estão às reações de estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexos no estado fundamental e supressão colisional ou dinâmica [55]. Neste trabalho a supressão de fluorescência foi analisada na interação proteína-ligante.

Assumindo um sistema de dois estados, temos:



sendo P_f a proteína livre, L_f o ligante livre e L_nP é o complexo proteína-ligante formado, o qual terá uma constante de associação (K_b) dada por:

$$K_b = \frac{[L_n P]}{[P_f][L_f]^n} \quad (7)$$

o qual $[P_f]$ é a concentração de proteína livre, L_f a concentração de ligante livre e $[L_n P]$ a concentração do novo complexo formado e n o número de ligantes por proteína.

Se a concentração total de proteína no sistema é $[P_t] = [P_f] + [P_b]$ então substituindo a relação na equação 7 teremos:

$$K_b = \frac{[P_t] - [P_f]}{[P_f][L_f]^n} \quad (8)$$

Dividindo ambos os lados da equação por $[P_t]$, considerando ainda que a concentração de proteína livre é proporcional à intensidade de fluorescência F e a concentração de proteína total proporcional à intensidade de fluorescência inicial do sistema, de tal forma que $\frac{P_f}{P_t} = \frac{F}{F_0}$, tem-se então:

$$K_b [L_f]^n = \frac{F_0 - F}{F} \quad (9)$$

Uma vez que $[L_t] \sim [L_f] = [L]$, tem-se:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log(K_b) + n \log([L]) \quad (10)$$

sendo F_0 e F as intensidades de fluorescência antes e após a adição de ligante, K_b a constante de associação, n o número de ligantes por proteína e $[L]$ a concentração de ligante total [57,58].

2.2.2. A termodinâmica da interação proteína-ligante

Para manter o funcionamento do corpo, as macromoléculas biologicamente relevantes, como proteínas, não atuam de maneira isolada. Elas estão envolvidas em inúmeras interações com proteínas, ácidos nucleicos, membranas, ligantes e outros através de interações com elevado grau de especificidade. Essas interações exibem contribuição tanto entálpica (ΔH) quanto entrópica (ΔS) e, como qualquer processo espontâneo, a ligação ocorre somente quando está associada à energia livre de Gibbs negativa ($\Delta G < 0$) a qual é dada por

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (11)$$

Ou em função da constante de ligação K_b como

$$\Delta G = -RT\ln(K_b) \quad (12)$$

sendo R a constante universal dos gases, T é a temperatura e K_b é a constante de ligação.

Para sistemas nos quais a variação de entalpia não é significativa, a equação de van't Hoff pode ser aplicada [59]

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

Ambas as contribuições entálpicas e entrópicas estão associadas a mudanças conformacionais. As entálpicas envolvendo quebra ou formação de interações não-covalentes entre os átomos da proteína e entre solvente e proteína. As entrópicas devido a alterações dinâmicas da cadeia principal e laterais da proteína e organização do solvente, principalmente quando envolve interação deste com superfícies hidrofóbicas. A contribuição entrópica é dominante em muitas interações proteína-ligante onde moléculas de água são liberadas de cavidades hidrofóbicas [59]. Em proteínas, interações hidrofóbicas ocorrem tipicamente entre aminoácidos como leucina, isoleucina, alanina, valina e fenilalanina [5].

3. Objetivos gerais

A proposta deste trabalho é estudar a dinâmica estrutural de Grb2 e Grb2-SH2 por ressonância magnética nuclear e verificar a interação de Grb2-SH2 com cumarina. Estes estudos possibilitarão o melhor entendimento do papel da dinâmica da Grb2 no reconhecimento molecular dos diferentes alvos moleculares, bem como a termodinâmica envolvida na interação com cumarina. Para isso, serão abordadas a dinâmica do domínio Grb2-SH2 isolado e sua interação com ligante, o comportamento do domínio Grb2-SH2 na proteína Grb2 inteira, a termodinâmica da interação Grb2-SH2-ligante.

3.1. Objetivos específicos

- Expressar e purificar Grb2-SH2 em meio LB;
- Expressar e purificar ^2H , ^{15}N -Grb2 e seu domínio ^{15}N , ^{13}C -Grb2-SH2;
- Assinalar as ressonâncias da Grb2;
- Assinalar as ressonâncias do domínio Grb2-SH2;
- Medir os parâmetros de relaxação R_1 , R_2 de Grb2;
- Medir os parâmetros de relaxação R_1 , R_2 e hNOE do domínio Grb2-SH2;
- Mapear a interação entre o domínio Grb2-SH2 e cumarina;
- Obter os parâmetros termodinâmicos da interação Grb2-SH2 e cumarina por supressão de fluorescência.

4. Metodologia

4.1. Transformação dos plasmídeos recombinantes em células de *Escherichia coli* linhagem DH5 α

Os plasmídeos recombinantes (vetor pET 33), que contém os genes que codificam a proteína Grb2 e o domínio Grb2-SH2, foram gentilmente cedidos pelo professor John Edward Ladbury (University of Leeds, United Kingdom).

Para aumentar a quantidade dos plasmídeos recombinantes, estes foram transformados em *Escherichia coli* DH5 α quimicamente competentes de acordo com o protocolo descrito no Anexo I. Incubou-se 3 μL (150 ng) de plasmídeo com células competentes durante 30 minutos em gelo. Posteriormente realizou choque térmico a 42 °C por 30 segundos e em seguida em gelo por 2 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 300 μL de meio de cultura líquido LB (L3022 Sigma-Aldrich) e incubou-se por uma hora a 37 °C sob agitação de 90 RPM. Logo após, a cultura foi centrifugada por 1 minuto a 10.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 20 μL de meio LB, os quais foram adicionados à placa contendo meio LB sólido e antibiótico. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C. Posteriormente, as colônias foram selecionadas e os plasmídeos purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Anexo II).

4.2. Transformação em células *E. coli* linhagem BL21 (DE3)

Para que ocorra a expressão da proteína, os plasmídeos necessitam ser inseridos em bactérias que possuam uma maquinaria específica de expressão. Por isso, os plasmídeos recombinantes foram transformados em células BL21 (DE3) quimicamente competentes de maneira equivalente ao item 4.1.

Em seguida, as colônias foram selecionadas e crescidas em 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de Canamicina e incubados *overnight* a 100 RPM a 37 °C. Foram armazenadas alíquotas de 1 mL com 50% de glicerol em -80 °C.

4.3. Expressão do domínio Grb2-SH2

Primeiramente, 1 mL do pré inóculo mencionado no item 4.2 foi adicionado a 50 mL de meio líquido LB com antibiótico de resistência e mantido sob agitação de 100 RPM a 37 °C *overnight*. Adicionou 5 mL desta cultura de bactérias em 200 mL de pré meio mínimo M9 (0,1 mM CaCl₂, 1 g/L de NH₄Cl, 0,2 mM de MgSO₄, 10 mM Cloreto de Ferro (III), coquetel vitamínico (1 mg/L Biotina, 1mg/L Cloreto de Colina, 1 mg/L Ácido Fólico, 1 mg/L Nicotinamida, 1 mg/L Ácido D-Pantotênico, 1 mg/L Hidrocloreto Piridoxal, 0,1 mg/L Riboflavina), 2-3 g/L C₆H₁₂O₆, solução TS2 com íons metálicos (ZnSO₄, MnCl₂, H₃BO₃, CaCl₂, NiCl₂, CuCl₂, Na₂MoO₄, Na₂SeO₃) e antibióticos), estando com Densidade Óptica (DO) de 0,2. Então, incubou-se sob agitação de 100 RPM a 37 °C até atingir DO₆₀₀ = 0,7-1,0. Centrifugou-se à 5.300xg, 20 °C durante 20 min. O *pellet* foi ressuspenso em 1 L de meio mínimo M9 enriquecido com ¹⁵NH₄Cl para Grb2, e ¹⁵NH₄Cl e ¹³C₆H₁₂O₆ para o domínio SH2. Manteve sob agitação 100 RPM a 37 °C até atingir DO₆₀₀ = 0,6. Atingida a DO₆₀₀, a temperatura foi diminuída para 20 °C e a cultura com bactérias foi induzida utilizando 0,4 mM de IPTG, permanecendo incubada em 100 RPM *overnight* por 17 h. A seguir, a suspensão foi submetida à centrifugação a 3.500xg em 4 °C por 40 minutos. Então, as células foram incubadas com tampão Tris-HCl (50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl, 2 mM PMSF) e após 30 minutos a amostra foi submetida à lise celular através da sonicação pulsada em 10 ciclos (2 segundos *ON* e 1 segundo *OFF*). O extrato foi

coletado por centrifugação a 35.000xg a 10 °C por 1 h e 30 min. O sobrenadante foi filtrado em 0,45 µm Minisart®.

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

4.4. Expressão da proteína ^{15}N -Grb2 em D_2O

Para a expressão da proteína Grb2 em D_2O , utilizou-se 5 mL de pré-inóculo que ficou sob agitação 120 RPM *overnight* a temperatura de 37 °C. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 4000xg em temperatura ambiente por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 25 mL de meio mínimo M9 não marcado (descrito em 4.3) com DO_{600} inicial de 0,1. A cultura foi submetida à agitação de 120 RPM em 37 °C por 11 h. Posteriormente centrifugou a 4000xg em 20 °C por 15 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 100 mL de meio mínimo M9 contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e água deuterada (D_2O). Em seguida a cultura com DO_{600} inicial de 0,1 ficou sob agitação de 120 RPM em 30 °C por 12 h até atingir $\text{DO}_{600}=0,5$. Após esse período a cultura foi diluída para 200 mL de meio mínimo M9 contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e D_2O ($\text{DO}_{600}=0,1$) e submetida a agitação de 120 RPM em 37 °C por 3 h até atingir $\text{DO}_{600}=0,5$. Neste momento a cultura foi diluída para 1 L de meio mínimo M9 contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e D_2O , com inicial de $\text{DO}_{600}=0,1$. Após 12 h a temperatura foi diminuída para 20 °C e a cultura foi induzida com 0,4 mM de IPTG. Após 42 h a cultura foi centrifugada a 3500xg a 20 °C por 30 minutos. O *pellet* foi submetido a processo de lise celular como descrito em 4.3.

4.5. Purificação da proteína Grb2 e domínio Grb2-SH2

Utilizou o sistema de purificação manual com resina *IMAC HiTrap HP* previamente carregada com cobalto. Esta foi lavada com água destilada e equilibrada com tampão (50 mM de Tris-HCl pH 8,0 com 100 mM de NaCl). Em sequência, a fração solúvel foi aplicada à coluna seguida por lavagem com 5 mM de imidazol para retirar as interações inespecíficas. Posteriormente, foram realizadas lavagens com gradiente variando de 10 até 500 mM de imidazol, sendo

que a proteína foi eluída com 200 mM. Concentrou-se a amostra com as frações retiradas do processo de purificação por afinidade e realizou-se a purificação por gel filtração (exclusão molecular) utilizando a coluna *Sephacryl 100* (GE Life Science) para retirada de contaminantes bem como a troca de solução tampão da amostra. Utilizou-se tampão com 20 mM de NaPi pH 7,0 contendo 200 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), e 5 mM de azida. A pureza da amostra após a purificação foi verificada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 20% para o domínio Grb2-SH2 e 15% para a proteína Grb2.

4.6. Espectroscopia de absorção UV-Vis

A fim de obter a concentração da proteína Grb2, do domínio SH2 e da cumarina, efetuaram-se medidas de absorção UV-Vis em espectrofotômetro *Thermo Scientific BIOMATE UV-Visible*.

As medidas foram feitas utilizando a faixa de leitura de 220 a 500 nm em temperatura ambiente com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico. Para o cálculo das concentrações fez-se a subtração do espectro da linha de base do tampão e utilizou o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280} = 38055 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a proteína Grb2, $\epsilon_{280} = 13980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o domínio SH2 [60]. A cumarina foi diluída em etanol e a concentração foi medida utilizando $\epsilon_{277} = 11438 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [61].

4.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram adquiridos nos espectrômetros Bruker Avance III 800 e Bruker Avance III HD 900 MHz (CNRMN, UFRJ) e Avance III HD 600 MHz (CMIB, UNESP) usando sondas de tripla ressonância e amplificadores de quatro canais de gradiente. O espectrômetro 600 MHz está equipado com sonda criogênica, o que permite estudos de proteínas em concentrações mais baixas.

Os parâmetros de relaxação R_2 e R_1 para a proteína Grb2 foram adquiridos com 268 μM de ^{15}N , ^2H -Grb2 utilizando a abordagem de tempo constante, no qual

um tempo de relaxação via CPMG (R_2) ou recuperação de saturação (R_1) é definido (T). As sequências de pulsos empregadas usam transferência de polarização $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ via TROSY. Para cada experimento, dois espectros são adquiridos, um de referência ($T=0$ ou próximo de zero) e outro com T suficiente para que aproximadamente 50% da magnetização seja perdida via relaxação. Um espectro de referência é adquirido a $T = 0$, o qual fornecerá os valores de intensidade I_0 . As intensidades serão convertidas em R_2 efetivo (R_2^{eff}) usando a seguinte equação:

$$R_{1\text{ ou }2}^{\text{eff}} = -\frac{1}{T - T_0} \ln \frac{I}{I_0} \quad (14)$$

Para a proteína Grb2 utilizou-se os tempos $T_0 = 10$ e $T = 600$ ms para as medidas de R_1 e $T_0 = 0$ ms e $T = 16,96$ ms para as medidas de R_2 .

O erro experimental foi calculado a partir da razão sinal/ruído para cada pico do espectro com tempo constante de relaxação T , utilizando a equação 7:

$$\Delta R_{1\text{ ou }2}^{\text{eff}} = \frac{1}{T - T_0} \frac{\text{Ruido}}{\text{Sinal}} \quad (15)$$

A relação dos experimentos adquiridos encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3: Relação dos experimentos realizados para medidas dos parâmetros de relaxação R_2 e R_1 da proteína Grb2. Experimentos realizados em 25 °C com 102 μM e 268 μM Grb2 em 600 e 900 MHz respectivamente.

Experimento	Número de scan	Matriz de dados	Referência
TROSY	4	1024 x 140	[62]
TROSY R_2	128	2048 x 140	[63]
TROSY R_1	96	2048 x 140	[63]

As medidas dos parâmetros de relaxação para a proteína Grb2 foram realizadas em duas condições experimentais: 1) 102 μM Grb2, em tampão 20 mM NaPi pH 7,0 contendo 200 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, e 5 mM de azida; as medidas dos parâmetros de relaxação para esta condição foram realizadas em 600 MHz. Para aumentar a solubilidade da proteína utilizou-se adição de arginina e ácido glutâmico [64], tendo a condição 2) 268 μM Grb2, em

tampão 20 mM NaPi pH 7,0 contendo 200 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, e 5 mM de azida; as medidas dos parâmetros de relaxação para esta condição foram realizadas em 900 MHz. Para ambas condições experimentais foram utilizados experimentos como descrito na tabela 3.

Os parâmetros de relaxação do domínio SH2 (R_1 , R_2 e hNOE) foram medidos pelos experimentos de HSQC (Tabela 4) utilizando 93 μM ^{15}N -SH2 em pH 7. Para as medidas de R_1 , os tempos T de relaxação utilizados foram: 20 ms, 100 ms, 250 ms 500 ms, 750 ms, 1000 ms, Para as medidas de R_2 , os tempos T de relaxação utilizados foram: 16,96 ms, 101,76 ms, 33,92 ms, 135,68 ms, 50,88 ms e 67,84 ms. As medidas de $\{^1\text{H}\} - ^{15}\text{N}$ NOE heteronuclear foram analisadas a partir da razão entre as intensidades do espectro saturado e não saturado. O erro experimental foi calculado a partir da razão sinal/ruído (para cada pico) do espectro que mais se aproxima de 50 % da relaxação, utilizando a equação 15.

Tabela 4: Relação dos experimentos realizados para medidas dos parâmetros de relaxação R_2 , R_1 e hNOE do domínio Grb2-SH2 e HSQC para as titulações de cumarina. Experimentos realizados em 900 MHz, 25 °C com 93 μM SH2 isotopicamente marcada com ^{15}N e ^{13}C .

Experimento	Número de scan	Matriz de dados	Referência
^{15}N , ^1H -HSQC	2	1024 x 400	[65]
^{15}N , ^1H -HSQC R_2	32	1024 x 90	[66]
^{15}N , ^1H -HSQC R_1	24	1024 x 90	[66]
^{15}N , ^1H -HSQC hNOE	56	1024 x 180	[66]
^1H , ^{15}N -HSQC (titulações)	16	1024 x 200	[65]

A determinação das estruturas tridimensionais do domínio SH2 no estado fundamental foi realizada com base em experimentos de RMN bidimensionais e tridimensionais (Tabela 5) (3D HNCO, 3D HNCACB, 3D HCcH-TOCSY, 3D hCCH-TOCSY, 3D CC(CO)NH, 3D CBCA(CO)NH, 3D HBHA(CO)NH, 3D HN(CA)CO), que possibilitaram o assinalamento sem ambiguidades baseados nos

deslocamentos químicos de ^1H , ^{15}N e ^{13}C do domínio SH2. A estrutura secundária bem como os ângulos diedros ϕ e ψ foram obtidos através dos deslocamentos químicos de HN, N, C α , C β e H α comparados com a biblioteca de estruturas através do TalosN [67].

Tabela 5: Relação de experimentos 3D para o assinalamento completo do domínio SH2 em pH 7. Experimentos realizados em 700, 800 e 900 MHz, 25 °C com 300 μM SH2 isotopicamente marcada com ^{15}N e ^{13}C .

Experimento	Frequência (MHz)	Scan	Matriz de dados	Referência
HNCO	700	8	1024 x 80 x 140	[68]
HNCACB	700	64	1024 x 80 x 140	[69]
HCcH-TOCSY	800	8	1024 x 160 x 160	[70]
hCCH-TOCSY	800	8	1024 x 140 x 140	[70]
CC(CO)NH	800	64	1024 x 80 x 140	[71]
CBCA(CO)NH	800	16	1024 x 70 x 140	[72]
HBHA(CO)NH	800	16	1024 x 64 x 130	[72]
^{13}C -NOESY-HSQC (aromáticos)	900	32	1024 x 80 x 184	[65]
^{13}C -NOESY-HSQC	900	32	1024 x 70 x 180	[65]
^{15}N -NOESY-HSQC	900	32	1024 x 70 x 180	[65]

Todos os espectros obtidos foram processados utilizando software NMRDraw e NMRPipe que se encontram na máquina virtual NMRbox [73].

4.8. Titulação de Cumarina em SH2 por RMN

Para mapear a interação entre Grb2-SH2 e cumarina utilizou-se da alta sensibilidade que os *spin* nucleares apresentam em relação a mudanças em seus ambientes químicos. Seguindo perturbações nos deslocamentos químicos (CSP – *Chemical Shift Perturbation*) dos núcleos após a adição de ligante, pôde-se verificar o sítio de interação bem como mudanças conformacionais induzidas na proteína a partir da interação com cumarina. Foram feitas titulações de cumarina em Grb2-SH2 e a partir de espectros 2D ^{15}N , ^1H -HSQC foi possível seguir essas mudanças nos deslocamentos químicos e nas intensidades das amidas dos resíduos quando adicionava-se ligante ao sistema. As perturbações nos deslocamentos químicos foram analisadas a partir da equação 18 [74].

$$\Delta\delta_{NH} = \sqrt{\frac{1}{2} \left[\Delta\delta_H^2 + \left(\frac{\Delta\delta_N}{10} \right)^2 \right]} \quad (18)$$

no qual $\Delta\delta_H$ e $\Delta\delta_N$ são as diferenças de deslocamentos químicos do ^1H e ^{15}N , respectivamente. As diluições da proteína à medida que o ligante era adicionado bem como a concentração de cumarina encontram-se na Tabela 6.

A cumarina foi diluída em etanol e a concentração foi determinada por espectroscopia UV-Vis (seção 4.6).

Tabela 6: Experimentos de titulação de cumarina em ^{15}N -SH2. Encontram-se na tabela, o volume de cumarina adicionada a cada titulação (ΔV), a concentração de cumarina e de Grb2-SH2, volume total no sistema a cada titulação.

ΔV (μL)	[cumarina] (μM)	[^{15}N -SH2] (μM)	Volume total (μL)
0,0	0,0	77,8	550,0
3,3	19,7	77,3	553,3
3,3	39,1	76,4	556,6
3,3	58,3	75,0	559,9
3,3	77,3	73,3	563,2
6,6	114,7	70,7	569,8
6,6	151,1	67,5	576,4
13,2	221,6	62,9	589,6
13,2	289,1	57,5	602,8
26,4	415,4	50,2	629,2

4.9. Cálculo da Estrutura em Solução

A estrutura do Grb2-SH2 foi calculada utilizando o software *chemical-shift* – Rosetta (cs-rosetta versão 3.7), uma ferramenta robusta para obtenção de estruturas proteicas [75]. O cs-rosetta faz uso de uma biblioteca de fragmentos que são obtidos a partir de estruturas do *Protein Data Bank* juntamente dos deslocamentos químicos teóricos calculados utilizando o programa SPARTA [76]. A seleção dos fragmentos é feita por homologia e semelhança com os deslocamentos químicos de ^{13}C , ^{15}N e ^1H obtidos experimentalmente (dados depositados no *Biological Magnetic Resonance Data Bank* – BMRBId.: 27781). A partir da sub-biblioteca criada, utiliza-se o método de Monte Carlo para se montar a estrutura e métodos de mecânica molecular para a minimização da energia do modelo. Utiliza-se do funil de convergência, que consiste em um gráfico que correlaciona o RMSD de todos os modelos calculados em relação à estrutura de menor energia em função do *score* de energia de cada molécula obtida. Os cálculos foram feitos utilizando o Rosetta v. 3.7 instalado no NMRBOX [73]. A

sub-biblioteca de fragmentos foi criada utilizando o servidor <https://spin.niddk.nih.gov/bax/nmrserver/csrosetta> à partir dos dados de deslocamento químico da cadeia principal do Grb2-SH2. E as bibliotecas de fragmentos criadas foram de tripeptídeos e nonapeptídeos, selecionados por homologia e por deslocamento químico.

4.10. Espectroscopia de Fluorescência

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados em espectrofluorímetro ISS PC1 – Champaign II, USA com banho térmico Nestlab RTE-221 – *Thermo Electron Corporation, USA*. Utilizou cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. O comprimento de onda para excitação dos triptofanos do domínio Grb2-SH2 foi de 290 nm e a faixa de comprimento de onda para coleta dos espectros de emissão de 300 a 500 nm.

As medidas foram feitas em temperaturas de 291, 295 e 299 K utilizando 2 μ M de Grb2-SH2. Foram feitas titulações de 2 μ L de cumarina, variaram de 0 a 208 μ M a concentração.

5. Resultados e discussões

5.1. Parâmetros físico-químicos das proteínas através do servidor *online*

Utilizou-se a ferramenta *online ProtParam* [60] para obter as informações físico-químicas teóricas da proteína através de sua sequência de resíduos de aminoácidos. Alguns destes parâmetros encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros físico-químicos teóricos da proteína adaptadora Grb2 obtidos através da ferramenta *online ProtParam*.

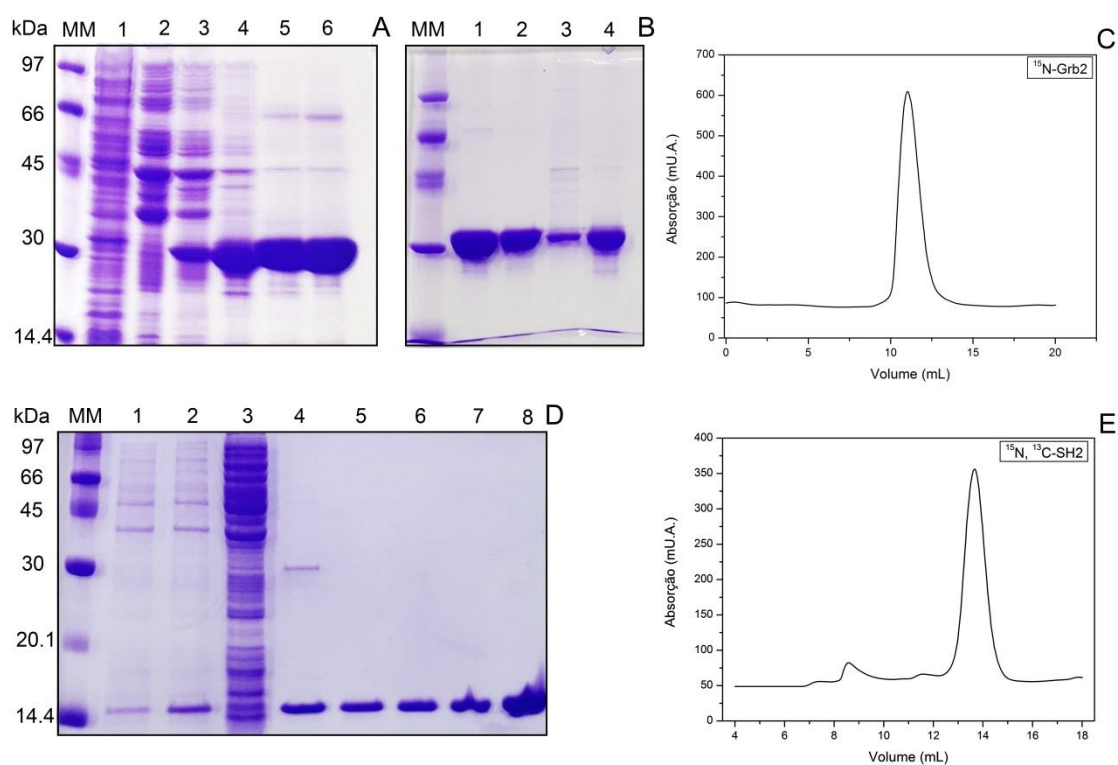
PARÂMETROS FÍSICO QUÍMICOS	Grb2	Grb2-SH2
Nº de resíduos de aminoácidos	217	106
Massa molecular (kDa)	25,2	12,4
Ponto isoelétrico	5,89	9,63
Coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$)	38.055	13.980

Os parâmetros obtidos foram fundamentais para orientar a estratégia de purificação, preparo dos tampões, bem como todos os procedimentos realizados neste trabalho.

5.2. Purificação da proteína Grb2 e do domínio Grb2-SH2

Os resultados da purificação da proteína ^{15}N -Grb2 e do domínio ^{15}N , ^{13}C -SH2 podem ser visualizados através do SDS-PAGE (Figura 15). Estes resultados mostram que as proteínas foram purificadas com elevado grau de pureza, como pode ser visto nos géis de poliacrilamida (faixa 2) na Figura 15B e faixas 6 a 8 na Figura 15D. Este grau de purificação permitiu realizar os experimentos biofísicos e estruturais propostos de forma adequada, com concentrações da ordem de 268 μM da proteína Grb2 e da ordem de 300 μM do domínio Grb2-SH2.

Figura 15: Purificação da proteína Grb2 e do domínio Grb2-SH2. A) 15% SDS-PAGE corado com azul de *coomassie* referente à purificação por afinidade a Cobalto da proteína Grb2. 1) *Flow through*; 2) 10 mM; 3) 80 mM; 4) 100 mM; 5 e 6) 200 mM de imidazol. B) De 1 a 4 referem-se à purificação por gel filtração com eluição em tampão 20 mM de NaPi pH 7 com 200 mM NaCl. C) Cromatograma referente à purificação por gel filtração em AKTA Purifier coluna *Sephacryl 100*. D) 20% SDS-PAGE referente a expressão e purificação do domínio Grb2-SH2; 1) Cultura de bactérias antes da indução com IPTG; 2) Após a indução; 3) *Flow through*; 4) 100 mM de imidazol; 5) 200 mM de imidazol; 6 a 8) os poços de 1 a 4 referem-se a purificação por gel filtração com eluições em tampão 20 mM de NaPi pH 7 com 200 mM NaCl. E) Cromatograma referente à purificação por gel filtração em AKTA Purifier coluna *Sephacryl 100*.



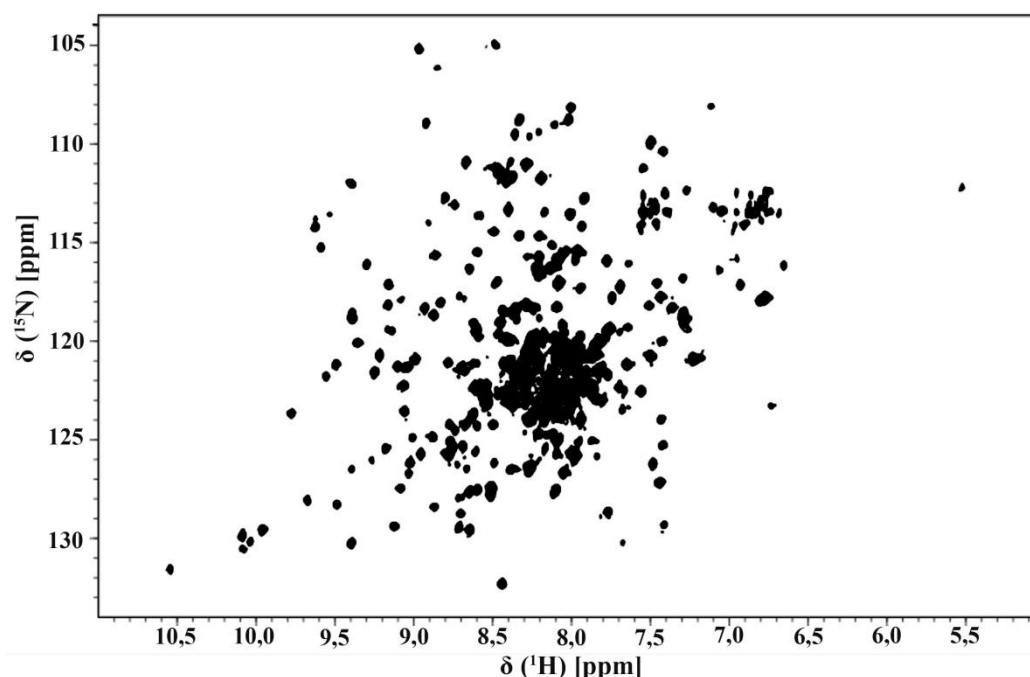
5.3. Informações estruturais de Grb2

Foram feitos experimentos de ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC da proteína Grb2 crescida em meio de cultura contendo ~99 % de D_2O . Desta forma a proteína fica isotopicamente marcada com ^2H (~70 %) e ^{15}N (~99%), o qual pode-se observar através do espectro apresentado (Figura 16). A contagem do número de picos revela o esperado de acordo com a sequência primária da proteína Grb2 (217 resíduos de aminoácidos), mostrando dispersão de deslocamento químico

característico de uma proteína com estrutura secundária e terciária definidas (5 ppm em ^1H e 30 ppm em ^{15}N) [77]. As diferenças nas intensidades referem-se ao alargamento de linha provocado pela dinâmica da proteína, o qual a largura da linha é diretamente proporcional a taxa de relaxação R_2 (largura a meia altura da banda $LW=R_2/\pi$). A dinâmica térmica de Grb2, com movimentos rotacionais global e interno da ordem de ps a ns, contribui para R_2 o qual quanto maior a molécula, maior o valor de R_2 e conseqüentemente mais alargada a linha espectral. Além disso, trocas conformacionais da ordem de μs a ms também contribuem para o alargamento dos sinais de ressonância.

A intensidade proporciona importantes informações a respeito da dinâmica local e até mesmo da presença de troca conformacional de Grb2, o que pode ser comparado com o que foi reportado por Yuzawa e colaboradores [22], os quais realizaram experimentos a fim de investigar a respeito da dinâmica da proteína em solução, e ainda compararam com a estrutura cristalográfica disponível na literatura de Grb2 em sua forma dimérica [21]. Na seção seguinte será discutido a respeito da dinâmica de Grb2 juntamente dos parâmetros de relaxação. A priori, a análise do espectro de TROSY permite observar linhas finas, alta dispersão de deslocamento químico, compatíveis com uma proteína bem estruturada em solução.

Figura 16: Espectro 2D ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC de 268 μM Grb2 em 20 mM NaPi pH 7 com 200 mM NaCl, 50 mM Ácido Glutâmico e 50 mM Arginina. A dispersão e a contagem dos picos revelam que a proteína encontra-se com estrutura secundária definida, sem presença de degradação. Os picos sobrepostos são esperados, uma vez que Grb2 é uma proteína relativamente grande e a região de 8.5 a 8.0 ppm em ^1H uma região onde existe grande parte das ressonâncias dos resíduos de aminoácidos. As diferentes intensidades nos picos podem estar associadas à flexibilidade da macromolécula em solução, envolvendo dinâmica e troca conformacional.



Sabe-se que a proteína Grb2 apresenta 3 domínios, sendo eles dois SH3, um N-terminal e outro C-terminal (N-SH3 e C-SH3, respectivamente) e um domínio SH2. No assinalamento do domínio C-SH3, disponível na literatura (BMRB Entry 18748) e utilizado para sobrepor na proteína Grb2 completa, os autores utilizaram tampão 25 mM NaPi pH 7,5 com 140 mM NaCl, o que difere das condições utilizadas para Grb2 em nossos experimentos (20 mM NaPi pH 7,0 com 200 mM NaCl) [26]. Uma vez que os núcleos são extremamente sensíveis ao ambiente químico em que se encontram, a diferença de tampão, entre outros fatores, levou a deslocamentos químicos diferentes e a não sobreposição total de todos os picos de C-SH3 em Grb2. Somente os resíduos em que a sobreposição ou proximidade eram não ambíguas foram usados no assinalamento do C-SH3 da

Para o domínio SH2, utilizou-se o assinalamento feito neste trabalho nas mesmas condições de pH e temperatura. O assinalamento do domínio SH2 será apresentado em seções seguintes. Uma vez obtido os assinalamentos dos domínios SH2 e C-SH3, esses foram sobrepostos no espectro da proteína Grb2 completa (Figura 17), o qual permitiu obter os parâmetros de relaxação de cada domínio quando analisado no contexto de Grb2.

[illegible]

66

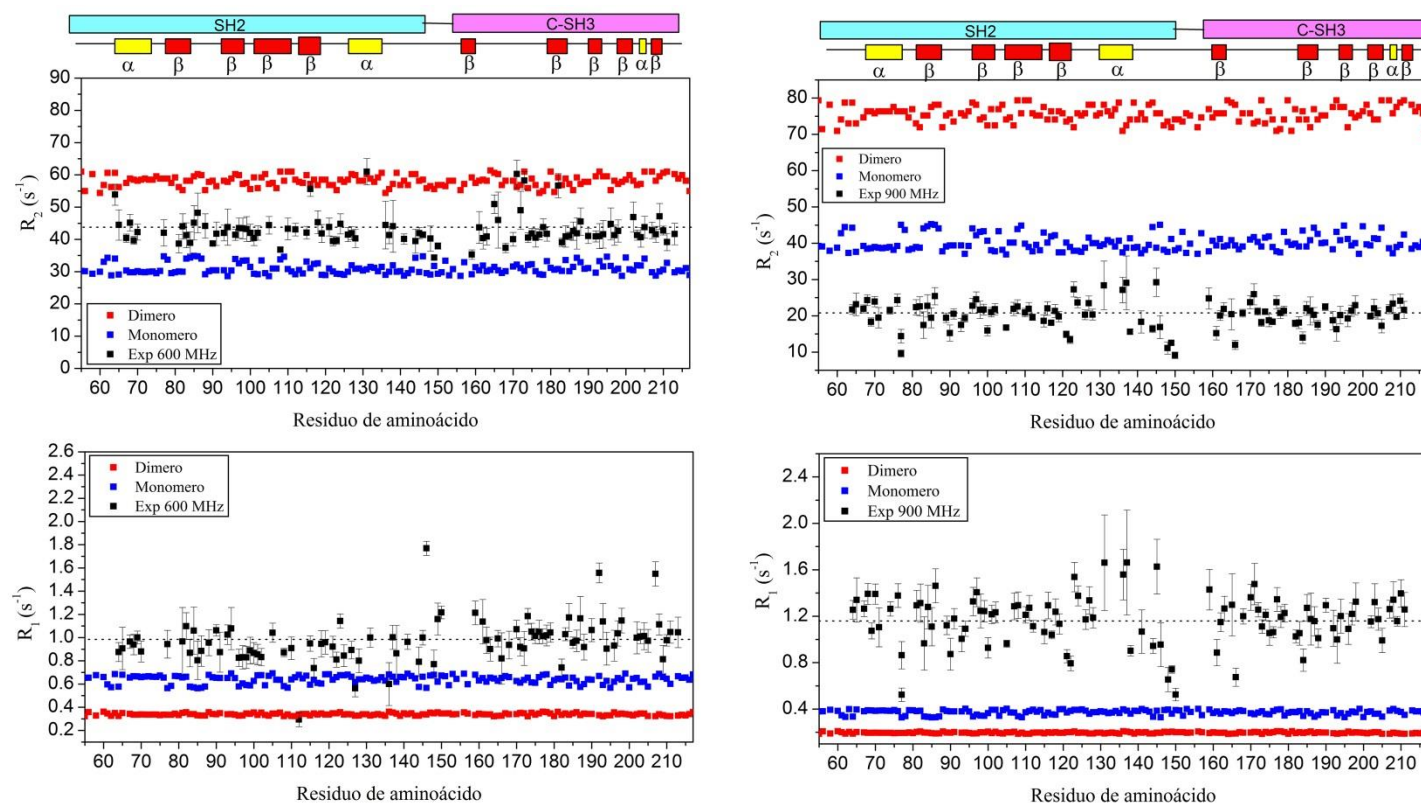
apresentam picos isolados puderam ser assinalados de forma não ambígua. Além disso, uma vez que foi possível identificar os resíduos na proteína Grb2 completa, e sabendo da dinâmica que esta proteína apresenta, torna-se interessante verificar estes fenômenos a partir de estudos das taxas de relaxação R_1 e R_2 .

Diante disso, foram feitos experimentos para medida de T_1 e T_2 baseados na transferência de polarização via TROSY. Os resultados encontram-se na seção 5.4.

5.4. Dinâmica estrutural de Grb2

Para caracterizar a dinâmica de cada vetor ^1H - ^{15}N da cadeia principal, a relaxação longitudinal do ^{15}N (R_1) e a transversal (R_2) foram medidas utilizando amostra ^2H , ^{15}N -Grb2 uniformemente marcada. Os parâmetros de relaxação fornecem importantes informações a respeito de movimentos da macromolécula em solução nas escalas de tempo de ps a ns (R_1 e R_2) e μs a ms (R_2). Além disso, foram calculadas as taxas de relaxação R_1 e R_2 teóricas para o monômero e o dímero da proteína em 600 e 900 MHz, como forma de comparação com os dados experimentais obtidos (Figura 18).

Figura 18: Comparação das taxas de relaxação R_2 e R_1 de ^2H , ^{15}N -Grb2 calculados teoricamente com os dados obtidos experimentalmente. Os cálculos teóricos foram feitos para a proteína monomérica e dimérica em 600 e 900 MHz. Para os experimentos em 600 MHz utilizou-se $102\ \mu\text{M}$ ^2H , ^{15}N -Grb2 em 20 mM NaPi pH 7,0 com 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 5 mM azida e para 900 MHz utilizou-se $268\ \mu\text{M}$ ^2H , ^{15}N -Grb2 em mesmo tampão com adição de 50 mM ácido glutâmico e 50 mM arginina.



Nota-se que os domínios SH2 e C-SH3 apresentam liberdade conformacional semelhante em Grb2, visto que os valores de R_1 e R_2 médio obtido para cada domínio são similares (Figura 18). A média das taxas de relaxação R_2/R_1 foi verificada e assim o tempo de correlação rotacional global (τ_c) de Grb2 foi calculado utilizando a equação 16, que define um modelo aproximado para um corpo rígido.

$$\tau_c \cong \frac{1}{4\pi\nu_{15N}} \sqrt{6 \frac{R_2}{R_1} - 7} \quad (16)$$

o qual ν_{15N} corresponde a frequência do ^{15}N (60,834 MHz em 14,04 T e 91,244 MHz em 21,14 T), R_2 à taxa de relaxação transversal e R_1 à taxa de relaxação longitudinal.

Tabela 8: Parâmetros de relaxação R_2 e R_1 , e o tempo de correlação rotacional da proteína Grb2 em 14,04 T (600 MHz) e 21,14 T (900 MHz).

	14,04 T	21,14 T
$\overline{R_2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	43,1	20,2
$\overline{R_1} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0,970	1,17
R_2/R_1	44,5	17,3
$\tau_c \text{ (ns)}$	16,0	8,00

O R_2 observado tem contribuições de movimentos de ps a ns, e também pode ter contribuições de movimentos lentos (μs a ms) que caracterizam troca conformacional (R_{ex}). Assim,

$$R_2^{obs} = R_2^{DD,CSA} + R_{ex} \quad (17)$$

sendo $R_2^{DD,CSA}$ a relaxação devido a interação dipolo-dipolo e anisotropia, R_{ex} contribuição de troca conformacional.

Desta forma, resíduos que tiveram R_2 maior que a média possivelmente encontram-se em troca conformacional, os quais podem participar de interações transientes e ser importantes para reconhecimento molecular.

Para calcular os parâmetros de relaxação teóricos de Grb2 foi utilizado o software Hydronmr [78]. Para Grb2 dimérica (PDBid.: 1GRI) e monomérica (1 subunidade isolada da estrutura cristalográfica do dímero PDBid.: 1GRI). Através desta comparação pôde-se verificar o comportamento da Grb2 em relação a seus estados de oligomerização. Para 14,1 T (600 MHz), a Grb2 apresentou valores de R_2 experimental de $\sim 43 \text{ s}^{-1}$, enquanto a média teórica para o dímero foi de $\sim 56 \text{ s}^{-1}$ e $\sim 30 \text{ s}^{-1}$ para o monômero. Para o R_1 , os valores experimentais tiveram uma média de $\sim 1,0 \text{ s}^{-1}$, enquanto que a média teórica para o dímero foi $\sim 0,35 \text{ s}^{-1}$ e $\sim 0,70 \text{ s}^{-1}$ para o monômero. Estes dados indicam que nas condições experimentais dos dados obtidos em 14,1 T há um equilíbrio entre dímero e monômero da proteína, com predominância da Grb2 monomérica. Nesta condição o τ_c calculado foi de 16 ns, compatível com a Grb2 monomérica. Yuzawa et al. (2001) determinaram τ_c de 14 ns para a Grb2 monomérica estabilizada pela interação com um fosfopeptídeo. Cabe lembrar que a condição experimental foi de $\sim 102 \text{ }\mu\text{M}$ Grb2 em tampão NaPi pH 7,0 com 200 mM de NaCl.

Para os dados obtidos a 21,1 T (900 MHz) a condição experimental foi de $\sim 268 \text{ }\mu\text{M}$ Grb2 em tampão NaPi pH 7,0 com 200 mM de NaCl, 50 mM de arginina e 50 mM de ácido glutâmico. Para esta condição foi determinado R_2 experimental médio de $\sim 20,2 \text{ s}^{-1}$ enquanto que o teórico foi de $\sim 75 \text{ s}^{-1}$ para a forma dimérica e $\sim 40 \text{ s}^{-1}$ para a forma monomérica. Para o R_1 experimental obtido $\sim 1,2 \text{ s}^{-1}$, e R_1 teórico de $\sim 0,2 \text{ s}^{-1}$ para o dímero e $\sim 0,4 \text{ s}^{-1}$ para o monômero, e o τ_c calculado pela relação R_2/R_1 foi de 8 ns. Embora o valor de $\tau_c = 8 \text{ ns}$ seja incompatível com ambas as formas de Grb2, este valor mostra maior proximidade com o esperado para o monômero da proteína. Esta discrepância pode ser devido ao elevado erro experimental encontrado na média de R_1 . Comparando-se apenas os valores de R_2 experimentais e teóricos, a proteína também se comporta mais com o esperado para o monômero.

Lin et al. verificaram que Grb2 desempenha importante função na ativação da via MAPK, controlando o ciclo celular. Ela interage em sua forma dimérica com o receptor FGFR2 via domínios C-SH3 [18]. Além disso, Zamal et al. verificaram que Grb2 apresenta um equilíbrio entre suas formas monomérica e

dimérica dentro da célula, a qual é fundamental para a regulação da via de sinalização da MAPK [36]. Neste trabalho, Zamal e colaboradores mostram que a constante de dimerização de Grb2 em PBS é 0,7 μM , e ainda que o dímero pode ser perturbado com fosforilação em Y160 e/ou interação de pequenos ligantes no domínio SH2. Através de experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS), termoforese em microescala (MST) e tempo de vida e anisotrópica de fluorescência os autores mostram que tanto o raio hidrodinâmico, a anisotropia de fluorescência (r), bem como os dados de MST apresentam dependência de concentração da Grb2, demonstrando a ocorrência do equilíbrio dímero/monômero de Grb2. Na faixa entre 2,5 e 30 μM , a proteína selvagem encontra-se dimérica, enquanto o mutante Y160E dimeriza em concentrações mais altas. Os autores observaram que o parâmetro de anisotropia para o dímero era menor que para o monômero, o que é contra-intuitivo. A divergência nos valores de τ_c , obtidos a partir de r , pode sugerir que Grb2 quando dimérica adota uma conformação compacta enquanto que a sua forma monomérica é mais estendida e desordenada, implicando em τ_c menor para o dímero que para o monômero [36]. A fim de verificar essa suposição, adotou-se uma estrutura oblata para a Grb2 monomérica (PDBid.: 1GRI) através do UCSF Chimera, sendo que os domínios de Grb2 foram mantidos como rígidos e os *loops* esticados a fim de se obter uma estrutura hipotética oblata. Uma vez obtido fez-se a minimização da energia e realizou-se cálculos teóricos de R_1 e R_2 com o *software* Hydrnmr [78]. Esses cálculos foram importantes para comparar com os dados obtidos aqui e assim obter melhor entendimento a respeito do estado oligomérico em que Grb2 se encontra para as condições experimentais utilizadas. A estrutura oblata, bem como os cálculos de R_1 e R_2 , encontram-se no anexo III.

Tabela 9: Levantamento bibliográfico dos estados oligoméricos de Grb2 em diferentes condições experimentais.

WT Grb2						
Condições experimentais				Método	Estado oligomérico predominante	Referência
Tampão	pH	Temperatura (°C)	[Grb2] (μM)			
PBS (137 mM NaCl, 10 mM, NaH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KH ₂ PO ₄)	7,4	20	0,4 – 40	DLS	Dimérico	Lin et al., 2012
20 mM NaCl, 20 mM HEPES	8,0	20		MST	Dimérico	
20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl	8,0	15	15	ITC	Dimérico	
PBS (137 mM NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KH ₂ PO ₄)	7,4	20	0,007 – 30	MST	Dimérico	Zamal et al., 2015
PBS (137 mM NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KH ₂ PO ₄)	7,4	20	2,5 – 30	DLS	Dimérico	
Não mostrado no paper		25	0,05	Anisotropia	Dimérico	
PBS (137 mM NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KH ₂ PO ₄)	7,4	25	40	Gel filtração	Dimérico	
100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl	8,5	23	1,0	FRET	Dimérico	
20 mM KH ₂ PO ₄ (pY peptídeo)	7,2	25	1200	R ₁ , R ₂	Monomérico	Yuzawa et al., 2002
20 mM KH ₂ PO ₄ (pY peptídeo)	7,2	25	1000	SAXS	Monomérico	

A Tabela 9 mostra um levantamento bibliográfico do estado oligomérico da Grb2 em diferentes condições experimentais, facilitando a comparação com os dados apresentados nesta dissertação. Os dados apresentados sugerem que nas condições experimentais utilizadas aqui (20 mM NaPi pH 7 com 200 mM NaCl) a Grb2 se comporta mais com o esperado para o monômero, mesmo em concentrações acima de 100 μ M de Grb2. Estes dados são muito relevantes, todavia necessitam ser colocados em um contexto mais amplo. Analisando a Tabela 9 com um resumo do estado oligomérico da Grb2 previamente determinados e correlacionados com as respectivas condições experimentais, e por outro lado verificando nossos dados, percebe-se que esses indicam um comportamento mais complexo para o equilíbrio monômero/dímero da Grb2, o qual pode depender principalmente do pH, força iônica e possivelmente efeitos específicos de Na⁺ e K⁺ presentes nas soluções tampão. Há também a possibilidade da Grb2 estar dimérica, o que é mais compatível com a literatura, e que cada domínio se comporte com liberdade rotacional suficiente para os parâmetros de relaxação se aproximarem de um proteína menor. Em outras palavras, poderia haver uma grande flexibilidade inter-domínio. Todavia, mais estudos são necessários para esta caracterização.

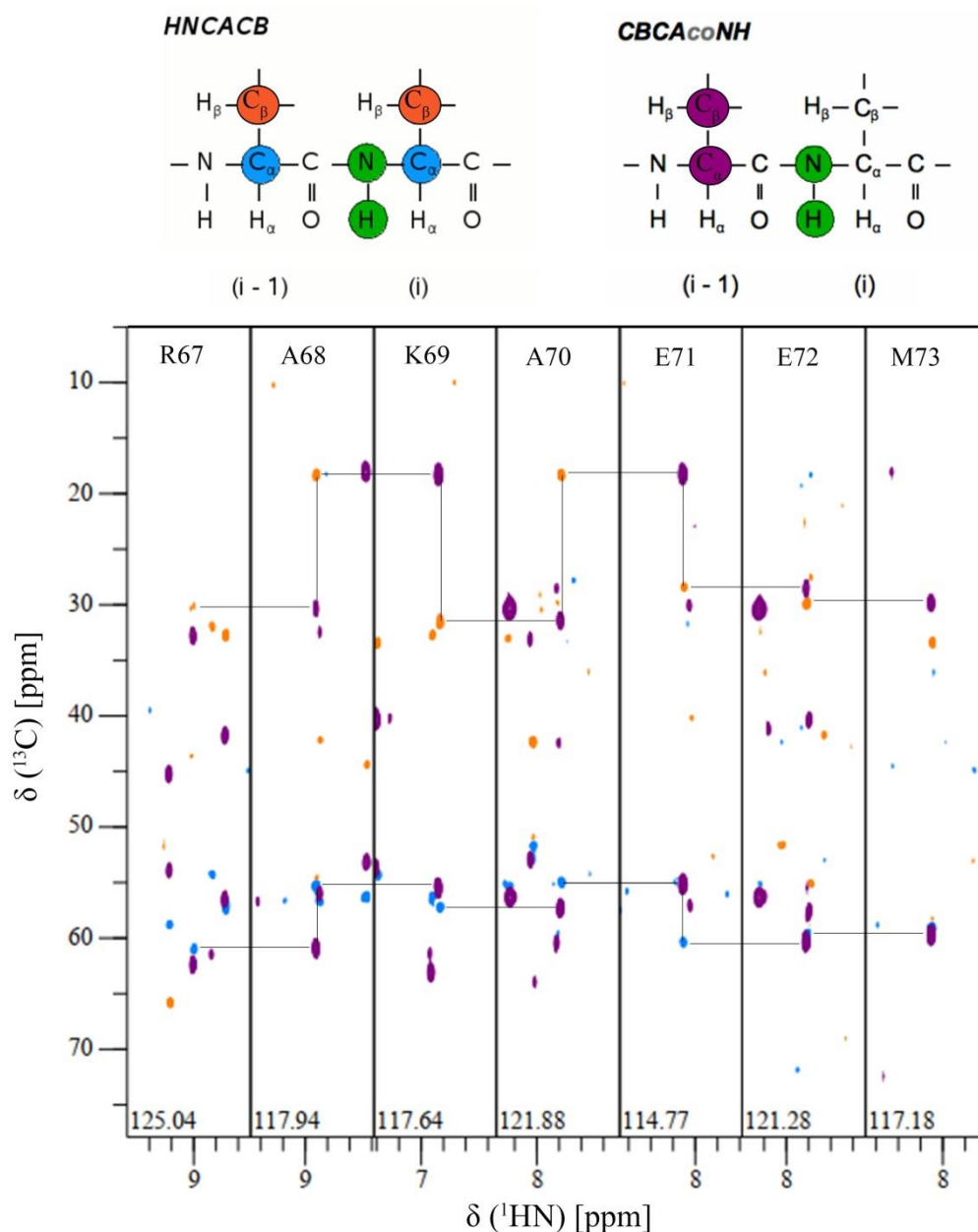
Vale dizer que, para estudos futuros será necessário melhorar a qualidade dos parâmetros de relaxação a fim de diminuir o erro experimental. Para os dados apresentados nesta dissertação foi utilizado o método de tempos constantes, o qual utiliza-se apenas 2 pontos (equação 14), um para o tempo de referência e outro para tempo constante. Presume-se que, ao utilizar medidas em tempos diversos e fazer uso de decaimento exponencial para ajuste, (assim como feito para obter os parâmetros de relaxação para o domínio Grb2-SH2 nos dados apresentados nessa dissertação) os parâmetros de relaxação serão de melhor qualidade.

5.5. Assinalamento das ressonâncias do domínio Grb2-SH2

A fim de se estudar os parâmetros de relaxação de Grb2-SH2, primeiramente obteve-se o assinalamento das ressonâncias do mesmo por meio de análise de experimentos clássicos de tripla-ressonância (Ver materiais e métodos Tabela 5).

Os resultados referentes a esta parte do trabalho estão em processo de publicação na revista *Biomolecular NMR Assignments*, e um resumo do artigo pode ser encontrado logo. Para ilustrar o assinalamento sequencial utilizando sequências de pulso de tripla-ressonância, a Figura 19 mostra o par de experimentos HNCACB e CBCA(CO)NH, com as conexões sequencias dos resíduos R67 até M73. Conforme descrito em Materiais e Métodos, outros espectros de tripla-ressonâncias foram adquiridos, os quais possibilitaram o assinalamento das cadeias principais e cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do domínio Grb2-SH2.

Figura 19: Espectros de HNCACB (picos em azul e laranja) e CBCA(CO)NH (picos roxos) evidenciando o assinalamento sequencial utilizado para obter as ressonâncias dos resíduos de aminoácidos do domínio Grb2-SH2 em pH 7. Pode-se observar as conexões dos resíduos R67 até M73.



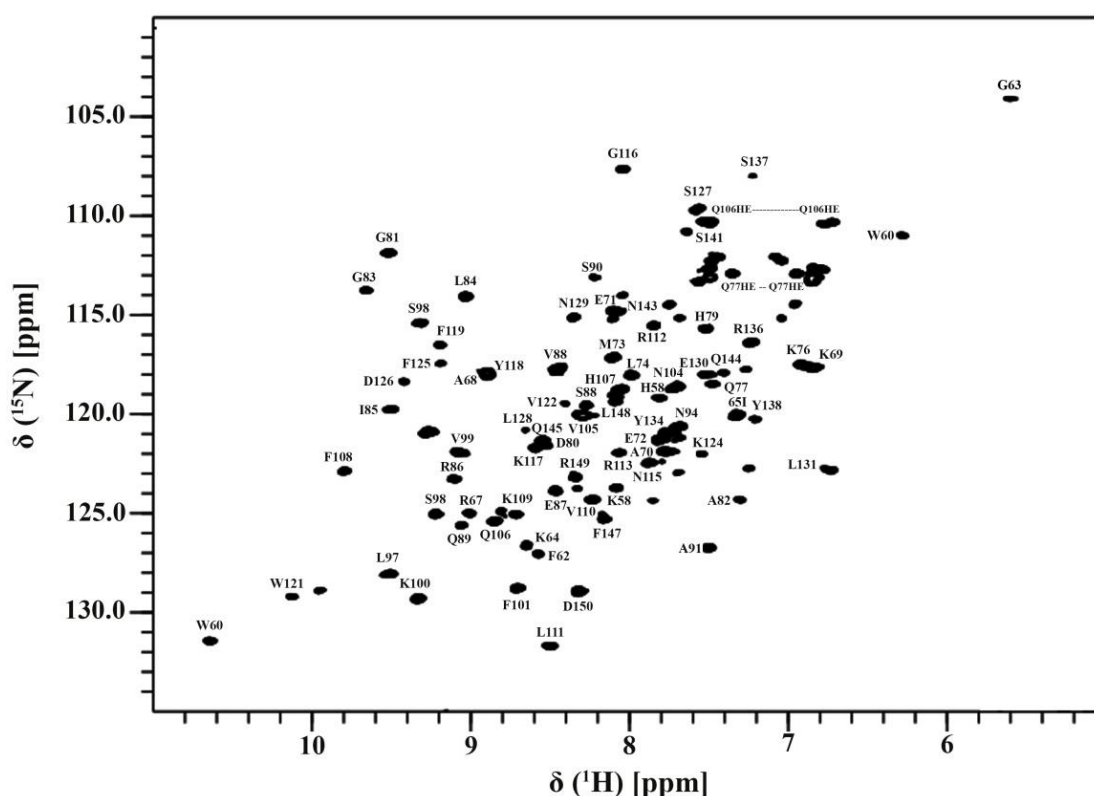
5.5.1. Resumo do manuscrito

Através da figura 20 pode-se verificar o espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC do domínio Grb2-SH2. Excluindo a cauda N-terminal com His₆-tag, todos os 96 resíduos do domínio tiveram as ressonâncias assinaladas. Foram assinalados 84% dos núcleos do *backbone* ($^{13}\text{C}_\alpha$, ^{13}CO , H_α , HN amídicos, e ^{15}N) do domínio Grb2-

SH2. As ressonâncias assinaladas para $^{13}\text{C}_\alpha$ e H_α totalizaram 97,9% e 94,2% respectivamente, exceto C_α de H58 e V122 não foram assinalados. Considerando o ^{13}CHn das cadeias laterais da proteína, foram assinalado 68,5% dos ^{13}C e 84,1% dos ^1H , totalizando um assinalamento de 77,4%. Um total de 97,8% dos C_β e 94,5% dos H_β foi assinalado, exceto C_β W6 e V68 não foram encontrados. Das 92 amidas, 16 não foram assinaladas devido à falta de informação no espectro de ^1H - ^{15}N -HSQC. Foram assinaladas 76 amidas ^1HN e ^{15}N (82,6 %), 76 ^{13}CO de um total de 96 (79,2 %). Os resíduos M54, F61, S75, R78, H79, N103 e G114 estão em região de *loop*, altamente expostos ao solvente e possivelmente em troca rápida com a água. Foram feitas previsões teóricas das taxas de troca com a água usando o software SPHERE [79], o qual mostrou alta taxa para os resíduos M54, S75, R78, H79, N103 e G114, justificando parcialmente a ausência desses picos no ^1H - ^{15}N -HSQC devido a troca com a água. Experimentos em pH 5,0 feitos pelo nosso grupo (dados não mostrados) e por Wang et al. em pH 5,3 mostram as ressonâncias de todos esses picos em pH baixo, corroborando com a hipótese de troca com a água em pH 7,0. O software SPHERE prediz que o resíduo de aminoácido F7 tenha baixa taxa de troca com a água.

Os resíduos de aminoácidos L120, W121, V123, V132, D133 e R142 estão próximos ao sítio de reconhecimento de fosfotirosina e possivelmente estão em troca conformacional. Através do software SPHERE foi verificado baixa taxa de troca para L120, W121, V123, V132 e D133. Em experimentos em pH 5,0 (dados não mostrados) e 5,3 [80] não foi possível verificar L120 e V132, mostrando a presença de troca conformacional. Para R88, o software SPHERE [79] prediz alta taxa de troca com o solvente. Pode-se verificar 6 picos no ^1H - ^{15}N -HSQC não assinalados devido a falta de informação nos experimentos de tripla ressonância. A cadeia lateral do resíduo de aminoácido W121 encontra-se em troca conformacional como pode-se verificar duas ressonâncias no espectro ^1H - ^{15}N -HSQC (Figura 20).

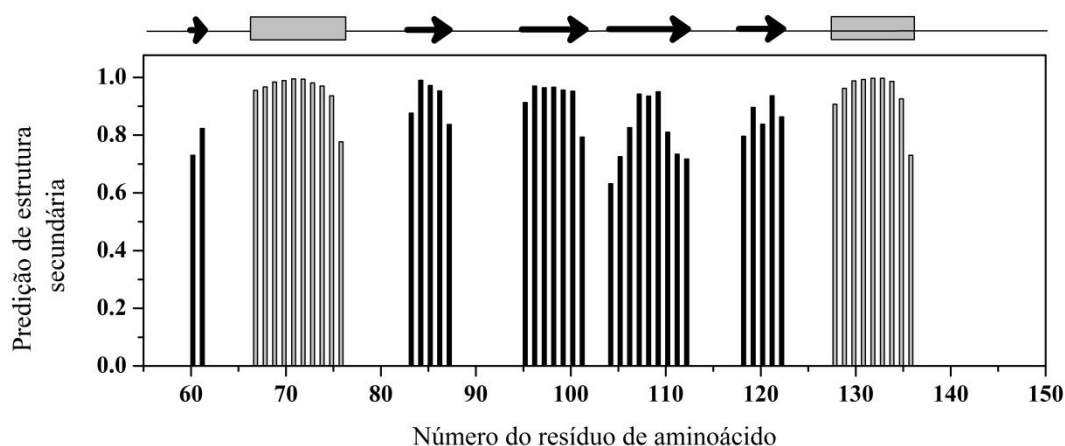
Figura 20: Espectro 2D ^1H - ^{15}N -HSQC em espectrômetro 900 MHz do domínio ^{15}N - ^{13}C Grb2-SH2 em 25°C contendo 350 μM de Grb2-SH2 em 20 mM NaPi pH 7 com 200 mM NaCl e 10 % (v/v) D_2O . Todos os picos encontram-se marcados com abreviação de uma letra para cada resíduo de aminoácido. Os grupos NH_2 da cadeia lateral dos resíduos Q131 e Q106 estão indicados em linha tracejada. Nota-se dois picos para a cadeia lateral do W121, indicando troca conformacional para esse resíduo.



A figura 21 mostra a predição da estrutura secundária obtida pelo software TalosN [81]. A predição mostra que o domínio Grb2-SH2 consiste de 5 fitas- β e 2 hélices- α , em concordância com a literatura [82]. A construção descrita e assinalada por Wang et al., [80] tem início em I53 até A163, sendo que os resíduos de aminoácidos I150 até T159 são parte do *linker* entre o domínio SH2 e C-SH3, e do Y160 até A163 são resíduos que fazem parte do domínio C-SH3, e formam uma pequena fita- β neste domínio. A fita- β na região C-terminal (146-IFLR-149) previsto através do deslocamento químicos *index* (CSI) por Wang et al., não existe na estrutura de Grb2 *full lenght* encontrada na literatura [21] e também não foi encontrada na predição feita com os deslocamentos químicos do

presente trabalho. Todos os deslocamentos foram depositados no *Biomagnetic Resonance Bank* (<http://www.bmrb.wisc.edu>) cujo número de acesso é 27781.

Figura 21: Predição de estrutura secundária realizada pelo software TalosN baseado no assinalamento dos deslocamentos químicos de Grb2-SH2. No gráfico pode-se verificar as probabilidades previstas pelo TalosN em função do número do resíduo de aminoácido, as barras pretas correspondem as fitas- β (flechas pretas) e as barras cinzas às hélices- α (retângulos cinzas).



A partir do espectro 2D ^{15}N , ^1H -HSQC SH2 (Figura 20), nota-se que os picos apresentam dispersão no deslocamento químico entre $\sim 3,2$ ppm ao longo de ^1H e ~ 21 ppm ao longo de ^{15}N , o que é característico de proteínas com estrutura secundária e terciária definidas.

5.5.2. Estrutura do domínio Grb2-SH2 pelo CS-Rosetta

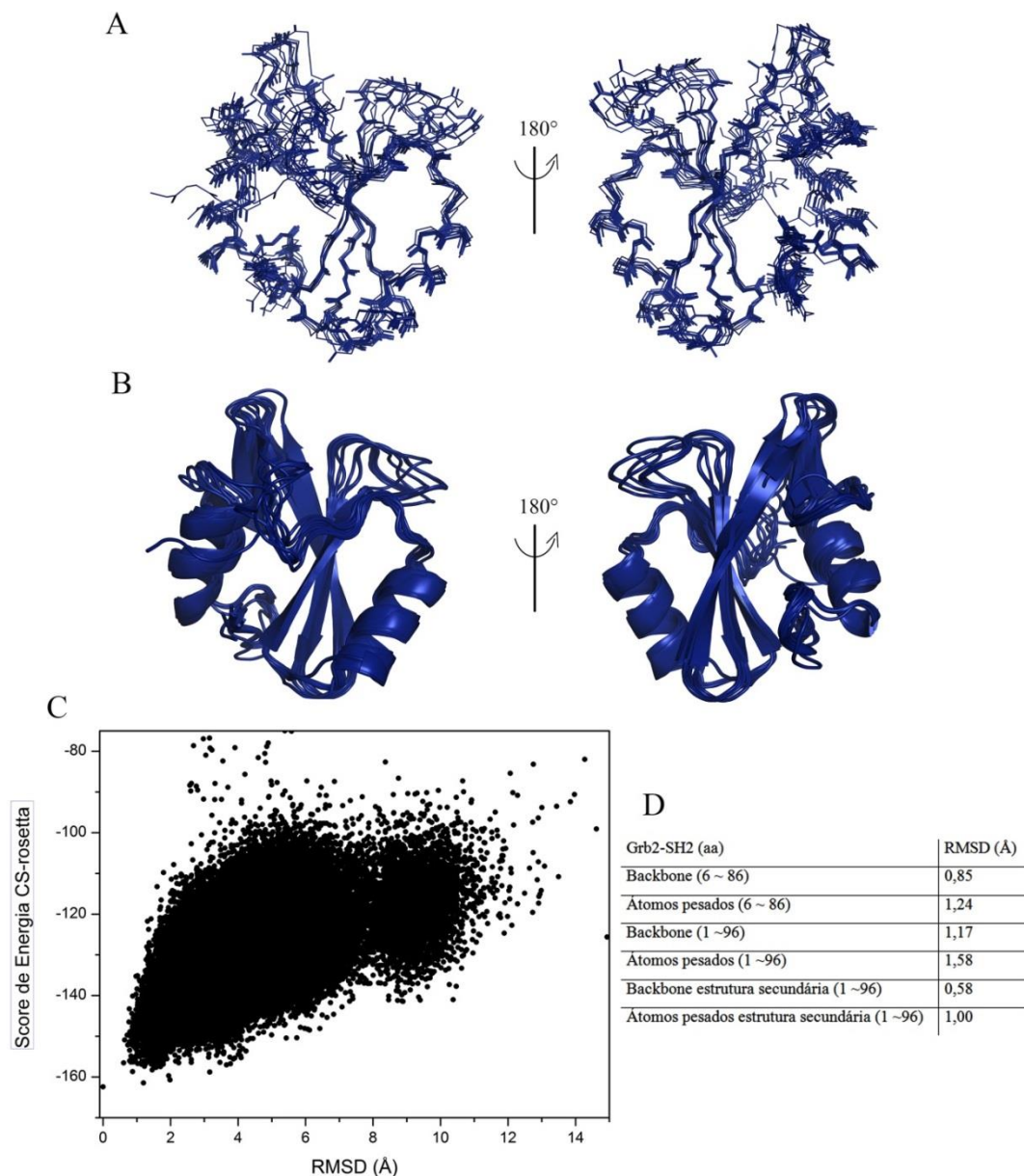
Uma vez que não se encontra disponível na literatura a estrutura de Grb2-SH2 em pH 7, optou-se por determinar a estrutura utilizando o *chemical shift* rosetta (cs-rosetta), o qual faz uso da metodologia *molecular fragment replacement*. Pode-se também adicionar restrições de distância a partir de NOEs a partir de espectros NOESY. Todavia, a estrutura apresentada nessa dissertação foi calculada na ausência de NOE, demonstrando que os deslocamentos químicos são suficientes para se obter uma estrutura convergente e bastante similar à descrita por Thornton et al., 1996 [82]. Posteriormente serão introduzidas as restrições de

NOEs, as quais permitirão resoluções de cadeias laterais e melhor confiabilidade no modelo.

A Figura 22 mostra as 10 estruturas de menor energia calculadas pelo cs-rosetta, as quais pode-se verificar uma boa sobreposição das ligações químicas (Figura 22A) e estrutura secundária (Figura 22B). Na Figura 22C é mostrado o funil de energia das 80.000 estruturas calculadas pelo cs-rosetta, pelo qual se verifica que há convergência, o que justifica a apresentação das 10 estruturas de menor energia (Figura 22A e 22B). A tabela contida na Figura 22D mostra que há uma boa resolução na cadeia principal da proteína, principalmente envolvendo os elementos de estrutura secundária.

Uma vez obtido o assinalamento e estrutura de Grb2-SH2 em pH 7, experimentos para calcular os parâmetros de relaxação do domínio foram feitos e encontram-se na seção seguinte.

Figura 22: Sobreposição das 10 estruturas de menor energia com A) mostrando a representação em *wires* e B) a representação em *cartoon*; C) Convergência do score de energia das 80.000 estruturas calculadas pelo CS-Rosetta; D) RMSD das 10 estruturas de menor energia.

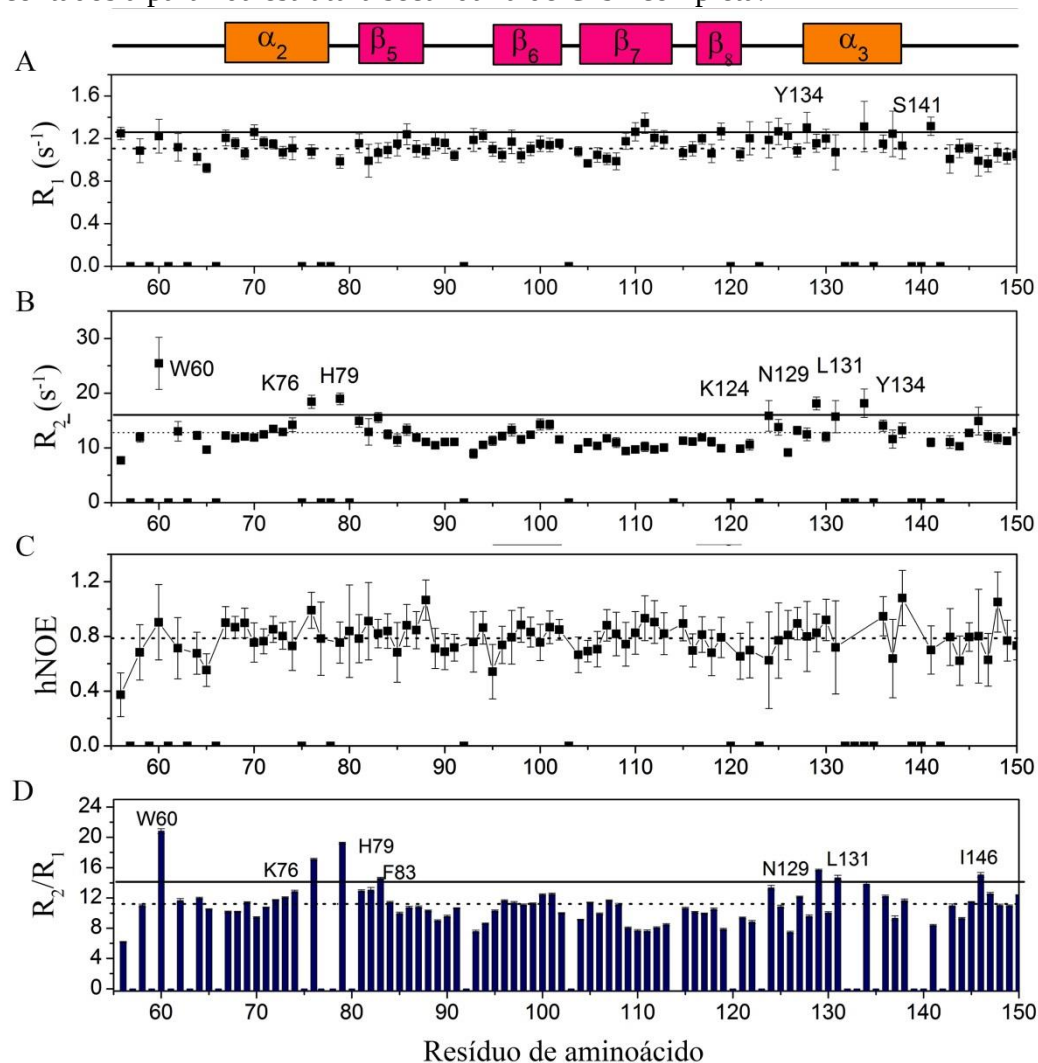


5.6. Dinâmica estrutural do domínio Grb2-SH2

Através de experimentos 2D ^1H , ^{15}N -HSQC caracterizou-se a dinâmica de cada vetor ^1H - ^{15}N da cadeia principal do domínio Grb2-SH2. As taxas de

relaxação R_1 , R_2 e hNOE (Figura 23) foram medidas utilizando amostra ^1H , ^{15}N -Grb2-SH2 uniformemente marcada.

Figura 23: Parâmetros de relaxação do vetor ^1H - ^{15}N da cadeia principal do domínio Grb2-SH2. A razão entre as taxas de relaxação R_2 e R_1 mostram que o domínio apresenta regiões próximas a hélice- α_3 e fita- β_8 com maior dinâmica conformacional. Além disso, os resíduos de aminoácidos com hNOE ≤ 0.6 apresentam maior flexibilidade. As linhas tracejadas referem-se aos valores médios e as linhas contínuas à soma da média e desvio padrão para cada parâmetro calculado. Os retângulos alaranjados e cor-de-rosa representam as estruturas secundárias do domínio, sendo os números de fitas- β e hélices- α contados a partir da estrutura secundária de Grb2 completa.

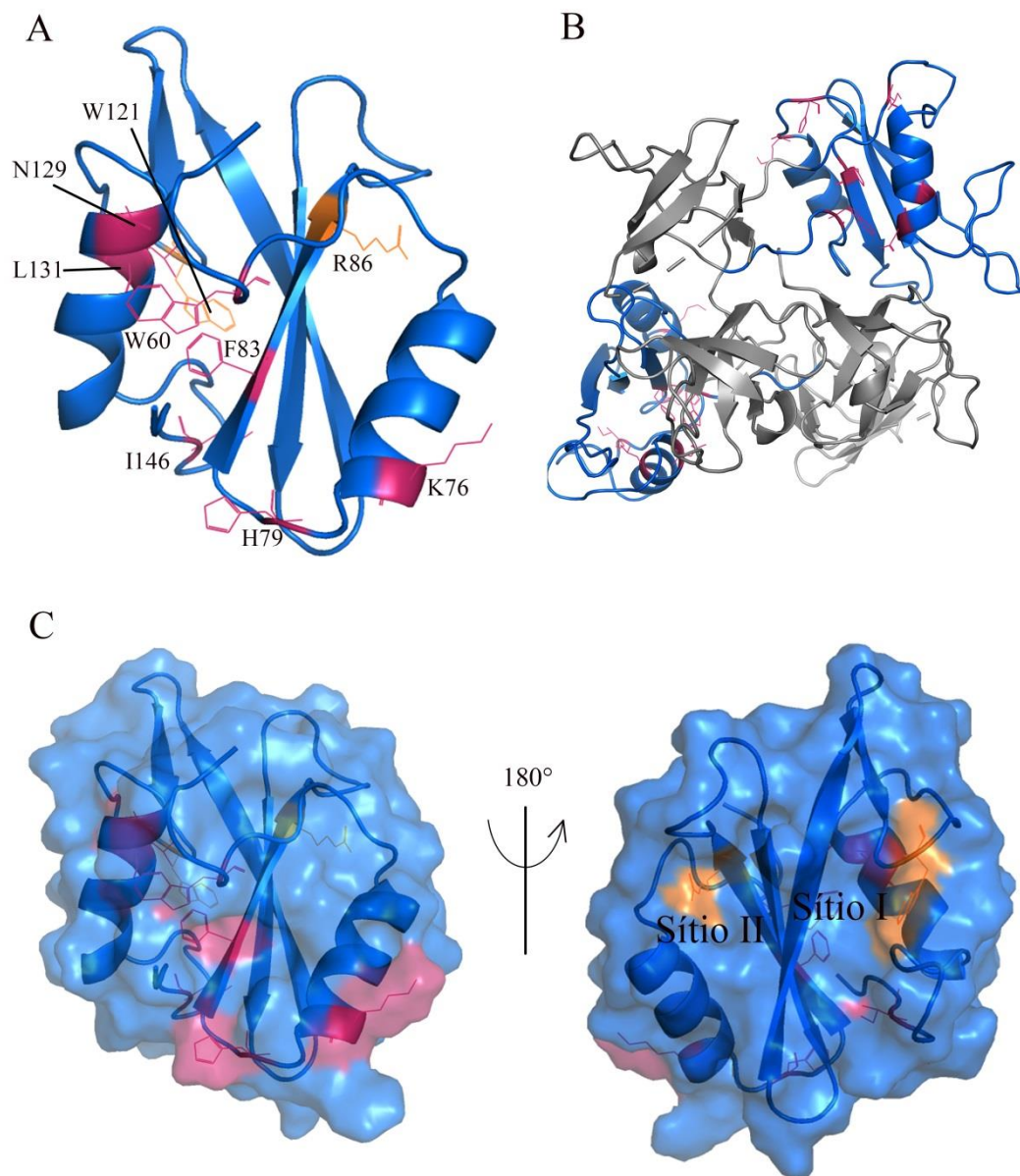


A taxa de relaxação R_1 média encontrada para o domínio Grb2-SH2 foi de $1,1 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$. Pode-se notar que os resíduos de aminoácidos Y134, localizado no

loop entre a fita- β_8 e a hélice- α_3 , e o resíduo S141 na região C-terminal encontram-se com R_1 fora da média encontrada para Grb2-SH2, indicando que esses resíduos estão em dinâmica rápida da ordem de ps – ns (Figura 23A). Já para a taxa de relaxação transversal, a média encontrada foi de $12,6 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$, podendo verificar que os resíduos W60, K76, H79 localizados próximos a hélice- α_2 , e os resíduos K124, N129, L131 e Y134 localizados próximos à hélice- α_3 encontram-se com taxa de relaxação acima da média calculada para o domínio, indicando que esses encontram-se em troca conformacional lenta da ordem de μs – ms (Figura 23B). A média de hNOE = $0,78 \pm 0,16$ é tipicamente encontrada para resíduos com baixa flexibilidade da ordem de ps – ns (Figura 23C). Com exceção da região N-terminal, que apresentou alta flexibilidade com hNOE baixos, as regiões de estrutura secundária e os *loops* encontram-se com pouca flexibilidade.

A média da razão $\frac{R_2}{R_1} = 11,23 \pm 0,15$ mostra que os resíduos W60, K76, H79, F83, N129, L131 e I146 estão em troca conformacional lenta da ordem de μs – ms (Figura 23D). Esses resíduos podem ser visualizados na estrutura do Grb2-SH2 (Figura 24A e 24C), evidenciando um sítio superficial em troca conformacional. Visualizando esses resíduos na proteína Grb2 dimérica (Figura 24B), nota-se que este sítio se encontra voltado para os *linkers* entre SH2 e os domínios SH3, na face oposta aos sítios I e II responsáveis pelo reconhecimento de fosfopeptídeos em Grb2-SH2. A mobilidade encontrada nesses sítios (destacados em cor de rosa na Figura 24B) pode estar associada a características alostéricas da proteína, implicando em funções específicas desse domínio em interações proteína-proteína dentro da célula. Resíduos de aminoácido em troca conformacional são frequentemente encontradas em sítios ativos de enzimas, sítios de reconhecimento molecular e alostéricos [83].

Figura 24: Resíduos em troca conformacional lenta (colorido em cor-de-rosa) indicados na estrutura do domínio Grb2-SH2 (colorido em azul). Os resíduos de aminoácido R86 e W121 fazem parte dos sítios I e II, responsáveis pelo reconhecimento de fosfotirosina e fosfopeptídeos (pY+2), respectivamente, encontram-se indicados em C coloridos em alaranjado. Em B verifica-se o dímero de Grb2, coloridos em azul são os domínios Grb2-SH2 e em cor de rosa os resíduos formando uma superfície em troca conformacional, voltados para os *linkers* entre SH2 e os domínios SH3.



O tempo de correlação rotacional calculado a partir da razão $\frac{R_2}{R_1}$ (equação 9) foi $\tau_c = 7$ ns, o qual é compatível para a massa molecular do domínio Grb2-SH2.

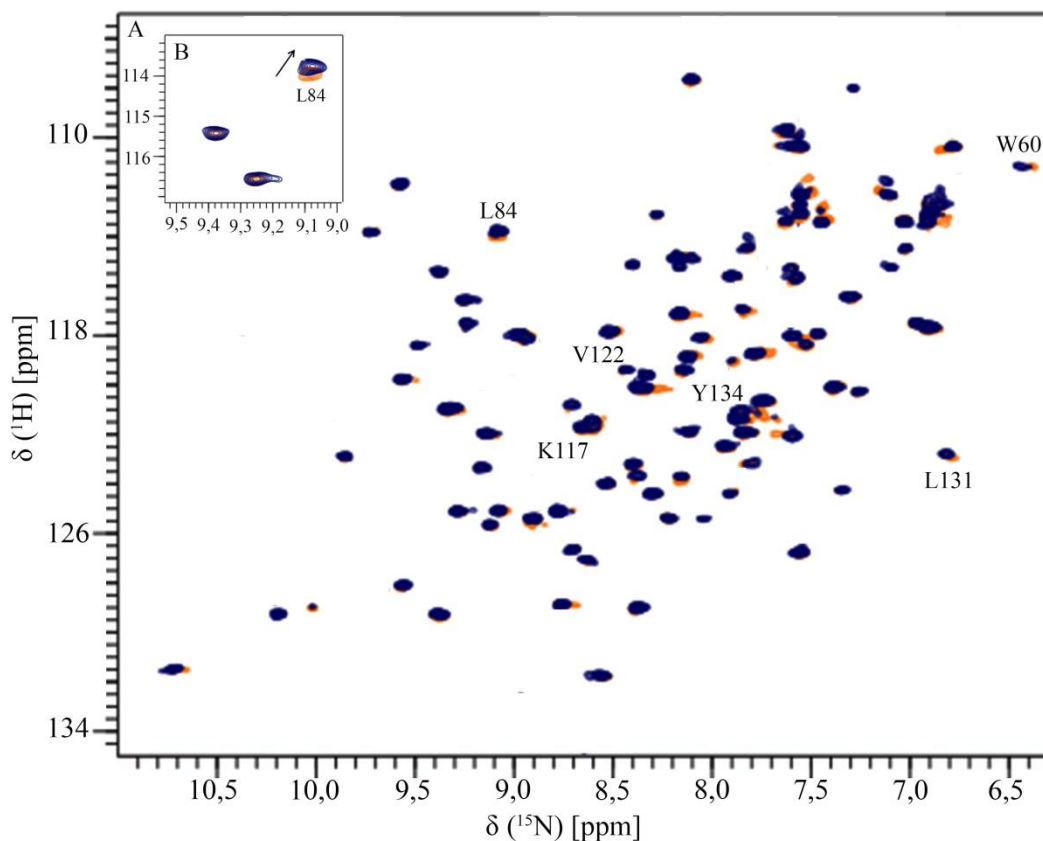
A atuação dos domínios SH2 no reconhecimento de proteínas parceiras dentro da célula é fundamental para sinalizações celulares. O domínio Grb2-SH2 é a maior classe de domínios que reconhecem fosfopeptídeos no proteoma humano [5,31,32]. Portanto, além do interesse em entender como a dinâmica estrutural pode estar associada à função de Grb2-SH2, tem-se também a proposta de pequenas moléculas para potenciais fármacos, como as cumarinas. Sabendo que a proteína Grb2 é ubiquamente encontrada dentro da célula e ainda devido ao fato de ser uma proteína multidomínios, existe o interesse em estudar a sua capacidade de atuar como carreadora no citosol. Diante disso, através de estudos prévios realizados pelo nosso grupo (Sanches *et. al.*, artigo em processo de submissão), foi verificada a supressão de fluorescência dos triptofanos de Grb2 na presença de diferentes concentrações de cumarina, e ainda experimentos de STD-RMN (*saturation transfer difference* por ressonância magnética nuclear) e simulações por dinâmica molecular e *docking* molecular sugerem que a interação ocorre no domínio Grb2-SH2. Posto isso, foram realizados experimentos com o domínio Grb2-SH2 isolado com cumarina, a fim de se verificar a interação bem como determinar os resíduos envolvidos (seção 5.7).

5.7. Interação entre o domínio SH2 e cumarina

A partir das titulações realizadas foi possível seguir os resíduos de aminoácidos que sofreram perturbações em seus ambientes químicos causados pela presença de cumarina. Os espectros da titulação de 58,3 μ M de cumarina encontram-se na Figura 24, onde nota-se que os resíduos de aminoácidos W60, L84, K117, V122, L131, e Y134 mostraram perturbações significativas em relação à média calculada para o domínio Grb2-SH2.

Figura 25: A) Espectros ^{15}N , ^1H -HSQC de Grb2-SH2 na presença e na ausência de cumarina (azul e alaranjado, respectivamente). Os resíduos de aminoácidos

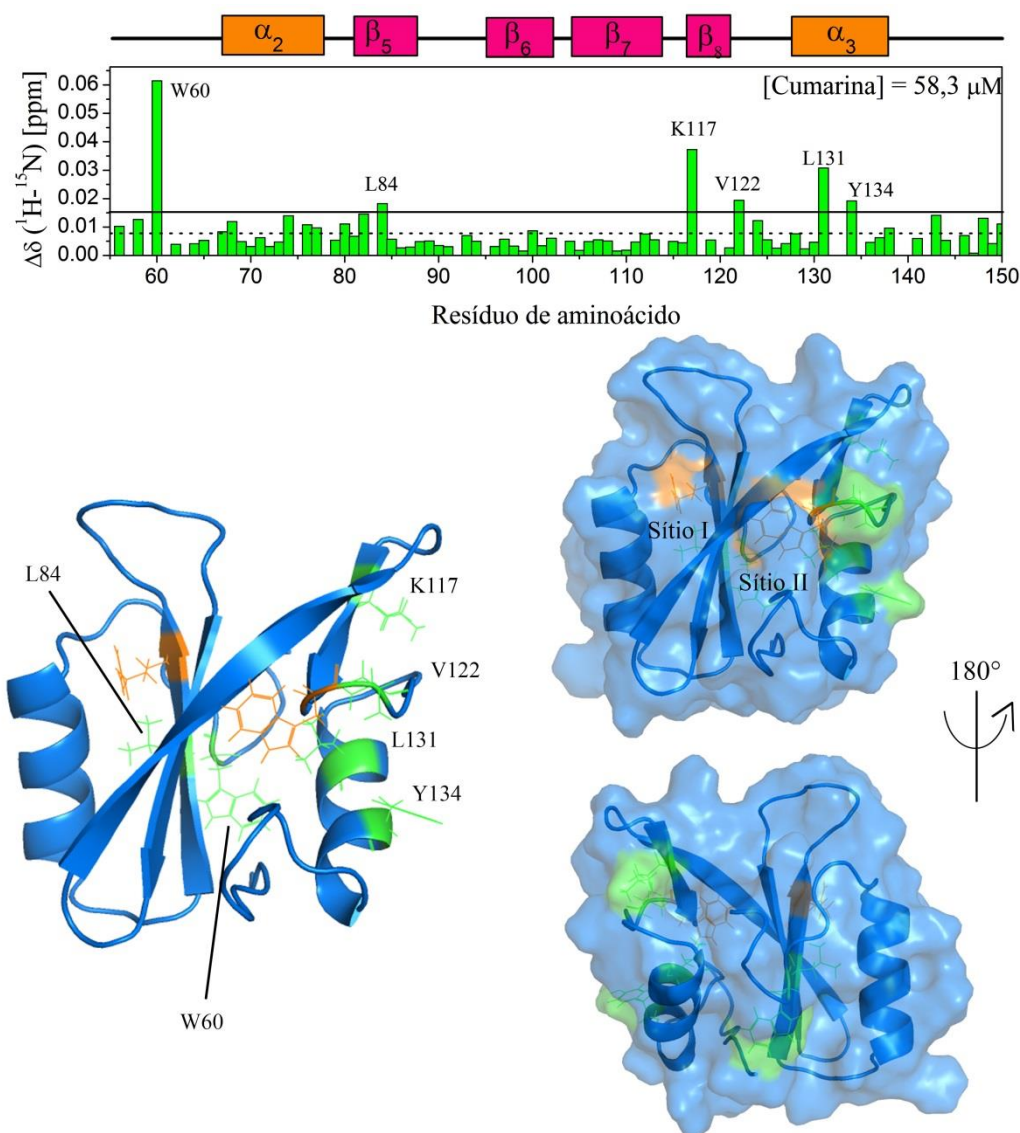
W60, L84, K117, V122, L131 e Y134 mostraram perturbações significativas, sugerindo interação com o domínio. B) Região ampliada mostrando a perturbação de deslocamento químico para o resíduo L84.



Uma vez que os resíduos com perturbações significativas são os mesmos para todas as titulações, optou-se utilizar a titulação de 58,3 μM , entendendo que para esta medida a quantidade de etanol na amostra (1,8 %) não é suficiente para interferir na interação. O valor médio encontrado foi $\Delta\delta_{NH} = 0,017$ ppm (Figura 26). Os resíduos de aminoácidos que se encontram acima desse valor estão coloridos em verde na estrutura da Figura 26. Pode-se notar que o *pocket* envolvendo a α_3 e a β_8 sofreram perturbações provenientes da interação com o ligante.

Figura 26: Cálculo das perturbações nos deslocamentos químicos dos resíduos de aminoácidos do domínio Grb2-SH2. Os resíduos com perturbações significativas são aqueles que se encontram envolvidos na interação com cumarina, e estão

coloridos em verde na estrutura. Os resíduos de aminoácidos em laranja mostram a R32, responsável pela interação com a fosfotirosina (pY) (Sítio I) e o W121, responsável pela interação pY+2 (Sítio II).



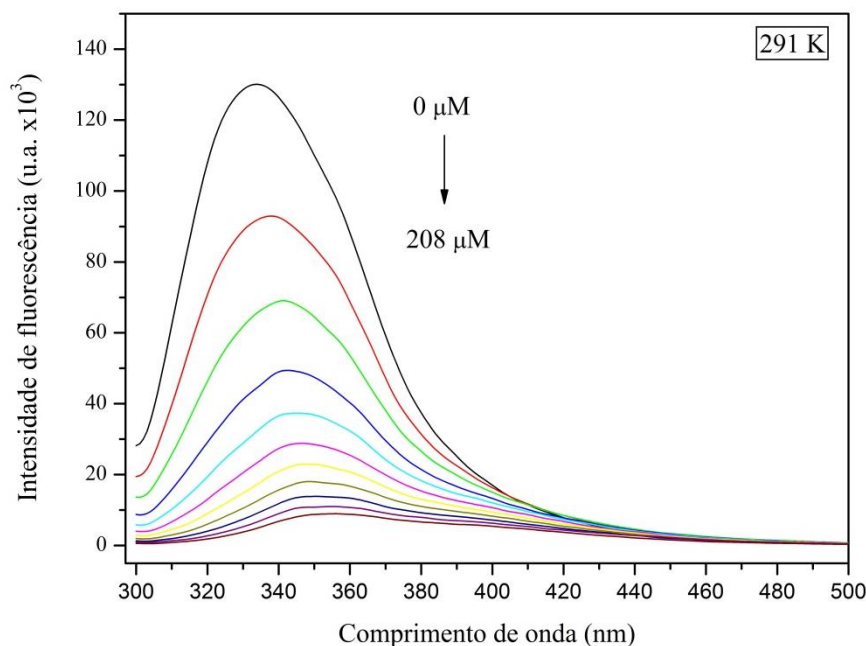
De acordo com os dados de CSP nota-se que a interação com cumarina está próximo ao sítio II do domínio, próximo a hélice- α_3 e a região de *loop* entre hélice- α_3 e a fita- β_8 . Este sítio de interação foi o previsto teoricamente por *docking* e dinâmica molecular em colaboração com grupo do Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira (paper em processo de submissão).

5.8. Espectroscopia de Fluorescência

Observa-se através do espectro de emissão de fluorescência do domínio Grb2-SH2 na Figura 27 que ocorreu a supressão na intensidade do sinal com o aumento da concentração de cumarina. Utilizou-se 2 μM de SH2-Grb2 e a concentração de ligante variou de 0 até 208 μM . As temperaturas utilizadas foram de 291, 295 e 299 K e a excitação do fluoróforo triptofano em 290 nm. O espectro de emissão foi coletado entre 300 e 500 nm. Verifica-se através do espectro que o pico de emissão máxima se desloca para o vermelho ao longo das titulações de cumarina, indicando que um ou mais resíduos de triptofano estão se tornando mais acessíveis ao solvente conforme aumenta a concentração de cumarina no meio. Uma vez já discutido a respeito dos resíduos que fazem parte da interação com cumarina por meio dos dados de RMN apresentados, a supressão de fluorescência sugere que o W60 esteja sofrendo mudanças conformacionais, expondo o sítio de interação e consequentemente a cumarina interage no *pocket*. É importante ressaltar que pelo espectro de fluorescência da proteína ligada a cumarina verifica-se que ambos os triptofanos estão expostos ao solvente, indicando que haja uma comunicação entre eles. O W60 está na face oposta ao sítio II e o W121 é o resíduo do sítio II que interage com o fosfopetídeo na posição pY +2. A cumarina leva a uma possível abertura do sítio.

Resultado similar foi observado para a titulação com a Grb2 inteira (manuscrito em processo de submissão). Observou-se tanto supressão da fluorescência, permitindo o cálculo da constante de ligação ($K_b \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$), como deslocamento de espectro para o vermelho, caracterizando exposição de um ou mais triptofanos ao solvente.

Figura 27: A) Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM do domínio Grb2-SH2 na ausência e na presença de diferentes concentrações do supressor cumarina com excitação em $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$ em 291 K.



Através do gráfico de duplo-log (equação 10, Figura 28) pode-se verificar que a constante de associação obtida foi $K_b \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ o que é tipicamente encontrado em interações moderadas [57]. Todos os coeficientes de correlação para o gráfico de duplo-log foram de 0,999 indicando que a interação está de acordo com o modelo sugerido. Além disso, o número de ligantes por proteína foi encontrado numa razão 1:1, ou seja, um ligante por domínio Grb2-SH2, confirmando os dados encontrados por ressonância magnética nuclear.

Uma vez encontrada a constante de associação, aplicou-se a equação de Van't Hoff (equação 13) a fim de se determinar o perfil termodinâmico da interação. O gráfico de Van't Hoff pode ser visualizado na Figura 28B e a constante de associação para cada temperatura bem como as contribuições energéticas encontram-se na Tabela 10.

Figura 28: A) Gráfico duplo-log do complexo Grb2-SH2 e cumarina em 291, 295 e 299 K sugere que a interação de uma molécula no domínio com constante de dissociação $K_b \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ o que é esperado para uma interação moderada. B)

Gráfico de Vant' Hoff para as 3 temperaturas analisadas mostra uma inclinação positiva.

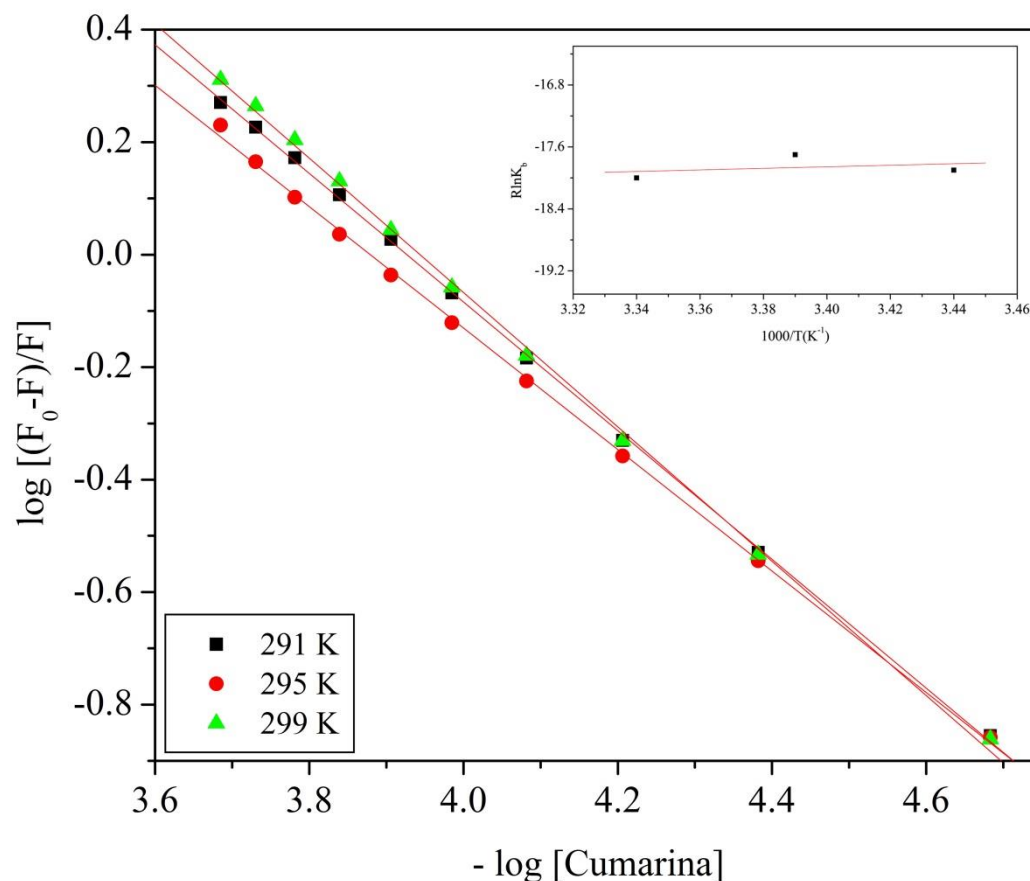


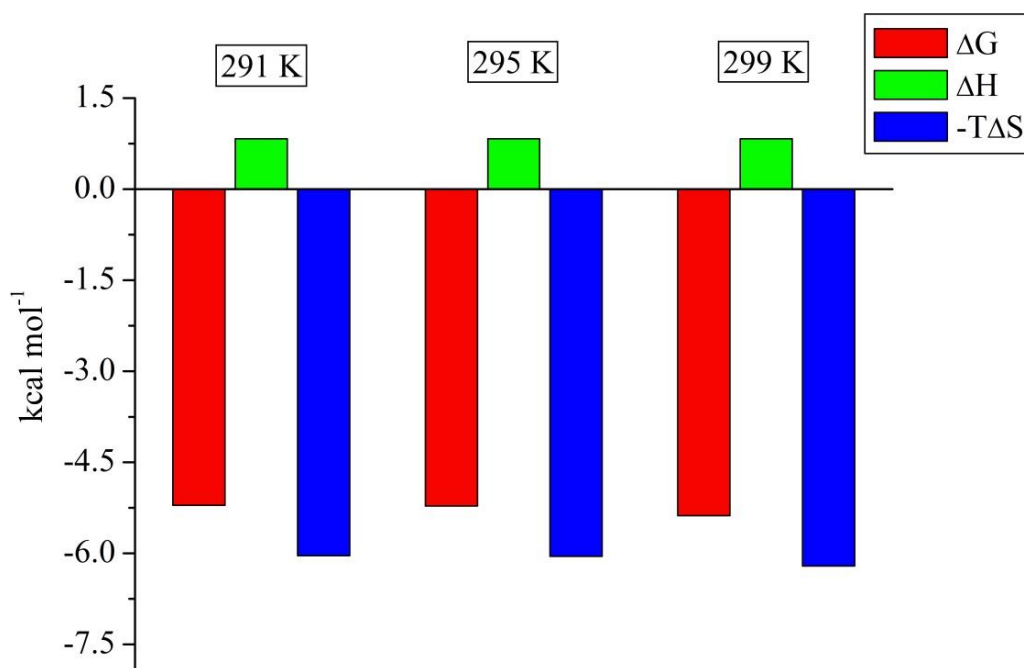
Tabela 10: Valores do número de ligantes por proteína (n), constante de associação (K_b), e parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e $T\Delta S$) encontrados para a formação do complexo Grb2-SH2 e cumarina.

T(K)	n	K_b ($\times 10^3 \text{ M}^{-1}$)	ΔG (kcal mol^{-1})	ΔH (kcal mol^{-1})	- $T\Delta S$ (kcal mol^{-1})
291	1,14	8,44	- 5,2	0,8	6,0
295	1,08	7,56	- 5,2		6,0
299	1,19	8,78	- 5,4		6,2

Através do perfil termodinâmico (Figura 29) nota-se que a energia livre de Gibbs obtida é negativa ($\Delta G < 0$) indicando uma reação espontânea para a interação entre Grb2-SH2 e cumarina. A respeito das contribuições entrópicas e

entálpicas, sabe-se que $T\Delta S > 0$ e $\Delta H > 0$ são tipicamente encontrados para interações hidrofóbicas [58,84]. Sendo assim, analisando as contribuições entálpicas e entrópicas para a energia livre de Gibbs pode-se verificar que interações hidrofóbicas favorecem a estabilização do complexo Grb2-SH2 – cumarina formado. O custo entrópico da estabilização da interação deve-se às moléculas de água que são liberadas da camada de solvatação para o meio, com isso a cumarina interage com o domínio. Este processo faz com que a entropia do sistema aumente, ou seja, esta contribuição termodinâmica é favorável para que a interação Grb2-SH2 e cumarina ocorra, sendo esta uma interação hidrofóbica entropicamente dirigida.

Figura 29: Perfil termodinâmico da interação de Grb2-SH2 com cumarina. A contribuição $\Delta G < 0$, $T\Delta S > 0$ e $\Delta H > 0$ sugerem que a interação é entropicamente dirigida, guiada por efeitos hidrofóbicos.



6. Conclusão

A caracterização de interações entre proteínas e ligantes é importante, pois auxilia no entendimento de mecanismo de ação que propicia conhecimentos para

o desenvolvimento de fármacos mais eficazes. Estes estudos possibilitam entender a nível molecular o microambiente em que a molécula interage e como a proteína pode ser física e estruturalmente afetada. Além da importância a respeito das interações proteína-ligante, é fundamental o entendimento da dinâmica conformacional que a proteína apresenta, uma vez que essa está intrinsecamente relacionada a funções específicas que as macromoléculas desempenham na célula.

Realizou-se o assinalamento por comparação da proteína Grb2 que permitiu medir propriedades dinâmicas do SH2 e C-SH3. Os parâmetros de relaxação obtidos para Grb2 juntamente do cálculo do tempo de correlação rotacional e a comparação com a predição teórica dos parâmetros de relaxação, mostraram que a proteína se comporta como se esperaria da Grb2 predominantemente monomérica e que o equilíbrio monômero-dímero apresenta um comportamento mais complexo do que aquele descrito pela literatura, o qual precisa ser melhor investigado. Duas possibilidades se aventam: (i) a Grb2 está monomérica nas condições estudadas aqui ou (ii) a Grb2 está dimérica, porém apresenta uma flexibilidade entre os domínios que caracterizaria uma liberdade rotacional dos mesmos.

Realizou-se o assinalamento do domínio Grb2-SH2 em pH 7 e posteriormente a predição da estrutura secundária baseado nos deslocamentos químicos por TalosN, o qual mostrou a que Grb2-SH2 em pH 7 encontra-se com duas hélices- α e 5 fitas- β , o que é de acordo com o encontrado na literatura para essa classe de domínios. Além do mais, realizou-se o cálculo da estrutura do domínio, e através do funil de energia obtido pôde-se verificar uma boa convergência para a estrutura de menor energia.

Os parâmetros de relaxação do domínio Grb2-SH2 mostraram resíduos próximos a hélice- α_3 com dinâmica térmica em escala de tempo de ps a ns, e os resíduos W60, K76, H79, F83, N129, L131 e I146 em troca conformacional lenta da ordem de μ s a ms. Esses resíduos formam um sítio superficial em troca conformacional, localizado na face oposta aos sítios de reconhecimento de fosfopeptídeos do domínio Grb2-SH2. Esses resíduos em dinâmica possivelmente

estão envolvidos em alosteria em processos de reconhecimentos de interação com proteínas parceiras em sinalizações celulares.

Além da dinâmica dessas regiões, o mapeamento da interação com cumarina por meio de perturbações nos deslocamentos químicos sugerem um sítio envolvendo a hélice- α_3 e o *loop* entre a hélice- α_3 e fita- β_8 . Este sítio de interação encontra-se próximo ao sítio II responsável pelo reconhecimento de fosfopeptídeos (pY+2) em Grb2-SH2. E ainda vale ressaltar que este sítio de interação com cumarina já havia sido proposto por cálculos teóricos de *docking* e dinâmica molecular (manuscrito em processo de submissão). Uma vez obtidos os resíduos envolvidos na interação com cumarina, experimentos verificando a supressão de fluorescência mostraram que a interação é entropicamente dirigida, e efeitos hidrofóbicos favorecem a estabilização do complexo. O W60 mostrou-se importante para a interação, o qual possivelmente está passando por mudanças conformacionais, tornando-se mais acessível ao solvente a fim de expor o *pocket* para estabilização da cumarina no sítio. Esta interação é moderada com $K_b \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ e ocorre com uma proporção 1:1.

A partir do levantamento bibliográfico que caracteriza as vias envolvendo a proteína Grb2 bem como seu domínio SH2, a cascata de sinalização MAPK e o ligante cumarina, e ainda os resultados aqui apresentados pode-se verificar que a proteína Grb2 é um alvo promissor e a cumarina é uma molécula potencial para o desenvolvimento de fármacos antitumorais. A dinâmica do domínio Grb2-SH2 em diferentes escalas de tempo é importante para o entendimento a respeito da função-estrutura desses importantes alvos proteicos.

7. Perspectivas

- Obter parâmetros de relaxação da interação do domínio Grb2-SH2 e cumarina a fim de elucidar seleção conformacional;
- Verificar dinâmica lenta (micro a milisegundos) por dispersão de relaxação via CPMG do domínio Grb2-SH2;

- Caracterizar o estado oligomérico da Grb2 e repetir experimentos de relaxação para se obter informação sobre a dinâmica inter-domínio e a liberdade rotacional dos mesmos.

Referências

- [1] William H. Markle, Melanie A. Fisher, Raymond A. Smego Jr., Compreendendo a saúde global, 2^o, Artmed, 2015.
- [2] Gulnar Azevedo, Cláudio Pompeiano Noronha, Liz Maria de Almeida, Silva Mendonça, A Situação do Câncer no Brasil, 2006.
- [3] F. Bunz, Principles of Cancer Genetics, Springer Science & Business Media, 2008.
- [4] A. Malzyner, R. Caponero, Câncer e Prevenção, MG Editores, 2013.
- [5] Donald Voet, Judith Voet, Charlotte Pratt, Fundamentos de Bioquímica, 4th ed., Artmed, 2014.
- [6] G. Cooper, A Célula. Uma Abordagem Molecular, Edição: 3^a, Artmed, Porto Alegre, 2007.
- [7] A.K. Abbas, A.H.H. Lichtman, S. Pillai, Imunologia Celular e Molecular, Elsevier Brasil, 2015.
- [8] D.L. Nelson, Princípios de Bioquímica de Lehninger, Edição: 6^a, Artmed, 2014.
- [9] Rang, Dale, Farmacologia, 7th ed., Elsevier, 2012.
- [10] Artur A. Belov, Moosa Mohammadi, Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling, 5 (2012).
- [11] Bárbara V. Silva, Bruno A. C. Horta, Ricardo Bicca Ricardo Bicca de Alencastro, Angelo C. Pinto, Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos, (2009).
- [12] J. Schlessinger, Signal transduction by allosteric receptor oligomerization, Trends in Biochemical Sciences. 13 (1988) 443–447. doi:10.1016/0968-0004(88)90219-8.
- [13] Bruce Alberts, Biologia Molecular da Célula, Artmed Editora, 2010.
- [14] Caio Abner V G Leite, José Victor G Costa, Rodrigo B Callado, Nathanael L Torres, Roberto César P Lima Junior, Ronaldo A Ribeiro, Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer, (2012).
- [15] B. Alberts, Biologia Molecular da Célula, Edição: 5^a, Artmed, Porto Alegre, 2009.
- [16] V. Kumar, Jon C. Aster, Abbas Abbas, Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças, 9th ed., Elsevier, 2015.
- [17] A.S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch, MAP kinase signalling pathways in cancer, Oncogene. 26 (2007) 3279–3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421.
- [18] Z. Ahmed, C.-C. Lin, K.M. Suen, F.A. Melo, J.A. Levitt, K. Suhling, J.E. Ladbury, Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity, J. Cell Biol. 200 (2013) 493–504. doi:10.1083/jcb.201204106.

- [20] Ana M. Tari, Gabriel Lopez-Berestein, Grb2: A pivotal protein in signal transduction, 28 (2001) 142–147.
- [21] S. Maignan, J.P. Guilloteau, N. Fromage, B. Arnoux, J. Becquart, A. Ducruix, Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor, *Science*. 268 (1995) 291–293.
- [22] S. Yuzawa, M. Yokochi, H. Hatanaka, K. Ogura, M. Kataoka, K. Miura, V. Mandiyan, J. Schlessinger, F. Inagaki, Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for target recognition, *J. Mol. Biol.* 306 (2001) 527–537. doi:10.1006/jmbi.2000.4396.
- [23] A. Giubellino, T.R. Burke, D.P. Bottaro, Grb2 Signaling in Cell Motility and Cancer, *Expert Opin. Ther. Targets*. 12 (2008) 1021–1033. doi:10.1517/14728222.12.8.1021.
- [24] H. Lodish, A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, M.P. Scott, *Molecular Cell Biology*, 7th edition, W. H. Freeman, New York, 2012.
- [25] D. Voet, J.G. Voet, *Bioquímica*, Artmed Editora, 2013.
- [26] Chi-Chuan Lin, Fernando A. Melo, Ragini Ghosh, Kin M. Suen, Loren J. Stagg, John Kirkpatrick, Stefan T. Arold, Zamal Ahmed, John E. Ladbury, Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2, (2012).
- [27] C.-C. Lin, F.A. Melo, R. Ghosh, K.M. Suen, L.J. Stagg, J. Kirkpatrick, S.T. Arold, Z. Ahmed, J.E. Ladbury, Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2, *Cell*. 149 (2012) 1514–1524. doi:10.1016/j.cell.2012.04.033.
- [28] R.J. Santen, R.X. Song, R. McPherson, R. Kumar, L. Adam, M.-H. Jeng, W. Yue, The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 239–256. doi:10.1016/S0960-0760(01)00189-3.
- [29] Cheng Kui QU, The SHP-2 tyrosine phosphatase: Signaling mechanisms and biological functions, 10 (2000) 279–288.
- [30] D. Kraskouskaya, E. Duodu, C.C. Arpin, P.T. Gunning, Progress towards the development of SH2 domain inhibitors, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3337–3370. doi:10.1039/c3cs35449k.
- [31] Liu Bernard A., Engelmann Brett W., Nash Piers D., The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction, *FEBS Lett.* 586 (2012) 2597–2605. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.054.
- [32] M. Vidal, V. Gigoux, C. Garbay, SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 40 (2001) 175–186.
- [33] G. Waksman, D. Kominos, S.C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, R.B. Birge, D. Cowburn, H. Hanafusa, B.J. Mayer, M. Overduin, M.D. Resh, C.B. Rios, L. Silverman, J. Kuriyan, Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides, *Nature*. 358 (1992) 646–653. doi:10.1038/358646a0.
- [34] D. Papaioannou, S. Geibel, M.B.A. Kunze, C.W.M. Kay, G. Waksman, Structural and biophysical investigation of the interaction of a mutant Grb2 SH2 domain (W121G) with its cognate phosphopeptide, *Protein Sci.* 25 (2016) 627–637. doi:10.1002/pro.2856.

- [35] M.S. Kimber, J. Nachman, A.M. Cunningham, G.D. Gish, T. Pawson, E.F. Pai, Structural Basis for Specificity Switching of the Src SH2 Domain, *Mol. Cell.* 5 (2000) 1043–1049. doi:10.1016/S1097-2765(00)80269-5.
- [36] Z. Ahmed, Z. Timsah, K.M. Suen, N.P. Cook, G.R.L. Iv, C.-C. Lin, M. Gagea, A.A. Marti, J.E. Ladbury, Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7354. doi:10.1038/ncomms8354.
- [37] K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity, Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity, *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* 2013, 2013 (2013) e963248. doi:10.1155/2013/963248, 10.1155/2013/963248.
- [38] Anuradha Thakur, Ramit Singla, Vikas Jaitak, Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies, (2015).
- [39] M.E. Marshall, L. Mendelsohn, K. Butler, L. Riley, J. Cantrell, C. Wiseman, R. Taylor, J.S. Macdonald, Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 5 (1987) 862–866.
- [40] Karina Gueogjian, Funcionalização de cumarina via reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura de sais de organotrifluoroboratos de potássio, Universidade de São Paulo, 2011.
- [41] A. Lacy, R. O’Kennedy, Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 3797–3811.
- [42] Cristina Montagner, Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas, Univeridade Federal de Santa Catarina, 2007.
- [43] J.L. Mohler, B.T. Williams, I.M. Thompson, M.E. Marshall, Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 (1994) S35–S38. doi:10.1007/BF01377123.
- [44] J.S. Lopez-Gonzalez, H. Prado-Garcia, D. Aguilar-Cazares, J.A. Molina-Guarneros, J. Morales-Fuentes, J.J. Mandoki, Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines, *Lung Cancer Amst. Neth.* 43 (2004) 275–283. doi:10.1016/j.lungcan.2003.09.005.
- [45] A. Maucher, E. von Angerer, Antitumour activity of coumarin and 7-hydroxycoumarin against 7,12- dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary carcinomas, (1994).
- [46] M.A. Musa, J.S. Cooperwood, M.O.F. Khan, A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 2664–2679.
- [47] R. Eisberg, Física Quântica, Edição: 1ª, Elsevier, Rio de Janeiro (RJ), 1979.
- [48] R.S. Macomber, A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy, 1 edition, Wiley-Interscience, New York, 1997.

- [49] M.H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, 2 edition, Wiley, Chichester, England ; Hoboken, NJ, 2008.
- [50] Joseph P. Hornak, *The Basics of NMR*, 2014.
- [51] Jeremy N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford, New York, 1995.
- [52] S.M. Pascal, *NMR Primer: An HSQC-based Approach*, 1st edition, IM Publications LLP, Chichester, 2008.
- [53] K.V. Pervushin, G. Wider, K. Wüthrich, Single Transition-to-single Transition Polarization Transfer (ST2-PT) in $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY, *J. Biomol. NMR.* 12 (1998) 345–348. doi:10.1023/A:1008268930690.
- [54] L.E. Kay, D.A. Torchia, A. Bax, Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease, *Biochemistry.* 28 (1989) 8972–8979.
- [55] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition, Springer, New York, 2011.
- [56] B. Valeur, M.N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2 edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2013.
- [57] Frei Ding, Guangyu Zhao, Jinli Huang, Ying Sun, Li Zhang, Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme, (2009).
- [58] I.P. Caruso, W. Vilegas, M.A. Fossey, M.L. Cornélio, Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: fluorescence spectroscopy and computational approach, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 97 (2012) 449–455. doi:10.1016/j.saa.2012.06.043.
- [59] John E. Ladbury, Babur Z. Chowdhry, *Biocalorimetry - Applications of calorimetry in the biological sciences*, Wiley, London, 1996.
- [60] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: J.M. Walker (Ed.), *Proteomics Protoc. Handb.*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005: pp. 571–607. doi:10.1385/1-59259-890-0:571.
- [61] F.P. de Souza, Investigation of the Interaction between Coumarins and Its Derivatives with Human Serum Albumin: STD-NMR, Fluorescence and Docking Molecular Studies, *Int. J. Sci.* 5 (2016) 1–11.
- [62] M. Czisch, R. Boelens, Sensitivity Enhancement in the TROSY Experiment, *J. Magn. Reson.* 134 (1998) 158–160. doi:10.1006/jmre.1998.1483.
- [63] G. Zhu, Y. Xia, L.K. Nicholson, K.H. Sze, Protein dynamics measurements by TROSY-based NMR experiments, *J. Magn. Reson. San Diego Calif* 1997. 143 (2000) 423–426. doi:10.1006/jmre.2000.2022.
- [64] A.P. Golovanov, G.M. Hautbergue, S.A. Wilson, L.-Y. Lian, A simple method for improving protein solubility and long-term stability, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 8933–8939. doi:10.1021/ja049297h.
- [65] A.G. Palmer, J. Cavanagh, P.E. Wright, M. Rance, Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 1969. 93 (1991) 151–170. doi:10.1016/0022-2364(91)90036-S.

- [66] N.A. Farrow, O. Zhang, J.D. Forman-Kay, L.E. Kay, A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of ¹⁵N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium, *J. Biomol. NMR.* 4 (1994) 727–734.
- [67] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts, *J. Biomol. NMR.* 44 (2009) 213–223. doi:10.1007/s10858-009-9333-z.
- [68] S. Grzesiek, A. Bax, Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein, *J. Magn. Reson.* 1969. 96 (1992) 432–440. doi:10.1016/0022-2364(92)90099-S.
- [69] M. Wittekind, L. Mueller, HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins, *J. Magn. Reson. B.* 101 (1993) 201–205. doi:10.1006/jmrb.1993.1033.
- [70] L.E. Kay, G.Y. Xu, A.U. Singer, D.R. Muhandiram, J.D. Formankay, A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain ¹H and ¹³C Correlations in H₂O Samples of Proteins, *J. Magn. Reson. B.* 101 (1993) 333–337. doi:10.1006/jmrb.1993.1053.
- [71] G.T. Montelione, B.A. Lyons, S.D. Emerson, M. Tashiro, An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10974–10975. doi:10.1021/ja00053a051.
- [69] S. Grzesiek, A. Bax, Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C ¹⁵N-enriched proteins, *J. Biomol. NMR.* 3 (1993) 185–204. doi:10.1007/BF00178261.
- [73] M.W. Maciejewski, A.D. Schuyler, M.R. Gryk, I.I. Moraru, P.R. Romero, E.L. Ulrich, H.R. Eghbalian, M. Livny, F. Delaglio, J.C. Hoch, NMRbox: A Resource for Biomolecular NMR Computation, *Biophys. J.* 112 (2017) 1529–1534. doi:10.1016/j.bpj.2017.03.011.
- [74] Mike P. Williamson, Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding, (2013) 1–16.
- [75] Y. Shen, R. Vernon, D. Baker, A. Bax, De novo protein structure generation from incomplete chemical shift assignments, *J. Biomol. NMR.* 43 (2009) 63–78. doi:10.1007/s10858-008-9288-5.
- [76] Y. Shen, A. Bax, SPARTA+: a modest improvement in empirical NMR chemical shift prediction by means of an artificial neural network, *J. Biomol. NMR.* 48 (2010) 13–22. doi:10.1007/s10858-010-9433-9.
- [77] J. Liu, J. Song, Insights into Protein Aggregation by NMR Characterization of Insoluble SH3 Mutants Solubilized in Salt-Free Water, *PLOS ONE.* 4 (2009) e7805. doi:10.1371/journal.pone.0007805.
- [78] J. García de la Torre, M.L. Huertas, B. Carrasco, HYDRONMR: Prediction of NMR Relaxation of Globular Proteins from Atomic-Level Structures and Hydrodynamic Calculations, *J. Magn. Reson.* 147 (2000) 138–146. doi:10.1006/jmre.2000.2170.
- [79] Y.-Z. Zhang, Protein and peptide structure and interactions studied by hydrogen exchanger and NMR, Diss. Available ProQuest. (1995) 1–203.

- [80] Y.S. Wang, A.F. Frederick, M.M. Senior, B.A. Lyons, S. Black, P. Kirschmeier, L.M. Perkins, O. Wilson, Chemical shift assignments and secondary structure of the Grb2 SH2 domain by heteronuclear NMR spectroscopy, *J. Biomol. NMR.* 7 (1996) 89–98.
- [81] Y. Shen, A. Bax, Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks, *J. Biomol. NMR.* 56 (2013) 227–241. doi:10.1007/s10858-013-9741-y.
- [82] K.H. Thornton, W.T. Mueller, P. McConnell, G. Zhu, A.R. Saltiel, V. Thanabal, Nuclear magnetic resonance solution structure of the growth factor receptor-bound protein 2 Src homology 2 domain, *Biochemistry.* 35 (1996) 11852–11864. doi:10.1021/bi952615s.
- [83] A.P. Valente, C.A. Miyamoto, F.C.L. Almeida, Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 3697–3703.
- [84] Ronan O’Brien, Ihtshamul Haq, *Applications of Biocalorimetry: Binding, Stability and Enzyme Kinetics*, John Wiley & Sons, 2004.
- [85] D.C. Flynn, Adaptor proteins, *Oncogene.* 20 (2001) 6270–6272. doi:10.1038/sj.onc.1204769.

Anexo I

Preparo de Células Competentes – Protocolo RbCl

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 o pH para 5,8.

**filtrar em membrana de 0,22 µm.

Solução RF2

Reagente	125 mL
MOPS 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
Cloreto de Rubídio	0,15 g
Cloreto de Cálcio	1,37 g
Glicerol 15% (m/v)	18,75 g

*ajustar pH para 6,8. **filtrar em membrana de 0,2 µm.

SOB

Reagente	50 mL
Meio L.B	24,438 mL
KCl 2,5 mM	312 µL
Solução de Magnésio	250 µL

Transferir 500 µL de cada pré-inóculo para novos Erlenmeyers contendo 25 mL de meio SOB.

Incubar por 2h a 37°C com 80 rpm;

Transferir a cultura para 2 tubos falcon de 15mL;
Incubar em gelo por 15 minutos;
Centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C;
Descartar o sobrenadante;
Ressuspender em 1/3 do volume inicial em solução RF1;
Incubar em gelo 15 min;
Centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C;
Descartar o sobrenadante;
Ressuspender em 1/12,5 do volume inicial em solução RF2;
Incubar em gelo 15 min;
Distribuir alíquotas de 100 µL em tubos previamente gelados;
Congelar em N₂ líquido;
Armazenar em -80°C.

Anexo II

Purificação plasmidial – protocolo miniprep

Centrifugar o meio com bactérias a 8000 RPM por 3 min a 25°C;

Adicionar 250 µL de Buffer P1 e agitar;

Adicionar 250 µL de Buffer P2 e agitar até ficar claro e esperar 4 min;

Adicionar 350 µL de Buffer N3 e agitar invertendo o tubo;

Centrifugar por 10 min a 13000 RPM;

Coletar o sobrenadante e colocar na coluna;

Centrifugar 1 min e descartar o líquido decantado;

Adicionar 750 µL de Buffer PE, centrifugar por 1 min;

Descartar o resíduo e centrifugar novamente;

Transferir a coluna para um novo *eppendorf*;

Adicionar 60 µL Buffer EB e esperar 1 min e centrifugar 1 min.

Anexo III

Através dos cálculos de R_2 teóricos para a estrutura oblata de Grb2 pode-se notar que os mesmos não estão de acordo com os dados experimentais obtidos em 600 e 900 MHz. Essa comparação sugere que a proteína Grb2 não se encontra monomérica oblata para as condições experimentais deste trabalho. A estrutura utilizada encontra-se na Figura 29.

Figura 30: Cálculos teóricos de R_2 e R_1 de Grb2 monomérica e oblata.

