

RESSALVA

Atendendo solicitação do
autor, o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente a
partir de 03/04/2026

RENAN PEREIRA PEDRO

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

São José do Rio Preto

2024

RENAN PEREIRA PEDRO

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

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

Financiadora: CNPq - Processo: 140306/2020-0

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso

Coorientador: Dr. Raphael Vinícius Rodrigues Dias

São José do Rio Preto

2024

P372a Pedro, Renan Pereira.

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

173 f. : il., tabs., fotos

Orientador: Fernando Alves de Melo

Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso

Coorientador: Raphael Vinicius Rodrigues Dias

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

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

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

RENAN PEREIRA PEDRO

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

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

Financiadora: CNPq - Processo: 140306/2020-0

Comissão Examinadora:

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

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

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

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

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

São José do Rio Preto

03 de abril de 2024

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

“But still, like air, I’ll rise.”

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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