

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 12/04/2020.



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. biofísica 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 responsabilidade 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 μ s 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 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 $\text{hNOE} \leq 0.6$ 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

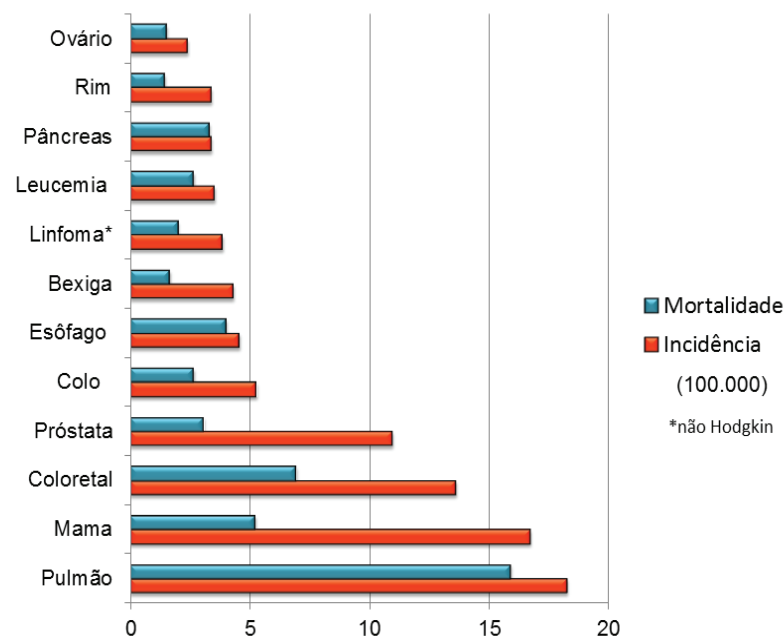
1. Introdução

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].

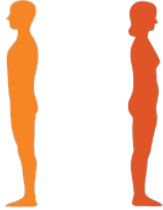
Figura 1: Estatística dos 15 tipos de cânceres com maior incidência e mortalidade em nível mundial.



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

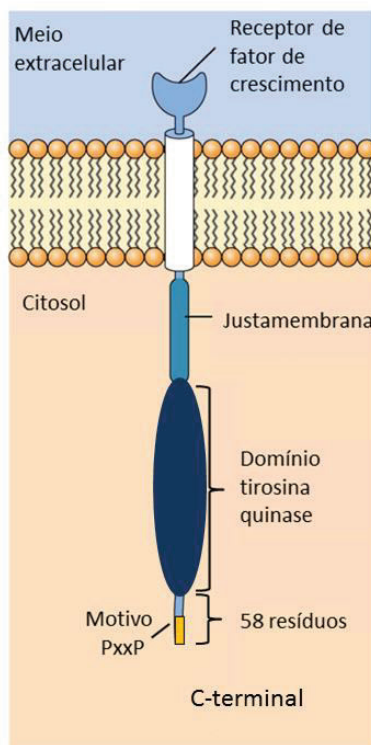
As vias de sinalização controlam respostas adequadas e específicas dentro da célula. A sinalização celular em eucariotos envolve moléculas sinalizadoras denominadas ligantes, os quais interagem com proteínas receptoras que podem se encontrar na membrana celular, solúveis no meio citoplasmático ou até 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,

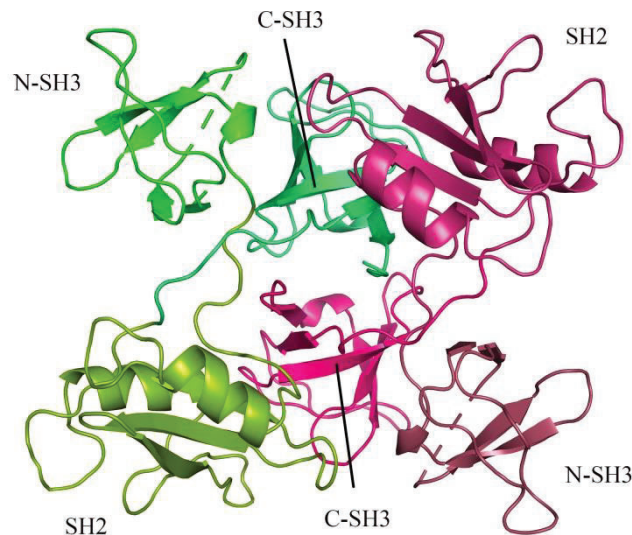
encontram-se submetidas a um constante e preciso controle de sobrevivência, crescimento, diferenciação e apoptose. Entretanto, durante o processo de proliferação celular, estas também estão sujeitas a erros que podem gerar perda de controle de crescimento celular, dando início ao crescimento acima das 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.

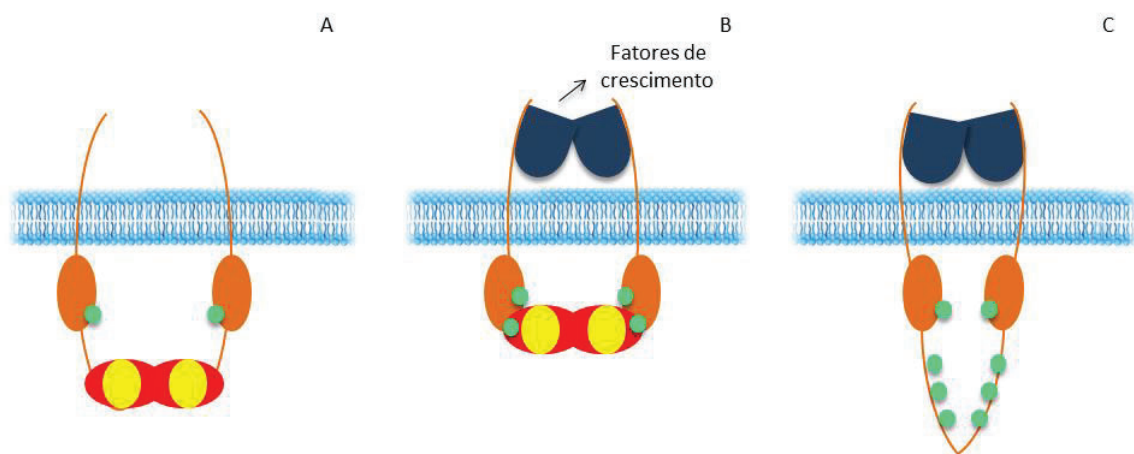
O domínio SH3 contém de 50 a 75 resíduos de aminoácidos e se liga em sequências de 9 ou 10 resíduos ricos em prolina (P), contendo o *motif* P-x-x-P (ou PxxP) sendo x-x quaisquer outros dois resíduos. Ele apresenta um enovelamento que é composto por fitas- β antiparalelas empacotadas uma contra a outra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

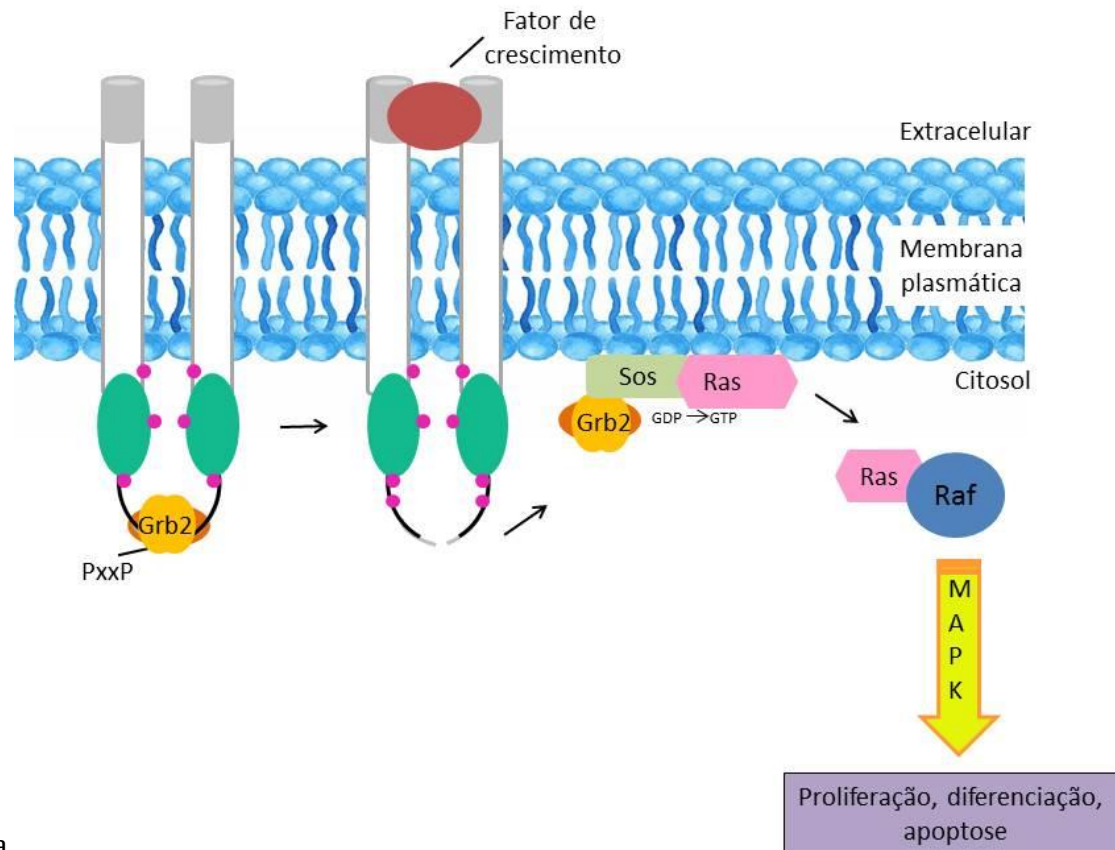


Fonte: Chi-Chuan Lin *et al.*; 2012 – adaptado.

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].

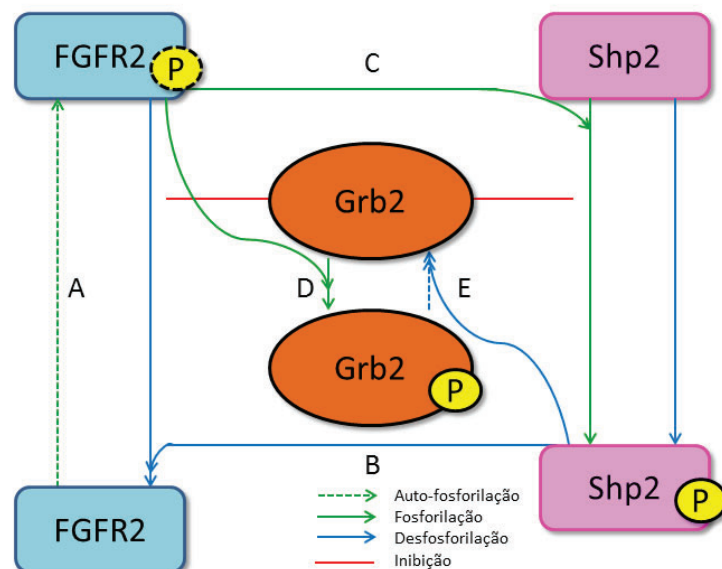
Figura 6: Esquema representativo da ativação da cascata de sinalização MAPK. Após estímulos por fatores de crescimento, fosforilações são induzidas em Grb2 por FGFR2. Então, a proteína Grb2 se dissocia de FGFR2 e interage com Sos via domínios SH3. A Sos é responsável pela troca de GDP em GTP na proteína 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

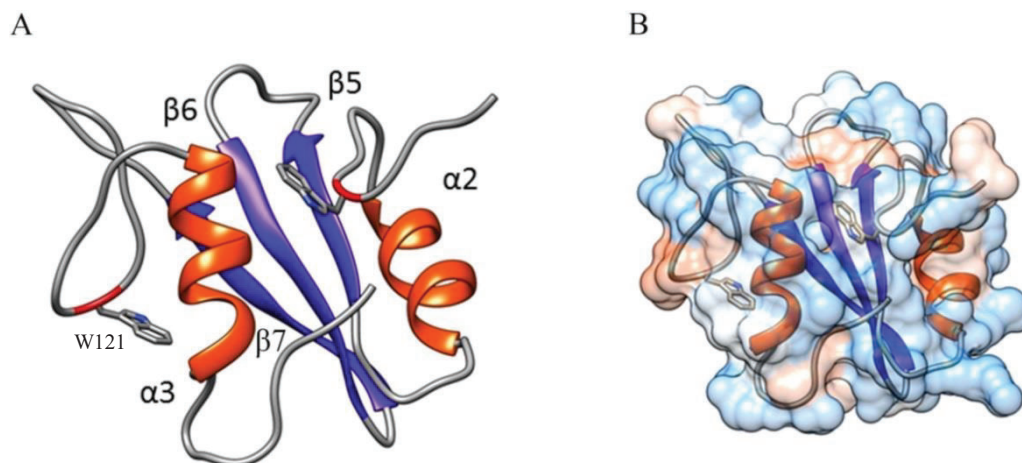
desempenhada por MAPK, a falta de regulação causa o crescimento celular descontrolado, podendo ocasionar o desenvolvimento de tumores e até mesmo má formação fetal [18].

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].

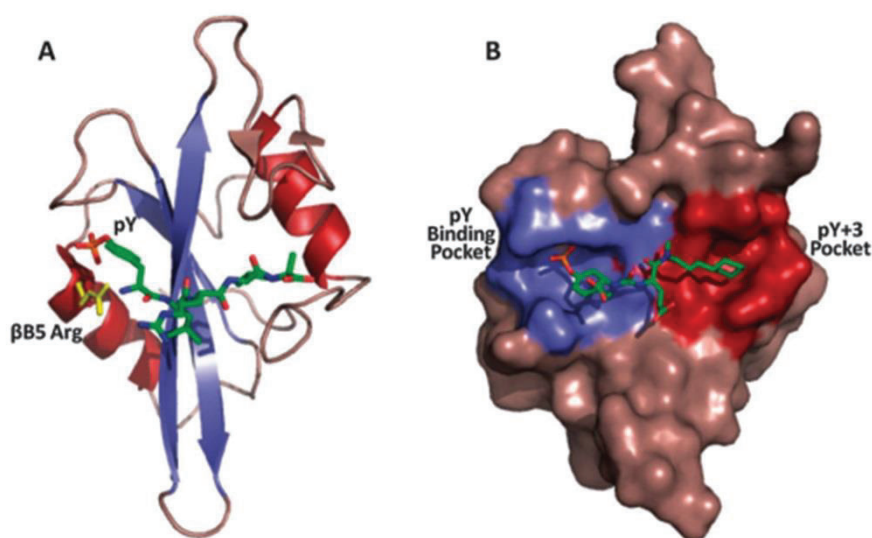
Os domínios SH2 apresentam uma estrutura bem conservada sendo uma folha- β central cercada por duas hélices- α (Figura 8).

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

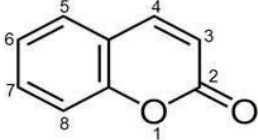
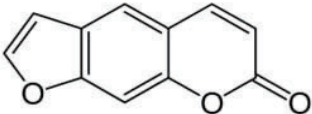
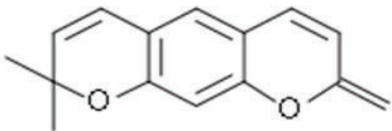
amplamente estudada devido aos seus benefícios para a saúde humana [37]. Uma breve introdução desta molécula encontra-se na subseção 1.5.

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

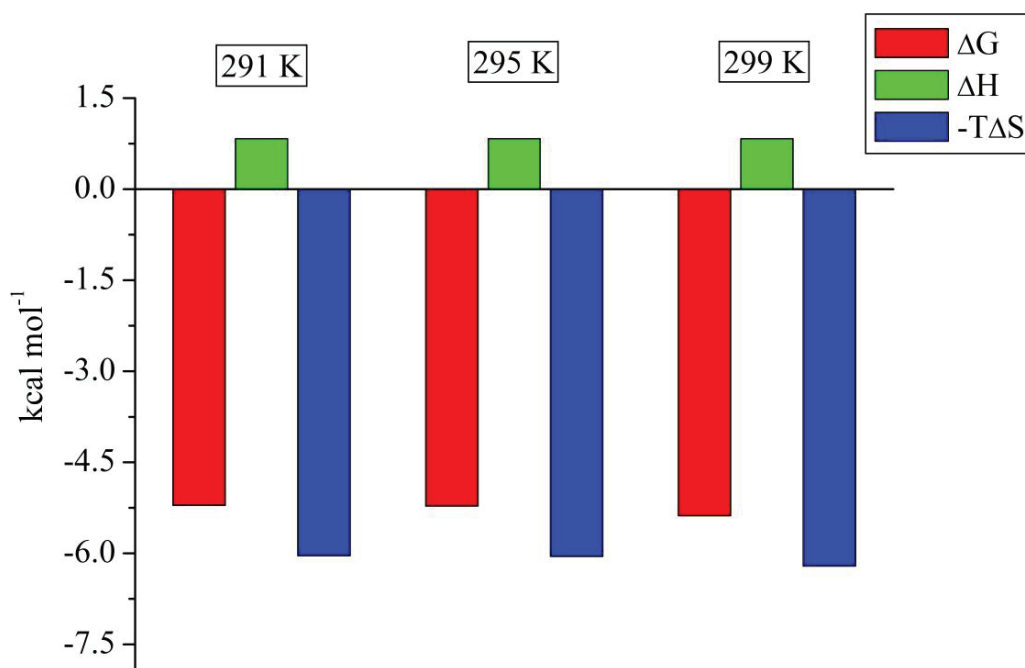
As cumarinas são metabólitos secundários, atuando principalmente na defesa das plantas [42]. Elas foram primeiramente encontradas em sementes de *Dipteryx odorata* selvagem, uma árvore popularmente conhecida como Cumaru, nativa no Brasil, Colômbia, Peru e Guiana [37].

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

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 milissegundos) 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. Eghbalnia, 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.