UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Jéssica Andrade Tedesco

Estudos moleculares e de interação com Cumarina (1,2-Benzopirona) da proteína Grb2 e seus mutantes Grb2 W121A e Grb2 W60A

São José do Rio Preto
2023

Jéssica Andrade Tedesco

Estudos moleculares e de interação com Cumarina (1,2-Benzopirona) da proteína Grb2 e seus mutantes Grb2 W121A e Grb2 W60A

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

São José do Rio Preto

2023

T256e

Tedesco, Jéssica Andrade

Estudos moleculares e de interação com Cumarina (1,2-Benzopirona) da proteína Grb2 e seus mutantes Grb2 W121A e Grb2 W60A / Jéssica Andrade Tedesco. -- São José do Rio Preto, 2023

179 p. : il., tabs.

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

Orientador: Fernando Alves de Melo

1. Grb2. 2. Cumarina. 3. pH. 4. Flexibilidade Proteica. 5. Dimerização Proteica. 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.

Jéssica Andrade Tedesco

Estudos moleculares e de interação com Cumarina (1,2-Benzopirona) da proteína Grb2 e seus mutantes Grb2 W121A e Grb2 W60A

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

Financiadora: CAPES

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador
Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida
Universidade Estadual do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho
USP - Ribeirão Preto
Profa. Dra. Rosângela Itri
USP - São Paulo
Prof. Dra. Eneida de Paula
UNICAMP

São José do Rio Preto

15 de setembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a minha mãe, por todo apoio ao longo destes 32 anos. Como ela mesma me escreveu em uma carta em 2016 “Percorremos sempre juntas este caminho e nem sempre foi fácil, não é filha? Mas hoje tenho certeza de que tudo valeu a pena”. Agradeço todos os conselhos, todos os puxões de orelha que me fizeram a pessoa que sou hoje, e principalmente, por todos os longos telefonemas em momentos em que eu precisava desabafar e compartilhar minhas frustrações e vitórias. Ao meu pai, que mesmo de longe, sempre me apoiou e me ajudou a ser a pessoa que sou hoje. Todos os conselhos sobre eletricidade e mecânica. Ao meu gordinho por todas as risadas compartilhadas e todas as comidas deliciosas. Mesmo de longe, eu sempre quero compartilhar do seu crescimento e das suas conquistas. À minha avó de coração e criação, Di, agradeço todo o apoio que vem me dando desde pitiquinha. É muito bom poder compartilhar as minhas conquistas com você e sempre aprender com a sua bondade comigo e com a minha família. Com certeza sem você nada disso seria possível. À minha incrível prima, Flávia, por me apresentar e incentivar o vício da leitura. Você criou um monstrinho dentro de mim que eu jamais serei capaz de agradecer o suficiente.

Agradeço ao meu eterno Grupo A, Giovana e Raphael por todas as conversas no WhatsApp de madrugada sobre crises existenciais e muita risada também. Giovana, você se tornou uma enorme surpresa na minha vida. Obrigado por todo o companheirismo dentro e fora do laboratório. Obrigado por surtar comigo após conversas com o Fernando, por todo apoio experimental e emocional. Com certeza grande parte das discussões desse trabalho não teriam sido possíveis sem você e nossas intermináveis conversas e teorias. Obrigado pelas viagens a congressos e para realizar experimentos …. e nossas maravilhosas idas ao Outlet. Raphael, estamos juntos desde a graduação e minha admiração e carinho por você só aumenta com o passar do tempo. Obrigado pela paciência com a pessoa aqui que não entende nada de computacional, por todo o trabalho que eu te passei, e vou continuar te passando, e por todas as conversas sobre “o que mais a gente pode fazer pra corroborar esses resultados?”. Sem sombra de dúvidas o meu doutorado não seria o mesmo sem vocês dois.

Ao meu orientador, Fernando, obrigado pela confiança no meu trabalho e na minha pessoa. Obrigado por me dar a liberdade de escolher por qual caminho seguir, mesmo que não tenha dado certo algumas vezes, isso com certeza me tornou a pesquisadora que sou hoje. Obrigado por todas as conversas, mesmo aquelas em que eu tive crises existenciais acerca de todo o meu trabalho. Obrigado pelos churrascos, hamburguers, outbacks, espetinhos. E, principalmente, obrigado pelos memes que só pessoas com o humor peculiar igual ao nosso aproveitam. Fico muito feliz de saber que, além de professor e orientador, posso te chamar de amigo.

Agradeço ao Ícaro por sempre aguentar todos os meus surtos relacionados à Ressonância e todos os ensinamentos nesses 6 anos, desde o meu mestrado. Sem dúvidas, grande parte deste trabalho não seria possível sem o seu apoio e conhecimento.

Agradeço aos amigos que fiz durante cursos e congressos e, principalmente, ao bonde da Grb2: Ramon e Alexia. Obrigado por compartilharem comigo o conhecimento dessa proteína que virou o meu filho e por todas as discussões acerca deste trabalho.

Ao Sirius pela oportunidade de realizar os experimentos de Infravermelho com o auxílio de profissionais tão competentes e dispostos a ensinar. Lucyano e Francisco, obrigado por todas as dúvidas sanadas e alguns meses de preparação para que os experimentos fossem realizados.

À banca por aceitar avaliar e contribuir com este trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física, por todo auxílio e ensinamentos. Ao CMIB e IBILCE pela infraestrutura proporcionada para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Processo 88882.434373/2019-01).

“A ciência nunca resolve um problema

sem criar pelo menos outros dez”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

O desenvolvimento do câncer envolve uma série de alterações genéticas e epigenéticas que permitem o escape do controle homeostático das células, suprimindo inapropriadamente a proliferação e inibição da sobrevivência de células. Uma das alterações é a elevação do pH intracelular por volta de 7.0 para 8.0. A proteína adaptadora Grb2 está largamente envolvida em uma variedade de carcinomas devido ao seu papel crucial em vias de sinalização responsáveis pelo crescimento e proliferação celular. Propõe-se, então, neste estudo caracterizar possíveis mudanças conformacionais e dinâmicas da proteína Grb2 WT relacionada à modificação do pH e a importância dos triptofanos 60 e 121 localizados no domínio SH2 através de mutações pontuais por alanina. As proteínas Grb2 WT e W60A apresentaram estrutura predominante em dímero, enquanto W121A apresenta uma prevalência da estrutura monomérica. As estruturas diméricas apresentam um aumento do diâmetro hidrodinâmico dependentes do aumento do pH. Para Grb2 WT, este aumento do diâmetro acompanha um aumento de estruturas desordenadas, conferindo uma maior flexibilidade para a proteína. No caso de Grb2 W60A, observou-se um aumento de hélices α e folhas β, sendo que a primeira ocupa um volume maior do que a segunda, corroborando com os dados de DLS, e conferindo maior estabilidade para o pH 8.0. O monômero de Grb2 com a mutação W121A, ainda não relatado na literatura, apresenta um diâmetro estável com variação de 0.1 nm entre os pHs e sem alteração significativa de sua estrutura secundária dependente do aumento de pH. A molécula de Cumarina tem recebido muita atenção na última década devido às suas propriedades anticancerígenas, embora faltem estudos à nível molecular. Um estudo conduzido por Sanches *et al.* (2019) caracterizou a interação com a proteína Grb2 em pH 8.0 através da técnica de Espectroscopia de Fluorescência com excitação em 290 nm, a qual pode apresentar contribuições significativas da excitação de Tirosinas. Desta forma, optou-se pela caracterização da interação entre as moléculas e as estruturas diméricas WT e W60A em ambos os pHs com excitação em 295 nm. Ambas as interações são espontâneas e governadas por contribuições hidrofóbicas, com constante de associação na ordem de 10^4 M^{-1}. As constantes de Hill para ambas as proteínas demonstram uma interação com cooperatividade negativa em pH 7.0 (n_H~0.7) e não cooperativa para pH 8.0 (n_H~1.0). A diferença de interação entre as proteínas se caracteriza pelo fato do mecanismo de supressão em pH 7.0 ser estático para a *wildtype* e dinâmico para W60A. De forma geral, a semelhança entre as interações da proteína Grb2 WT e Grb2 W60A indica que a cumarina apresenta sítio de interação próximo ao triptofano 121, como proposto por Sanches *et al.* (2019) através de análises computacionais. Quanto à estrutura secundária das proteínas, a molécula de Cumarina apresenta uma tendência de ordenação, apresentando um aumento de folhas β para a proteína Grb2 WT e de α hélices para Grb2 W60A. Os resultados apresentados podem ser essenciais para o entendimento de possíveis mecanismos de restauração de sinais aberrantes em vias de sinalização provocados pela basificação do meio intracelular, além de aumentar o entendimento da interação da molécula de Cumarina e comprovar a importância do triptofano 121 no processo de dimerização da proteína Grb2 WT.

PALAVRAS-CHAVE: Grb2. Cumarina. pH. Flexibilidade proteica. Dimerização proteica

ABSTRACT

Cancer development involves a series of genetic and epigenetic alterations leading to disruption of cellular homeostasis, proliferation suppression, and survival inhibition. One of the changes is intracellular pH elevation from around 7.0 to 8.0. The adapter protein Grb2 is widely involved in various carcinomas due to its crucial role in signaling pathways responsible for cell growth and proliferation. This study aims to characterize potential conformational and dynamic changes of Grb2 WT under pH modification and the significance of tryptophans 60 and 121 located in the SH2 domain via alanine point mutations. Grb2 WT and W60A proteins exhibit predominant dimeric structure, while W121A display a prevalent monomeric structure. Dimeric structures show an increase in hydrodynamic diameter with pH increase. For Grb2 WT, this diameter increase correlates with enhanced disordered structures, imparting greater flexibility. Grb2 W60A exhibits increased α-helix and β-sheet formation, particularly favoring α-helix at pH 8.0, providing greater stability. The monomer of Grb2 with W121A mutation, not reported in literature, displays a stable diameter with minimal secondary structure change across pH variations. Coumarin molecule has received attention for its anticancer properties, with limited molecular-level studies. A study by Sanches *et al.* (2019) characterized the interaction with Grb2 protein at pH 8.0 via Fluorescence Spectroscopy with 290 nm wavelength excitation, potentially involving tyrosine excitation. Here, the interaction between the molecule and dimeric WT and W60A structures is characterized at both pHs with 295 nm excitation. Interactions are spontaneous and governed by hydrophobic contributions, with binding constants around 10^4 M^{-1}. Hill coefficients display negative cooperativity at pH 7.0 (n_H~0.7) and non cooperative at pH 8.0 (n_H~1.0). Interaction difference arises from pH 7.0 suppression mechanism being static for *wildtype* and dynamic for W60A. Overall, similarity in Grb2 WT and Grb2 W60A interactions suggests Coumarin's interaction site near tryptophan 121, as proposed by Sanches *et al.* (2019) via computational analyses. Regarding protein secondary structures, Coumarin tends to induce ordering, increasing β-sheets for Grb2 WT and α-helix for Grb2 W60A. Presented results may be key to understanding potential restoration mechanisms of aberrant signaling pathways due to intracellular alkalinization, enhancing the knowledge of coumarin interactions and confirming the importance of tryptophan 121 in the Grb2 WT protein dimerization process.

KEYWORDS: Grb2. Coumarin. pH. Protein Flexibility. Protein Dimerization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Número estimado de casos incidentes de câncer mundialmente em 2020 para ambos os sexos. Mama (2.2 milhões), Pulmão (2.2 milhões), Colorretal (1.9 milhão), Próstata (1.4 milhão), Estômago (1.0 milhão), Fígado (0.9 milhão), Útero (0.8 milhão), Esôfago (0.6 milhão), Tireoide (0.58 milhão) e Bexiga (0.57 milhão).	40
Figura 2 –	Incidência mundial de câncer em 2020. (A) Sexo feminino – predominância dos canceres de mama e útero. (B) Sexo masculino – maior heterogeneidade nos tipos de câncer com maior predominância dos canceres de próstata e pulmão.	41
Figura 3 –	Três tipos de sinais encontrados em animais. (A) Endócrino – o sinal é transportado pela corrente sanguínea até uma célula alvo. (B) Parácrino – o sinal age em uma célula vizinha. (C) Autócrino – o sinal age na própria célula que o produz.	42
Figura 4 –	Principais características adaptativas em células cancerígenas.	43
Figura 5 –	Exemplos de proteínas receptoras de membrana. (A) Proteínas acopladas a canais iônicos. (B) Proteínas receptoras acopladas à proteína G. (C) Proteínas receptoras com atividade enzimática.	45
Figura 6 –	Esquema representativo da formação do complexo heterotetrâmero do dímero de Grb2 (domínio cSH3 em vermelho, domínio SH2 em verde e nSH3 em azul) e FGFR2 (azul). O complexo inicial com excesso de Grb2 se transforma em um complexo 2:2 com adição de FGFR2 até a saturação do sistema.	47

Figura 7 – Representação do mecanismo de controle da ativação de FGFR2 por Grb2. (A) Estado basal do complexo FGFR2 – Grb2. Grb2 (domínio cSH3 em vermelho, domínio SH2 em verde e nSH3 em azul) se liga através de seu domínio cSH3 na região C-terminal de FGFR2, resultando no heterotetrâmero 2:2. O domínio quinase (azul) possui mobilidade suficiente para a fosforilação de alguns resíduos de tirosina (incluindo Y653 e Y654). Receptor ativo, sinalização inativa. (B) Fatores de crescimento extracelular (marrom) e HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycan*) (preto) se ligam à parte extracelular de FGFR2. Mudanças conformacionais ocorrem resultando na fosforilação de Grb2 pelo domínio quinase de FGFR2. (C) Grb2 fosforilada se desliga do receptor por repulsão eletrostática. O domínio quinase de FGFR2, na ausência de Grb2, se torna totalmente ativo acessando resíduos de tirosina previamente localizados na interface FGFR2 – Grb2 por transfosforilação. Receptor ativo, sinalização ativa. 48

Figura 8 – Esquema representativo da ativação da via de sinalização da MAPK. Inicialmente, FGFR2 é ativada pela ligação de um fator de crescimento externo, ativando a proteína RAS através da molécula adaptadora Grb2, a qual recruta um fator de troca do nucleotídeo guanina (SOS), o qual realiza a catálise, induzindo RAS a trocar seu GDP por GTP. O processo se segue pela estimulação sequencial de proteínas quinases, como a RAF, MEK e ERK. As ERK migram para o núcleo celular fosforilando um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, dando início ao processo de proliferação celular. 49

Figura 9 –	Representação da estrutura cristalográfica da proteína Grb2 dimérica (domínio cSH3 em vermelho, SH2 em verde e nSH3 em azul).	50
Figura 10 –	Estrutura tridimensional do domínio cSH3 adaptada da estrutura cristalográfica da proteína adaptadora Grb2 através do PDB ID: 1GRI.	51
Figura 11 –	Estrutura tridimensional do domínio SH2 com a nomenclatura de suas respectivas estruturas secundárias e a alça EF.	52
Figura 12 –	Estrutura tridimensional cristalográfica do dímero de SH2 formado através de *domain-swapping*. Os protômeros foram identificados de cores diferentes para evidenciar a troca da hélice α3 e o alongamento da alça EF.	53
Figura 13 –	Estrutura tridimensional do dímero da proteína Grb2 mediado pelo *domain-swapping* dos domínios SH2.	54
Figura 14 –	Exemplos de Cumarinas com suas respectivas estruturas planares.	55
Figura 15 –	(A) Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 dimérica em pH 8.0 na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula de Cumarina.	57
Figura 16 –	Epítopos da molécula de Cumarina interagindo com a proteína Grb2 em pH 8.0 computados através da técnica de STD.	57
Figura 17 –	Representação do complexo Grb2-Cumarina para a interação com os aminoácidos destacados do domínio SH2 obtidos computacionalmente.	58

Figura 18 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 Y160F em pH 7.0 e 8.0 na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula de Cumarina. 59

Figura 19 – Epítopos da molécula de Cumarina interagindo com a proteína Grb2 Y160F em pH 7.0 (A) e 8.0 (B) computados através da técnica de STD. 60

Figura 20 – Representação do complexo Grb2 Y160F-Cumarina para a interação em pH 7.0 e 8.0 com os aminoácidos destacados do domínio SH2 obtidos computacionalmente. 61

Figura 21 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 WT por afinidade ao Cobalto. MM – Marcador de massa molecular (kDa); Flow – proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 – 1000 mM – concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. 74

Figura 22 – Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 WT em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). Nota-se um deslocamento no volume de eluição dependente do pH. 75

Figura 23 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 WT obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas do DSC para a proteína Grb2 WT foram obtidas entre 20 e 80 ºC com taxa de aquecimento de 1 ºC/min. Em preto, tem-se a curva experimental obtida, em vermelho seu respectivo *fit*. Em verde tem-se a primeira deconvolução, seguida da segunda em azul e da terceira em ciano. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para se ajustar à curva experimental e cada uma delas pode ser associada aos três domínios da proteína. (A) Em pH 7.0 é observado um termograma estreito, correspondente à uma maior cooperatividade entre os domínios durante o processo de desnaturação térmica. (B) Um termograma mais amplo pode ser observado em pH 8.0, significando que os domínios desnaturam mais independente uns dos outros em um processo no qual a cooperatividade térmica é significativamente baixa. 76

Figura 24 – Gráfico de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 WT em diferentes pHs básicos: 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). Nota-se em ambas as curvas a presença de dois picos, sendo o primeiro muito mais presente com porcentagem em massa perto de 100%, o qual foi considerado neste trabalho. 79

Figura 25 – Coeficiente de correlação da proteína Grb2 WT em pH 7.0 (preto) e pH 8.0 (vermelho) ao longo do tempo. O menor decaimento do coeficiente em pH 8.0 indica um volume maior ocupado pela proteína quando comparado com a amostra em pH 7.0, a qual apresenta um decaimento mais rápido do coeficiente de correlação. 80

Figura 26 – Parâmetros de relaxação T1 e T2 para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) para 7.54 ppm adquiridos por medidas de ^{1}H – RMN. Ambos os parâmetros foram ajustados exponencialmente pelas equações presentes em cada gráfico. 81

Figura 27 – Espectro de Infravermelho da proteína Grb2 WT nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). 83

Figura 28 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 7. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta (~1680 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}). 84

Figura 29 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 8. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em verde é característica de alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}). 85

Figura 30 – Espectro 2D $^{1}H,^{15}N$-HSQC de 350 µM de Grb2 WT em 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.0 contendo 50 mM NaCl, 1 mM BME, 90% H_2O/10% D_2O. Os assinalamentos foram realizados através de comparação com assinalamentos dos domínios SH2 e cSH3 isolados depositados no *Biological Magnetic Resonance Bank* com IDs 27781 (SH2) e 18748 (cSH3). 87

Figura 31 – Espectro 2D $^{1}H,^{15}N$-HSQC de 350 µM de Grb2 WT em 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 contendo 50 mM NaCl, 1 mM BME, 90% H_2O/10% D_2O. Os assinalamentos foram realizados através de comparação com assinalamentos dos domínios SH2 e cSH3 isolados depositados no *Biological Magnetic Resonance Bank* com IDs 27781 (SH2) e 18748 (cSH3). 88

Figura 32 – Sobreposição dos espectros 2D $^{1}H,^{15}N$-HSQC da proteína Grb2 WT com concentração de 350 µM em 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.0 (verde) e pH 8.0 (roxo) contendo 50 mM NaCl, 1 mM BME, 90% H_2O/10% D_2O. Os resíduos de aminoácidos em comum de ambos os pHs são mostrados na figura e as setas indicam os que apresentam maior deslocamento. Tais resíduos de aminoácidos são mostrados em maior resolução na parte inferior da figura. 89

Figura 33 – ^{15}N perturbação do deslocamento químico (CSP) por resíduo de aminoácido de Grb2 WT. Os valores de CSP foram obtidos através do *software* CcpNMR por comparação entre os espectros do pH 7.0 e pH 8.0 e plotados no programa Origin Pro 8. A linha cheia faz referência à média dos deslocamentos (0.012 ppm) e tal média acrescida do desvio padrão é definida pela linha pontilhada (0.019 ppm). 90

Figura 34 – Estrutura da proteína Grb2 WT cristalográfica (PDB: 1GRI). Os resíduos de aminoácido com maiores valores de CSP estão destacados em amarelo. A grande maioria destes estão localizados em estruturas secundárias ordenadas (hélices-alfa para o SH2 e fitas-beta para o cSH3). 91

Figura 35 – Diferenças de cargas teóricas em pH 7.0 e 8.0 para a proteína Grb2 WT. A) Estrutura cristalográfica dimérica da proteína Grb2 WT (PDB: 1GRI). As cores representam os domínios cSH3 (azul), SH2 (vermelho) e nSH3 (laranja), assim como as cadeias A (azul) e B (cinza). Os resíduos destacados apresentam mudanças na protonação em pH 7.0 e 8.0. B) Representação da superfície da estrutura cristalográfica de Grb2 WT colorida de acordo com o potencial eletrostático e mostrando as regiões que são afetadas pelas mudanças de protonação. 93

Figura 36 – Análise da dinâmica molecular. A) *Root-Mean-Square Fluctuations* (RMSF) da proteína Grb2 WT e sobreposição das estruturas durante os 500 ns da dinâmica molecular. B) Área Acessível ao Solvente (SASA). C) Raio de giro. Todos os gráficos e estruturas foram coloridos de acordo com a protonação relativa ao pH. 94

Figura 37 – Decomposição do movimento da dinâmica molecular. A) Vetores representando dois movimentos com maior amplitude de Grb2 WT durante a dinâmica molecular. As estruturas representam o movimento calculado por esses vetores. Estas foram coloridas de acordo com a direção do movimento indicado pela flecha na barra de cores. B) Vetores com maior intensidade são mostrados, 96

indicando a direção e movimento da estrutura da proteína.

Figura 38 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 295 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 98

Figura 39 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 295 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo de fluorescência em maior resolução. 99

Figura 40 – Gráfico de Stern-Volmer. Supressão da fluorescência de Grb2 WT nas temperaturas 291 (preto), 295 (azul) e 299 K (vermelho) pela concentração de Cumarina. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. 100

Figura 41 – Gráfico Duplo-log. Dados relativos ao efeito da supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2 WT na presença de Cumarina, para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B), nas temperaturas 291 (preto), 295 (vermelho) e 299 (azul) K. Inserido no canto superior direito encontra-se o gráfico de van’t Hoff, responsável pela determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação. 101

Figura 42 – Parâmetros termodinâmicos caracterizados através do ajuste linear do gráfico de van’t Hoff para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B). Em rosa está a contribuição da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde a entalpia (ΔH), e em roxo a 104

entropia (ΔS) levando em consideração a temperatura analisada.

Figura 43 – Espectro de STD do complexo Grb2 WT – Cumarina em pH 7.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre Grb2 WT e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 WT. 106

Figura 44 – Espectro de STD do complexo Grb2 WT – Cumarina em pH 8.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre Grb2 WT e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 WT. 106

Figura 45 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 7 contendo o dobro de Cumarina em concentração. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. As deconvoluções em vermelho e verde são características de voltas beta (~1680 e 1680 cm^{-1}), em azul alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em ciano representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em rosa e amarelo duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}). 108

Figura 46 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 8 com o dobro da concentração de Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em vermelho é característico de voltas beta (~1690 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}), em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}) e em amarelo estruturas de agregados de fita beta (~1610 cm^{-1}). 110

Figura 47 – Domínio SH2 da proteína Grb2 (PDB: 1GHU) [60] com os triptofanos 60 (vermelho) e 121 (azul) destacados. 114

Figura 48 – Frustração conformacional da proteína Grb2 WT (acima) e com a mutação W60A (abaixo). As linhas em vermelho demonstram regiões frustradas conformacionalmente da proteína, enquanto que em verde, as regiões não-frustradas. 115

Figura 49 – Contatos realizados pelo resíduo 60 da proteína Grb2 em sua estrutura cristalográfica quando este é um triptofano (contatos específicos em vermelho) e quando este é uma alanina (contatos específicos em verde). Os resíduos marcados em azul são comuns para os dois resíduos (triptofano e alanina). Cada resíduo em contato está especificado na parte direita da imagem, assim como a distância deste ao resíduo 60 e a porcentagem em que o contato acontece durante a dinâmica molecular. 116

Figura 50 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 W60A por afinidade ao Cobalto. MM - Marcador de massa molecular (kDa); Flow - proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 - 1000 mM - concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. 117

Figura 51 – Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). 118

Figura 52 – Sobreposição dos perfis cromatográficos da proteína Grb2 WT (preto) e Grb2 W60A (vermelho) em pH 7.0. 118

Figura 53 – Gráfico de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 W60A nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). 119

Figura 54 – Coeficiente de correlação da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) ao longo do tempo. 120

Figura 55 – Gráfico de espalhamento dinâmico da luz comparativo das proteínas Grb2 WT e W60A em pH 8.0 demonstrando um maior diâmetro hidrodinâmico para a proteína. 121

Figura 56 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 7.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta (~1680 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 122

cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).

Figura 57 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}). 124

Figura 58 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 295 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito a região de máximo da fluorescência encontra-se em maior resolução. 127

Figura 59 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 290 nm e temperatura de 295 K. No canto superior direito apresenta-se a região de máximo de fluorescência em maior resolução. 128

Figura 60 – Gráfico de Stern-Volmer. Supressão da fluorescência de Grb2 W60A nas temperaturas 291 (preto), 295 (azul) e 299 K (vermelho) pela concentração de Cumarina. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. 129

Figura 61 – Gráfico Duplo-log. Dados relativos ao efeito da supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2 W60A na presença de Cumarina, para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B), nas temperaturas 291 (preto), 295 (vermelho) e 299 K (azul). Inserido no canto superior direito encontra-se o gráfico de van't Hoff, responsável pela determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação. 131

Figura 62 – Parâmetros termodinâmicos caracterizados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B). Em rosa está a contribuição da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde a entalpia (ΔH), e em roxo a entropia (ΔS) levando em consideração a temperatura analisada. 133

Figura 63 – Espectro de STD do complexo Grb2 W60A - Cumarina em pH 7.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento de *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre a proteína e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 W60A. 135

Figura 64 – Espectro de STD do complexo Grb2 W60A - Cumarina em pH 8.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento de *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre a proteína e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 W60A. 135

Figura 65 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 7 contendo a mesma concentração de Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta (~1690 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}). 137

Figura 66 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em verde é característico de alfa-hélices (~1670 cm-1), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}), em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}). 139

Figura 67 – Frustração conformacional da proteína Grb2 WT (acima) e com a mutação W121A (abaixo). As linhas em vermelho mostram regiões frustradas conformacionalmente da proteína, enquanto que em verde, as regiões não-frustradas. 144

Figura 68 – Contatos realizados pelo resíduo 121 da proteína Grb2 em sua estrutura cristalográfica quando este é um triptofano (contatos específicos em vermelho) e quando este é uma alanina (contatos específicos em verde). Os resíduos marcados em azul são comuns para os dois resíduos (triptofano e alanina). Cada resíduo em contato está especificado na parte direita da imagem, assim como a distância deste ao resíduo 121 e a porcentagem em que o contato acontece durante a dinâmica molecular. 145

Figura 69 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 W121A por afinidade ao Cobalto. MM - Marcador de massa molecular (kDa); Flow - proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 - 1000 mM - concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. 146

Figura 70 – Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 W121A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). 146

Figura 71 – Sobreposição dos perfis cromatográficos das proteínas Grb2 WT (preto), W60A (vermelho) e W121A (azul) em pH 7.0 evidenciando a diferença no volume de eluição de cada uma das proteínas e a diferença em relação à proteína W121A. 147

Figura 72 – Gráficos de espalhamento dinâmico da luz: distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico (esquerda) e coeficiente de correlação (direita) da proteína Grb2 W121A em diferentes pHs básicos: 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) referentes ao primeiro pico de eluição da cromatografia por exclusão molecular. 148

Figura 73 – Gráficos de espalhamento dinâmico da luz: distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico (esquerda) e coeficiente de correlação (direita) da proteína Grb2 W121A nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) para o segundo pico de eluição da cromatografia por exclusão molecular. 149

Figura 74 – Distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico das proteínas Grb2 WT e Grb2 W121A nos pHs 7.0 (esquerda) e 8.0 (direita). 150

Figura 75 – Gráfico da variação do diâmetro das estruturas Grb2 WT dimérica (preto) e Grb2 W121A monomérica (vermelho) ao longo dos 300 ns de dinâmica molecular. 151

Figura 76 – Estrutura mais representativa do dímero de Grb2 WT (esquerda) e do monômero de Grb2 W121A (direita) e seu diâmetro associado. 151

Figura 77 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W121A em pH 7.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta (~1680 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}). 153

Figura 78 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W121A em pH 8.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em verde é característica de alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}). 154

Figura 79 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 291 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 170

Figura 80 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 299 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 171

Figura 81 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 291 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 172

Figura 82 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 299 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 173

Figura 83 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 291 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 174

Figura 84 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 299 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 175

Figura 85 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 291 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 176

Figura 86 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 299 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros termodinâmicos dos experimentos de DSC. Cada deconvolução em ambos os pHs estão associadas a diferentes temperaturas de *melting* e entalpias calorimétricas. As temperaturas de *melting* foram retiradas do valor máximo de C_p correspondente, enquanto as entalpias calorimétricas foram calculadas através da integração de cada deconvolução. 78

Tabela 2 – Mudanças de entalpia de van't Hoff associadas a cada curva de deconvolução nos pHs 7.0 e 8.0. A entalpia foi calculada pela equação de van't Hoff para cada deconvolução assim como para o termograma completo. 78

Tabela 3 – Valores médios de T_1 e T_2 dos 13 pontos analisados de 7.0 a 9.0 ppm em ambos os pHs. O valor maior razão T_1/T_2 em pH 8.0 indica que este possui um diâmetro maior do que a proteína em pH 7.0. 82

Tabela 4 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 7.0. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro. 85

Tabela 5 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho evidenciando o aumento percentual de estruturas desordenadas acompanhado com um decréscimo de folhas β. 86

Tabela 6 – Resíduos de aminoácidos com valores de perturbação de deslocamento químico maiores do que a média acrescida do desvio padrão e seus respectivos valores. 91

Tabela 7 – Constantes de supressão de Stern-Volmer. Valores obtidos para o complexo Grb2 WT – Cumarina nas temperaturas de 291 K, 295 K e 299 K através da inclinação da reta do ajuste linear para ambos os pHs. 101

Tabela 8 – Coeficiente de Hill (n_H) e constante de associação (K_a) determinados através dos gráficos de duplo-log para as três temperaturas em ambos pHs. 103

Tabela 9 – Parâmetros termodinâmicos para os pHs 7.0 e 8.0 determinados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff. 105

Tabela 10 – Valores dos epítopos da molécula de Cumarina na interação com Grb2 WT nos pHs 7.0 e 8.0. 107

Tabela 11 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 7.0 com o dobro da concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro. 109

Tabela 12 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 8.0 com o dobro da concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro. 110

Tabela 13 – Comparação das porcentagens de estruturas secundárias (α hélices, folhas β e estruturas desordenadas) da proteína Grb2 WT pura nos pHs 7.0 e 8.0 e da interação entre Cumarina e Grb2 WT em pH 8,0 na proporção 2:1. 111

Tabela 14 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 com seus respectivos centros e porcentagens. 123

Tabela 15 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com seus respectivos centros e porcentagens. 125

Tabela 16 – Constantes de supressão de Stern-Volmer. Valores obtidos para o complexo Grb2 W60A – Cumarina nas temperaturas de 291, 295 e 299 K através da inclinação da reta do ajuste linear para ambos os pHs. 130

Tabela 17 – Coeficiente de Hill (n_H) e constante de associação (K_a) determinados através dos gráficos de duplo-log para as três temperaturas em ambos pHs. 132

Tabela 18 – Parâmetros termodinâmicos para os pHs 7.0 e 8.0 determinados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff. 134

Tabela 19 – Valores dos epítopos da molécula de Cumarina na interação com Grb2 W60A nos pHs 7.0 e 8.0. 136

Tabela 20 – Porcentagens calculadas através das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 W60A em pH 7.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi 138

calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.

Tabela 21 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro. 140

Tabela 22 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W121A em pH 7.0 com seus respectivos centros e porcentagens. 153

Tabela 23 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W121A em pH 8.0 com seus respectivos centros e porcentagens. 155

LISTA ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

ε - Coeficiente de extinção molar

l - Caminho Óptico

$\Delta\delta_N$ - Perturbação do deslocamento químico do Nitrogênio

$\Delta\delta_{HN}$ - Perturbação do deslocamento químico do Hidrogênio

ΔG - Energia Livre de Gibbs

ΔH - Entalpia

ΔH_{cal} - Entalpia calorimétrica

ΔH_{VH} - Entalpia de van't Hoff

ΔS - Entropia

Abs_{277} - Absorção da luz em 277 nm

Abs_{280} - Absorção da luz em 280 nm

I_0 - intensidade do espectro de *off-resonance*

I_{SAT} - intensidade do espectro *on-resonance*

I_{STD} - intensidade do espectro da diferença

t_{HN} - Tempo de aquisição para o Hidrogênio

T_m - Temperatura de *melting*

t_N - Tempo de aquisição para o Nitrogênio

A/ALA - Alanina

aa - Aminoácido

ATR - Reflexão Total Atenuada

BME - β-mercaptoetanol

BMRB - *Biological Magnetic Resonance Bank*

C - concentração

C/CIS - Cisteína

CcpNMR - *Collaborative Computational Project for NMR*

CPMG - *Carr-Purcell-Meiboon-Gill*

CSP, Δ□ - *Chemical Shift Perturbations*

D/ASP - Aspartato

D_H - Diâmetro hidrodinâmico

DLS - Espalhamento Dinâmico da Luz

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade Óptica

DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura

E/GLU - Glutamato

F/PHE - Fenilalanina

FGFR - Proteína receptora de fatores de crescimento tirosina quinase

FGFR2 - *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*

FRET - Transferência Ressonante de Energia por Fluorescência

FSD - Deconvolução de Fourier

G/GLY - Glicina

GAP - *Gtpase-Activating Protein*

Grb2 - *Growth Factor Receptor Bound Protein 2*

Grb2 W121A - Grb2 mutação Triptofano 121 por Alanina

Grb2 W60A - Grb2 mutação Triptofano 60 por Alanina

Grb2 WT - Grb2 *wildtype*

GST - Glutationa-S-transferase

H/HIS - Histina

HSPG - *Heparan Sulfate Proteoglycan*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*

I/ILE - Isoleucina

IPTG - Isopropil β-D-tiogalactopiranosida

ITC - Calorimetria de Titulação Isotérmica

K/LYS - Lisina

K_a - constante de afinidade

K_{sv} - Constante de Stern-Volmer

L/LEU - Leucina

LB - Meio líquido Luria-Bertani

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

M/MET - Metionina

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*

MM - Marcador de massa molecular

N/ASN - Asparagina

NF1 - *neurofibromin*

n_H - Coeficiente de Hill

OMS - Organização Mundial de Saúde

P/PRO - Prolina

PCA - *Principal component analysis*

PDB - *Protein Data Bank*

pH_e - pH extracelular

pH_i - pH intracelular

PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

pY - resíduo de tirosina fosforilada

Q/GLN - Glutamina

R/ARG - Arginina

Ras - *Rat Sarcoma virus protein*

RMSD - *Root mean square deviation*

RMSF - *Root mean square fluctuation*

RPM - Rotações por minuto

S/SER - Serina

SASA - *Accessible surface area*

SAXS - Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SH2 - *Src homology domain 2*

SH3 - *Src homology domain 3*

SOS - *Son of Sevenless*

STD - Diferença de Transferência de Saturação (*Saturation Transfer Difference*)

T/THR - Treonina

T1 - *Time-Lattice Relaxation*

T2 - *Transverse Relaxation*

V/Val - Valina

W/TRP - Triptofano

Y/TYR - Tirosina

SUMÁRIO

1.	**INTRODUÇÃO**	40
1.1.	**Fisiologia do Câncer**	42
1.2.	**Sinalização Celular**	44
1.3.	**A interação FGFR2-Grb2 e a via de sinalização da MAPK**	46
1.4.	**A proteína adaptadora Grb2**	49
1.5.	**A molécula de Cumarina**	55
1.6.	**Grb2 e sua interação com Cumarina**	56
2.	**MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS**	62
2.1.	**Objetivos específicos**	63
3.	**MATERIAIS E MÉTODOS**	64
3.1.	**Transformação dos plasmídeos recombinantes em células *Escherichia coli* linhagem TOP10**	64
3.2.	**Transformação em células *E. coli* linhagem BL21 DE3**	64
3.3.	**Expressão proteínas em meio não-marcado**	64
3.4.	**Expressão em Meio Mínimo isotopicamente marcado**	65
3.5.	**Purificação das proteínas**	65
3.6.	**Espectroscopia de Absorção UV-VIS**	66
3.7.	**Ressonância Magnética Nuclear**	66
3.7.1.	$^{1}H,^{15}N$-HSQC	67
3.7.2.	STD (*Saturation Transfer Difference*)	67
3.7.3.	^{1}H-RMN T1 (*Time-Lattice Relaxation*) e T2 (*Transverse Relaxation*)	68
3.8.	**Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**	68
3.9.	**Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)**	69
3.10.	**Espectroscopia de Fluorescência**	69
3.11.	**Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier**	71

3.12. **Dinâmica e análises computacionais** 72

4. **RESULTADOS** 74

4.1. **Grb2 WT** 74

4.1.1. Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0 74

4.1.1.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) 75

4.1.1.2. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) 79

4.1.1.3. T1 e T2 - ^{1}H-RMN 81

4.1.1.4. Estrutura Secundária por Infravermelho 82

4.1.1.5. ^{1}H,^{15}N-HSQC - RMN 86

4.1.1.6. Estudos Computacionais 92

4.1.2. Interação Grb2 WT e Cumarina nos pHs 7.0 e 8.0 97

4.1.2.1. Espectroscopia de Fluorescência 97

4.1.2.2. STD-RMN (*Saturation Transfer Difference*) 105

4.1.2.3. Estrutura Secundária por Infravermelho 107

4.1.3. Conclusões preliminares 111

4.2. **Grb2 W60A** 114

4.2.1. Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0 117

4.2.1.2. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) 119

4.2.1.3. Estrutura Secundária por Infravermelho 121

4.2.2. Interação Grb2 W60A e Cumarina pHs 7.0 e 8.0 125

4.2.2.1. Espectroscopia de Fluorescência 126

4.2.2.2. STD-RMN (*Saturation Transfer Difference*) 134

4.2.2.3. Estrutura Secundária por Infravermelho 136

4.2.3. Conclusões preliminares 140

4.3. **Grb2 W121A** 143

4.3.1. Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0 145

4.3.1.2. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) 147

4.3.1.3. Dinâmica Computacional 150

4.3.1.4. Estrutura Secundária por Infravermelho 152

4.3.2. Conclusões preliminares 155

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 157

REFERÊNCIAS 161

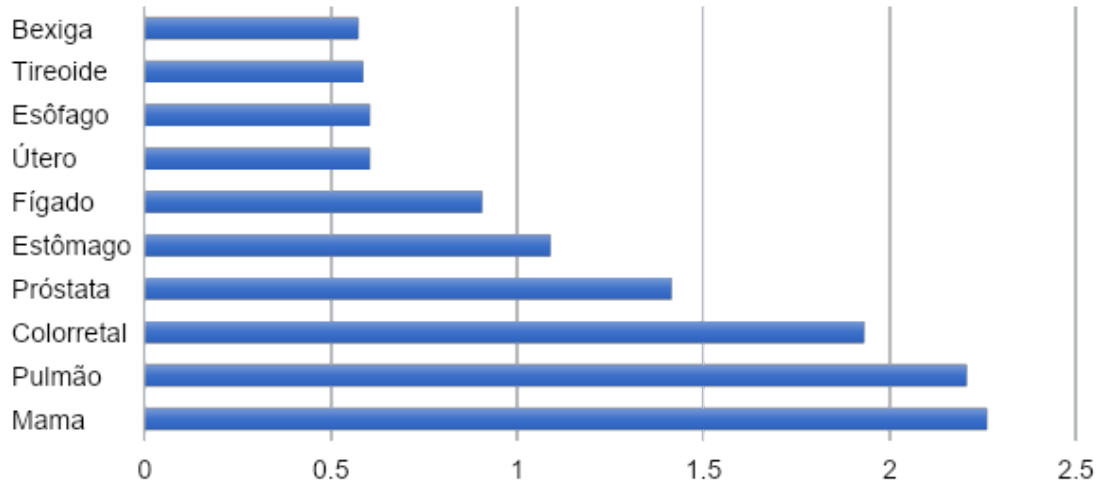
ANEXO A 170

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do câncer envolve sucessivas alterações genéticas e epigenéticas que permitem o escape do controle homeostático das células, suprimindo inapropriadamente a proliferação e inibição da sobrevivência de células aberrantes proliferadas fora de seus nichos normais. A maioria dos cânceres surgem em células epiteliais, manifestados por carcinomas em órgãos como pulmão, mama, pele, fígado e pâncreas. Sarcomas, por outro lado, surgem de tecidos mesenquimais, ocorrendo em fibroblastos, miócitos, adipócitos e osteoblastos. Tumores não epiteliais podem também se desenvolver em células do sistema nervoso (gliomas, neuroblastomas e medulo-blastomas) e tecidos hematopoiéticos (leucemia e linfoma) [1].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2020, haviam 18 milhões de novos casos de câncer, 9.8 milhões de mortes registradas e 44 milhões de pessoas vivendo com câncer a mais de 5 anos. Dentre as maiores ocorrências (Figura 1), podem ser citados os cânceres de mama (2.2 milhões), pulmão (2.2 milhões), colorretal (1.9 milhão), próstata (1.4 milhão) e estômago (1.0 milhão) [2].

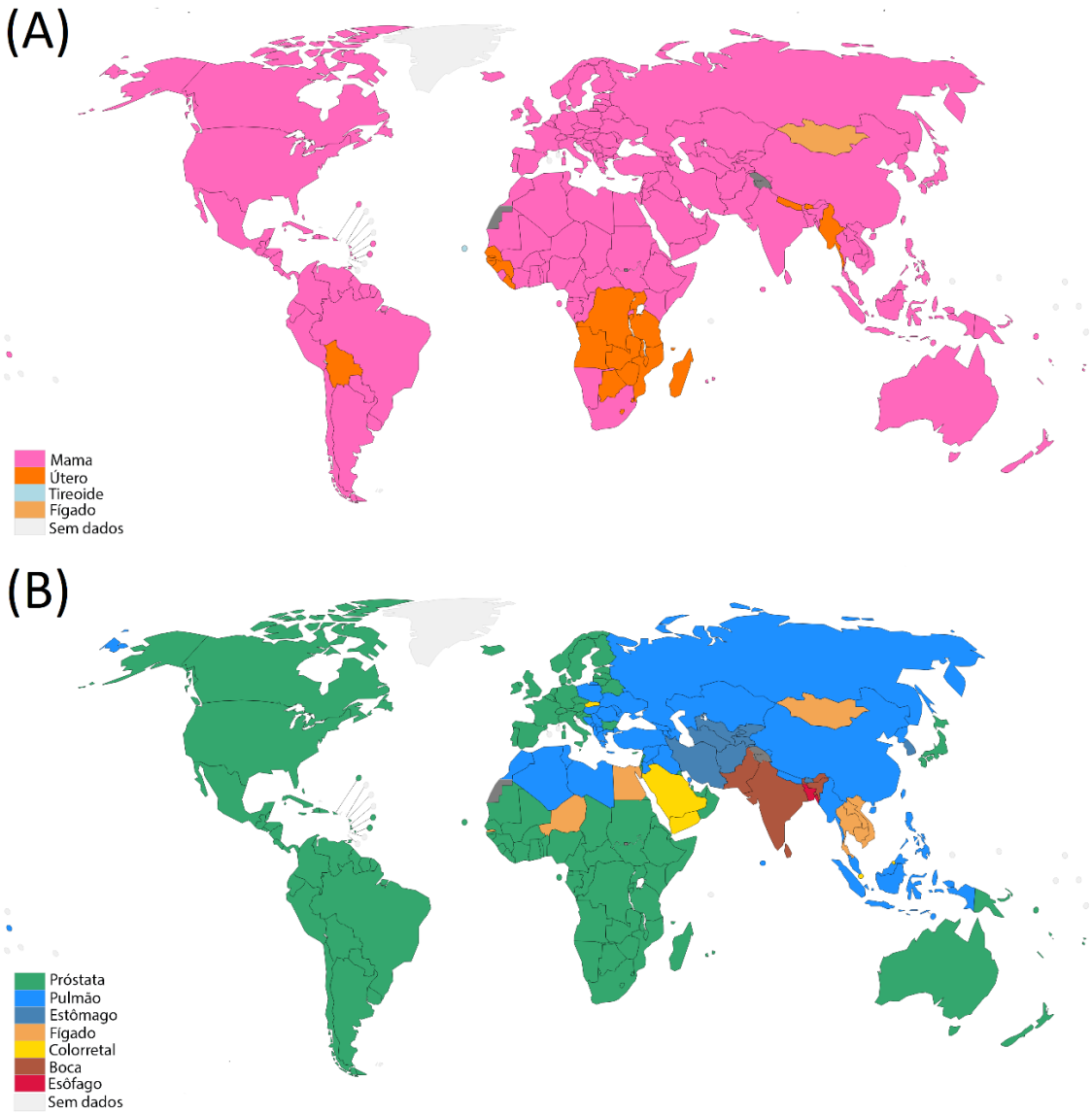
Figura 1 – Número estimado de casos incidentes de câncer mundialmente em 2020 para ambos os sexos. Mama (2.2 milhões), Pulmão (2.2 milhões), Colorretal (1.9 milhão), Próstata (1.4 milhão), Estômago (1.0 milhão), Fígado (0.9 milhão), Útero (0.8 milhão), Esôfago (0.6 milhão), Tireoide (0.58 milhão) e Bexiga (0.57 milhão).



Fonte: Adaptado de Sung *et al*. (2021) [2].

Para o sexo feminino, como pode ser observado na Figura 2, a predominância do câncer de mama e útero é vista mundialmente, com exceção de alguns casos de câncer de tireoide e fígado. Por outro lado, para o sexo masculino existe uma maior heterogeneidade nos tipos de câncer, sendo mais evidentes os de próstata e pulmão.

Figura 2 – Incidência mundial de câncer em 2020. (A) Sexo feminino – predominância dos canceres de mama e útero. (B) Sexo masculino – maior heterogeneidade nos tipos de câncer com maior predominância dos canceres de próstata e pulmão.

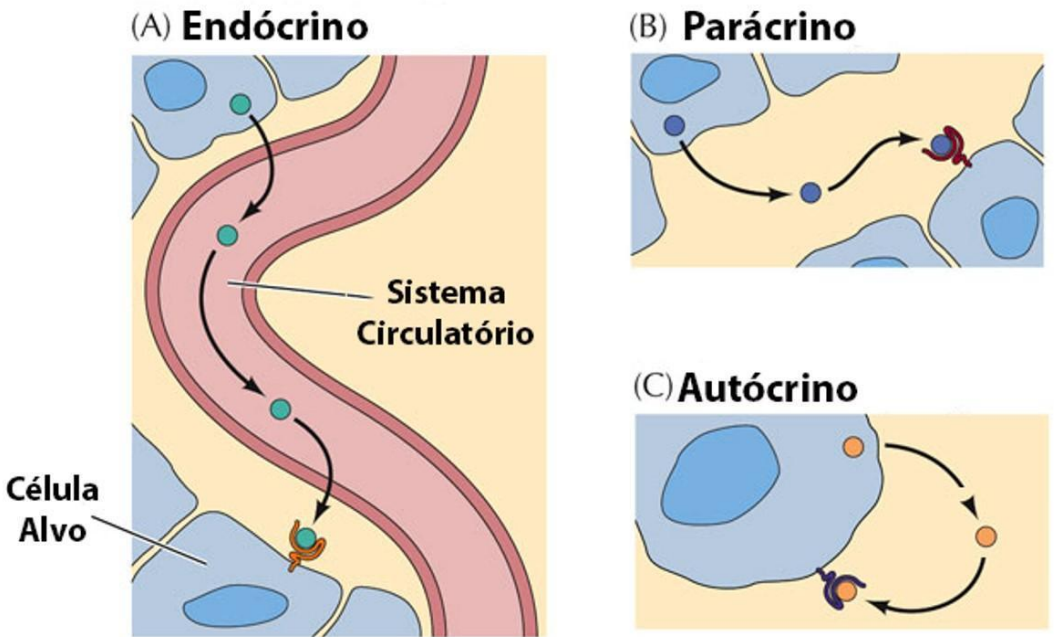


Fonte: Ferlay *et al*. (2021) [3].

1.1. Fisiologia do Câncer

As células normais de todo organismo vivo coexistem em perfeita harmonia citológica, histológica e funcional, harmonia esta orientada no sentido da manutenção da vida. A capacidade das células em receber e responder a sinais para além da membrana plasmática é fundamental para a manutenção da vida. Células recebem sinais constantes de proteínas de membrana que atuam como receptores de informação, monitorando o meio externo em relação ao oxigênio, disponibilidade de alimento, pH, força osmótica, luz e presença de substâncias químicas nocivas, predadores ou competidores de alimentos. Tais sinais geram respostas apropriadas, como o movimento na direção do alimento ou oposto a substâncias nocivas. Em animais, observam-se três categorias de sinais: autócrinos (agem na própria célula que o produz), endócrinos (transportados pela corrente sanguínea até uma célula alvo), ou parácrinos (agem em uma célula vizinha) (Figura 3). Em qualquer um dos casos, o sinal é detectado por um receptor específico e convertido em uma resposta celular [4], [5].

Figura 3 – Três tipos de sinais encontrados em animais. (A) Endócrino – o sinal é transportado pela corrente sanguínea até uma célula alvo; (B) Parácrino – o sinal age em uma célula vizinha; (C) Autócrino – o sinal age na própria célula que o produz.



Fonte: Adaptado de Krauss (2014) [4]

A estimulação da proliferação celular normal é quase sempre desencadeada por fatores de crescimento que se ligam aos receptores dispostos nas membranas celulares. O sinal recebido por esses receptores é transmitido para o citoplasma e, por fim, para o núcleo [6].

Células tumorais invasivas adquirem várias características adaptativas, incluindo autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios, evasão à apoptose e aumento do potencial replicativo. Oito características do câncer foram, e ainda são extensivamente estudadas (Figura 4) [1], [6].

Figura 4 – Principais características adaptativas em células cancerígenas.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011 [6].

A desregulação do pH também é uma característica adaptativa da maioria dos cânceres. Em células normais adultas, o pH extracelular (pH_e) varia entre 6.2 e 6.9, enquanto o pH intracelular (pH_i) entre 6.9 e 7.2. No entanto, células cancerosas apresentam pH_i acima de 7.4 e pH_e entre 6.7 e 7.1 [7]–[10]. Tal reversão no gradiente do pH celular cria um microambiente perfeito para a sobrevivência celular, garantindo às células resistência à apoptose, a qual é associada à acidificação do meio intracelular.

Embora a proliferação celular dependente do pH seja mediada por múltiplos mecanismos, um pH intracelular acima de 7.2 aumenta a taxa em que células estimuladas por fatores de crescimento entram na fase S, caracterizada pela síntese de cópias do DNA e duplicação do material genético, e progridem para as fases G2, na qual ocorre o aumento do volume celular, e fase M, ocorrendo a divisão da célula em duas novas [11]. Além disso, o aumento do pH intracelular suprime *checkpoints* de reparo de DNA, contribuindo para a instabilidade genética de células cancerosas [12]–[14].

Neste sentido, alterações no pH celular podem atuar como sinais regulatórios, modulando múltiplas proteínas que controlam a sinalização celular.

1.2. Sinalização Celular

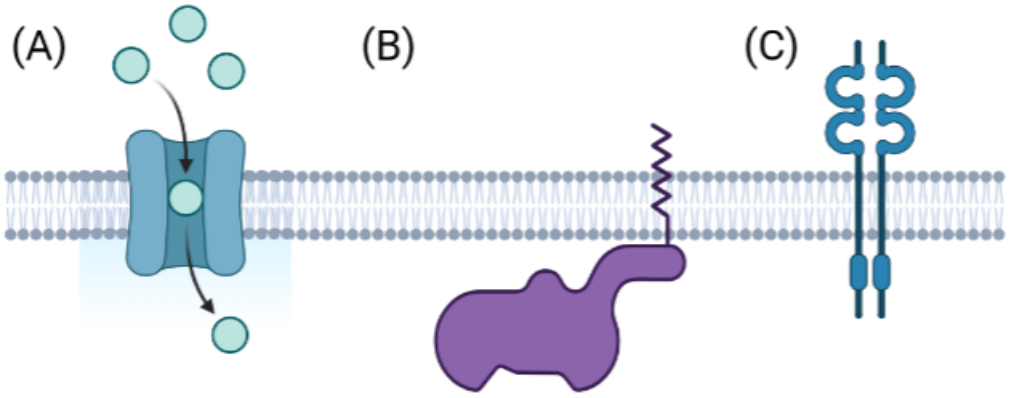
Inúmeras vias de sinalização mediadas por proteínas controlam respostas adequadas e específicas dentro da célula. As sinalizações celulares em eucariotos envolvem moléculas sinalizadoras denominadas ligantes que interagem com proteínas receptoras que se encontram na membrana celular, solúveis no meio citoplasmático ou até mesmo na membrana nuclear da célula. No caso de proteínas receptoras da membrana citoplasmática, elas encarregam-se de receber o sinal proveniente do ligante no meio extracelular e passá-lo para o meio intracelular e, assim, propaga-lo por meio de outras proteínas sinalizadoras encontradas no citosol até o núcleo. Estas sinalizações envolvem processos extremamente regulados dentro das células onde estímulos extracelulares são gerados por meio da interação de ligantes como hormônios, citocinas, fatores de crescimento, entre outros, com proteínas receptoras [15].

Uma vez que o ligante interage com a proteína receptora, este pode fazer com que um complexo proteico seja gerado, denominado ligação cruzada, podendo ainda ocasionar mudanças conformacionais na proteína receptora. Todavia, ambos irão resultar em mudanças geométricas na região citoplasmática da proteína receptora, possibilitando a interação com outras moléculas no citosol para que ocorra a sinalização celular [15].

As proteínas receptoras (Figura 5) encontradas na membrana celular são divididas de acordo com o seu mecanismo de transdução de sinal. Existem

proteínas receptoras que estão acopladas a canais iônicos, as receptoras acopladas à proteína G e as proteínas receptoras com atividade enzimática [5], [16].

Figura 5 – Exemplos de proteínas receptoras de membrana. (A) Proteínas acopladas a canais iônicos. (B) Proteínas receptoras acopladas à proteína G. (C) Proteínas receptoras com atividade enzimática.



Fonte: elaborado pela autora através do software Biorender

As proteínas receptoras que apresentam atividade enzimática são geralmente quinases, e se apresentam como proteínas alfa-hélice transmembrana com um sítio de interação com o ligante na porção extracelular e o sítio catalítico na região intracelular, como é o caso da proteína receptora de fatores de crescimento tirosina quinase (FGFR) [16]. A fosforilação, através da ligação de fatores de crescimento, aumenta a atividade quinase onde tirosinas fosforiladas e sequências vizinhas criam sítios de ancoragem para outras proteínas, como as adaptadoras, que são indispensáveis para a propagação da sinalização celular [17], [18].

As proteínas adaptadoras constroem vínculos, através de fosforilações e do reconhecimento de resíduos específicos onde diferentes enzimas são recrutadas para que a sinalização celular seja propagada. Estas contêm domínios específicos que permitem a interação proteína-proteína, como, por exemplo, os domínios do tipo SH2 (*Src homology domain 2*) e SH3 (*Src homology domain 3*) [19].

Para o funcionamento normal das células de diferentes tecidos, a propagação das informações é mediada por inúmeras 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, podem ocasionar o surgimento de tumores [6].

1.3. A interação FGFR2 – Grb2 e a via de sinalização da MAPK

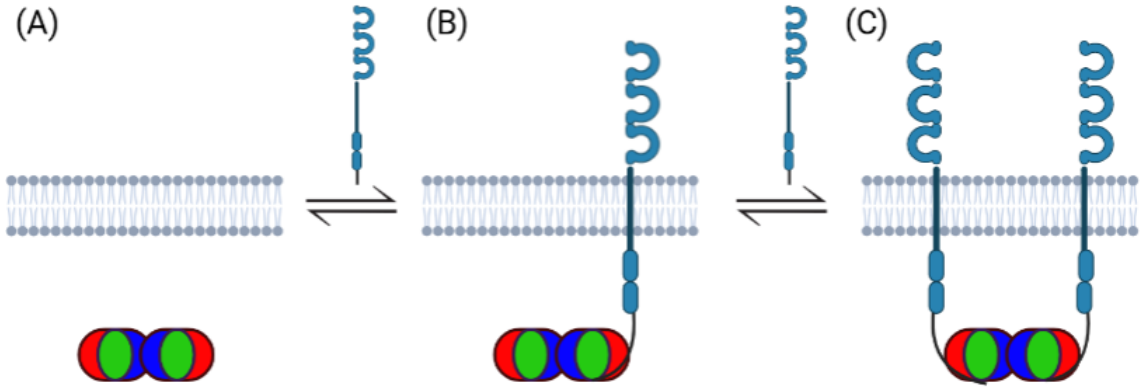
Um dos mecanismos envolvidos na sinalização celular, como dito anteriormente, é a interação entre proteínas responsáveis por transmitir estímulos extracelulares através de receptores da membrana plasmática até o núcleo celular. Sendo assim, a regulação da transdução do sinal para o interior da membrana é essencial para o controle de sinalizações aberrantes, responsáveis por uma série de carcinomas e síndromes.

A interação entre as proteínas FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) e a proteína Grb2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*) foi extensamente estudada ao longo dos anos [20]–[22]. Estudos de ITC (Calorimetria de Titulação Isotérmica), DLS (Espalhamento Dinâmico da Luz) e FRET (Transferência Ressonante de Energia por Fluorescência) determinaram propriedades acerca da interação entre Grb2 e a cauda terminal da proteína FGFR2 [20], [22]. A região C-terminal de FGFR2 apresenta vários motivos PxxP, provendo sítios de interação para o domínio cSH3 de Grb2, enquanto o domínio nSH3 não mostrou nenhum tipo de interação nos estudos acima. Ahmed *et al.* (2010) determinou a constante de ligação, através de estudos de interação entre sequências peptídicas equivalentes à cauda terminal de FGFR2 e Grb2. Grb2 cSH3 se liga à sequência C-terminal de FGFR2 com constante de dissociação na ordem de 10 – 100 μM, enquanto o domínio SH2 não se ligou a nenhum dos peptídeos estudados [20].

O dímero de Grb2, portanto, apresenta interação com a proteína FGFR2 de forma muito específica para a ativação de vias de sinalização. Lin *et al.* (2012) apresenta em seu trabalho dois mecanismos regulatórios cruciais na interação entre tais proteínas. Primeiramente, Grb2 induz a dimerização de FGFR2 anterior à estímulos extracelulares. À medida que FGFR2 é titulada em Grb2 dimérica, um complexo inicial é formado com estequiometria 2:1 Grb2:FGFR2. Com o aumento da concentração de FGFR2, o complexo 2:1 é saturado por FGFR2 dando origem a uma estequiometria 2:2. Devido à condição dimérica de Grb2 utilizada nos experimentos e sua ligação à FGFR2 ser detectada somente no domínio cSH3, os

dados de ITC podem ser elucidados assumindo-se que quanto maior a quantidade de FGFR2 titulada no complexo 2:1, os domínios cSH3 recrutam uma molécula adicional de FGFR2, formando um heterotetrâmero (Figura 6) [22].

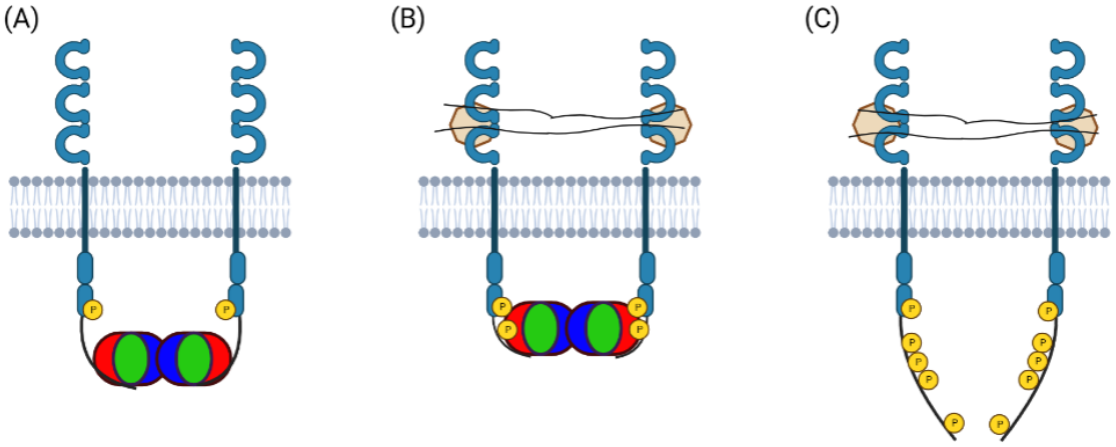
Figura 6 – Esquema representativo da formação do complexo heterotetrâmero do dímero de Grb2 (domínio cSH3 em vermelho, domínio SH2 em verde e nSH3 em azul) e FGFR2 (azul). O complexo inicial com excesso de Grb2 se transforma em um complexo 2:2 com adição de FGFR2 até a saturação do sistema.



Fonte: adaptado de Lin *et al.* (2012) [22] através do software Biorender

O heterotetrâmero (Figura 7), em seu estado basal, apresenta baixos níveis de atividade da quinase mas, sem nenhum efeito sob a via de sinalização. A ligação de Grb2 com a região C-terminal de FGFR2 inibe o acesso à resíduos de tirosina que, na fosforilação, formam sítios de ligação para o recrutamento de proteínas parceiras. Quando ocorre a estimulação do receptor por fatores de crescimento (FGFs) externos à membrana, a atividade da quinase é regulada positivamente pela fosforilação do resíduo Y209 da Grb2. Neste estado fosforilado, Grb2 se dissocia do complexo devido à repulsão eletrostática entre as proteínas. O receptor é então capaz de realizar mudanças conformacionais necessárias para adquirir um estado fosforilado e uma sinalização ativa [22].

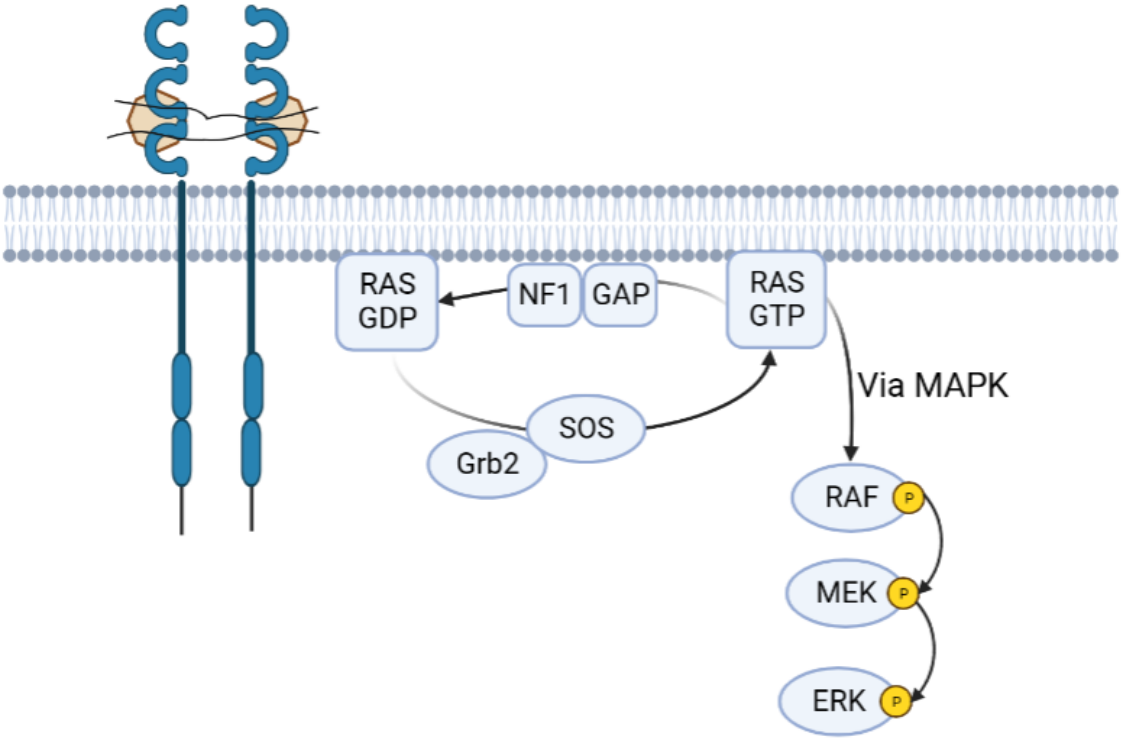
Figura 7 - Representação do mecanismo de controle da ativação de FGFR2 por Grb2. (A) Estado basal do complexo FGFR2 – Grb2. Grb2 (domínio cSH3 em vermelho, domínio SH2 em verde e nSH3 em azul) se liga através de seu domínio cSH3 na região C-terminal de FGFR2, resultando no heterotetrâmero 2:2. O domínio quinase (azul) possui mobilidade suficiente para a fosforilação de alguns resíduos de tirosina (incluindo Y653 e Y654). Receptor ativo, sinalização inativa. (B) Fatores de crescimento extracelular (marrom) e HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycan*) (preto) se ligam à parte extracelular de FGFR2. Mudanças conformacionais ocorrem resultando na fosforilação de Grb2 pelo domínio quinase de FGFR2. (C) Grb2 fosforilada se desliga do receptor por repulsão eletrostática. O domínio quinase de FGFR2, na ausência de Grb2, se torna totalmente ativo acessando resíduos de tirosina previamente localizados na interface FGFR2 – Grb2 por transfosforilação. Receptor ativo, sinalização ativa.



Fonte: adaptado de Lin *et al.* (2012) [22] através do software Biorender

A proteína Grb2, agora fosforilada e em sua forma monomérica, atua como uma ponte e recruta a proteína Sos (*"Son of Sevenless" – Pro-rich domain of GTP-GDP exchange factor*) para próximo da membrana plasmática, a qual realiza a catálise de substituição do GDP ligado em Ras (*Rat Sarcoma virus* protein) (Figura 8). A RAS é regulada por um mecanismo liga/desliga, em que é ativada pela SOS (Ras-GTP) e inibida pelo complexo formado por GAP (*Gtpase-Activating Protein*) e NF1 (*neurofibromin*), os quais se ligam a Ras-GTP, catalisando sua conversão para Ras-GDP. Quando ativada, a RAS inicia uma sequência em cascata de fosforilações de RAF/MEK/ERK e a ERK se desloca para dentro do núcleo para ativar fatores de transcrição que regulam genes relacionados à produção de fibroblastos. A via de sinalização da MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) compreende as proteínas RAF/MEK/ERK e regula os processos de proliferação e diferenciação celulares [23], [24].

Figura 8 – Esquema representativo da ativação da via de sinalização da MAPK. Inicialmente, FGFR2 é ativada pela ligação de um fator de crescimento externo, ativando a proteína RAS através da molécula adaptadora Grb2, a qual recruta um fator de troca do nucleotídeo guanina (SOS), o qual realiza a catálise, induzindo RAS a trocar seu GDP por GTP. O processo se segue pela estimulação sequencial de proteínas quinases, como a RAF, MEK e ERK. As ERK migram para o núcleo celular fosforilando um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, dando início ao processo de proliferação celular.



Fonte: elaborado pela autora através do software Biorender.

Sendo assim, é de fundamental importância o estudo da proteína Grb2, a qual atua diretamente na regulação da proteína FGFR2 e na ativação da via de sinalização da MAPK, responsável pela proliferação e diferenciação celular. A regulação do sinal para o interior da membrana é essencial para o controle de sinalizações aberrantes, responsáveis por uma série de carcinomas e síndromes.

1.4. A proteína adaptadora Grb2

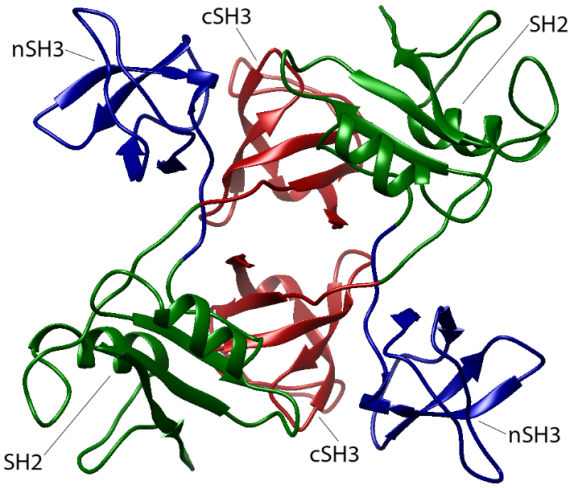
A proteína Grb2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*) é uma proteína adaptadora citosólica ubiquamente expressa em eucariotos, atuando em diversas vias de sinalização de proteínas quinases nas células [25], [26].

Os primeiros estudos acerca da proteína Grb2 foram baseados em seu papel crucial na sinalização celular, especialmente em relação às vias MAPK e PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*). Ahmed *et al.* (2015) observou a existência de um equilíbrio entre as duas conformações da proteína Grb2 (monômero e dímero), assim como uma especificidade das interações referentes a cada conformação [27]. Grb2, além de adaptadora, se mostra como uma proteína capaz de modular a via de sinalização, visto que se conecta com FGFR2 em sua forma dimérica, inativando a via, e com SOS em sua forma monomérica, dando sequência aos eventos de ativação da via de sinalização.

No entanto, a ubíqua distribuição da proteína Grb2 por toda a célula permite com que esta tenha outras funções além de adaptadora como a indução de troca conformacional para ativação da fosfatase SHP2 [28] e seu papel nas vias de reparo de DNA [29] e regulação da expressão de microRNA [30].

Estruturalmente, Grb2 apresenta 271 aminoácidos compreendidos em um único domínio SH2 (*Src homology domain 2*) sanduichado por dois domínios SH3 (*Src homology domain 3*) (c- e n- terminal), tendo sua estrutura em cristal resolvida em 1995 (Figura 9) [26]. As proteínas adaptadoras apresentam domínios responsáveis pelo reconhecimento de sequências específicas que permitem as interações proteína-proteína, facilitando a sinalização celular [31].

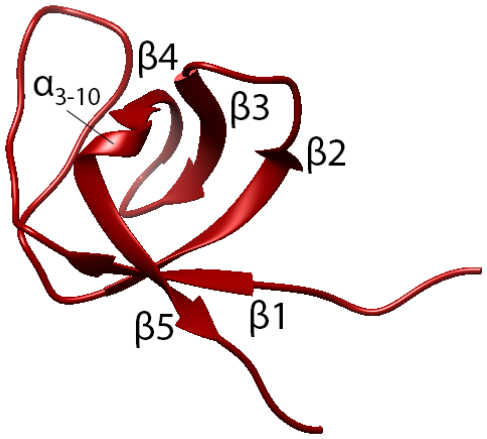
Figura 9 – Representação da estrutura cristalográfica da proteína Grb2 dimérica (domínio cSH3 em vermelho, SH2 em verde e nSH3 em azul)



Fonte: Adaptado de *Protein Data Bank* (PDB) ID: 1GRI

Os domínios SH3 (Figura 10) contém de 50 a 75 aminoácidos e são constituídos por um barril beta formado por 5 fitas beta antiparalelas e uma hélice $\alpha_{3\text{-}10}$, se ligando em sequências de 9 ou 10 aminoácidos ricos em prolina (Pro), contendo o motivo PxxP (como é o caso da proteína FGFR2) [16]. O domínio SH2 se separa dos domínios SH3 através de dois *linkers* longos e flexíveis, enquanto a interação fraca entre os domínios SH3 ocorre de tal forma que permita uma possível dependência entre eles [32].

Figura 10 – Estrutura tridimensional do domínio cSH3 adaptada da estrutura cristalográfica da proteína adaptadora Grb2 através do PDB ID: 1GRI.



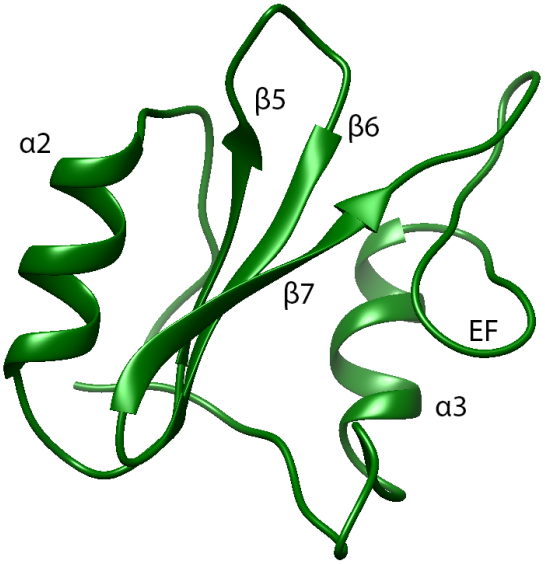
Fonte: Adaptado de PDB ID: 1GRI

O domínio SH2 (Figura 11) da proteína Grb2, assim como outros domínios do tipo SH2, é formado por uma folha-beta central antiparalela (formada por cinco fitas beta) entre duas alfa-hélices [33]. Possui uma forma hemisférica contendo cerca de 100 resíduos de aminoácidos que fazem o reconhecimento de resíduos de tirosinas fosforiladas (pY) [16], [34], [35].

Dois sítios de interação bem definidos são encontrados nos domínios SH2. O sítio de interação 1 é composto por 3 resíduos positivamente carregados que apresentam suas cadeias laterais estruturalmente próximas umas das outras, interagindo com fosfopeptídeos através de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. Por outro lado, o sítio 2 localizado próximo a hélice α3 faz o reconhecimento de pY localizadas em posições pY+1 até pY+5 resíduos de aminoácidos. Tal sítio de ligação é constituído por um bolsão de ligação com tirosinas fosforiladas, na forma pY-x-N-x (sendo N uma asparagina e x qualquer

outro resíduo de aminoácido), conservado em todos os domínios SH2, e uma superfície de ligação formada pelos aminoácidos Q105, F107, H108, L120, W121, Y134 e L148 que reconhecem sequências de tirosinas fosforiladas seguidas de 3 ou 4 aminoácidos responsáveis pela especificidade de cada domínio SH2 [33].

Figura 11 – Estrutura tridimensional do domínio SH2 com a nomenclatura de suas respectivas estruturas secundárias e a alça EF.



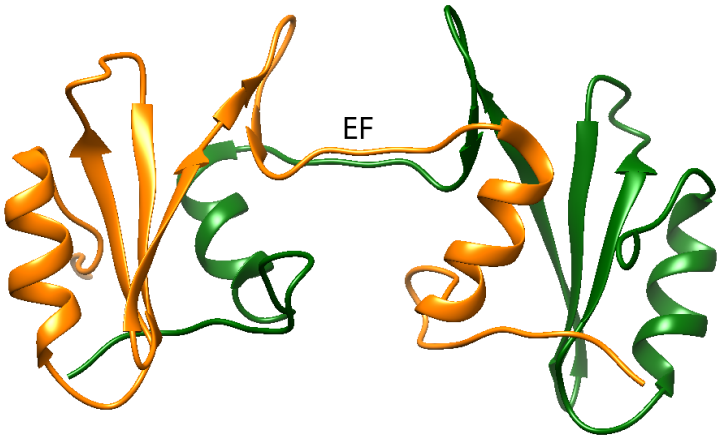
Fonte: Adaptado PDB ID: 1GHU

Desde 2020 trabalhos envolvendo a dimerização do domínio SH2 isolado da proteína Grb2 identificaram uma estrutura cristalográfica ainda desconhecida através de *domain-swapping* [36]–[40]. Tal processo ocorre quando dois ou mais monômeros trocam elementos estruturais e se associam em dímeros e oligômeros [41], [42]. No caso do domínio SH2, mudanças conformacionais na alça EF levam à abertura do monômero expondo uma interface para o solvente. Dois monômeros abertos podem então dimerizar através da troca de um domínio, ou parte dele, entre os monômeros da proteína.

Na estrutura proposta, os resíduos 121 - 123 que formam a alça EF da estrutura canônica do domínio SH2 de Grb2, se arranjam como uma cadeia estendida e observa-se a formação do dímero pela troca da hélice C-terminal (α3) (Figura 12). Cerca de 30% da área superficial total por monômero é “enterrada” com a dimerização, resultando em uma superfície de interação extensa. A interface C é quase completamente hidrofóbica com 5 resíduos aromáticos (F61, -83, -95, -101, W60) e 12 alifáticos (V99, -119, -132, -140, L97, -120, -128, -131, -148, I85, -146,

-151) formando o *core* do dímero em *domain-swapping*. Uma nova interação ocorre através de uma ponte de hidrogênio entre o grupo terminal amino da arginina 142 e o oxigênio carbonil da valina 122 entre os monômeros [36].

Figura 12 – Estrutura tridimensional cristalográfica do dímero de SH2 formado através de *domain-swapping*. Os protômeros foram identificados de cores diferentes para evidenciar a troca da hélice α3 e o alongamento da alça EF.

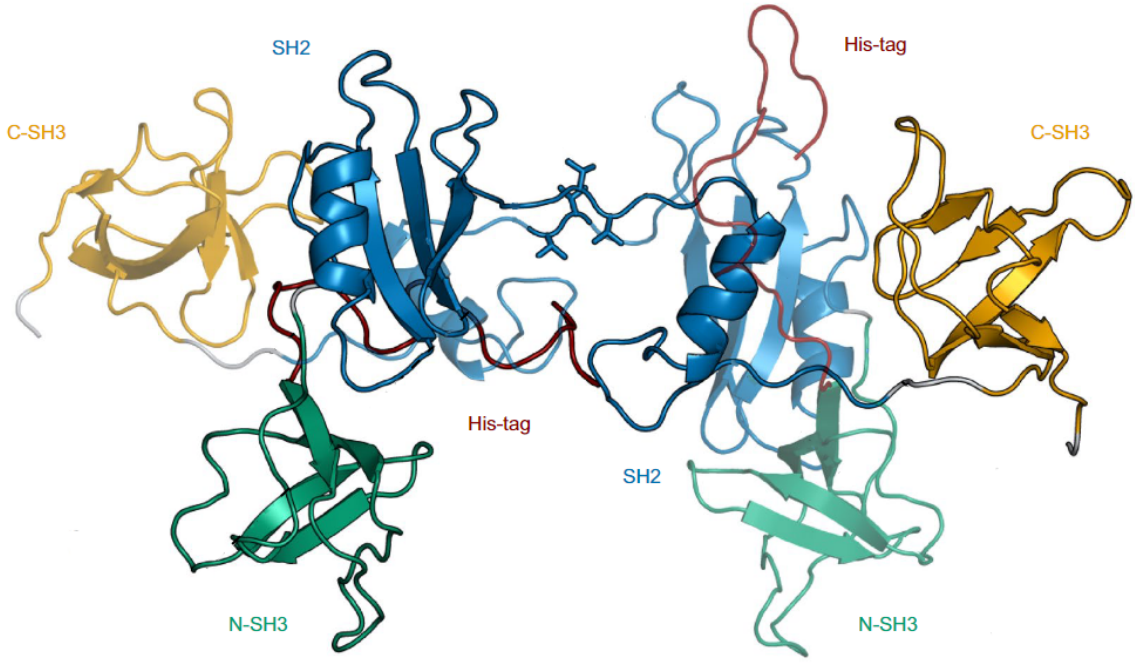


Fonte: Adaptado do PDB ID: 1FYR

Mesmo com diversos trabalhos indicando a dimerização do domínio SH2 por *domain-swapping*, duas questões importantes são levantadas: os trabalhos de Schiering (2000) [36] e Nioche (2002) [37] utilizam uma construção que contém uma cauda de GST, já postulada por facilitar o *domain-swapping* em alguns casos [43]; além disso, todas as estruturas foram resolvidas por cristalografia de raios-X, podendo não condizer com a realidade das estruturas em solução visto que é necessário o congelamento das amostras para a realização da técnica e esta não leva em consideração possíveis efeitos de flexibilidade intrínsecos a todas as proteínas.

Em 2023, no entanto, Sandouk e colaboradores observaram uma estrutura semelhante à dos cristais do dímero de SH2 enquanto trabalhavam com a proteína Grb2 nativa em solução [44]. Estudos de SAXS confirmaram uma inconsistência na sobreposição da estrutura cristalográfica do dímero de Grb2 (PDB: 1GRI). Desta forma, uma estrutura de *domain-swapping* foi proposta levando em consideração as alterações já observadas no dímero de SH2 isolado, a qual foi consistente com os resultados de SAXS (Figura 13).

Figura 13 – Estrutura tridimensional do dímero da proteína Grb2 mediado pelo *domain-swapping* dos domínios SH2.



Fonte: Adaptado de Sandouk *et al.* (2023) [44]

A base para o dímero de *domain-swapping* da proteína Grb2 mediado pelos domínios SH2, assim como para o domínio isolado, é a extensão da hélice α3 C-terminal e parte da alça adjacente (W121 - V123) conectando a hélice C-terminal de um protômero com o restante do protômero adjacente. Nesta nova configuração, a mudança na interface de dimerização da proteína pode ocasionar em diferenças significativas na especificidade das interações do domínio SH2 com proteínas parceiras. Além disso, a abertura da estrutura em *domain-swapping* leva a uma extensão nas posições dos domínios SH3 da proteína, fazendo com que os 4 domínios agora sejam acessíveis para interagir com proteínas parceiras.

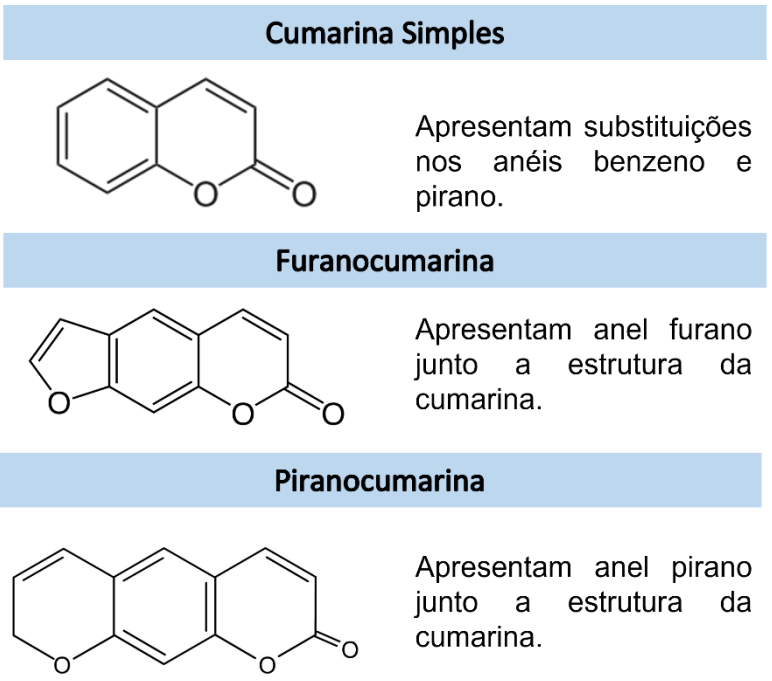
Visto que a proteína Grb2 está envolvida em eventos celulares básicos como crescimento celular, proliferação e metabolismo, muitos estudos evidenciaram que a proteína está largamente envolvida em vários tipos de cânceres [45]–[47]. Consequentemente, Grb2 tem sido um importante alvo para o estudo de moléculas naturais com propriedades anticancerígenas como Cumarina, Rutina e Morina [48], [49].

1.5. A molécula de Cumarina

A utilização de moléculas naturais como fármacos é um dos recursos mais antigos utilizados na cura de doenças, sendo estes apresentados nas mais variadas formas, de chás à compressas. Visando a síntese de fármacos para inibir a proliferação descontrolada de células tumorais, a procura por moléculas naturais que apresentam propriedades anticancerígenas e que possam interagir com proteínas em cascatas de sinalização aberrantes tem aumentado. As Cumarinas são uma classe de moléculas com importantes propriedades farmacológicas como bactericida, anti-inflamatório, anticoagulante, antitrombótico, vasodilatador e atividade anticancerígena comprovada [50], [51].

Cumarinas são membros da família dos compostos benzopirenos, que consistem em um anel benzeno junto a uma pirona. A classificação das Cumarinas ocorre de acordo com as substituições nos anéis benzeno e pirano, e podem ser classificadas como cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, e biscumarinas (Figura 14) [52].

Figura 14 – Exemplos de Cumarinas com suas respectivas estruturas planares.



Fonte: elaborado pela autora

As cumarinas são metabólitos secundários, ou seja, desempenham papel na defesa dos vegetais. Elas foram primeiramente encontradas em sementes de

Dipteryx odorata selvagem, uma árvore popularmente conhecida como Cumaru, nativa no Brasil, Colômbia, Peru e Guiana [52].

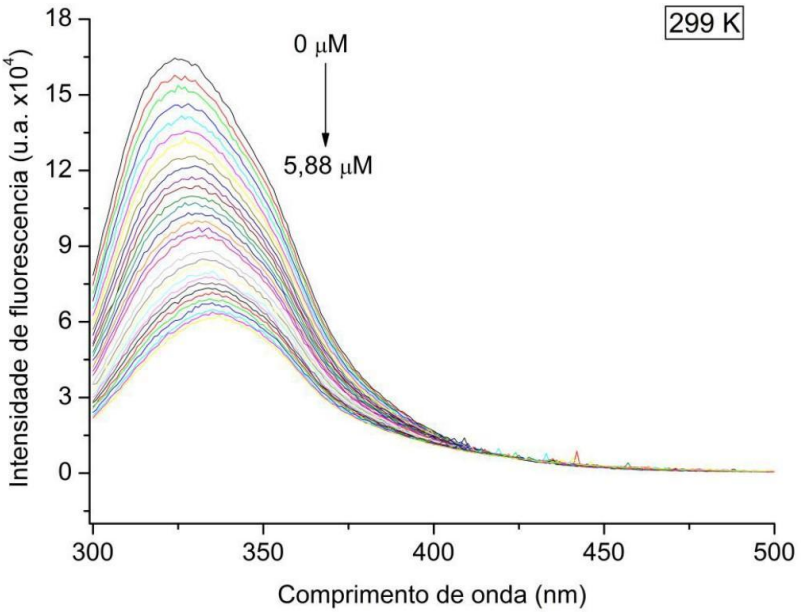
Os estudos utilizando cumarinas têm aumentado uma vez que o seu desempenho em atividades biológicas é amplo. Foi verificado por Mohler e colaboradores (1994) a atividade anticancerígena da cumarina 1,2 - benzopirona em células prostáticas, onde ratos tiveram o câncer regredido quando tratados com a molécula [53]. López-González (2004) verificou a eficácia desta cumarina *in vitro* na apoptose de adenocarcinoma pulmonar [54]. A cumarina também apresentou atividade inibitória semelhante ao efeito do tratamento quimioterápico tamoxifeno quando analisada para o câncer de mama [55], [56]. Tais estudos revelam grande potencial da molécula cumarina (1,2 - benzopirona), o que torna seu estudo fundamental em áreas multidisciplinares.

1.6. Grb2 e sua interação com Cumarina

Sanches *et al.* (2019) caracterizou em nível molecular a interação entre a molécula de Cumarina (1,2-benzopirona) e a proteína Grb2 dimérica em pH 8 através das técnicas de espectroscopia de fluorescência, STD (Diferença de Transferência de Saturação) e simulações computacionais de *docking* e dinâmica molecular [48].

Dados da espectroscopia de fluorescência demonstram a supressão do sinal com o aumento da concentração de Cumarina e uma contribuição tanto dinâmica quanto estática, comportamento observado em proteínas que apresentam classes de fluoróforos com diferentes acessibilidades ao supressor (Figura 15). Através do mecanismo de supressão dinâmica observado pela maior constante quando comparada com a aparente, o aumento da temperatura faz com que a viscosidade do meio reacional diminuía, facilitando o acesso da Cumarina ao fluoróforo e, assim, favorecendo a interação entre Cumarina e Grb2 [57]. A interação foi caracterizada como entropicamente dirigida, com caráter hidrofóbico, razão molecular 1:1 e constante de associação na ordem de 10^5 M^{-1}.

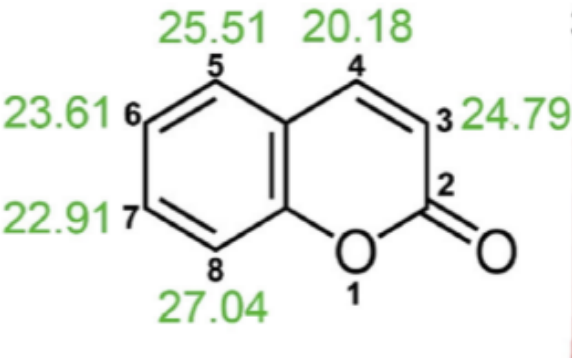
Figura 15 – (A) Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 dimérica em pH 8.0 na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula de Cumarina.



Fonte: Adaptado de Sanches *et al*. (2019) [48]

A análise de diferença de transferência de saturação (STD) entre a proteína Grb2 e a molécula de Cumarina revelaram uma interação moderada entre elas, fornecendo a maneira pela qual o ligante se encaixa na proteína, verificando-se que os hidrogênios 8 e 5 encontram-se mais enterrados na cavidade proteica (Figura 16).

Figura 16 – Epítopos da molécula de Cumarina interagindo com a proteína Grb2 em pH 8.0 computados através da técnica de STD.

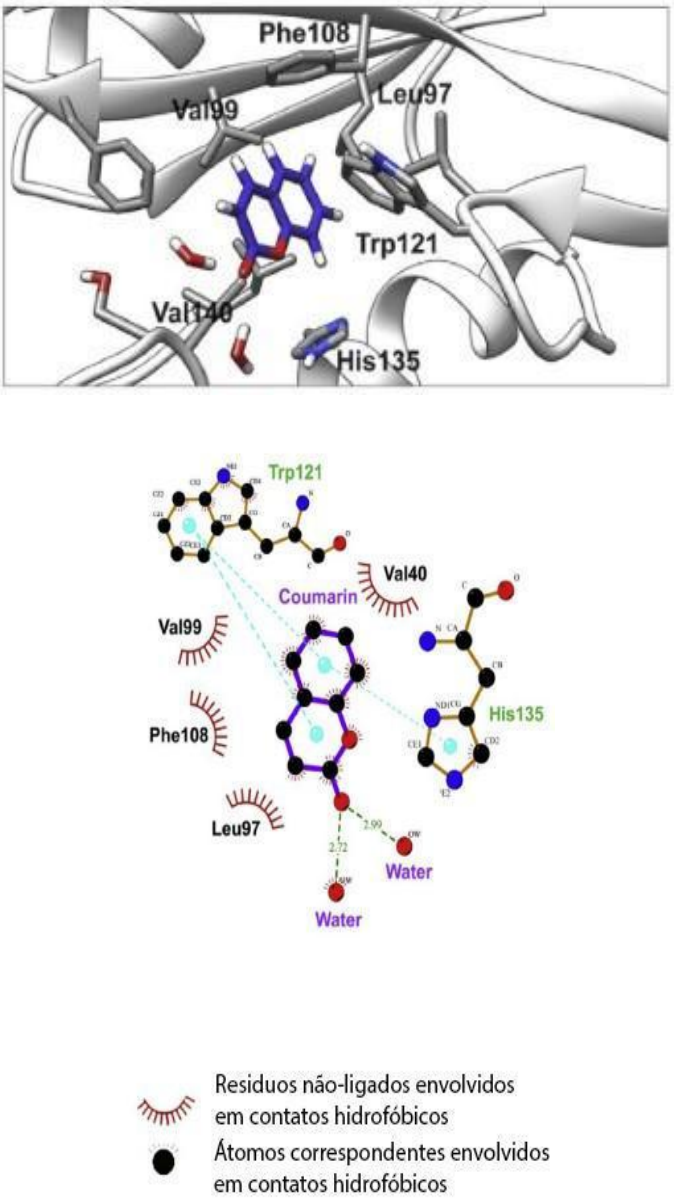


Fonte: Sanches *et al.* (2019) [48]

Para uma melhor compreensão das interações envolvidas no complexo Grb2-Cumarina, estudos computacionais de *docking* e simulações de dinâmica

molecular foram realizados. Tais estudos indicam um sítio de docagem da molécula da proteína Grb2 próximo ao triptofano 121 (W121). Este sítio, localizado em um bolsão hidrofóbico no domínio SH2, está de acordo com as características de ligação obtida pela técnica de espectroscopia de fluorescência (Figura 17).

Figura 17 – Representação do complexo Grb2-Cumarina para a interação com os aminoácidos destacados do domínio SH2 obtidos computacionalmente.



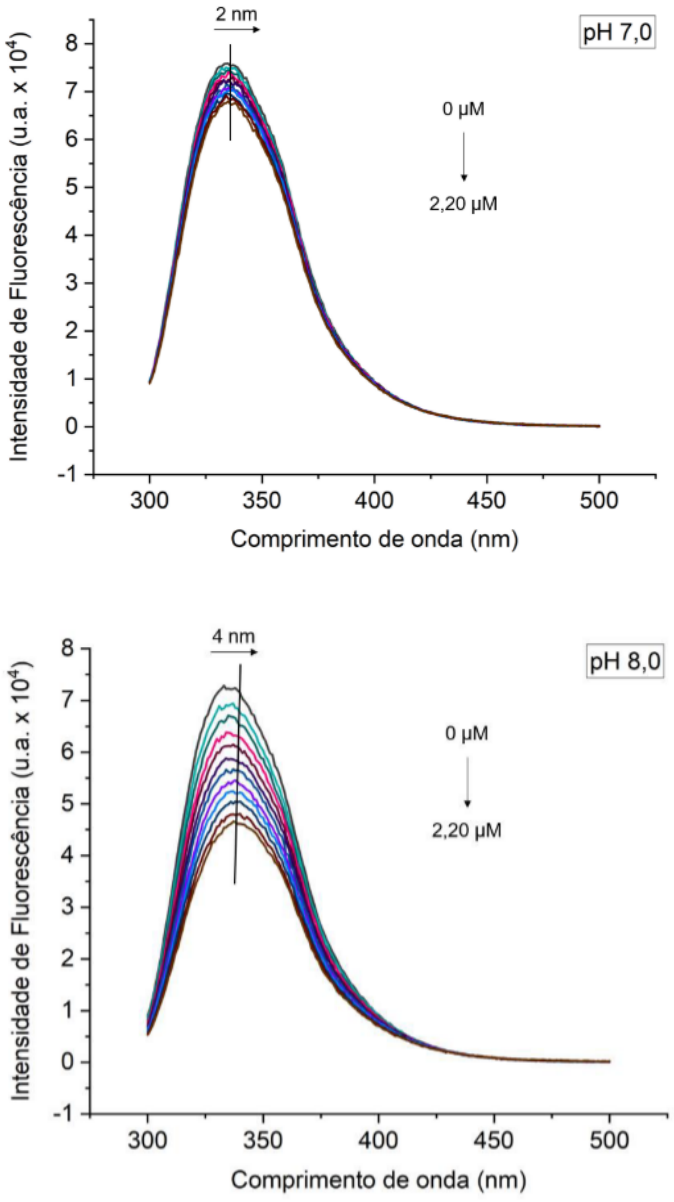
Fonte: Adaptado de Sanches *et al.* (2019) [48]

Recentemente, um trabalho ainda não publicado realizado pelo nosso grupo levou em consideração a interação da molécula de Cumarina com a proteína Grb2 mutada na posição 160 pela troca de uma tirosina por uma fenilalanina. Nesta

configuração, a proteína se apresenta na forma monomérica e a caracterização da interação com a molécula de Cumarina foi realizada em duas diferentes condições de pH (7.0 e 8.0).

A interação entre a proteína e a molécula foi classificada como favorável e hidrofóbica através da técnica de espectroscopia de fluorescência. Suas constantes de afinidade (K_a) foram determinadas na ordem de 10^4 M^{-1} para pH 7.0 e 10^5 M^{-1} para pH 8.0 (Figura 18).

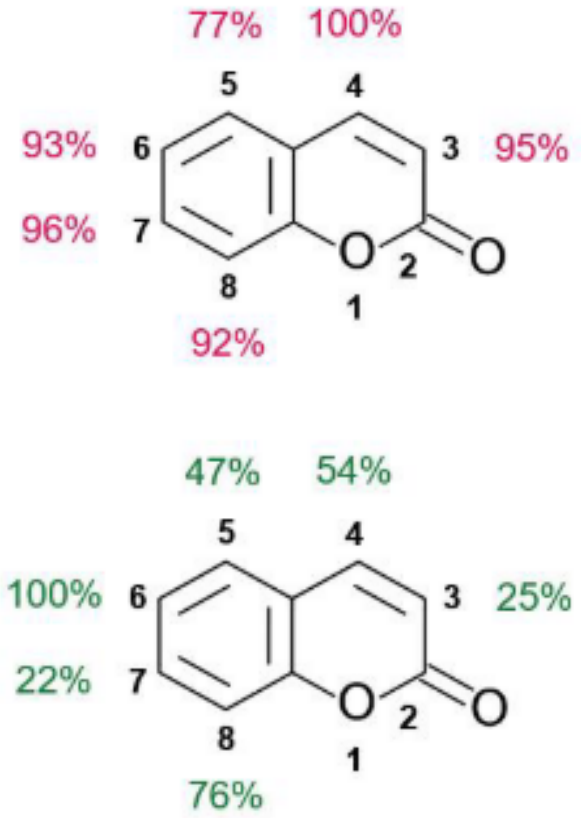
Figura 18 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM da proteína Grb2 Y160F em pH 7.0 (A) e 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula de Cumarina.



Fonte: cedido pela Msc. Giovana Casteluci

Através da técnica de ^{1}H-RMN STD, foi constatado um encaixe diferente modulado pela mudança de pH. Em pH 7.0 observa-se uma maior aproximação do hidrogênio 4 da molécula de Cumarina, enquanto em pH 8.0 esta maior aproximação se dá pelo hidrogênio 6 (Figura 19).

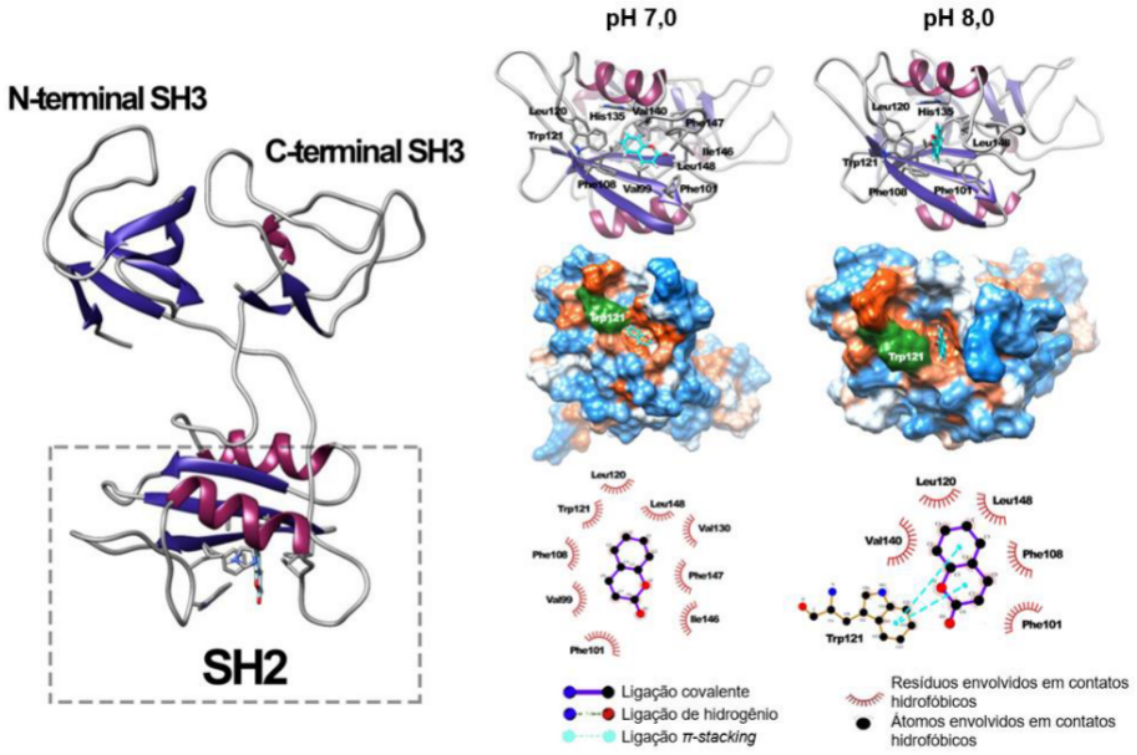
Figura 19 – Epítopos da molécula de Cumarina interagindo com a proteína Grb2 Y160F em pH 7.0 (rosa) e 8.0 (verde) computados através da técnica de STD.



Fonte: cedido pela Msc. Giovana Casteluci

A previsão do sítio de ligação, através de *docking* e dinâmica molecular indicou o bolsão hidrofóbico localizado próximo ao triptofano 121 como sítio mais favorável para a interação. Já em relação ao encaixe, os epítopos obtidos por STD em pH 7.0 indicam um encaixe paralelo da molécula em relação ao triptofano 121, enquanto que para pH 8.0 este encaixe se mostra de forma perpendicular, similar ao relatado por Sanches *et al.* (2019) [48] para o dímero da proteína (Figura 20).

Figura 20 – Representação do complexo Grb2 Y160F-Cumarina para a interação em pH 7.0 e 8.0 com os aminoácidos destacados do domínio SH2 obtidos computacionalmente.



Fonte: cedido pela Msc. Giovana Casteluci

Considerando a diferença nos valores obtidos para o monômero nos diferentes pHs, se faz necessário a caracterização da proteína Grb2 em sua forma dimérica nas mesmas condições além de sua interação com a molécula de Cumarina em pH 7.0, ainda desconhecida. A introdução de uma nova conformação da proteína através do mecanismo de *domain-swapping*, observado por Sandouk e colaboradores, abre novas possibilidades para o sítio de interação em que a molécula de Cumarina doca na proteína Grb2. Desta forma, a análise da função de cada triptofano localizado no domínio SH2 se torna importante para uma melhor caracterização do mecanismo de interação proteína-ligante.

2. MOTIVAÇÕES E OBJETIVOS

A elucidação do mecanismo de proliferação celular através da via de sinalização MAPK é de grande interesse visto que esta está relacionada com diversos tipos de carcinomas. Em especial, a proteína adaptadora Grb2 apresenta muita relevância visto que esta é responsável pela transdução do sinal [20]–[22], [27], [34].

Diante do aumento no número de cânceres ao redor do mundo, a busca por compostos naturais que apresentam propriedades anticancerígenas se tornou alvo de estudos [52]. As moléculas de Cumarinas, em especial 1,2 - benzopirona, são exemplos destes compostos naturais, no qual estudos indicaram importantes comprovações de suas propriedades anticancerígenas [50], [51], [54]–[56].

Visto que células cancerígenas apresentam modificações metabólicas, como o aumento do pH intracelular de 7.0 para 8.0, a caracterização da proteína Grb2 em ambos os pHs é fundamental para detectar e caracterizar alterações a nível molecular que possam influenciar na sua ação intracelular, assim como a caracterização da interação entre a molécula de Cumarina e a proteína Grb2 em sua forma dimérica no pH 7.0.

Estudos anteriormente citados indicaram que a interação entre a proteína Grb2 e a molécula de Cumarina em pH 8 [48] ocorre em um sítio de ligação no domínio SH2, próximo ao triptofano 121, assim como os estudos para a proteína Grb2 Y160F monomérica, apresentando um encaixe diferente da molécula. Tais estudos levam em consideração a estrutura cristalográfica da proteína proposta por Maignan *et al.* (1995) [26]. O surgimento de uma nova conformação de Grb2 por *domain-swapping* em solução, relatada por Sandouk *et al.* (2023) [44], possibilita a docagem da molécula em outros sítios hidrofóbicos do domínio SH2 ainda não relatados na literatura. No intuito de aprofundar o conhecimento de tal interação, mutações pontuais nos triptofanos 60 e 121 podem auxiliar a determinar o real sítio de interação na proteína Grb2 dimérica e se existe algum processo alostérico entre os triptofanos localizados no domínio SH2.

Esta avaliação é de fundamental importância para a formação de um banco de dados que auxiliará na análise e estudo do impacto proporcionado por esta ligação na cascata de sinalização da MAPK bem como com outras proteínas dentro da célula.

2.1. Objetivos específicos

- Expressar e purificar as proteínas Grb2 *Wild Type* (WT), Grb2 W121A e Grb2 W60A nos pHs 7.0 e 8.0.
- Caracterizar parâmetros conformacionais e dinâmicos para ambos os pHs através das técnicas de Espalhamento Dinâmico da Luz, Ressonância Magnética Nuclear e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.
- Caracterizar parâmetros térmicos através da técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura.
- Caracterizar o perfil termodinâmico da interação de Grb2, WT e seus mutantes, com Cumarina por supressão de fluorescência em ambos os pHs.
- Mapear os epítopos das interações através da técnica de ^{1}H-RMN STD.
- Mapear possíveis alterações conformacionais da interação de Cumarina com Grb2 WT e seus mutantes através da técnica Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Transformação dos plasmídeos recombinantes em células *Escherichia coli* linhagem TOP10

Os plasmídeos que contém os genes que codificam as proteínas Grb2 WT e seus mutantes (W121A e W60A) foram clonados em vetor pET28a(+).

Para amplificação dos genes de interesse, os plasmídeos recombinantes foram transformados em linhagens celulares de *Escherichia coli* TOP10 quimicamente competentes. Incubou-se 80 ng de plasmídeo em células competentes durante 30 minutos em gelo. Posteriormente, realizou-se choque térmico a 42 ºC por 30 segundos e, em seguida, em gelo por 2 minutos para a inserção do gene na bactéria competente. Após este procedimento, adicionou-se 300 µL de meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) e incubou-se por uma hora a 37 ºC sob agitação de 100 RPM. Logo após, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 10,000 RPM e o pellet ressuspendido em 20 µL de meio LB líquido, sendo 15 µL aplicados à placa de cultura contendo meio LB sólido e 50 mg/mL de Canamicina. As placas foram incubadas a 37 ºC *overnight*. As colônias selecionadas foram adicionadas à meio LB líquido e Canamicina e incubadas a 100 RPM/37 ºC *overnight*. A cultura foi então purificada utilizando-se o kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAgen) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.2. Transformação em células *E. coli* linhagem BL21 DE3

Para que ocorra a expressão das proteínas, os plasmídeos necessitam ser inseridos em bactérias que possuam uma maquinaria específica de expressão. Por isso, os plasmídeos amplificados foram transformados em células BL21 DE3 quimicamente competentes de forma equivalente à seção 3.1. Após a seleção das colônias e o período de incubação em meio LB líquido contendo Canamicina, foram armazenadas alíquotas de 2 mL em freezer – 80 ºC.

3.3. Expressão proteínas em meio não-marcado

As alíquotas armazenadas em freezer – 80 ºC (pré-inóculo) foram adicionadas à 50 mL de meio LB líquido com 50 mg/mL de Canamicina e mantidas sob agitação de 100 RPM a 37 ºC *overnight*. Adicionou-se 50 mL desta cultura de bactérias em

500 mL de meio líquido LB e manteve-se agitação de 100 RPM a 37 ºC até que a densidade óptica (DO) em 600 nm fosse equivalente a 0.6. Acrescentou-se 0,2 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) e a indução ocorreu por 18 horas a 20 ºC. O meio de cultura foi centrifugado a 3583 xg por 40 minutos a 4 ºC. As células foram ressuspendidas em tampão de lise Tris-HCl (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM de β-mercaptoetanol, pH 8.0) e lisadas por sonicação de 15 ciclos de 30 segundos cada (2 segundos ON e 1 segundo OFF) com 30 segundos de pausa entre cada ciclo para evitar o aquecimento da amostra. A amostra foi novamente centrifugada a 34,957 xg por 90 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro 0,45 µm Minisart®.

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

3.4. Expressão em Meio Mínimo isotopicamente marcado

A expressão em meio mínimo foi iniciada com o pré-inóculo cultivado em 50 mL de meio líquido LB contendo Canamicina e mantido sob agitação de 100 RPM a 37 ºC *overnight*. Adicionou-se volumes sucessivos desta cultura de bactérias em 200 mL de pré meio mínimo M9 (0,1 mM de $CaCl_2$; 1 g/L de NH_4Cl; 0,2 mM de $MgSO_4$; 10 mM de Cloreto de Ferro (III); coquetel vitamínico (1 mg/L de Biotina; 1mg/L de Cloreto de Colina; 1mg/L de Ácido Fólico; 1 mg/L de Nicotinamida; 1 mg/L de Ácido D-Pantotênico; 1 mg/L de Hidrocloreto Piridoxal; 0,1 mg/L de Riboflavina), 2-3 g/L $C_6H_{12}O_6$; solução TS2 contendo íons metálicos ($ZnSO_4$; $MnCl_2$; H_3BO_3; $CoCl_2$; $NiCl_2$; $CuCl_2$; Na_2MoO_4; Na_2SeO_3) e antibióticos)) até atingir uma DO_{600} inicial de 0.2. Então, incubou-se sob agitação de 100 RPM a 37 ºC até que a DO_{600} estivesse entre 0.7 e 1.0. Centrifugou-se a 5313 xg por 20 minutos a 20 ºC e os pellets foram ressuspendidos em 1L de meio mínimo M9 enriquecido com $^{15}NH_4Cl$ e a cultura foi mantida sob agitação de 100 RPM a 37 ºC até atingir a DO_{600}=0.9. Atingida a DO_{600}, a temperatura foi diminuída para 20 ºC e as culturas foram induzidas utilizando 0.2 mM de IPTG, permanecendo incubadas com agitação de 100 RPM por 18 horas. O processo de lise foi realizado conforme protocolo na seção 3.3. e a expressão foi atestada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.5. Purificação das proteínas

Visto que todas as proteínas apresentam cauda de histidina, utilizou-se o sistema de purificação manual com resina *IMAC HiTrap HP* previamente carregada

com cobalto. A coluna foi previamente lavada com água destilada e equilibrada com tampão contendo 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM de Imizadol e 1 mM BME em pH 8.0. Em seguida, a fração solúvel foi aplicada à coluna e lavada com tampão 50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl e 1 mM BME contendo 20 mM de Imizadol para a retirada de interações inespecíficas. Posteriormente, foi realizada a eluição com aumento gradativo da concentração de Imidazol até o limite de 1 molar. As amostras retiradas do processo de purificação por afinidade foram concentradas e injetadas em resina *Superdex 75* para o processo de gel filtração através do sistema automatizado *AKTA Purifier*. Utilizou-se tampão 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 contendo 50 mM de NaCl e 1 mM de BME nos pHs 7.0 e 8.0. A pureza das amostras após cada etapa de purificação foi verificada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a concentração da amostra final, adicionou-se 5 mM de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) como inibidor de protease.

3.6. Espectroscopia de Absorção UV-VIS

A concentração das proteínas utilizadas nos experimentos foi determinada através da lei de Beer-Lambert

$$Abs_{280} = \varepsilon \cdot C \cdot l \qquad \text{Equação 1}$$

onde l é o caminho óptico da cubeta utilizada, C a concentração da proteína, Abs_{280} a absorção da luz ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm e ε o coeficiente de extinção molar de cada proteína [58].

As medidas foram realizadas em espectrofotômetro *Varian Cary 3E*. Utilizou-se uma cubeta de 1 mm de caminho óptico e os coeficientes de extinção molar utilizados foram $\varepsilon_{280} = 38055$ M^{-1} cm^{-1} para Grb2 WT e $\varepsilon_{280} = 32555$ M^{-1} cm^{-1} para Grb2 W60A e Grb2 W121A. Para a Cumarina, foi realizado o mesmo procedimento com leitura em 277 nm e coeficiente de extinção molar de $\varepsilon_{277} = 11438$ M^{-1} cm^{-1}.

3.7. Ressonância Magnética Nuclear

Todas as amostras utilizadas para as diversas técnicas de ressonância se encontravam em tampão 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 contendo 50 mM NaCl e 90% H_2O/10% D_2O em pHs 7.0 e 8.0.

Todos os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 600.13 MHz equipado com uma criossonda de ressonância tripla 5 mm, sendo o gradiente de campo pulsado aplicado ao longo do eixo y.

Os espectros 1D foram processados e analisados no software Bruker TopSpin versão 4.1.4. Os espectros 2D obtidos foram processados utilizando-se NMRDraw e NMRPipe localizados no software NMRbox, e analisados através do software CcpNMR (*Collaborative Computational Project for NMR*) [59].

3.7.1. ^{1}H,^{15}N-HSQC

As amostras foram preparadas com volume total de 600 µL contendo 350 µM de Grb2 WT isotopicamente marcada com ^{15}N. A matriz de dados dos espectros consistiu de 1024* x 128* pontos (nos quais n* referem-se a pontos complexos) com tempos de aquisição de 106.5 ms (t_{HN}) e 58.5 ms (t_N). Um total de 32 scans por incremento de t_N foi coletado com atraso de 1.25 s e tempo total de 3.28 horas.

Espectros ^{1}H,^{15}N-HSQC pH 7.0 e 8.0 foram assinalados por semelhança através dos assinalamentos dos domínios SH2 e C-SH3 depositados no *Biological Magnetic Resonance Bank* (BMRB) com IDs 27781 [60] e 18748 [61], respectivamente. *Chemical Shift Perturbations* (CSP, Δ□) de todos os aminoácidos assinalados em pH 8.0 com referência aos do pH 7.0 foram calculados pela equação 2 [62], sendo $\Delta\delta_{HN}$ a perturbação do deslocamento químico referente aos hidrogênios e $\Delta\delta_{N}$ referente aos nitrogênios.

$$\Delta\delta = \sqrt{\Delta\delta_{HN}^{2} + \left(0.15 \cdot \Delta\delta_{N}\right)^{2}}/2 \qquad \text{Equação 2}$$

O gráfico foi plotado utilizando o programa Origin 8 Pro.

3.7.2. STD (*Saturation Transfer Difference*)

As amostras utilizadas foram de 15 µM das proteínas para determinar a melhor condição de saturação, a qual foi verificada em – 1.5 ppm para *on-resonance* e 20 ppm para *off-resonance*. O tempo de saturação foi de 2 segundos em um total de 10k scans com ds = 4 e *saturation power* de – 35 dBW. O filtro *spin-lock* foi de 30 ms quando o ligante foi titulado para supressão do sinal da proteína no espectro.

Para o experimento, utilizou-se de 1.34 mM de Cumarina diluída em etanol deuterado.

Posteriormente, os espectros foram tratados através do *software* Bruker TopSpin versão 4.1.4 e o mapeamento dos epítopos foi calculado pela razão entre as intensidades do espectro STD e do espectro de referência

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} = \frac{I_{STD}}{I_0} \quad \text{Equação 3}$$

onde I_0 é a intensidade do espectros de referência (*off-resonance*), I_{SAT} é a intensidade do espectro de saturação (*on-resonance*) e I_{STD} é a intensidade do espectro de diferença [63].

3.7.3. ^{1}H-RMN T1 (*Time-Lattice Relaxation*) e T2 (*Transverse Relaxation*)

Experimentos de T1 e T2 foram conduzidos com 300 µM de Grb2 WT. T2 foi medido através da sequência de *Carr-Purcell-Meiboon-Gill* (CPMG) e T1 pelo método de recuperação inversa.

Treze pontos de ambos os experimentos foram selecionados entre 7.0 e 9.0 ppm ^{1}H e analisados através do ajuste de uma distribuição exponencial

$$I = I_0 exp(-\frac{\tau_{1,2}}{T_{1,2}}) \quad \text{Equação 4}$$

onde τ varia de 0.001 a 1.5 segundos para T_1 e de 0 a 0.4164 segundos para T_2 [64]. O valor médio de T1 e T2 foi utilizado para determinar a razão T_1/T_2.

3.8. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As amostras foram preparadas para a técnica de DSC contendo 100 µM de proteína por amostra. Após o equilíbrio do aparelho (CSC 6300 Nano DSC III – *Calorimetry Sciences Corporation*) com o mesmo tampão em que a proteína se encontrava, foram realizadas varreduras à 1 ºC/min de 0 – 90 ºC alternando-se processos de aquecimento e resfriamento. O tempo de equilíbrio entre cada medida foi de 600 segundos. Os termogramas foram analisados no programa Origin 8 Pro e a determinação da mudança de entalpia calorimétrica foi conduzida através da integração de todo o termograma, assim como das deconvoluções realizadas pela

quantidade mínima necessária para os dados. A entalpia de van't Hoff (ΔH_{VH}) foi determinada pelo ajuste linear da equação 5.

$$\frac{d\ln K_{eq}}{d(\frac{1}{T})} = -\frac{\Delta H_{VH}}{R} \qquad \text{Equação 5}$$

onde R = 8.31 J/mol.K [65].

3.9. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

As medidas de DLS foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Panalytical) com 1.5 mL de amostra contendo 60 μM das proteínas. Os dados foram obtidos através da média de 3 medidas compostas por 10 acumulações cada.

A técnica de DLS consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em determinado ângulo. Tal análise fornece informações sobre o movimento da partícula em questão. O correlator do equipamento leva em consideração valores de intensidade $I(t)$ da luz espalhada em um instante de tempo t e a correspondente quantidade $I(t + \tau)$ em um instante posterior $t + \tau$. O correlator calcula a função de correlação da intensidade de luz espalhada através da média do produto

$$G_{\tau} = \int_{0}^{\infty} I(t)I(t + \tau)dt \qquad \text{Equação 6}$$

onde τ são incrementos discretos de tempo [66].

3.10. Espectroscopia de Fluorescência

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados utilizando o espectrofluorímetro ISS PC1 – *Champaign II*, USA com banho térmico Nestlab RTE – 221 – *Thermo Electron Corporation*, USA, em temperaturas de 291, 295 e 299 K. Utilizou-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico para as medidas e abertura das fendas de emissão e excitação ajustadas em 1 nm. Os triptofanos das proteínas foram excitados em 290 nm com a faixa de emissão de 300 a 500 nm. A supressão da fluorescência foi realizada com 2 μM das proteínas com um volume total de 2 mL, adicionando titulações de cumarina com concentração

estoque de 202 μM, variando o volume total da amostra em até 3% devido à influência do etanol utilizado na preparação da Cumarina.

A constante de associação (K_a) foi calculada conforme a equação 7, assumindo um modelo de dois estados para a interação proteína-ligante ($P_F + L_F \rightarrow PL$), em que P_F corresponde à proteína livre, L_F ao ligante livre e PL à interação entre a proteína e o ligante [67].

$$K_a = \frac{[PL]}{[P_F][L_F]} \qquad \text{Equação 7}$$

Podemos escrever a fração θ dos sítios de ligação da proteína que são ocupados pelo ligante da seguinte forma,

$$\theta = \frac{sítios\ de\ ligação\ ocupados}{total\ de\ sítios\ de\ ligação} = \frac{[PL]}{[PL]+[P]} = \frac{[L]}{[L]+K_d} \qquad \text{Equação 8}$$

onde $K_d = \frac{1}{K_a}$ é a constante de dissociação, o recíproco da constante de associação.

Para uma proteína com n sítios de ligação, a equação de equilíbrio fica da seguinte maneira:

$$P + nL \leftrightarrow PL_n \qquad \text{Equação 9}$$

A expressão para θ fica:

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \qquad \text{Equação 10}$$

Rearranjando os termos e tomando o log de ambos os lados obtemos:

$$log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n\ log[L] - logK_d \qquad \text{Equação 11}$$

A equação 11 é conhecida como equação de Hill, ou duplo-log, e um gráfico de $log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)$ em função de $log[L]$ fornece n como coeficiente angular e a partir do coeficiente linear podemos obter a constante K_d.

A correspondência entre a equação de Hill e a supressão de fluorescência de uma proteína é feita através do parâmetro θ. Na prática, a estimativa desse

parâmetro é dada pela fração da fluorescência inicial da proteína que é suprimida na presença do supressor. Quando fazemos esta correspondência, estamos dizendo que a fluorescência que está ao alcance do ligante/supressor em determinado sítio de ligação é suprimida, e que a fluorescência observada é proveniente de regiões da proteína onde se encontram os sítios de ligação desocupados. Portanto a correspondência fica da forma:

$$\theta = \frac{F_0 - F}{F_0} \qquad \text{Equação 12}$$

com, F_0 e F sendo as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença do supressor, respectivamente.

A correção do efeito de filtro interno foi realizada através da equação abaixo:

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{\left(A_{\lambda ex} + A_{\lambda em}\right)}{2}} \qquad \text{Equação 13}$$

onde $A_{\lambda ex}$ se refere ao coeficiente de extinção molar do ligante no comprimento de onda da excitação e $A_{\lambda em}$ no comprimento de onda de emissão utilizados na análise dos dados [68].

Após o cálculo da constante de associação para os experimentos realizados nas três temperaturas, os parâmetros termodinâmicos da interação foram calculados através da equação de van't Hoff

$$-\ ln\left(K_a\right) = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} \qquad \text{Equação 14}$$

em que K_a é a constante de ligação, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura em Kelvin, ΔH a contribuição entálpica e ΔS a entrópica.

3.11. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Os experimentos de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier foram realizados na linha IMBUIA presente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) localizado em Campinas/SP (Projeto #20221847). Utilizou-se um espectrômetro FTIR Agilent Cary 670 com o método de Reflexão Total Atenuada (ATR). Para cada espectro, um interferograma de 128 scans foi coletado com resolução de 8 cm^{-1}.

As amostras utilizadas apresentavam concentração de 220 μM de proteína (Grb2 WT e seus mutantes) em ambos os pHs. Os mesmos passos de aquisição e tratamento de dados foram realizados para as proteínas puras e complexadas com diferentes razões de Cumarina (0.5:1; 1:1 e 2:1).

Os espectros foram tratados através do método de Deconvolução de Fourier (FSD) e os números de onda relacionados à cada estrutura secundária foram retirados do trabalho de Dong *et al.* (1992) [69]–[71]. As deconvoluções foram feitas pelo número necessário para satisfazer a curva experimental através de uma mistura de curvas gaussianas e lorentzianas. O cálculo das porcentagem foi realizado pela análise da área de cada deconvolução relativa à área total do espectro.

3.12. Dinâmica e análises computacionais

As informações estruturais das proteínas estudadas ao longo deste trabalho foram extraídas do banco de dados PDB. Para o cristal de Grb2 (PDB: 1GRI) [26] a estrutura tridimensional apresenta um *gap* entre os resíduos 28 e 33 no SH3 N-terminal, o qual foi reconstruído utilizando os web servers Swiss Model [72] e AlphaFold [73]. Nos cálculos em que o objetivo principal era analisar as mudanças estruturais e dinâmicas devido a mudanças de pH, as protonações são calculadas de acordo com o pH e o ambiente químico utilizando o software propKa [74].

Todas as etapas da dinâmica molecular foram realizadas utilizando o pacote de programas GROMACS, versão 2020.3 [75]. O campo de força utilizado é o Amber [76] e os parâmetros utilizados seguiram um padrão de réplicas e tempos, sendo sempre realizados em triplicatas com um total de $2.5x10^8$ passos e um delta de 2 fs, resultando em um tempo computacional de 500 ns para cada réplica. A temperatura e pressão foram mantidas constantes utilizando os algoritmos V-rescale e Parrinelo-Rahman [75], seus valores foram de 300 K e 1 atm respectivamente. Os sistemas foram neutralizados pela substituição de algumas moléculas de água por íons de cloro (Cl-) e sódio (Na+) que ao todo ficaram em uma concentração de 150 mM.

Precedentes a dinâmica, as etapas de minimização e equilibração são necessárias para retirar as restrições estéricas e preparar o sistema. Para isso foram realizados $5x10^5$ passos de minimização de energia pelo método steepest-descent

com todos os átomos flexíveis e $5x10^5$ passos de minimização de energia pelo método dos gradientes conjugados. Em seguida a equilibração do sistema foi realizada em duas etapas, uma dinâmica de 1000 ps com restrição de posições para os átomos da proteína, de modo que o solvente ficasse livre para se ajustar de maneira correta, e uma outra dinâmica de 1000 ps sem restrições de posições para que o sistema se adaptasse às condições termodinâmicas.

Para o cálculo de docking molecular, utilizamos o programa "*UCSF Dock v6.7*" da Universidade de São Francisco – Califórnia e seus programas acessórios [77]. O método utiliza de campo de forças para os cálculos de interação e complementa com cálculos sofisticados de Energia Livre de interação pelo método MM/GBSA [78]. A praticidade e velocidade desses cálculos permitem uma ampla amostragem de conformações, possibilitando o refinamento dos resultados utilizando fundamentações estatísticas. A ordem cronológica das etapas para realização do docking são: Preparação das macromoléculas, preparação do sistema, cálculo do campo de força, cálculo da interação, e como diferencial, a etapa final consiste em utilizar a função *Amber Score* em que o sítio do receptor e o ligante são flexiveis, permitindo que pequenos rearranjos estruturais acarretando em ajustes induzidos da molécula.

As análises seguiram pelas ferramentas do próprio pacote GROMACS, como RMSF (*Root mean square fluctuation*), RMSD (*Root mean square deviation*), SASA (*accessible surface area*) e PCA (*principal component analysis*) [75]. As distâncias de contatos são calculadas utilizando o software criado pelo próprio grupo de pesquisa, onde fixamos um resíduos e determinamos um *range* (no caso, 6A), e durante cada passo da dinâmica calculamos todos os resíduos dentro desse *range*, calculando a distância média e a porcentagem em que os resíduos ficaram em contatos. Já as frustrações foram calculadas utilizando o web-server (*http://frustratometer.qb.fcen.uba.ar/*), em que faz o cálculo de energia, e identifica regiões na estrutura da proteína onde as interações não estavam otimizadas, indicando potencial frustração estrutural [79].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Grb2 WT

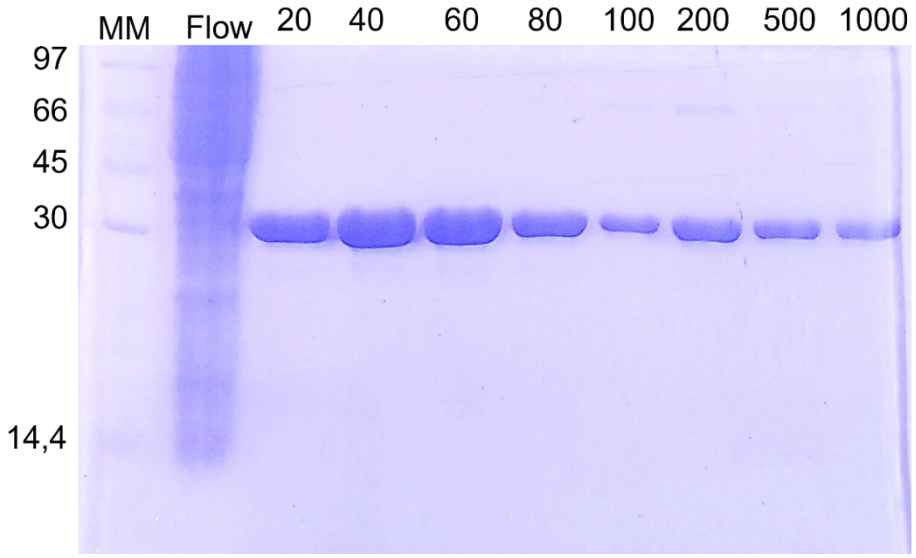
Como visto na introdução deste trabalho, a proteína Grb2 desempenha papel fundamental na regulação de vias de sinalização, especialmente a da MAPK. O entendimento de tal via e, consequentemente, da proteína Grb2 é fundamental para o reconhecimento de alterações que possam levar à desregulação de tais vias. No âmbito celular, a basificação do meio intracelular é imprescindível para o escape homeostático de células e aumento da proliferação de células cancerosas. Neste sentido, faz-se necessário conhecer a fundo possíveis alterações estruturais e dinâmicas da proteína Grb2 ocasionadas pela elevação do pH do meio.

4.1.1. Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0

A proteína Grb2 WT foi expressa seguindo protocolo das seções 3.3 e 3.4. O processo de purificação foi realizado em duas etapas: afinidade por Cobalto e exclusão molecular automatizada.

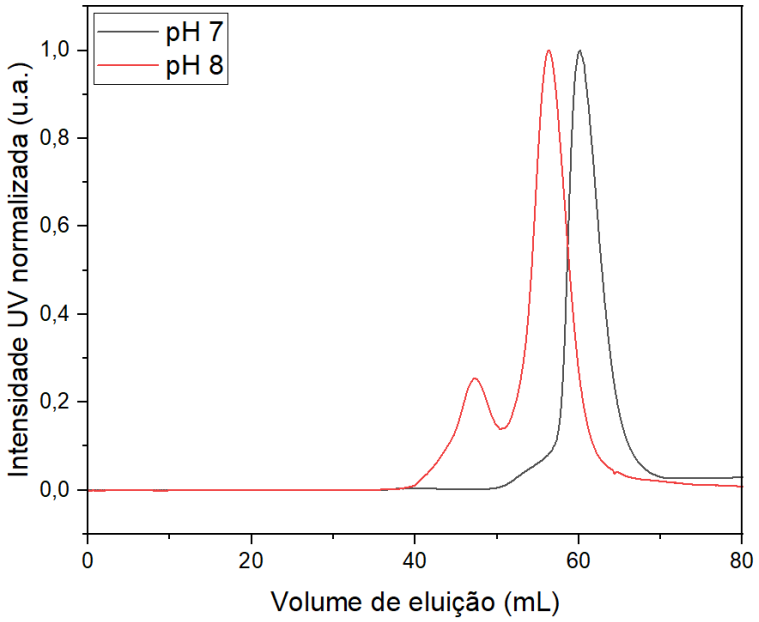
A purificação por afinidade ao Cobalto foi realizada com concentrações gradativas de Imidazol (20 – 1000 mM) e as amostras coletadas para aplicação em gel SDS-PAGE (Figura 21).

Figura 21 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 WT por afinidade ao Cobalto. MM – Marcador de massa molecular (kDA); Flow – proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 – 1000 mM – concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.



Visto que as amostras já se encontravam puras, estas foram concentradas e aplicadas em coluna *Superdex 75* para a etapa de purificação por exclusão molecular apenas para troca de tampão nos pHs desejados. Na Figura 22 temos o perfil cromatográfico da proteína sendo eluída em tampões de mesma composição, porém com alteração no pH (7.0 e 8.0). Devido à margem de precisão presente nos pHmetros disponíveis no laboratório, optou-se pela extrapolação do pH intracelular de células cancerosas para 8.0.

Figura 22 – Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 WT em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). Nota-se um deslocamento no volume de eluição dependente do pH.



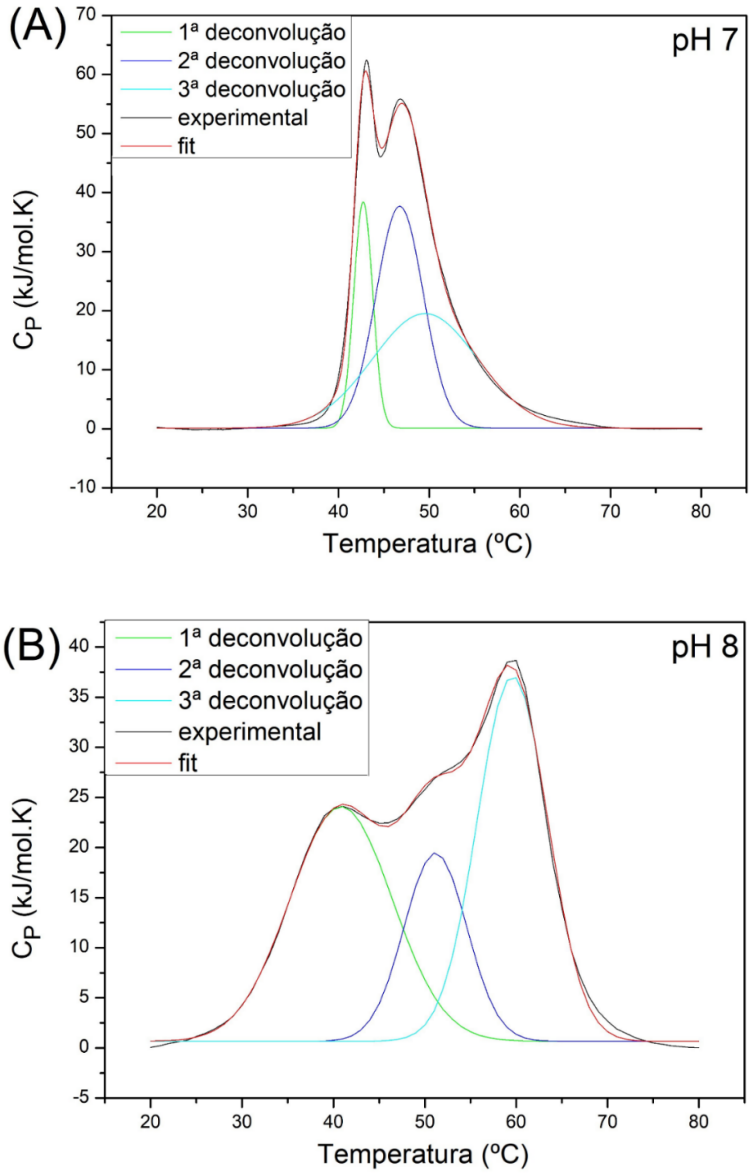
Como é possível observar pelo perfil cromatográfico acima, a proteína Grb2 WT apresenta um deslocamento no volume de eluição dependente do pH da solução utilizada. Visto que a cromatografia por exclusão molecular é realizada pela separação das proteínas de acordo com o seu tamanho, podemos supor, preliminarmente, que a proteína em pH 7.0 é mais compacta do que em pH 8.0 devido à sua eluição ocorrer em um volume menor de coluna. Além disso, em pH 8.0 há a presença de um pico eluído a partir de 40 mL, o qual foi coletado para aplicação em gel SDS-PAGE e confirmado ser uma forma oligomérica da proteína.

4.1.1.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Com o intuito de caracterizar mudanças na estabilidade térmica da proteína Grb2 WT em diferentes pHs, a proteína foi submetida à técnica de DSC para dois

diferentes pHs relacionados aos pHs intracelulares de células normais (7.0) e células cancerosas (8.0). Os termogramas obtidos estão representados abaixo na Figura 23.

Figura 23 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 WT obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas do DSC para a proteína Grb2 WT foram obtidas entre 20 e 80 ºC com taxa de aquecimento de 1 ºC/min. Em preto, tem-se a curva experimental obtida, em vermelho seu respectivo *fit*. Em verde tem-se a primeira deconvolução, seguida da segunda em azul e da terceira em ciano. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para se ajustar à curva experimental e cada uma delas pode ser associada aos três domínios da proteína. (A) Em pH 7.0 é observado um termograma estreito, correspondente à uma maior cooperatividade entre os domínios durante o processo de desnaturação térmica. (B) Um termograma mais amplo pode ser observado em pH 8.0, significando que os domínios desnaturam mais independente uns dos outros em um processo no qual a cooperatividade térmica é significativamente baixa.



Ambos termogramas apresentam um pico endotérmico deconvoluído por três curvas Gaussianas. A deconvolução foi realizada pelo número necessário para se ajustar aos dados experimentais. O ajuste das três deconvoluções pode estar correlacionado com a presença de três domínios em Grb2 WT (nSH3, SH2 e cSH3). Embora não seja possível determinar qual deconvolução está relacionada com qual domínio em específico, pode-se inferir que cada domínio apresenta uma relativa independência térmica durante o processo de desnaturação.

Embora os termogramas apresentem perfis similares em ambos os pHs, as temperaturas de *melting* e entalpia associadas a cada curva gaussiana muda de acordo com o pH escolhido. O aumento do pH resultou em um alargamento da curva do termograma juntamente com um deslocamento das temperaturas de *melting* associadas à cada deconvolução. A maior largura da curva experimental à meia altura de C_p em pH 8 (Figura 23b), quando comparado ao pH 7 (Figura 23a), demonstra uma menor cooperatividade entre domínios, levando à uma maior independência térmica de cada domínio da proteína. A maior cooperatividade em pH 7 pode ser correlacionada aos valores menores de entalpia calorimétrica visto que a desnaturação de um domínio influencia nos outros dois, enquanto em pH 8 observa-se um aumento nos valores da entalpia.

Tal independência corrobora com as temperaturas de *melting* de cada curva (Tabela 1), assim como as entalpias calorimétricas associadas (ΔH_{cal}), mostrando que embora pH 8.0 apresente uma menor cooperatividade, os maiores valores das temperaturas de *melting* conferem uma maior estabilidade térmica visto que é necessário uma quantidade energética mais elevada para desnaturar a proteína por completo.

Tabela 1 – Parâmetros termodinâmicos dos experimentos de DSC. Cada deconvolução em ambos os pHs estão associadas a diferentes temperaturas de *melting* e entalpias calorimétricas. As temperaturas de *melting* foram retiradas do valor máximo de C_p correspondente, enquanto as entalpias calorimétricas foram calculadas através da integração de cada deconvolução.

	pH 7.0		**pH 8.0**	
	T_m (ºC)	**ΔH_{cal} (kJ/mol)**	**T_m (ºC)**	**ΔH_{cal} (kJ/mol)**
Termograma Completo	43.0 ± 0.1	643 ± 9	60.0 ± 0.2	883 ± 3
1ª deconvolução	42.8 ± 0.1	99.7 ± 0.7	39.7 ± 0.2	328 ± 1
2ª deconvolução	46.7 ± 0.1	245 ± 2	52.4 ± 0.2	162 ± 2
3ª deconvolução	49.5 ± 0.1	281 ± 2	60.2 ± 0.2	352 ± 1

Na Tabela 2, temos os valores relacionados à entalpia de van't Hoff para cada deconvolução, assim como para o termograma completo.

Tabela 2 – Mudanças de entalpia de van't Hoff associadas a cada curva de deconvolução nos pHs 7.0 e 8.0. A entalpia foi calculada pela equação de van't Hoff para cada deconvolução assim como para o termograma completo.

	pH 7.0 (kJ/mol)	**pH 8.0 (kJ/mol)**
Termograma Completo	288.7 ± 0.6	112.8 ± 0.3
1ª deconvolução	1204.1 ± 0.9	215.5 ± 0.9
2ª deconvolução	522.8 ± 0.3	313.3 ± 0.4
3ª deconvolução	241.5 ± 0.1	342.6 ± 0.5

De um modo geral, a mudança de entalpia calorimétrica para o termograma completo é maior do que a mudança de entalpia de van't Hoff, indicando que a proteína Grb2 WT não se comporta como uma proteína de dois estados, possivelmente envolvendo estados intermediários de desnaturação ou domínios independentes.

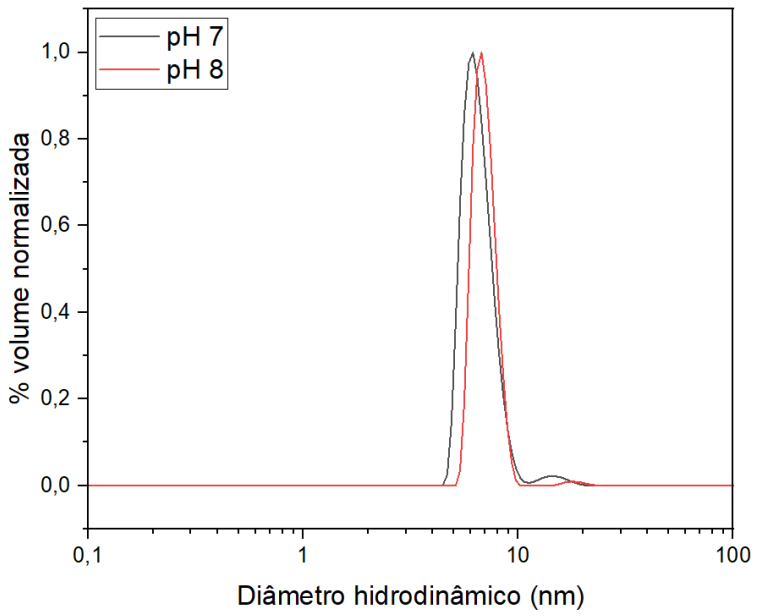
As diferenças nas mudanças de entalpia relacionadas à cada deconvolução necessita de uma análise mais detalhada, visto que em pH 7.0, a mudança de entalpia calorimétrica é menor do que a de van't Hoff nas duas primeiras

deconvoluções, demonstrando um possível efeito de irreversibilidade ou agregação, enquanto que em pH 8.0, esta é maior na segunda deconvolução, provavelmente devido à estados intermediários de desnaturação. A terceira deconvolução, no entanto, apresenta mudanças de entalpia calorimétrica similar à de van't Hoff para ambos os pHs, indicando um possível equilíbrio de dois estados.

4.1.1.2. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

Preliminarmente, através da purificação por exclusão molecular, observou-se uma diferença na compactação da proteína nos diferentes pHs, sendo mais compacta em pH 7.0 visto que esta é eluida em volume menor da coluna. Medidas de espalhamento dinâmico da luz permitiram determinar o diâmetro hidrodinâmico (D_H) da proteína nos sistemas investigados pela variação do pH. A Figura 24 apresenta os gráficos de porcentagem em volume por tamanho em nanômetro das amostras em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). Nota-se uma semelhança no tamanho da proteína em ambos os pHs com um pequeno aumento para o pH mais alto.

Figura 24 – Gráfico de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 WT em diferentes pHs básicos: 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). Nota-se em ambas as curvas a presença de dois picos, sendo o primeiro muito mais presente com porcentagem em massa perto de 100%, o qual foi considerado neste trabalho.

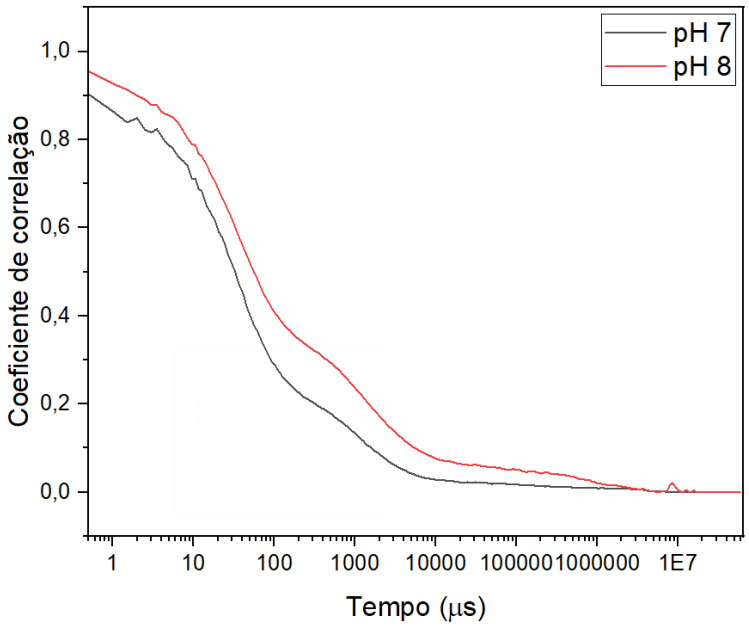


Duas populações são exibidas em cada pH. A primeira população, com porcentagem acima de 97% para ambas as medidas foi considerada na presente

análise. A segunda, devido à sua pequena percentagem, pode estar correlacionada à possíveis estados agregados da proteína, algum nível de oligomerização, ou partículas de poeira resultantes da manipulação da amostra para a realização do experimento.

O coeficiente de correlação, gerado pela técnica de DLS, nos ajuda a determinar o diâmetro hidrodinâmico de ambas as amostras (Figura 25). Grb2 WT em pH 7.0 apresenta um decaimento do coeficiente de correlação mais rápido quando comparado com a proteína em pH 8.0, especialmente perto de tempos na escala de milissegundos. Esta diferença de decaimento infere que a proteína em pH 8.0 é maior do que em pH 7.0.

Figura 25 – Coeficiente de correlação da proteína Grb2 WT em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) ao longo do tempo. O menor decaimento do coeficiente em pH 8.0 indica um volume maior ocupado pela proteína quando comparado com a amostra em pH 7.0, a qual apresenta um decaimento mais rápido do coeficiente de correlação.



Em pH 7.0, com uma porcentagem de 97.9%, a amostra consiste de partículas com o diâmetro hidrodinâmico de 6.509 nm com desvio padrão de 1.018 nm, característico de proteínas com massa molecular de aproximadamente 53.2 kDa. Este resultado é consistente com a massa molecular de Grb2 em seu estado dimérico, evidenciando que esta apresenta uma conformação tridimensional próxima de uma proteína globular. No entanto, em pH 8.0, o diâmetro hidrodinâmico de 6.927

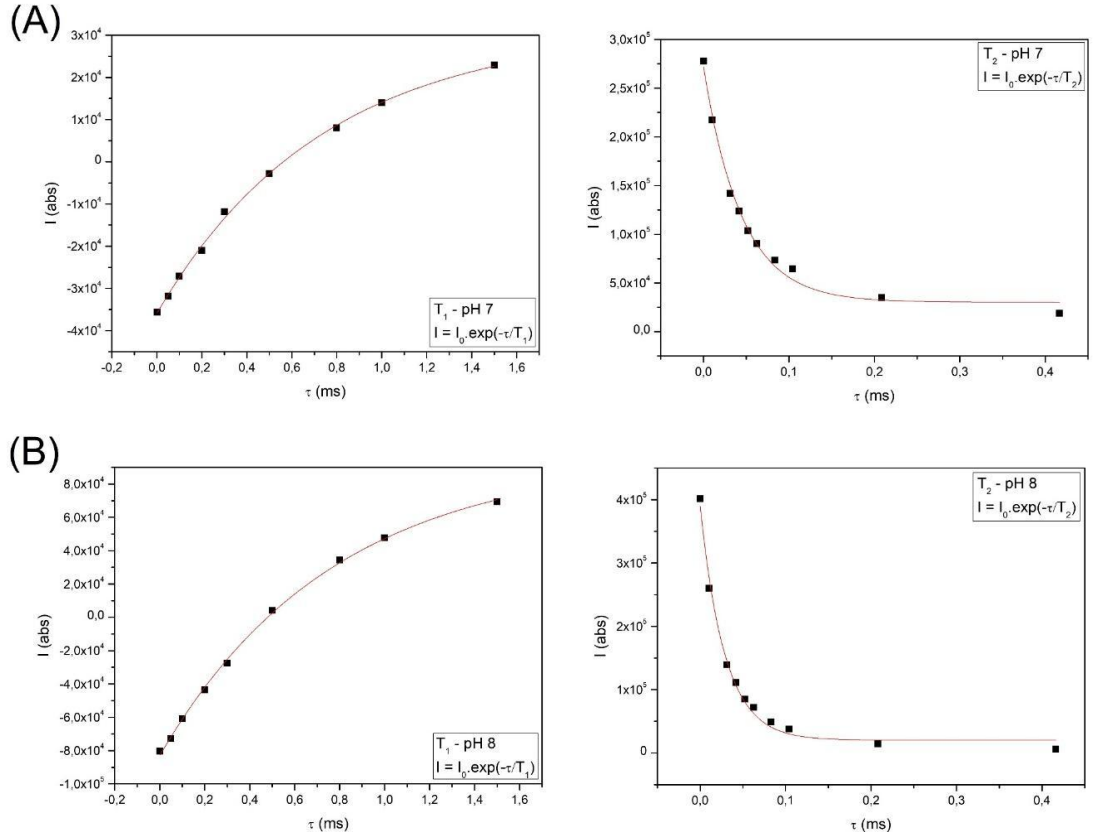
nm (desvio padrão de 0,814 nm) é um pouco maior do que o esperado para a proteína no mesmo estado oligomérico.

Visto que a determinação do diâmetro hidrodinâmico de uma molécula é definida como o diâmetro de uma esfera sólida perfeita, no qual quanto mais globular a proteína é, melhor correlacionado será o valor de D_H com o diâmetro real da proteína, é possível interpretar tal resultado como uma mudança da conformação estrutural de Grb2 WT para uma forma mais oblata.

4.1.1.3. T1 e T2 – ^{1}H – RMN

Para suportar os dados de DLS, experimentos de relaxação ^{1}H RMN foram realizados com o intuito de determinar os tempos de correlação rotacional da proteína em ambos os pHs. T1 (*time-lattice relaxation*) e T2 (*transverse relaxation*) foram calculados na região de 7.0 a 9.0 ppm. A Figura 26 mostra as curvas exponenciais utilizadas para ajustar T1 e T2 para 7.54 ppm em pH 7 (Figura 26a) e pH 8 (Figura 26b).

Figura 26 – Parâmetros de relaxação T1 e T2 para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) para 7.54 ppm adquiridos por medidas de ^{1}H – RMN. Ambos os parâmetros foram ajustados exponencialmente pelas equações presentes em cada gráfico.



Um total de 13 pontos foram selecionados para T1 e T2 e a média dos valores de cada um pode ser observado na Tabela 3, assim como a razão entre estes valores. Moléculas pequenas, e que apresentam alta rotação, apresentam valores longos de T1 e T2, enquanto a redução dos movimentos moleculares provoca um aumento nos valores de T1 e diminuição nos valores de T2 [80].

Tabela 3 – Valores médios de T_1 e T_2 dos 13 pontos analisados de 7.0 a 9.0 ppm em ambos os pHs. O valor maior razão T_1/T_2 em pH 8.0 indica que este possui um diâmetro maior do que a proteína em pH 7.0.

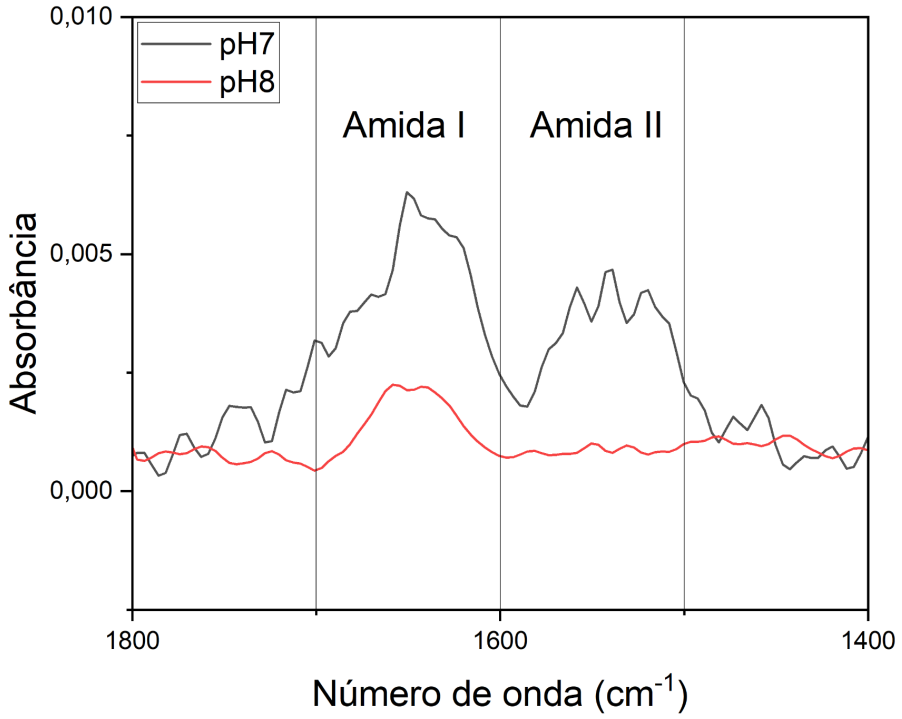
	pH 7.0	**pH 8.0**
T_1 (s)	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2
T_2 (s)	0.03 ± 0.01	0.019 ± 0.008
T_1/T_2	26.7 ± 0.4	31.6 ± 0.5

Em pH 8.0, observa-se um valor maior de T_1/T_2 quando comparado ao pH 7.0, característico de uma molécula com maior diâmetro, confirmando os dados de DLS em que a proteína apresenta um alargamento do diâmetro hidrodinâmico em pH mais básico.

4.1.1.4. Estrutura Secundária por Infravermelho

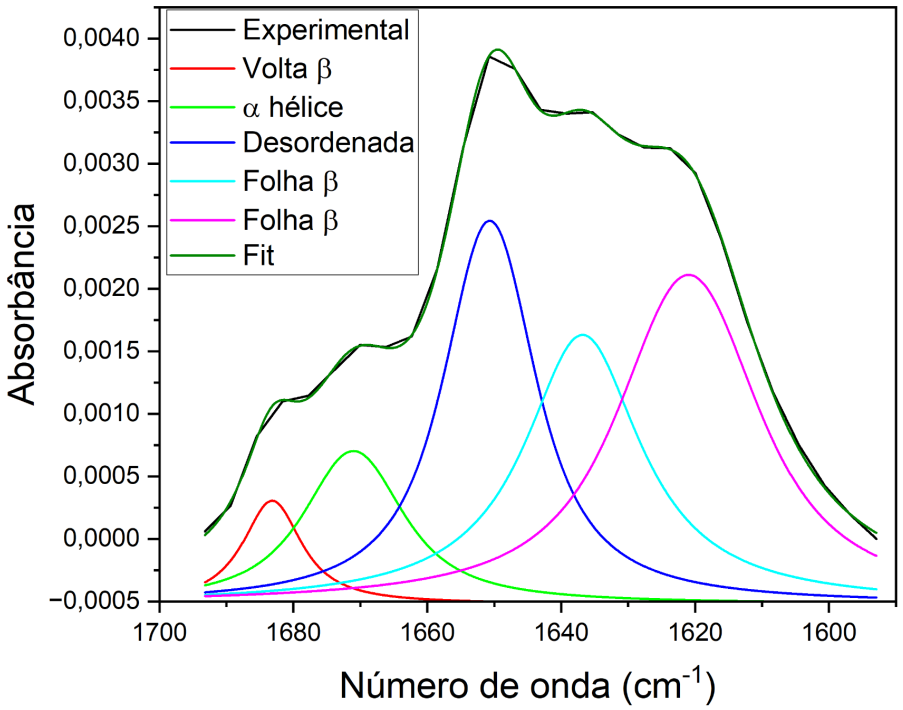
Experimentos de DLS e T1-T2 RMN mostraram um alargamento do diâmetro hidrodinâmico da proteína Grb2 WT em pH 8.0. Este aumento não necessariamente reflete em uma alteração da estrutura secundária da proteína mas também em um rearranjo das estruturas já existentes na proteína. Experimentos de Infravermelho por Transformada de Fourier foram realizados na linha de luz IMBUIA, localizada no SIRIUS, para determinar se a alteração do valor do pH de alguma forma afeta a composição de estrutura secundária da proteína Grb2 WT. Proteínas são caracterizadas no Infravermelho através de duas bandas: Amida I (1600 – 1700 cm^{-1}) e Amida II (1500 – 1600 cm^{-1}). Na Figura 27 tem-se a sobreposição dos espectros da proteína Grb2 WT em ambos os pHs, mostrando diferenças significativas em ambas as bandas utilizadas para a caracterização da estrutura secundária de proteínas.

Figura 27 – Espectro de Infravermelho da proteína Grb2 WT nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).



Devido ao baixo sinal da proteína Grb2 WT observado para a banda da Amida II, optou-se pela utilização da banda da Amida I (1600 – 1700 cm^{-1}) para a caracterização da sua estrutura secundária. Na Figura 28 tem-se o espectro da região da amida I da proteína Grb2 WT em pH 7.0, a qual foi deconvoluída em curvas gaussianas e lorentzianas no número mínimo necessário para satisfazer a curva experimental obtida.

Figura 28 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 7. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta (~1680 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



O cálculo das porcentagens de cada estrutura secundária foi realizado através da porcentagem da área de cada deconvolução relativa à área total do espectro analisado.

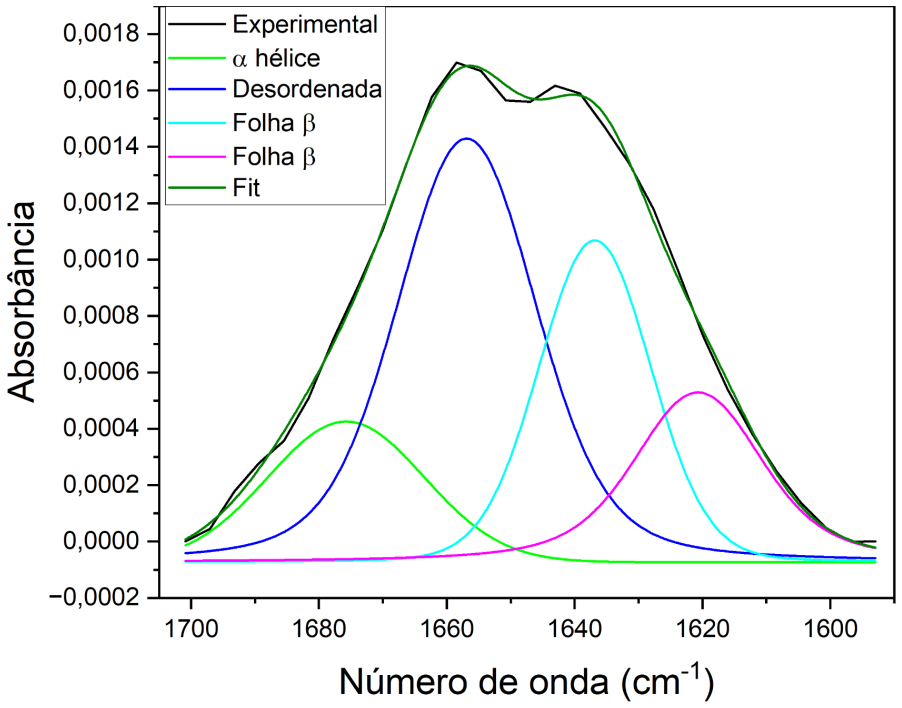
Na Tabela 4 encontram-se as porcentagens calculadas para pH 7.0 assim como os números de onda do centro de cada deconvolução utilizada para a determinação da estrutura estudada. Os números de onda relativos à cada estrutura podem apresentar deslocamento dependente do microambiente em que a proteína se encontra, além de um erro relacionado à resolução do experimento. Sendo assim, utilizou-se valores médios encontrados na literatura: 1624 – 1642 cm^{-1} para folhas-beta, 1650 – 1660 cm^{-1} para estruturas desordenadas, 1660 – 1970 cm^{-1} para hélices-alfa e 1680 – 1699 cm^{-1} para voltas-beta [70], [71], [81].

Tabela 4 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 7.0. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1682 ± 8	Volta β	5%
1671 ± 8	α hélice	11%
1650 ± 8	Desordenada	26%
1636, 1621 ± 8	Folha β	58%

Para a proteína em pH 8.0 (Figura 29) foram realizados os mesmos métodos de deconvolução empregados para pH 7.0, assim como o cálculo das porcentagens estruturais a partir da área relativa de cada curva deconvoluída.

Figura 29 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 8. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em verde é característica de alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



Diferentemente da proteína em pH 7.0, não foi possível observar uma influência de voltas beta no espectro de Grb2 WT em pH 8.0. A porcentagem das demais estruturas estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho evidenciando o aumento percentual de estruturas desordenadas acompanhado com um decréscimo de folhas β.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1675 ± 8	α hélice	14,4%
1650 ± 8	Desordenada	43%
1636, 1621 ± 8	Folha β	42%

Como evidenciado pelas porcentagens analisadas, observa-se uma diminuição de 16% em folhas beta e um aumento de 17% em estruturas desordenadas. A proteína Grb2 é majoritariamente composta por folhas beta. Sabe-se que folhas beta são lateralmente conectadas por pelo menos duas ou três pontes de hidrogênio, as quais conferem uma constrição de curto alcance e maiores valores entálpicos para proteína. O decaimento no número de folhas beta em pH 8,0 diminui consideravelmente a quantidade de pontes de hidrogênio da proteína. Esta redução de pontes pode ser correlacionada com uma conformação mais flexível, como visto com os dados de DLS, assim como um menor valor de entalpia necessário para a desnaturação da proteína, como evidenciado pelos dados de DSC.

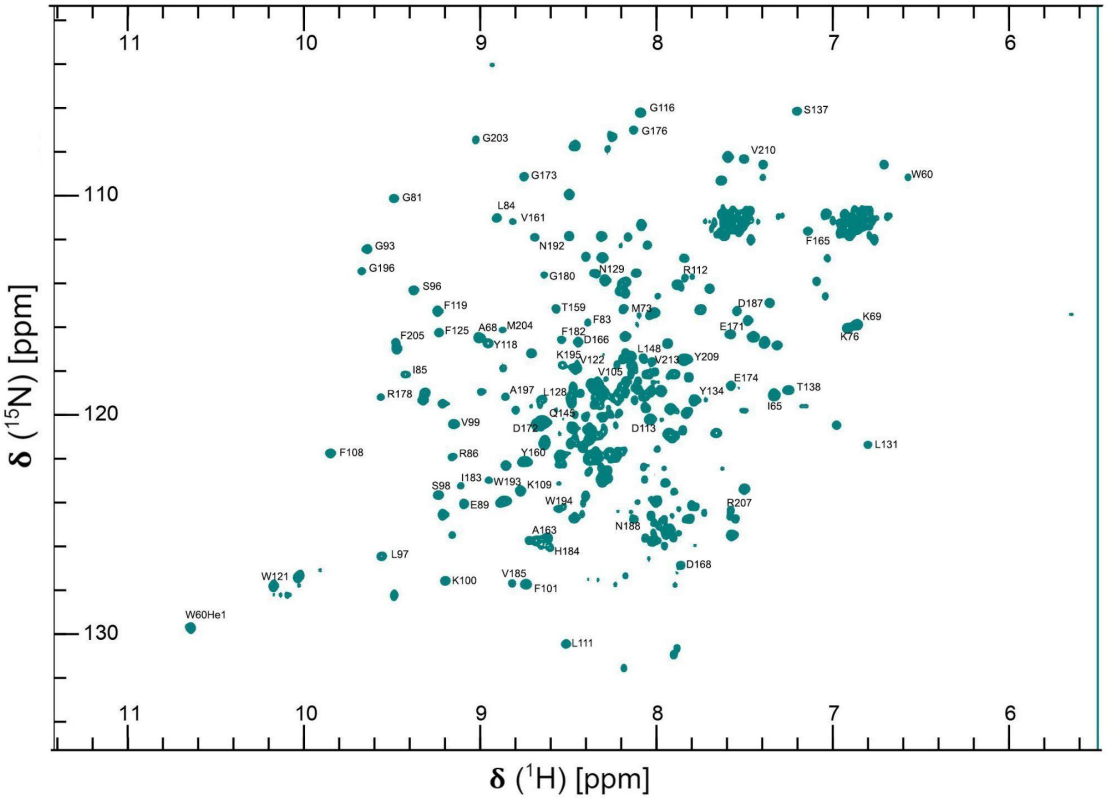
4.1.1.5. $^{1}H,^{15}N$ – HSQC – RMN

Experimentos de DSC e DLS indicam mudanças na cooperatividade entre os domínios da proteína Grb2 WT e seu arranjo conformacional, como visto por Infravermelho. Experimentos de $^{1}H,^{15}N$ – HSQC foram realizados com o intuito de mapear quais regiões estão sendo mais afetadas em função do pH.

O espectro de Grb2 em pH 7.0 (Figura 30) mostra um número de picos consistente com a quantidade de aminoácidos da proteína. O assinalamento de cada aminoácido foi realizado por comparação com os assinalamentos dos domínios SH2 e cSH3 depositados no *Biological Magnetic Resonance Bank* com IDs 27781 e 18748, respectivamente.

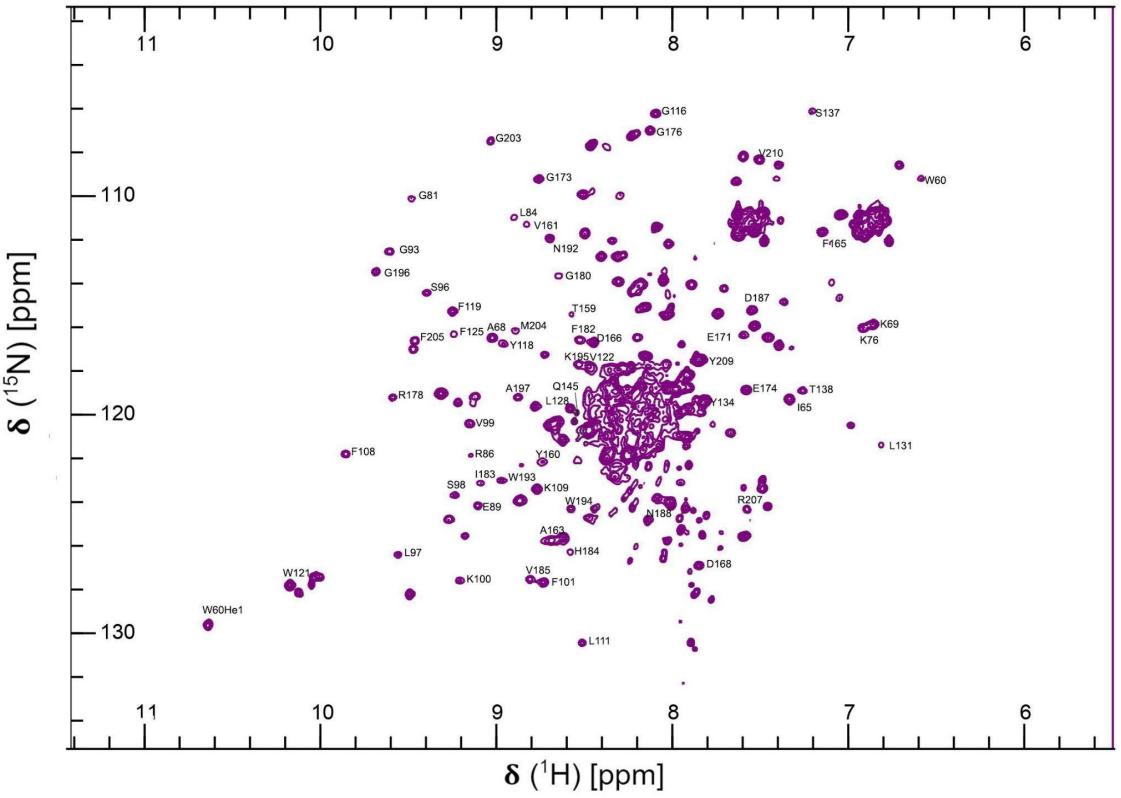
Visto que os assinalamentos já existentes foram realizados em condições químicas diferentes (tampão e domínios livres), alguns aminoácidos da proteína completa não foram assinalados devido à ambiguidade de alguns picos. No entanto, grande parte dos aminoácidos foram assinalados com êxito como pode ser visto na figura a seguir.

Figura 30 – Espectro 2D ^{1}H, ^{15}N-HSQC de 350 uM de Grb2 WT em 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.0 contendo 50 mM NaCl, 1 mM BME, 90% H_2O/10% D_2O. Os assinalamentos foram realizados através de comparação com assinalamentos dos domínios SH2 e cSH3 isolados depositados no *Biological Magnetic Resonance Bank* com IDs 27781 (SH2) e 18748 (cSH3).



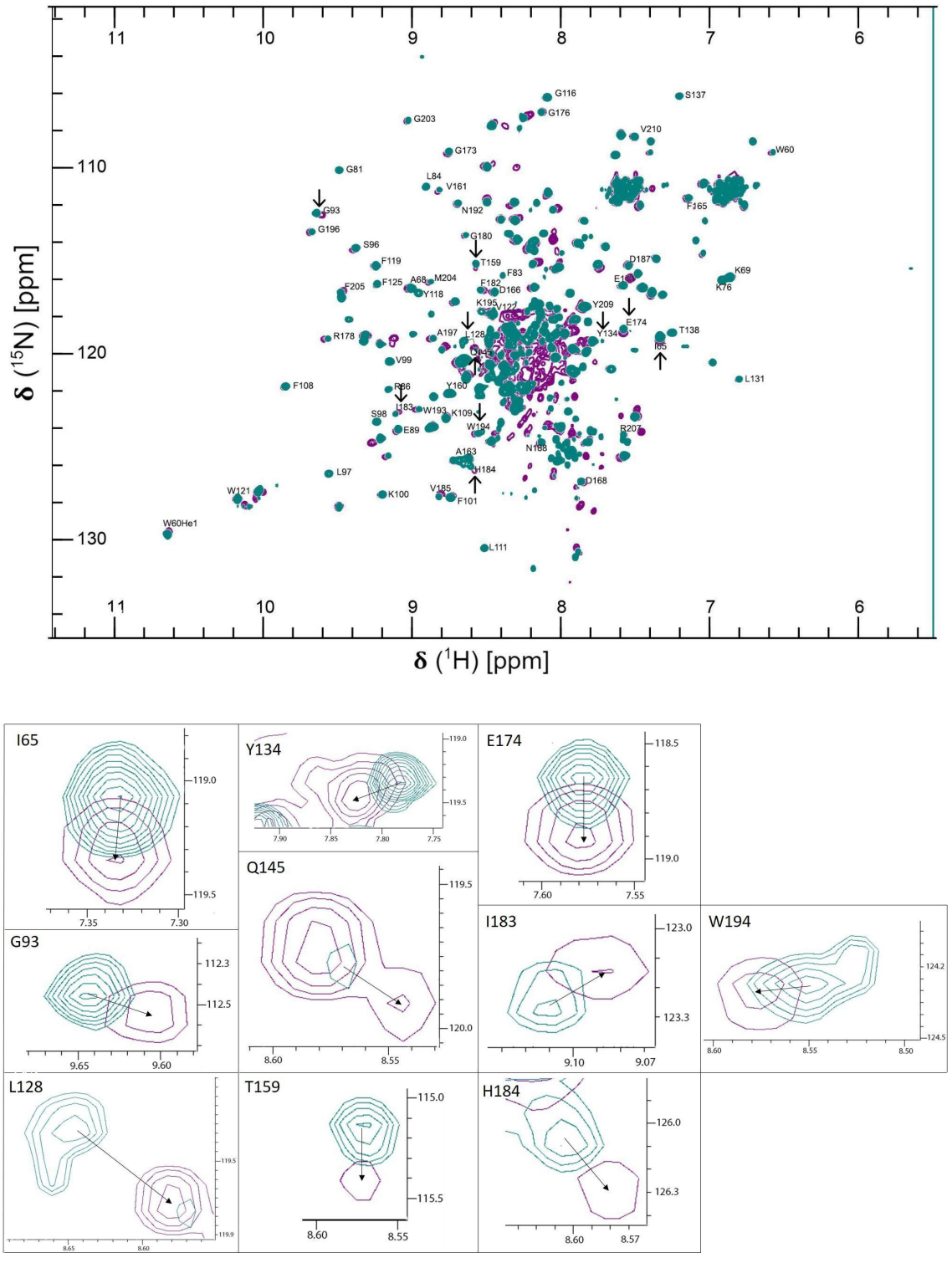
O espectro de ^{1}H, ^{15}N-HSQC da proteína em pH 8.0 foi analisado de maneira semelhante ao realizado com pH 7.0 (Figura 31). Alguns aminoácidos não puderam ser assinalados devido à ambiguidade de picos, como já comentado para a análise em pH 7.0, e devido à uma falta de resolução no espectro em pH 8.0, demonstrado pela região central (9 – 8 ppm, ^{1}H; próximo de 120 ppm, ^{15}N), o que é consistente com uma desestruturação da proteína nestas condições.

Figura 31 - Espectro 2D ^{1}H, ^{15}N-HSQC de 350 uM de Grb2 WT em 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 contendo 50 mM NaCl, 1 mM BME, 90% H_2O/10% D_2O. Os assinalamentos foram realizados através de comparação com assinalamentos dos domínios SH2 e cSH3 isolados depositados no *Biological Magnetic Resonance Bank* com IDs 27781 (SH2) e 18748 (cSH3).



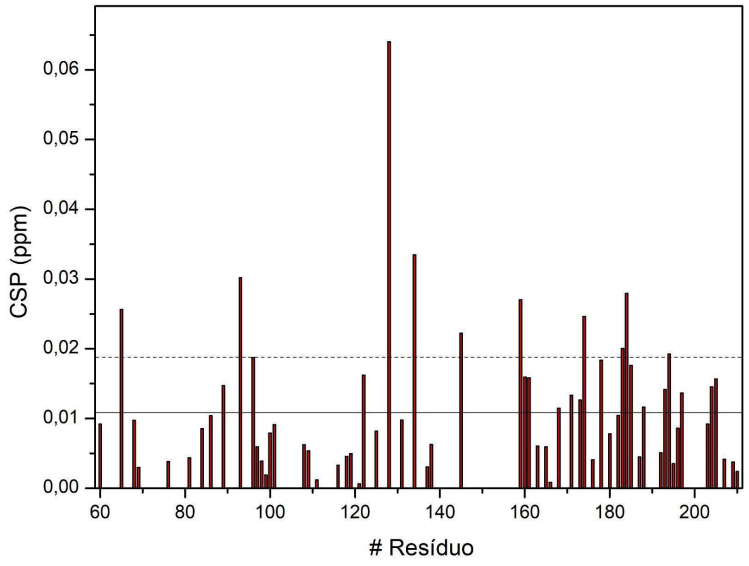
A sobreposição dos espectros foi realizada com o intuito de monitorar quais aminoácidos, comumente assinalados em ambos os pHs, estavam sofrendo uma maior perturbação de deslocamento químico (Figura 32).

Figura 32 – Sobreposição dos espectros 2D ^{1}H,^{15}N-HSQC da proteína Grb2 WT com concentração de 350 μM em 20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.0 (verde) e pH 8.0 (roxo) contendo 50 mM NaCl, 1 mM BME, 90% H_2O/10% D_2O. Os resíduos de aminoácidos em comum de ambos os pHs são mostrados na figura e as setas indicam os que apresentam maior deslocamento. Tais resíduos de aminoácidos são mostrados em maior resolução na parte inferior da figura.



Como visto na figura acima, a sobreposição de ambos os espectros com seus assinalamentos em comum mostra a presença de perturbações de deslocamento químico para alguns dos aminoácidos. Na Figura 33 foi realizado o histograma de tais aminoácidos e suas respectivas perturbações de deslocamento químico em relação ao nitrogênio. Os valores foram obtidos através dos deslocamentos encontrados em pH 8.0 com referência ao pH 7.0. Foram considerados com maior perturbação do deslocamento químico os aminoácidos que apresentaram valor maior do que a média (0.012 ppm - linha cheia) acrescida do desvio padrão (0.019 ppm - linha pontilhada).

Figura 33 – ^{15}N perturbação do deslocamento químico (CSP) por resíduo de aminoácido de Grb2 WT. Os valores de CSP foram obtidos através do *software* CcpNMR por comparação entre os espectros do pH 7.0 e pH 8.0 e plotados no programa Origin Pro 8. A linha cheia faz referência à média dos deslocamentos (0.012 ppm) e tal média acrescida do desvio padrão é definida pela linha pontilhada (0.019 ppm).



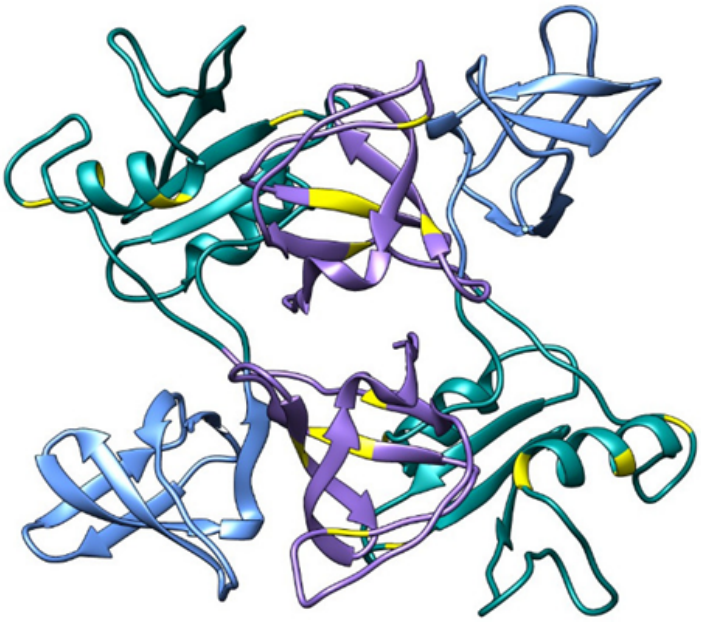
Embora todos os aminoácidos em comum tenham sofrido alguma perturbação do deslocamento químico, visto que a mudança de ambiente químico (pH) por si só já influencia a perturbação do deslocamento químico de alguns resíduos de aminoácidos, foi considerado no presente estudo a influência de 10 resíduos de aminoácidos que obtiveram uma perturbação de deslocamento químico maior do que a média acrescida do desvio padrão, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Resíduos de aminoácidos com valores de perturbação de deslocamento químico maiores do que a média acrescida do desvio padrão e seus respectivos valores.

Domínio SH2		**Domínio cSH3**	
Resíduo de aa	**CSP (ppm)**	**Resíduo de aa**	**CSP (ppm)**
I65	0.02563	T159	0.02705
G93	0.03018	E174	0.02462
L128	0.06401	I183	0.02006
Y134	0.03349	H184	0.02793
Q145	0.02222	W194	0.01925

Pelas análises dos espectros 2D ^{1}H, ^{15}N-HSQC e os valores de CSP, uma mudança equilibrada devido à alteração do pH é notada em ambos domínios SH2 (Tabela 6 – colunas 1 e 2) e cSH3 (Tabela 6 – colunas 3 e 4) com 5 resíduos de aminoácidos por domínio. A Figura 34 representa os resíduos de aminoácido com maiores valores de CSP e sua localização nas estruturas conhecidas da proteína Grb2 WT.

Figura 34 - Estrutura da proteína Grb2 WT cristalográfica (PDB: 1GRI). Os resíduos de aminoácido com maiores valores de CSP estão destacados em amarelo. A grande maioria destes estão localizados em estruturas secundárias ordenadas (hélices-alfa para o SH2 e fitas-beta para o cSH3).



Como observado, a maioria dos aminoácidos destacados na proteína estão localizados em estruturas secundárias ordenadas, levando à suposição de que tais perturbações possam influenciar diretamente na conformação da proteína, visto que os dados de infravermelho apresentam uma redução na porcentagem de estruturas ordenadas em pH 8.0.

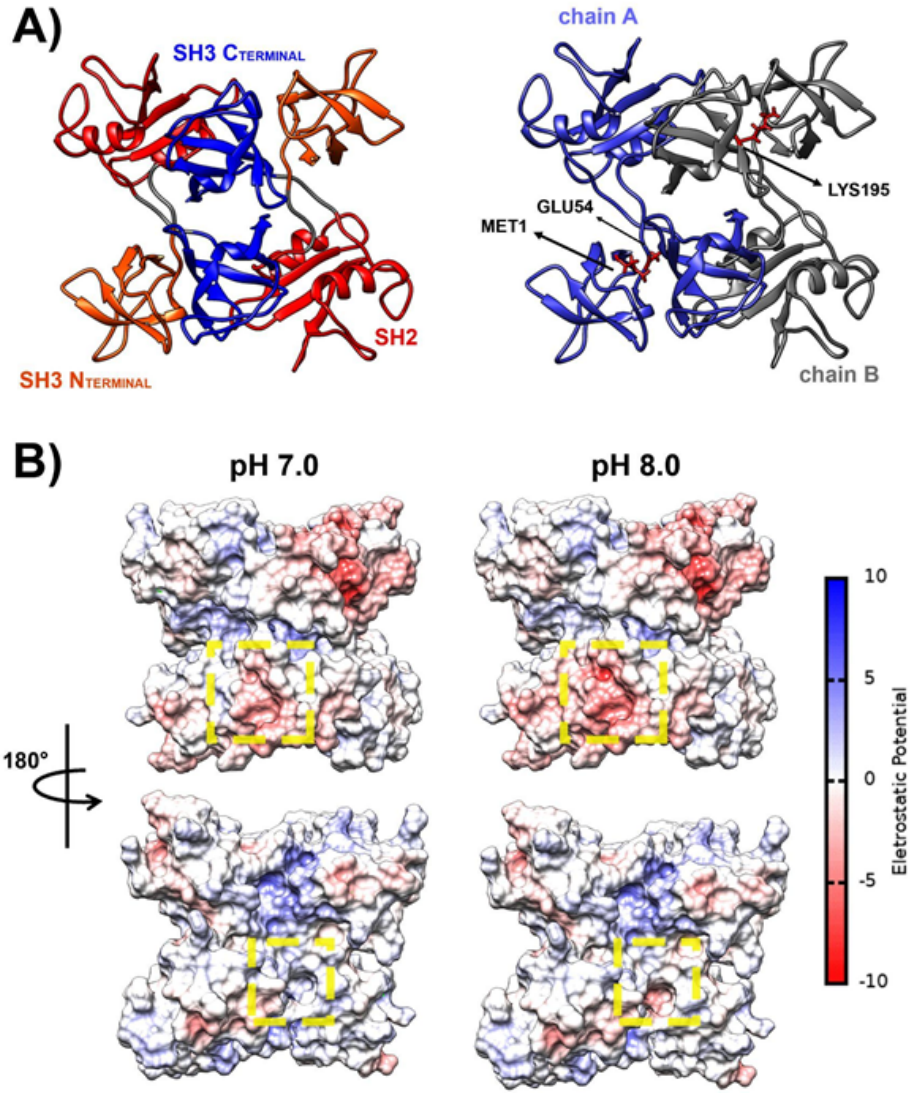
Resultados de DLS e T1-T2 RMN indicaram que o aumento do pH leva a um aumento do diâmetro da proteína, sendo natural supor que tais mudanças são determinadas não somente pela maior flexibilidade da proteína devido ao aumento de estruturas desordenadas, como visto pelos experimentos de infravermelho, mas também por perturbações dos domínios externos da proteína, como observado para o caso do cSH3 a partir dos resultados de CSP.

Embora algumas perturbações de deslocamento químico sejam observadas em aminoácidos não assinalados no espectro de $^{1}H,^{15}N$-HSQC, principalmente na região do domínio nSH3, a falta de tal assinalamento torna difícil a certeza de que é esta tendência que ocorre nos domínios em decorrência do aumento de pH. Como uma alternativa para tal problema, estudos computacionais foram realizados para mapear os movimentos realizados pela proteína durante a elevação do pH.

4.1.1.6. Estudos Computacionais

De acordo com os resultados experimentais, a proteína Grb2 WT apresenta diferentes sinais de relaxação e uma mudança estrutural global de pH 7.0 para pH 8.0 (vide seção 4.1.1.3). Computacionalmente, a primeira avaliação que foi realizada é a verificação das cargas de Grb2 em ambos os pHs. Considerando o pH e também o ambiente químico dos resíduos, observou-se que apenas 3 resíduos da proteína possuem uma alteração na protonação devido à mudança de pH. Apesar da estrutura ser um dímero, tais alterações não são espelhadas nas duas subunidades (monômeros) devido à disposição dos domínios e suas interações. A mudança de carga ocorre em resíduos localizados na interface de interação entre os domínios cSH3 e nSH3, afetando principalmente o domínio cSH3 (Figura 35a). As diferenças são intensificadas na cadeia A (M1 e E54) enquanto a cadeia B apresenta uma mudança moderada de carga (K195) (Figura 35a e 35b).

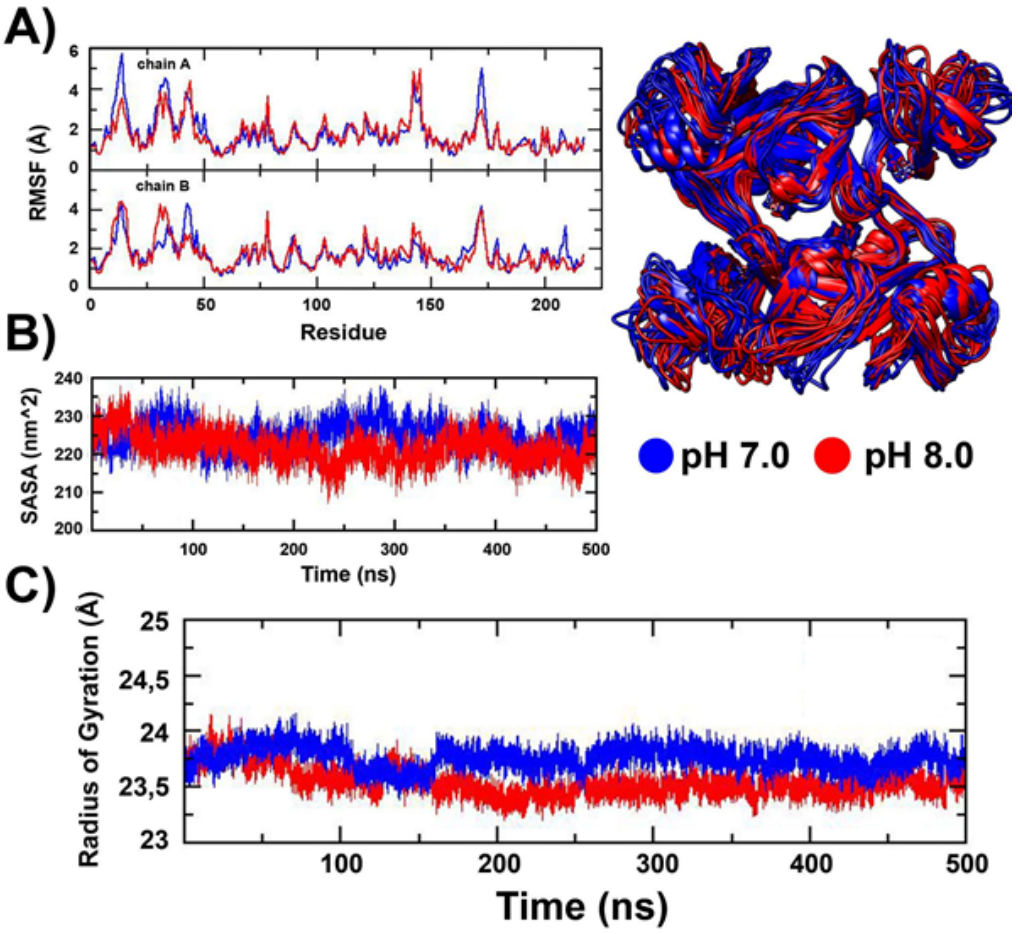
Figura 35 – Diferenças de cargas teóricas em pH 7.0 e 8.0 para a proteína Grb2 WT. A) Estrutura cristalográfica dimérica da proteína Grb2 WT (PDB: 1GRI). As cores representam os domínios cSH3 (azul), SH2 (vermelho) e nSH3 (laranja), assim como as cadeias A (azul) e B (cinza). Os resíduos destacados apresentam mudanças na protonação em pH 7.0 e 8.0. B) Representação da superfície da estrutura cristalográfica de Grb2 WT colorida de acordo com o potencial eletrostático e mostrando as regiões que são afetadas pelas mudanças de protonação.



Uma vez determinado os sistemas e cargas a serem utilizados, foram realizadas três réplicas de dinâmica molecular e todas as análises são referentes às médias desses três sistemas. Como primeira análise, calculamos as diferenças de flutuações residuais (RMSF – *Root-Mean-Square Fluctuations*) (figura 36a), mostrando que de modo geral, a estrutura dimérica de Grb2 é estável, e sem mudanças estruturais significativas. Juntamente com o RMSF, *clusterizamos* as estruturas mais representativas das dinâmicas nos diferentes pHs e alinhamos para

verificar as diferenças dos movimentos em suas estruturas terciárias. Nota-se que a região em que as mudanças estruturais são predominantes, é no domínio cSH3, corroborando com os resultados experimentais de $^{1}H,^{15}N$-HSQC, nos quais foi observado perturbações dos deslocamentos químicos para 5 resíduos presentes nesse domínio. Os cálculos de área acessível ao solvente (SASA) e raio de Giro (Figura 36b e 36c) também mostram estabilidade de Grb2 dimérica em ambos os pHs, todavia estes são cálculos estruturais globais e que não possibilitam destacar as pequenas variações em Grb2 uma vez que o número de resíduos (434, proteína dimérica) e sua estabilidade são fatores limitantes.

Figura 36 – Análise da dinâmica molecular. A) *Root-Mean-Square Fluctuations* (RMSF) da proteína Grb2 WT e sobreposição das estruturas durante os 500 ns da dinâmica molecular. B) Área Acessível ao Solvente (SASA). C) Raio de giro. Todos os gráficos e estruturas foram coloridos de acordo com a protonação relativa ao pH.

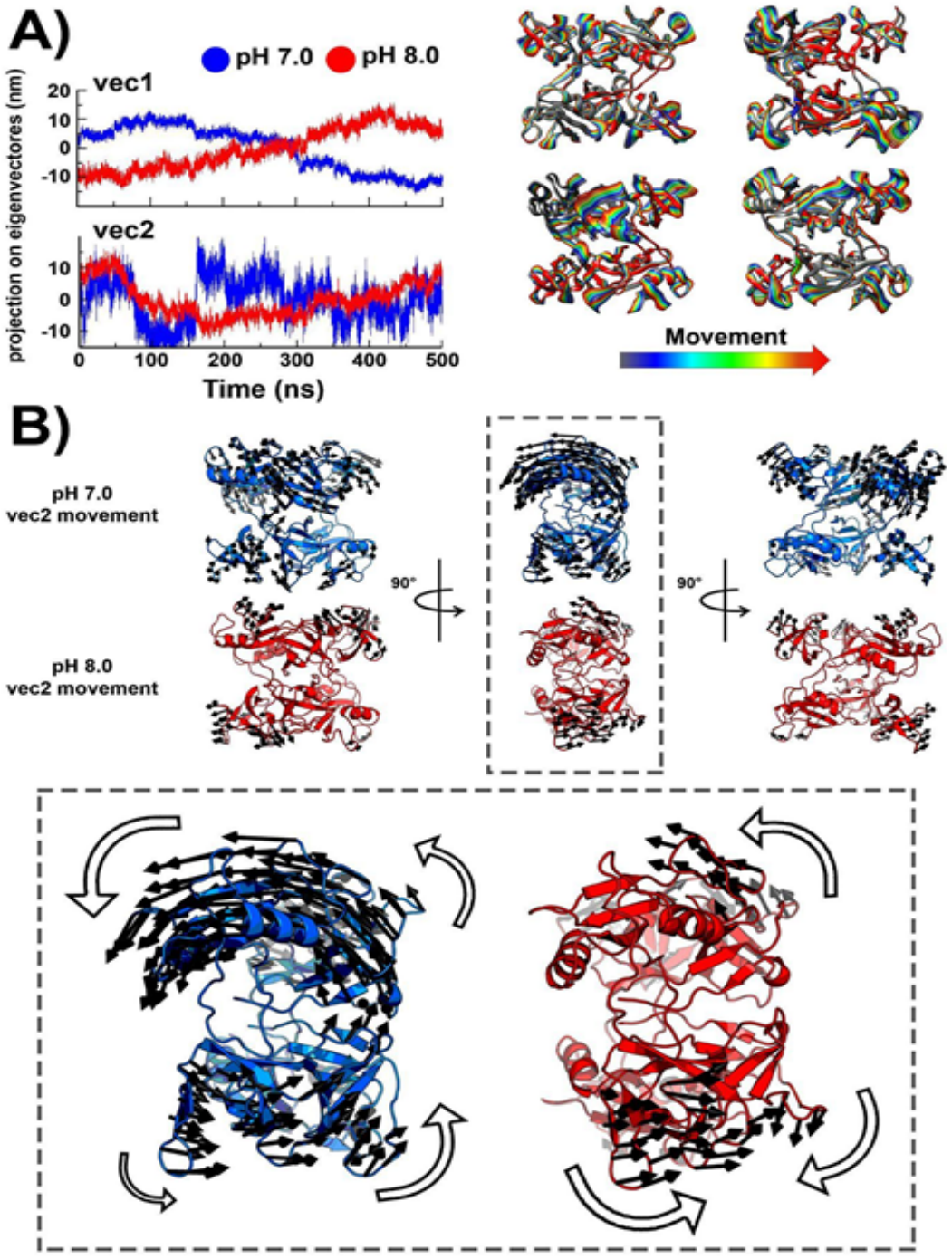


Como alternativa para avaliação de movimentos das estruturas terciárias de Grb2, utilizamos a técnica de PCA (*Principal Component Analysis*) para decompor os

dois movimentos de maiores amplitudes durante a dinâmica molecular (Figura 37a). Assim, os movimentos que não conseguimos verificar com as análises anteriores devido à estabilidade e tamanho podem ser avaliados. A decomposição desses dois movimentos mostram que a dinâmica molecular do sistema com protonações relativas ao pH 7.0 ocorrem de modo que os domínios têm tendência a se compactar em uma forma globular com um maior número de vetores de movimento e orientação no sentido do centro da proteína (Figura 37b). Já para o pH 8.0, esses vetores são espalhados em sentidos opostos e não mostram essa mesma tendência de movimento.

Este resultado vai de encontro com os resultados experimentais de DLS e $^{1}H,^{15}N$-HSQC, que mostraram uma estrutura globular e compacta para Grb2 em pH 7.0. Além disso, nos traz hipóteses e sugestões referentes às diferentes conformações estruturais da proteína Grb2 WT em soluções de pHs distintas, caracterizadas por diferenças de estabilidade e flexibilidade, como relatado pelos dados de DLS e Infravermelho, os quais apontam um aumento do diâmetro hidrodinâmico da proteína acompanhado por uma alteração em sua estrutura secundária. Tais mudanças conformacionais podem afetar diretamente as interações com proteínas parceiras, impactando sua atuação em vias de sinalização com pHs normais e cancerígenos, além de influenciar na ligação de pequenos ligantes com propriedades anticarcinogênicas, como é o caso da molécula de Cumarina 1,2-benzopirona, possibilitando novos sítios de interação devido à maior flexibilidade da proteína Grb2 WT.

Figura 37 – Decomposição do movimento da dinâmica molecular. A) Vetores representando dois movimentos com maior amplitude de Grb2 WT durante a dinâmica molecular. As estruturas representam o movimento calculado por esses vetores. Estas foram coloridas de acordo com a direção do movimento indicado pela flecha na barra de cores. B) Vetores com maior intensidade são mostrados, indicando a direção e movimento da estrutura da proteína.



4.1.2. Interação Grb2 WT e Cumarina nos pHs 7.0 e 8.0

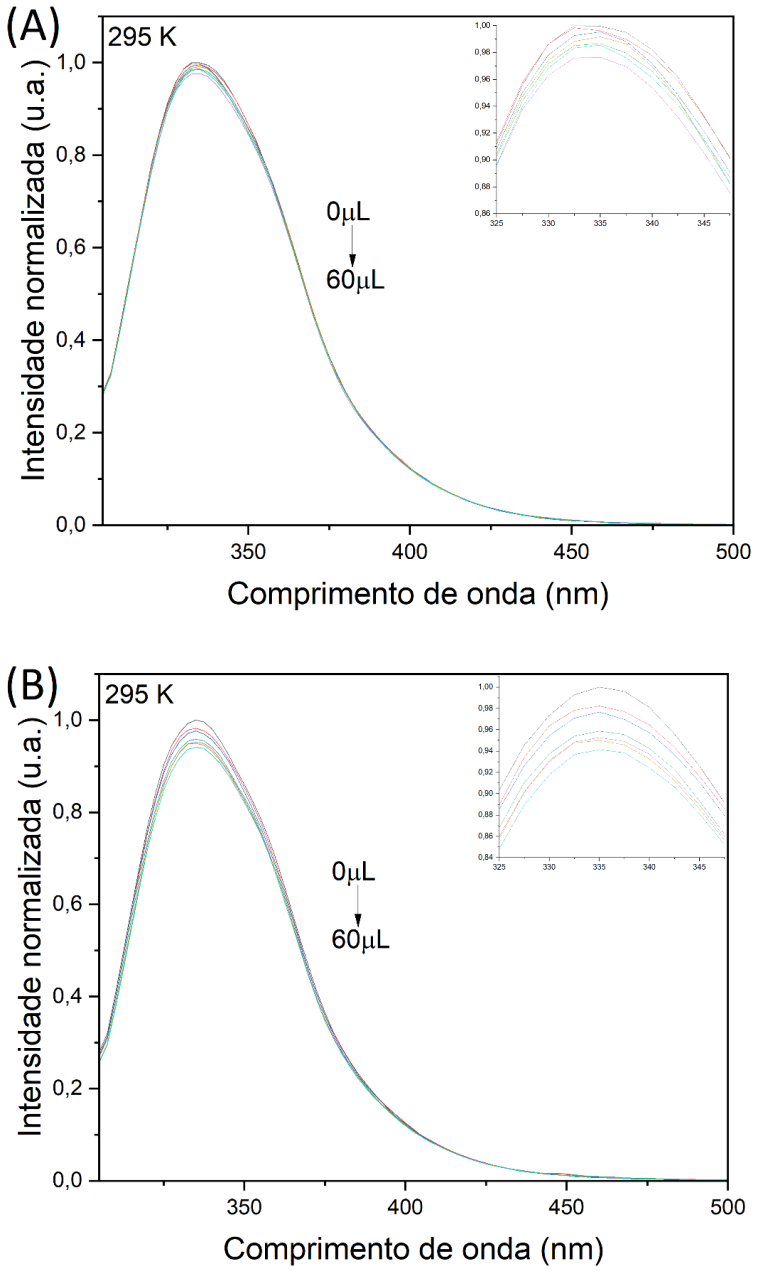
A molécula de Cumarina (1,2-benzopirona), como já citado, apresenta-se como um ótimo alvo de estudos moleculares visto sua característica anticarcinogênica e com resultados celulares promissores. Estudos da interação da proteína Grb2 WT com a molécula de Cumarina em pH 8.0 foram realizados anteriormente [48] e mostraram uma interação dinâmica do tipo hidrofóbica moderada, na ordem de 10^5 M^{-1} na qual um ligante interage com uma unidade proteica, sendo a proporção proteína-ligante 1:1. Decorrente dos resultados demonstrados acima referentes às mudanças na flexibilidade da proteína, se faz necessário a caracterização de tal interação em pH 7.0. Desta forma, optou-se por refazer o estudo da interação em pH 8.0 e realizá-lo em pH 7.0.

4.1.2.1. Espectroscopia de Fluorescência

Para os experimentos de Espectroscopia de Fluorescência, visto que o comportamento foi semelhante em todas as temperaturas, serão mostrados apenas os gráficos referentes à temperatura de 295 K e os gráficos das demais temperaturas encontram-se no Anexo A.

Um experimento controle foi realizado apenas com a titulação de etanol para determinar sua influência na proteína visto que a molécula de Cumarina foi diluída em etanol absoluto. O volume máximo de etanol presente na solução com proteína foi de 3% do volume total, de forma que não ultrapassasse o valor de 10% necessário para desnaturar a estrutura terciária a ponto de interferir no experimento [82]. A Figura 38 mostra o espectro de emissão de fluorescência da proteína Grb2 WT, a 295 K com adição de etanol absoluto.

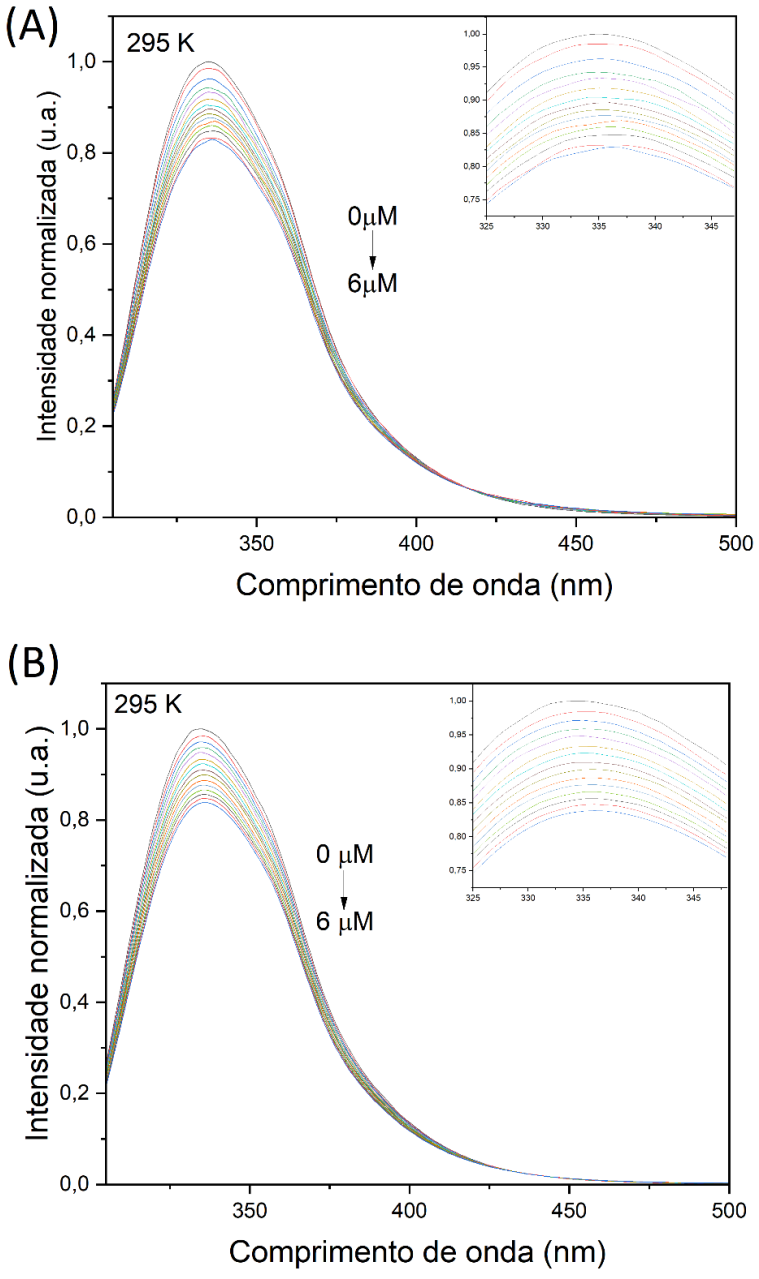
Figura 38 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 295 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.



A adição do etanol na proteína acarretou em uma supressão comparável entre os dois pHs. A maior diferença foi observada em pH 8 na temperatura de 295 K com uma redução de 5,7% na intensidade da fluorescência. Visto que este decaimento é menor do que 10%, os experimentos foram realizados normalmente até uma proporção de 3:1 em concentração de ligante:proteína.

A supressão de fluorescência da proteína em ambos os pHs na presença de Cumarina é apresentada na Figura 39 a seguir.

Figura 39 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 295 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo de fluorescência em maior resolução.

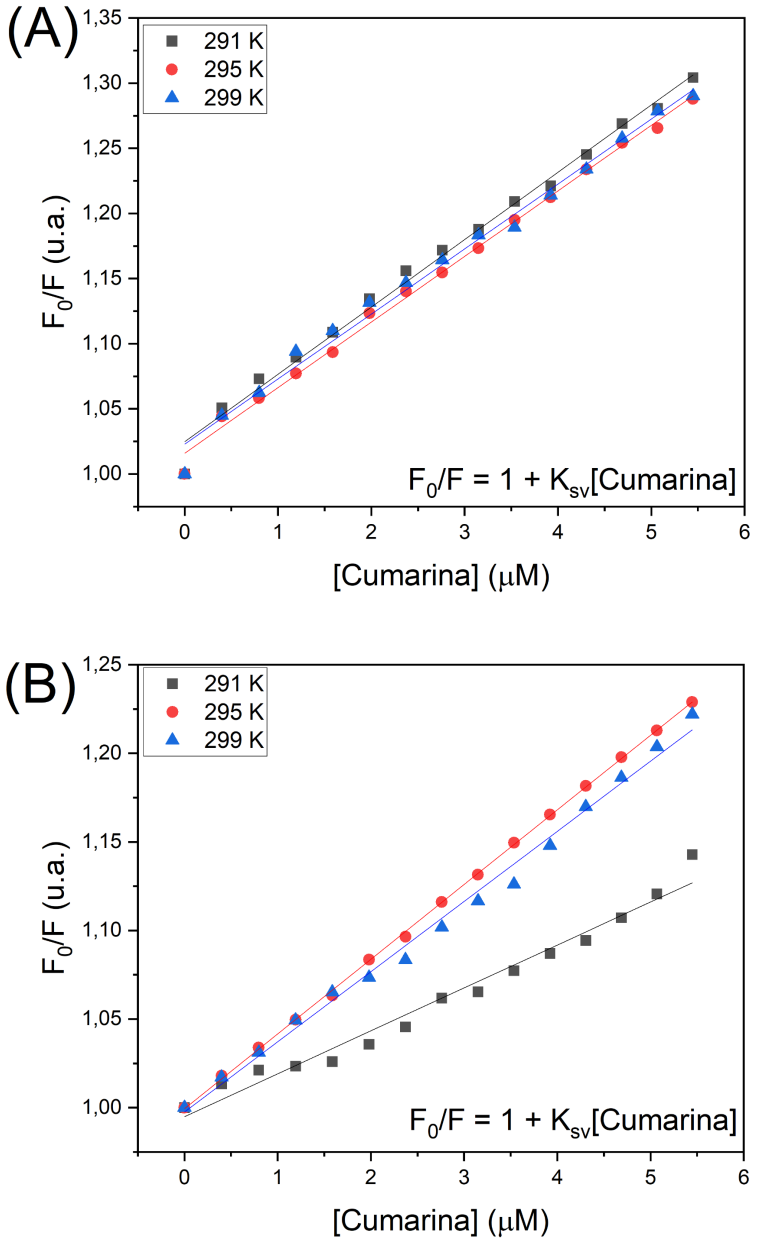


Os gráficos acima apresentados indicam que há interação entre Grb2 e Cumarina em ambos os pHs, visto que quanto maior a concentração de Cumarina no microambiente próximo ao triptofano, menor é a intensidade de fluorescência da

Grb2 WT. Percentualmente, a supressão da fluorescência em 295 K foi de 19,6% em pH 7.0 e 16,2% em pH 8.0.

A Figura 40 demonstra que os valores de supressão obtidos estão de acordo com a equação de Stern-Volmer nas temperaturas estudadas, apresentando uma linearidade da intensidade de fluorescência da proteína na presença de Cumarina (F_0/F) [67].

Figura 40 – Gráfico de Stern-Volmer. Supressão da fluorescência de Grb2 WT nas temperaturas 291 (preto), 295 (azul) e 299 K (vermelho) pela concentração de Cumarina. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0.



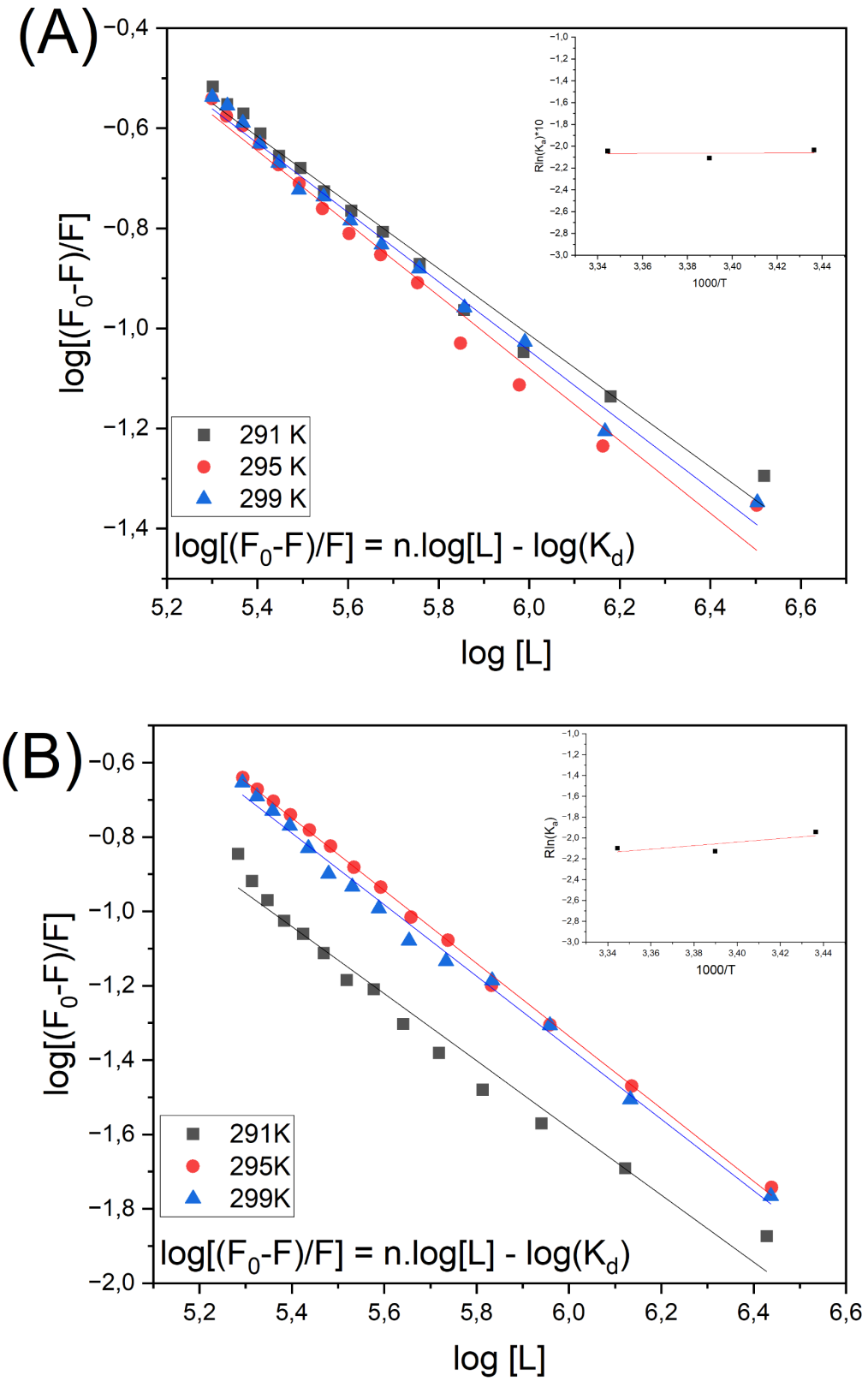
As constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) nas correspondentes temperaturas foram obtidas através de ajuste linear dos pontos pela equação apresentada nos gráficos. Os valores das constantes para o sistema Grb2 WT – Cumarina para ambos os pHs, mostrados na Tabela 7, indicam diferentes mecanismos de supressão para pH 7.0 e 8.0. Apesar de próximos, em pH 7.0, as constantes são inversamente proporcionais ao aumento de temperatura, indicando que o mecanismo de supressão da fluorescência de Grb2 WT pela Cumarina é estático, enquanto em pH 8.0 este mecanismo é dinâmico, visto pelo aumento do K_{sv} com o aumento da temperatura. Em outras palavras, o mecanismo dinâmico é iniciado pelo aumento das colisões decorrente do aumento da temperatura, enquanto o mecanismo estático é predominantemente resultado da formação de complexos [83].

Tabela 7 – Constantes de supressão de Stern-Volmer. Valores obtidos para o complexo Grb2 WT – Cumarina nas temperaturas de 291 K, 295 K e 299 K através da inclinação da reta do ajuste linear para ambos os pHs.

T (K)	**pH 7.0 – K_{sv} (10^4 M^{-1})**	**pH 8.0 – K_{sv} (10^4 M^{-1})**
291 K	5,71	2,42
295 K	4,90	3,98
299 K	4,79	4,24

A partir dos dados de supressão da fluorescência, as constantes de associação (K_a) e o coeficiente de Hill (n_H) foram estimados, de acordo com o método de duplo-log [67]. Tal método fornece uma relação logarítmica da razão da diferença entre a fração da proteína livre e ligada pela fração ligada em função da concentração de Cumarina. Na Figura 41 encontram-se os gráficos de duplo-log assim como os gráficos de van’t Hoff, utilizado para determinar os parâmetros termodinâmicos referente ao complexo, em ambos os pHs.

Figura 41 – Gráfico Duplo-log. Dados relativos ao efeito da supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2 WT na presença de Cumarina, para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B), nas temperaturas 291 (preto), 295 (vermelho) e 299 (azul) K. Inserido no canto superior direito encontra-se o gráfico de van't Hoff, responsável pela determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação.



Os valores de K_a ($1/K_d$) e n_H são obtidos através da inclinação da reta ajustada e da intersecção das ordenadas em cada temperatura e estão expostos na Tabela 8. É importante destacar que o valor de n_H obtido experimentalmente não reflete o número de sítios de ligação e sim o grau de interação entre eles. Quando $n_H = 1$, a ligação do ligante não é cooperativa. Isto ocorre quando as subunidades da proteína não se comunicam entre si. Se $n_H > 1$ (cooperatividade positiva), a ligação de uma molécula de ligante facilita a ligação de outras, e quando $n_H < 1$ (cooperatividade negativa), a ligação de uma molécula do ligante interfere com a ligação de outra [84].

Tabela 8 – Coeficiente de Hill (n_H) e constante de associação (K_a) determinados através dos gráficos de duplo-log para as três temperaturas em ambos pHs.

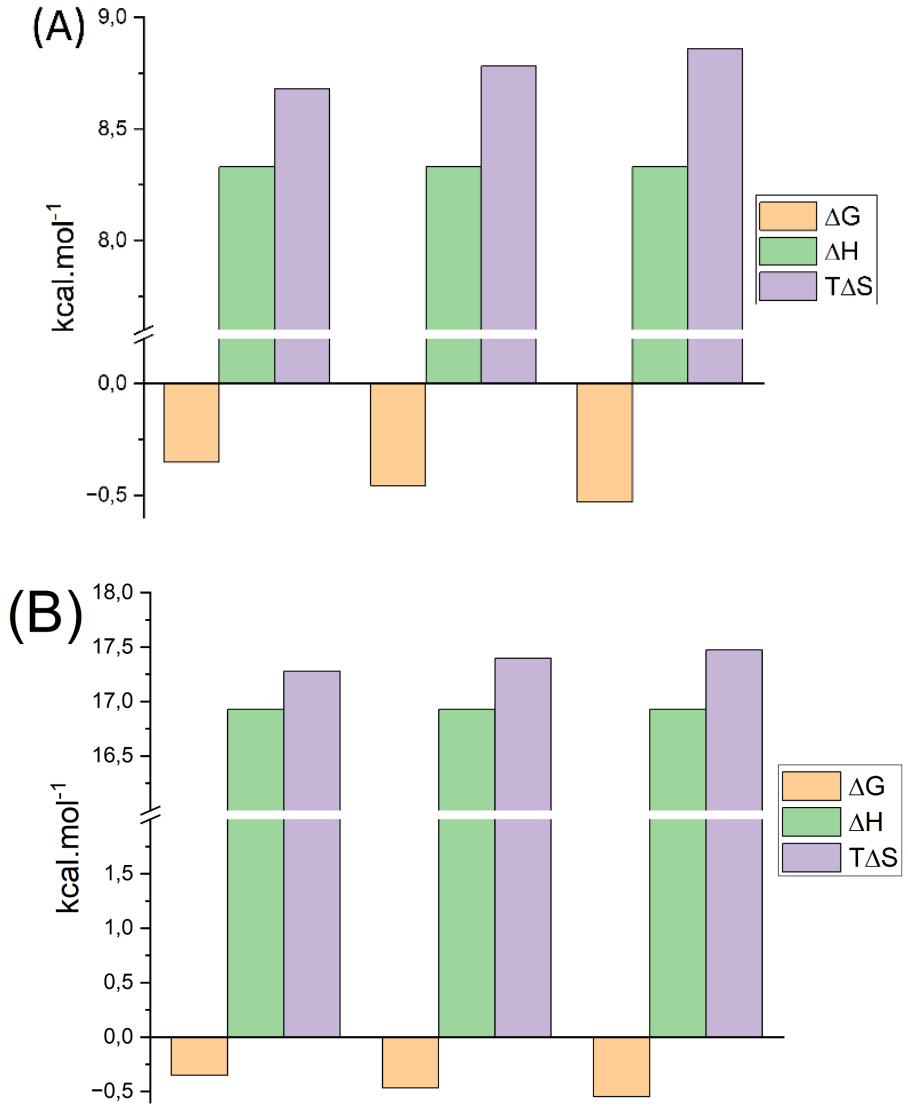
	pH 7.0		**pH 8.0**	
T (K)	**n_H**	**K_a (10^4 M^{-1})**	**n_H**	**K_a (10^4 M^{-1})**
291	0,59	2,03	0,93	1,82
295	0,77	3,61	1,01	4,63
299	0,69	2,98	0,98	3,99

Como relatado anteriormente, a proteína Grb2 em pH 7.0 apresenta uma maior cooperatividade entre os domínios quando comparado à proteína em pH 8.0. Este aumento na cooperatividade pode ser relacionado com a diferença nos coeficientes de Hill encontrados em ambos os pHs. Em relação à constante de associação (K_a), estudos anteriores do complexo em pH 8.0 mostraram uma interação da ordem de 10^5 M^{-1}, enquanto nossos experimentos determinaram uma constante na ordem de 10^4 M^{-1}. Esta diferença de ordem pode estar correlacionada com o comprimento de onda de excitação utilizado em cada um dos estudos, visto que no trabalho de Sanches *et al*. (2019) [48] foi utilizado o comprimento de onda de 290 nm, o qual pode sofrer influência da excitação de tirosinas, além do triptofano, ocasionando em um aumento da constante de associação.

Buscando caracterizar o tipo predominante de interação existente, utilizou-se a equação de van't Hoff para determinar os parâmetros termodinâmicos do complexo Grb2 WT – Cumarina. Através do ajuste linear do gráfico mostrado na Figura 41, obteve-se os parâmetros termodinâmicos para as temperaturas

analisadas como entalpia (ΔH), a partir do coeficiente angular da reta, e a entropia (ΔS) através da intersecção das ordenadas (Figura 42).

Figura 42 – Parâmetros termodinâmicos caracterizados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B). Em rosa está a contribuição da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde a entalpia (ΔH), e em roxo o termo entrópico (TΔS) levando em consideração a temperatura analisada.



Na Tabela 9 encontram-se os valores dos parâmetros termodinâmicos determinados a partir do gráfico de van't Hoff para ambos os pHs.

Tabela 9 – Parâmetros termodinâmicos para os pHs 7.0 e 8.0 determinados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff.

	pH 7.0			pH 8.0		
T (K)	**ΔG (kcal/mol)**	**ΔH (kcal/mol)**	**-TΔS (kcal/mol)**	**ΔG (kcal/mol)**	**ΔH (kcal/mol)**	**-TΔS (kcal/mol)**
291	-0,353	8,33	-8,68	-0,350	16,9	-17,3
295	-0,457		-8,78	-0,468		-17,4
299	-0,530		-8,86	-0,545		-17,5

A variação da entalpia se mantém constante, conforme a tabela acima, uma vez que o intervalo de temperatura trabalhado não é apreciável. Observa-se que a energia de Gibbs obtida é negativa ($\Delta G < 0$), indicando que a interação entre a proteína e a molécula de Cumarina é uma reação espontânea. Os valores positivos das contribuições entálpicas ($\Delta H > 0$) e entrópica ($-T\Delta S < 0$) são característicos de interações hidrofóbicas [85]. Desta forma, a interação do complexo Grb2 WT – Cumarina em ambos os pHs é caracterizada como espontânea e dirigida por efeitos hidrofóbicos.

É importante salientar que, embora a interação em ambos os pHs seja espontânea e dirigida por efeitos hidrofóbicos, a diferença no seu mecanismo de interação (estático para pH 7.0 e dinâmico para pH 8.0) acompanhado da diminuição na constante de Hill para pH 7.0, a qual demonstra uma mudança na cooperatividade do complexo, mostra que as mudanças conformacionais e dinâmicas ocasionadas pela mudança de pH acarreta em uma alteração no mecanismo de interação entre a proteína e o ligante.

4.1.2.2. STD-RMN (*Saturation Transfer Difference*)

A proteína Grb2 WT foi submetida a experimentos de RMN para verificar a interação com Cumarina por transferência da magnetização e calcular a porcentagem dos epítopos de interação, auxiliando a visualização do encaixe da molécula no sítio de interação da proteína.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 43 (pH 7.0) e Figura 44 (pH 8.0), é verificada a interação entre Cumarina e Grb2, devido à transferência de

saturação da proteína para o ligante, marcada pela diminuição da intensidade do sinal da Cumarina.

Figura 43 – Espectro de STD do complexo Grb2 WT – Cumarina em pH 7.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre Grb2 WT e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 WT.

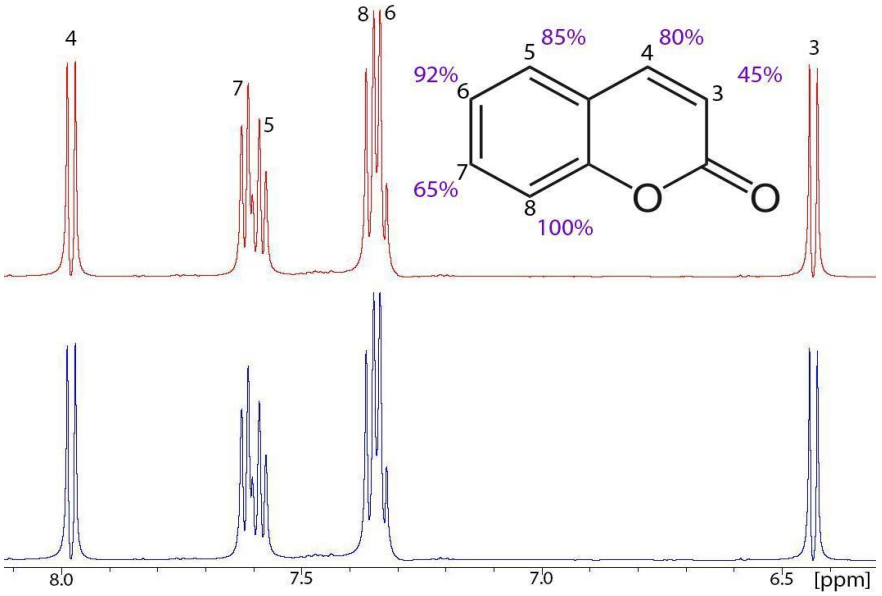
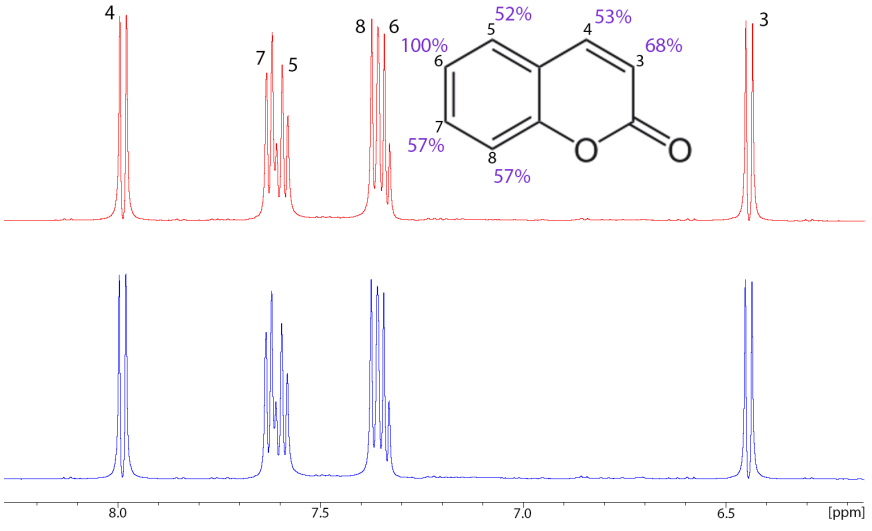


Figura 44 - Espectro de STD do complexo Grb2 WT – Cumarina em pH 8.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre Grb2 WT e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 WT.



Na Tabela 10 é mostrado um comparativo das porcentagens encontradas para os hidrogênios da molécula de Cumarina em ambos os pHs.

Tabela 10 – Valores dos epítopos da molécula de Cumarina na interação com Grb2 WT nos pHs 7.0 e 8.0.

		pH 7.0		**pH 8.0**	
Hidrogênio	**δ (ppm)**	**A_{std}**	**%**	**A_{std}**	**%**
3	6.43	0.0027	45	0.0198	68
4	7.97	0.0049	80	0.0154	53
5	7.56	0.0052	85	0.0151	52
6	7.31	0.0057	92	0.0289	100
7	7.62	0.0040	65	0.0164	57
8	7.37	0.0062	100	0.0164	57

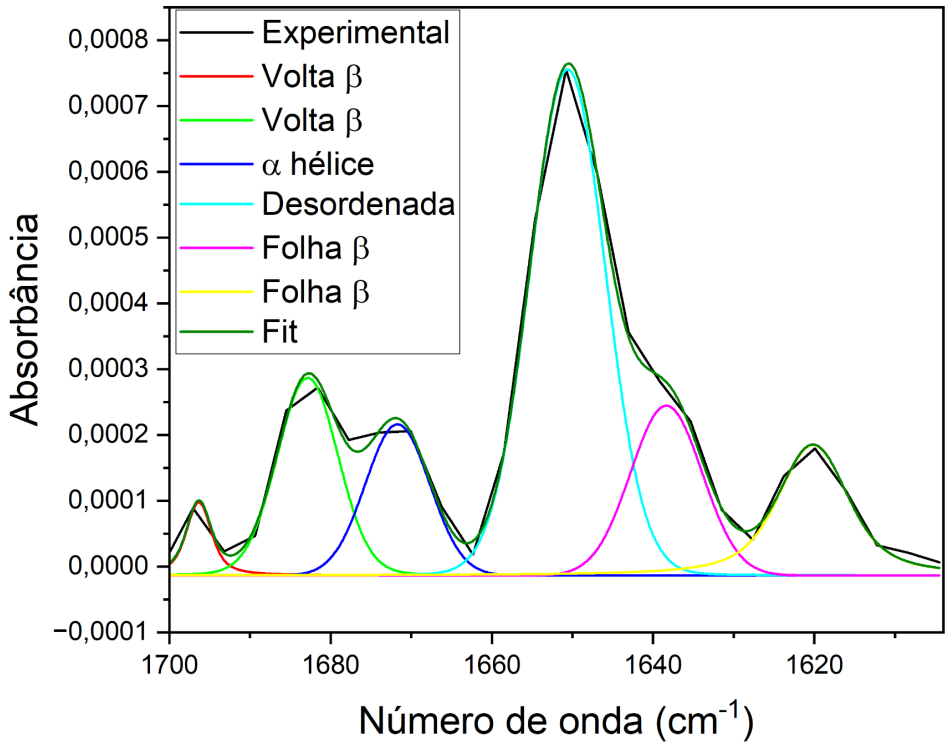
A partir dos valores acima, é possível salientar duas diferenças importantes decorrentes do pH: os hidrogênios com maior porcentagem em pH 7.0 são H8 (100%) e H6 (92%), enquanto em pH 8.0 são H6 (100%) e H1 (68%), e a intensidade do STD para pH 8.0 é uma ordem maior do que em pH 7.0, embora as porcentagens sejam em geral menores. Esta maior intensidade de STD em pH 8.0 nos informa que a interação é mais forte neste pH, porém com um encaixe diferente da molécula, evidenciado pela diferença dos epítopos com maior porcentagem (H8 – pH 7.0 e H1 – pH 8.0).

4.1.2.3. Estrutura Secundária por Infravermelho

A fim de caracterizar possíveis mudanças de estrutura secundária da proteína Grb2 WT quando esta interage com a molécula de Cumarina, a técnica de Infravermelho por Transformada de Fourier foi realizada na condição de excesso do ligante na proporção 2:1 [Cumarina]:[Grb2 WT] em ambos os pHs.

Assim como realizado para a proteína sem ligante, a caracterização da composição de estrutura secundária se deu a partir da deconvolução da banda Amida I (1600 – 1700 cm^{-1}) através de curvas gaussianas e lorentzianas no número mínimo necessário para satisfazer a curva experimental (Figura 45).

Figura 45 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 7 contendo o dobro de Cumarina em concentração. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. As deconvoluções em vermelho e verde são características de voltas beta (~1680 e 1680 cm^{-1}), em azul alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em ciano representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em rosa e amarelo duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



O cálculo das porcentagens de cada estrutura secundária foi realizado através da porcentagem da área de cada deconvolução relativa à área total do espectro analisado.

Na Tabela 11 encontram-se as porcentagens calculadas para pH 7.0 assim como os números de onda do centro de cada deconvolução utilizada para a determinação da estrutura estudada.

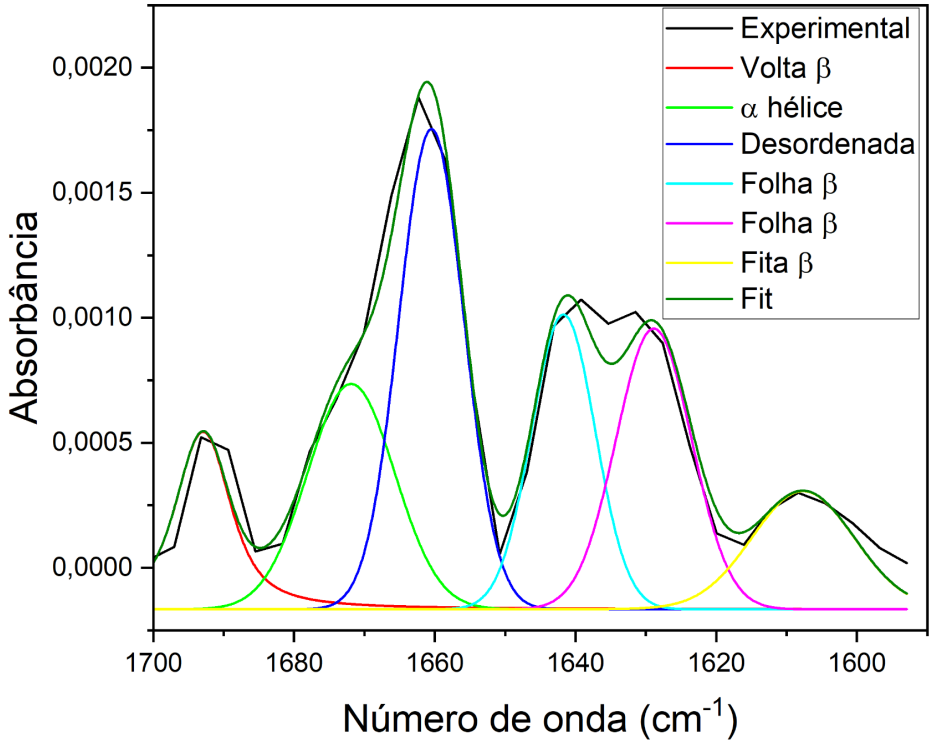
Tabela 11 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 7.0 com o dobro da concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1696, 1682 ± 8	Volta β	17%
1671 ± 8	α hélice	11%
1650 ± 8	Desordenada	44%
1638, 1620 ± 8	Folha β	28%

Comparativamente com os resultados da proteína Grb2 WT na ausência de Cumarina, a presença do ligante em pH 7.0 acarreta um aumento de 18% em estruturas desordenadas acompanhado de uma diminuição de 30% na porcentagem de folhas β, mantendo-se a proporção de α hélices em 11%. Levando-se em consideração este aumento significativo de estruturas desordenadas, a interação da molécula de Cumarina com a proteína Grb2 WT em pH 7.0 surte o mesmo efeito na estrutura secundária do que o observado para a elevação do pH na proteína pura.

Para a proteína em pH 8.0 (Figura 46) foram realizados os mesmos métodos de deconvolução empregados para pH 7.0, assim como o cálculo das porcentagens estruturais a partir da área relativa de cada curva deconvoluída.

Figura 46 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 8 com o dobro da concentração de Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em vermelho é característico de voltas beta (~1690 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}), em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}) e em amarelo estruturas de agregados de fita beta (~1610 cm^{-1}).



Na Tabela 12 encontram-se as porcentagens calculadas para pH 8.0 assim como os números de onda do centro de cada deconvolução utilizada para a determinação da estrutura estudada.

Tabela 12 – Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 8.0 com o dobro da concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1696 ± 8	Volta β	11%
1671 ± 8	α hélice	17%
1660 ± 8	Desordenada	27%
1641, 1628 ± 8	Folha β	35%
1607 ± 8	Agregado Fita β	10%

No caso da interação de Cumarina com a proteína em pH 8.0 observa-se um comportamento oposto ao citado anteriormente para pH 7.0. A molécula de Cumarina traz uma maior estabilidade para a proteína em pH 8.0 evidenciado pela diminuição de estruturas desordenadas em 16%. Tal configuração estrutural da proteína na presença do ligante se assemelha à estrutura secundária da proteína pura em pH 7.0, conforme mostrado da Tabela 13.

Tabela 13 – Comparação das porcentagens de estruturas secundárias (α hélices, folhas β e estruturas desordenadas) da proteína Grb2 WT pura nos pHs 7.0 e 8.0 e da interação entre Cumarina e Grb2 WT em pH 8,0 na proporção 2:1.

	Grb2 WT pH 7.0	Grb2 WT pH 8.0	2 Cumarina : 1 Grb2 pH 8.0
α hélice	11%	15%	17%
Folha β	58%	42%	45%
Desordenadas	26%	43%	27%

Os resultados de infravermelho, mesmo que preliminares, indicam que, de certa maneira, a molécula de Cumarina possa estar revertendo a desordenação causada pelo aumento de pH na proteína Grb2 WT.

4.1.3. Conclusões preliminares

Nesta seção, observa-se que a proteína Grb2 WT apresenta uma conformação próxima de globular em pH 7.0 com maior cooperatividade entre os seus domínios. Enquanto em pH 8.0, a proteína adquire uma conformação mais alongada, caracterizada por seu maior diâmetro hidrodinâmico.

Experimentos calorimétricos mostraram um deslocamento para a direita nas temperaturas de *melting* para pH 8.0, quando comparado ao pH 7.0, e valores menores de entalpia necessários para desnaturar a proteína por completo. Visto que os domínios estão mais espaçados em pH 8.0, estes se comportam de forma mais independente termicamente, como visto pela menor cooperatividade observada no termograma de DSC.

A alteração no diâmetro hidrodinâmico entre os pHs foi correlacionado com uma maior porcentagem de estruturas desordenadas em pH 8.0, como visto pelo

experimento de infravermelho, acompanhado por uma diminuição na porcentagem de folhas β. Tal decaimento é acompanhado por um menor número de pontes de hidrogênio, necessários para a estruturação de folhas β, sendo esta uma força restritiva de curto alcance, conferindo uma maior flexibilidade para a proteína em pH 8.0.

Experimentos de ^{1}H, ^{15}N-HSQC demonstraram um equilíbrio de deslocamentos químicos para os domínios SH2 e cSH3. A falta de assinalamento conhecido do domínio nSH3 impossibilita verificar se o mesmo comportamento é observado, mesmo que qualitativamente seja possível verificar o deslocamento de vários picos não assinalados no espectro.

Uma alternativa para a falta de assinalamento foi analisar computacionalmente os movimentos realizados por cada domínio com a mudança do pH. Tal análise mostrou uma predominância de movimentos dos domínios SH3, sendo estes centrais para pH 7.0 e periféricos para pH 8.0. O movimento observado pode ser correlacionado com o aumento do diâmetro hidrodinâmico com o aumento do pH, assim como os deslocamentos químicos observados quantitativamente para cSH3 e qualitativamente para nSH3.

A molécula de Cumarina, apresentando propriedades anticancerígenas comprovadas *in vivo*, é importante para a realização de estudos de interação com proteínas relacionadas com carcinomas. Visto que a proteína Grb2 apresenta mudanças conformacionais em diferentes pHs, é de fundamental importância entender como a interação com a molécula é realizada nessas diferentes condições.

Utilizando a propriedade intrínseca do fluoróforo triptofano, foi possível acompanhar a supressão da intensidade de fluorescência com a adição de Cumarina no sistema. Foi constatada uma interação de mesma ordem para os dois pHs (10^{4} M^{-1}), sendo as duas entropicamente dirigidas e com caráter hidrofóbico. No entanto, em pH 7.0 é observado um mecanismo estático, enquanto que em pH 8.0 se observa um mecanismo de interação dinâmico (influenciado pelo aumento da temperatura). Além disso, o decaimento da constante de hill observada em pH 7.0 reafirma a maior cooperatividade entre os domínios da proteína nessas condições.

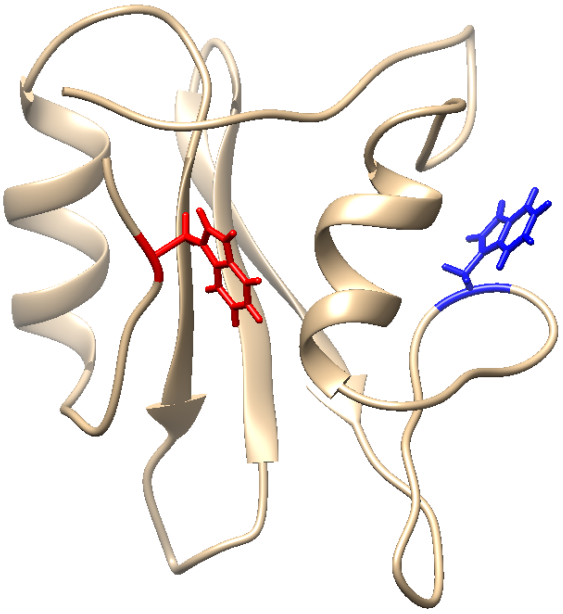
Por fim, a análise da estrutura secundária da proteína na presença de Cumarina demonstra uma reversão das estruturas ordenadas perdidas em pH 8.0,

evidenciado pelo aumento de folhas β na presença da molécula e a diminuição das estruturas desordenadas. O aumento de estruturas ordenadas causada pela interação com a molécula de Cumarina já foi relatado para a Insulina por Akbarian *et al.* (2020) [86].

4.2. Grb2 W60A

O domínio SH2 da proteína Grb2, como visto anteriormente, apresenta dois triptofanos localizados em regiões hidrofóbicas (W60 e W121) (Figura 47).

Figura 47 - Domínio SH2 da proteína Grb2 (PDB: 1GHU) [60] com os triptofanos 60 (vermelho) e 121 (azul) destacados.



Estudos computacionais da proteína Grb2 WT sugerem que a interação da molécula de Cumarina ocorre próximo ao bolsão hidrofóbico que contém o triptofano 121 [48]. Neste sentido, foi realizada a mutação do triptofano 60 por um resíduo de alanina no intuito de retirar um possível sítio de interação da Cumarina para evidenciar se a interação ocorre realmente próximo ao triptofano 121 e, além disso, se existe algum processo alostérico entre os triptofanos do domínio SH2.

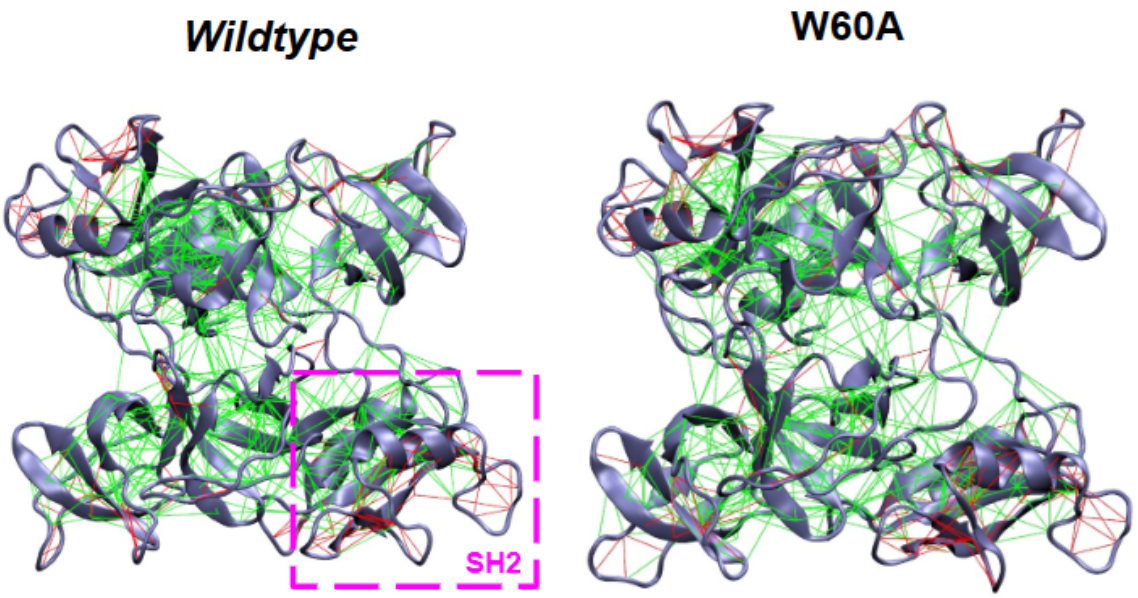
A substituição de um resíduo por Alanina é muito comum experimentalmente e pode ser visto como uma deleção da cadeia lateral do resíduo a ser substituído [87]. Os resultados de tal mutação geralmente são interpretados como um indicativo da contribuição de uma cadeia lateral em particular (como é o caso do Triptofano no presente trabalho) em interações ou processos alostéricos [88]–[90]. A substituição por Alanina elimina a contribuição da cadeia lateral sem alterar a conformação da cadeia principal, além de não impor efeitos estéricos e eletrostáticos extremos [91], [92]. Análises computacionais foram realizadas em colaboração com o Dr. Raphael

Vinícius Rodrigues Dias com o intuito de mapear possíveis mudanças ocasionadas pela mutação proposta.

Primeiramente, foi realizada uma extensa dinâmica molecular, na qual foram retiradas as estruturas mais representativas dos *ensembles*, as quais foram utilizadas para as análises de frustração. A frustração estrutural em proteínas ocorre quando algumas regiões da cadeia polipeptídica não conseguem alcançar sua conformação mais estável devido a restrições estéricas, conflitos de van der Waals, ou interações inadequadas entre resíduos vizinhos [79]. Tais regiões “frustradas” podem desempenhar um papel importante em fenômenos biológicos, como a função proteica, estabilidade, dobramento e até mesmo a evolução das proteínas [79]. Aqui, utilizamos a análise da frustração para verificar as diferenças na estrutura da proteína Grb2 dimérica *wildtype* e com a mutação W60A.

Na Figura 48 estão apresentadas as estruturas da proteína Grb2 em sua forma dimérica cristalográfica com e sem a mutação W60A. As regiões em vermelho mostram as regiões frustradas em ambas as estruturas.

Figura 48 - Frustração conformacional da proteína Grb2 WT (acima) e com a mutação W60A (abaixo). As linhas em vermelho demonstram regiões frustradas conformacionalmente da proteína, enquanto que em verde, as regiões não-frustradas.

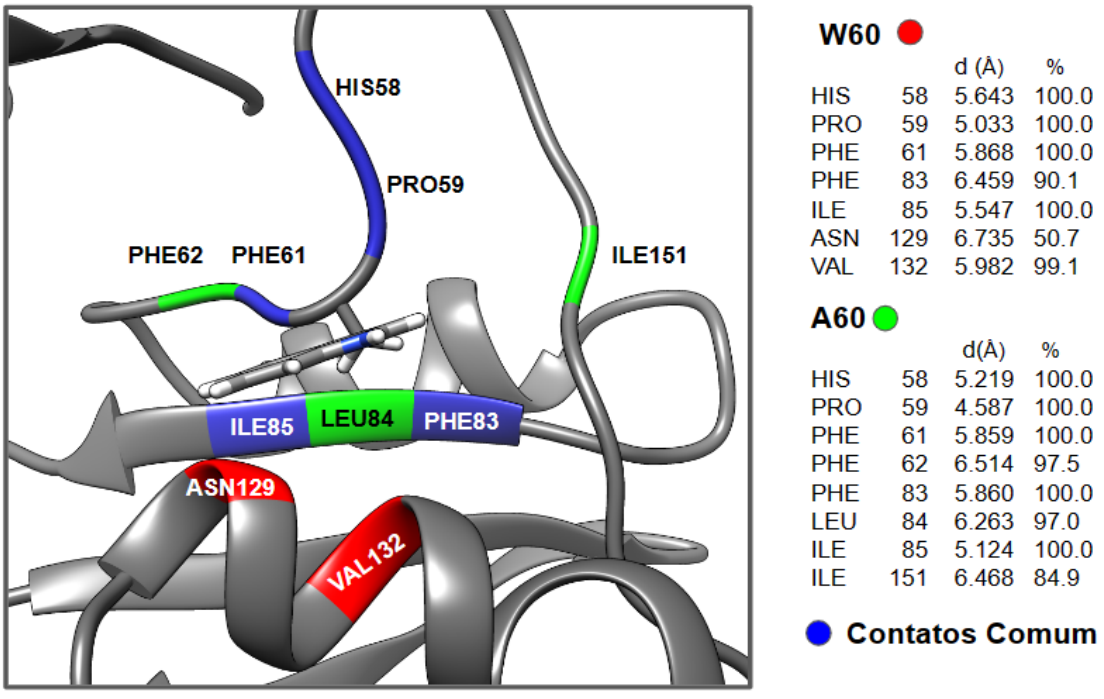


Como pode ser observado na figura acima, a proteína Grb2, de uma forma geral, possui grande parte da sua estrutura não-frustrada, exceto pelo domínio SH2.

A substituição do triptofano 60 por uma alanina nesta região não apresentou mudanças significativas na frustração da estrutura, comportando-se semelhante à Grb2 WT.

No entanto, experimentos de dinâmica molecular realizados com o intuito de mapear os contatos do resíduo 60 nas duas configurações citadas apresentaram mudança significativa na região do domínio SH2. Na Figura 49 temos os contatos do resíduo 60 específicos quando este é um triptofano (em vermelho) ou uma alanina (em verde), assim como os contatos em comum (em azul) para os dois resíduos.

Figura 49 - Contatos realizados pelo resíduo 60 da proteína Grb2 em sua estrutura cristalográfica quando este é um triptofano (contatos específicos em vermelho) e quando este é uma alanina (contatos específicos em verde). Os resíduos marcados em azul são comuns para os dois resíduos (triptofano e alanina). Cada resíduo em contato está especificado na parte direita da imagem, assim como a distância deste ao resíduo 60 e a porcentagem em que o contato acontece durante a dinâmica molecular.



Como pode ser observado na figura acima, a troca do Triptofano por um resíduo de Alanina influencia principalmente nos contatos envolvendo a região da α hélice pela perda de contato com os resíduos ASN 129 e VAL 132. Tal perda de contatos pode afetar a flexibilidade e estabilidade da estrutura dimérica da proteína. Visto que a proteína Grb2 WT apresentou mudanças significativas em sua

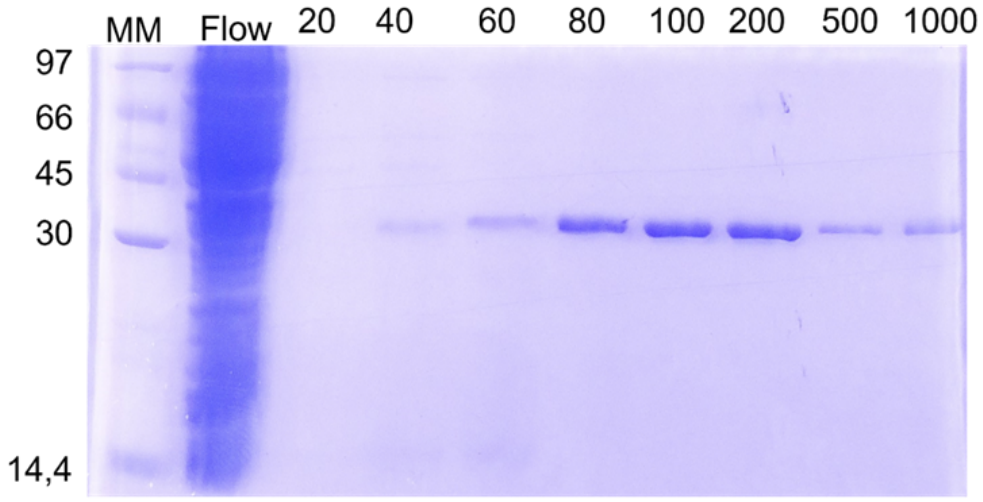
flexibilidade para os pHs 7.0 e 8.0, faz-se necessária uma avaliação nos mesmos pHs para a proteína Grb2 W60A para efeitos de comparação.

4.2.1. Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0

A proteína Grb2 W60A foi expressa seguindo protocolo das seções 3.3 e 3.4. O processo de purificação foi realizado através das etapas de afinidade por Cobalto e exclusão molecular automatizada.

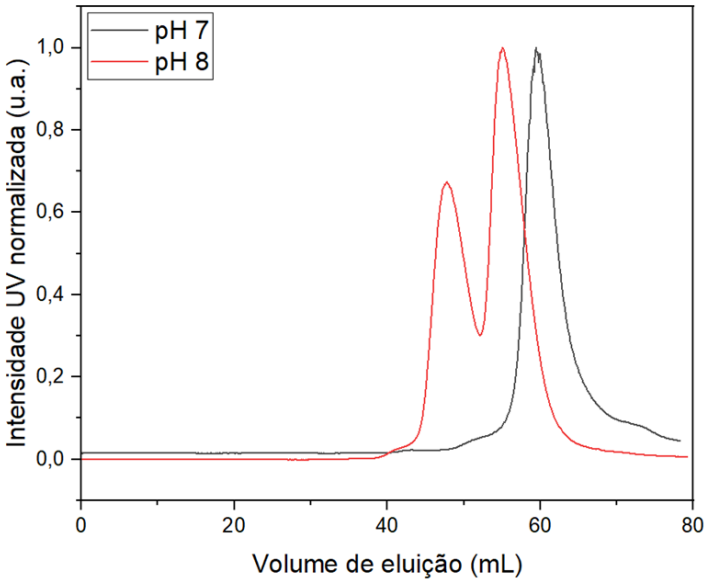
A purificação por afinidade ao Cobalto foi realizada com concentrações gradativas de Imidazol (20 - 1000 mM) e as amostras coletadas para aplicação em gel SDS-PAGE (Figura 50).

Figura 50 - Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 W60A por afinidade ao Cobalto. MM - Marcador de massa molecular (kDa); Flow - proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 - 1000 mM - concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.



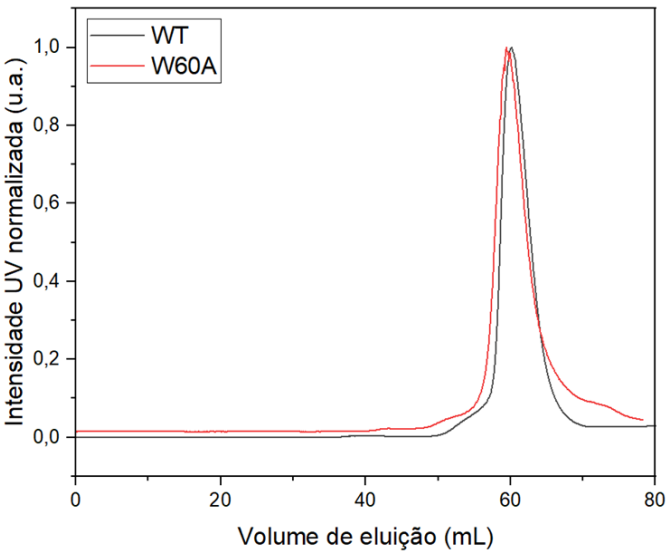
Visto que as amostras já se encontravam puras, estas foram concentradas e aplicadas em coluna *Superdex 75* apenas para troca de tampão nos pHs desejados. Assim como a proteína Grb2 WT, pode-se observar no perfil cromatográfico abaixo (Figura 51) que a proteína W60A também apresenta deslocamento no volume de eluição dependente do pH utilizado.

Figura 51 - Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).



Pode-se observar que o cromatograma em pH 8.0 novamente apresenta 2 picos com volumes de eluição distintos, mesmo com a pureza no processo de afinidade como atestado pelo gel SDS-PAGE mostrado na Figura 50. Amostras foram coletadas de ambos os picos para gel SDS-PAGE e foi verificado que ambos são estados oligoméricos diferentes de Grb2 W60A. O perfil cromatográfico é muito similar com o apresentado para Grb2 WT, como pode ser observado para o pH 7.0 na Figura 52.

Figura 52 - Sobreposição dos perfis cromatográficos da proteína Grb2 WT (preto) e Grb2 W60A (vermelho) em pH 7.0.



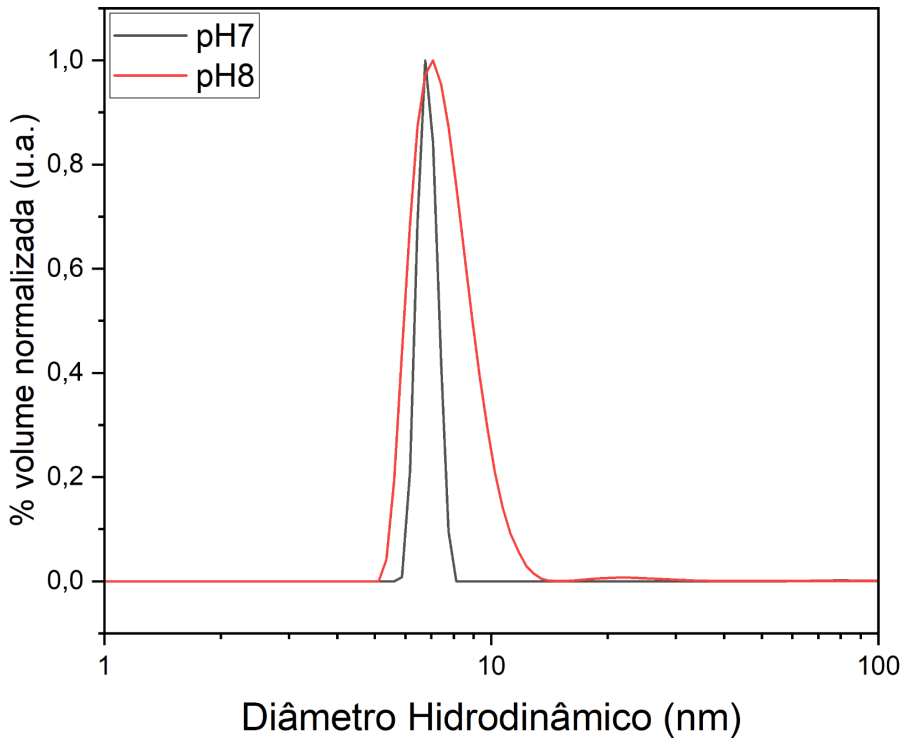
Desta forma, apesar de um pequeno deslocamento no volume de eluição, é possível inferir que a proteína W60A encontra-se no estado dimérico, e é este que será levado em consideração nos resultados apresentados a seguir.

4.2.1.2. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

Como visto pelo perfil cromatográfico, a proteína W60A apresenta um deslocamento no volume de eluição entre os pHs 7.0 e 8.0, indicando uma diferença em seu diâmetro hidrodinâmico. Além disso, o deslocamento no volume de eluição quando comparado com a proteína Grb2 WT, embora mínimo, indica uma diferença de diâmetro entre a WT e a mutante W60A.

Experimentos de DLS foram realizados para determinar a diferença de diâmetro entre os pHs analisados e a mudança de diâmetro causado pela mutação do triptofano 60. A Figura 53 apresenta os gráficos de porcentagem em volume por tamanho em nanômetro das amostras em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).

Figura 53 - Gráfico de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 W60A nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).



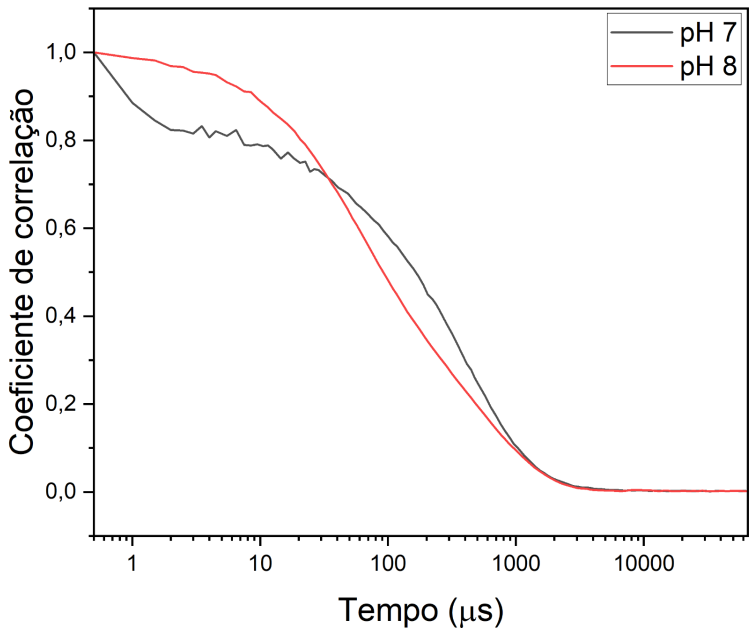
No gráfico acima, nota-se uma semelhança no tamanho da proteína em ambos os pHs com um pequeno aumento para o pH mais alto. Além disso, a

diferença na distribuição do diâmetro hidrodinâmico, caracterizado pela largura da curva, indica que a proteína Grb2 W60A em pH 8.0 apresenta uma maior flexibilidade alternando entre estruturas mais abertas e mais fechadas no decorrer do experimento.

Numericamente, ambos os pHs apresentaram um pico com porcentagem de 99.3%. Em pH 7.0 a proteína apresentou um diâmetro hidrodinâmico de 7.226 nm e desvio padrão de 0,636 nm, e em pH 8.0, um valor de 8.004 nm e desvio padrão de 1,112 nm, evidenciando o caráter mais alargado da proteína em pH mais alto, assim como observado anteriormente para a proteína sem mutação.

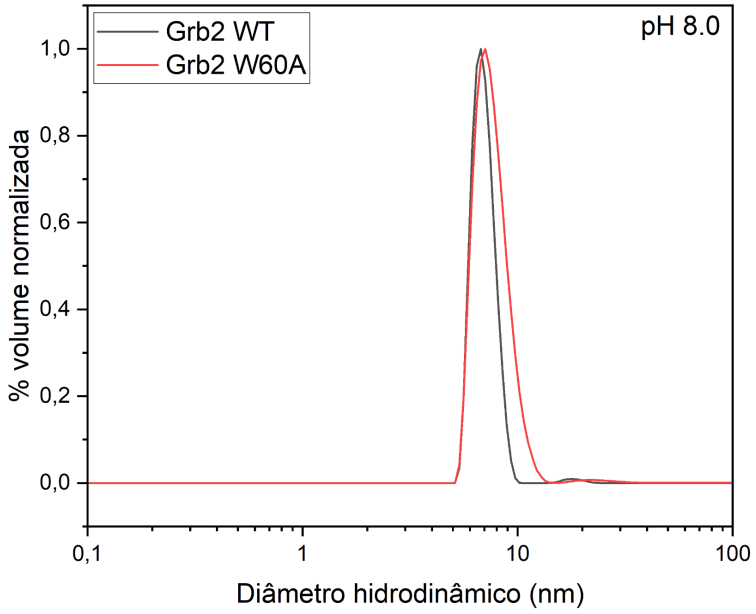
O coeficiente de correlação, mostrado na Figura 54, demonstra um decaimento do coeficiente de correlação mais rápido para a proteína em pH 7.0 mais pronunciado até próximo de 100 µs, inferindo que a proteína em pH 8.0, como visto pela distribuição, é maior do que a proteína em pH 7.0.

Figura 54 - Coeficiente de correlação da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) ao longo do tempo.



Comparativamente com a proteína Grb2 WT, a mutação do triptofano 60 por uma alanina acarretou em um aumento do diâmetro hidrodinâmico em aproximadamente 1 nm em ambos os pHs (Figura 55).

Figura 55 - Gráfico de espalhamento dinâmico da luz comparativo das proteínas Grb2 WT e W60A em pH 8.0 demonstrando um maior diâmetro hidrodinâmico para a proteína.

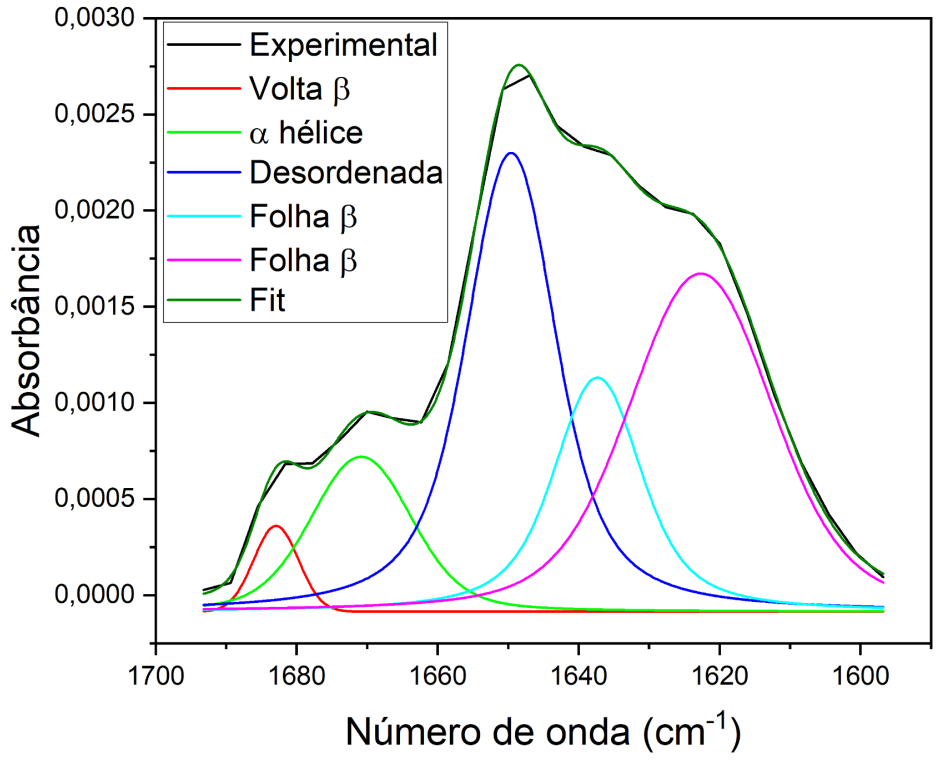


Tal aumento no diâmetro pode estar correlacionado com a perda de contatos com a hélice α, permitindo uma maior movimentação tanto da hélice quanto do *coil* em que o resíduo 60 está localizado.

4.2.1.3. Estrutura Secundária por Infravermelho

Assim como evidenciado para a proteína Grb2 WT, a mudança no pH do meio pode influenciar a composição de estruturas secundárias da proteína. Experimentos de Infravermelho foram realizados nos dois pHs com o intuito de monitorar uma possível mudança estrutural causada pela mutação do triptofano, além de monitorar o efeito causado pela alteração do pH do meio. A caracterização da estrutura secundária foi realizada, assim como para a proteína Grb2 WT, através da deconvolução da banda Amida I (1600 - 1700 cm^{-1}). Na Figura 56 tem-se o espectro da região da Amida I para a proteína em pH 7.0 e suas deconvoluções correlacionadas às estruturas secundárias.

Figura 56 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 7.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta (~1680 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



Na Tabela 14 encontram-se as porcentagens calculadas para o pH 7.0 assim como os números de onda do centro de cada deconvolução utilizada para a determinação da estrutura estudada.

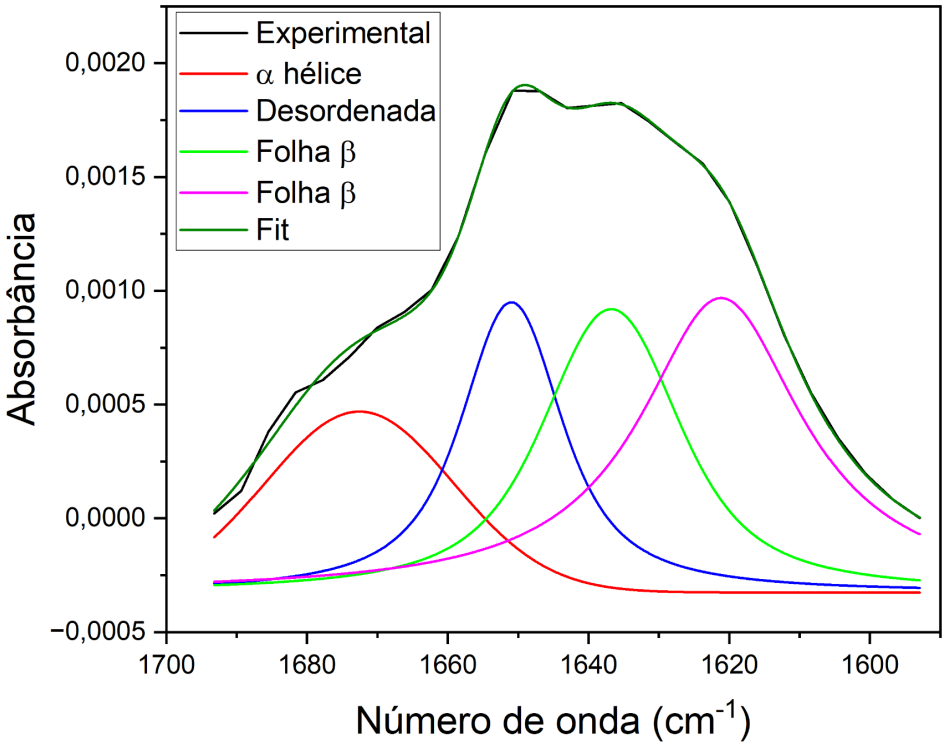
Tabela 14 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 com seus respectivos centros e porcentagens.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1682 ± 8	Volta β	3%
1670 ± 8	α hélice	11%
1649 ± 8	Desordenada	34%
1637, 1622 ± 8	Folha β	52%

Os dados de infravermelho para o pH 7.0 mostram um aumento de 8% na porcentagem de estruturas desordenadas e um decaimento de 6% em folhas β, quando comparados com os dados da proteína Grb2 WT. Tal aumento de estruturas desordenadas, aumentando a flexibilidade da proteína, corrobora com os dados de DLS que indicam um aumento de 1 nm no diâmetro hidrodinâmico do mutante em relação à proteína *wildtype*.

Para a proteína em pH 8.0 (Figura 57) foram realizados os mesmos métodos de deconvolução empregados para pH 7.0, assim como o cálculo das porcentagens estruturais a partir da área relativa de cada curva deconvoluída.

Figura 57 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



Assim como para a proteína Grb2 WT, não foi possível observar uma influência de voltas beta no espectro em pH 8.0. No entanto, o alargamento do perfil do espectro, quando comparado ao pH 7, demonstra uma distribuição mais homogênea das estruturas secundárias presentes na proteína, como pode ser observado na Tabela 15.

Tabela 15 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com seus respectivos centros e porcentagens.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1672 ± 8	α hélice	17%
1650 ± 8	Desordenada	20%
1636, 1621 ± 8	Folha β	63%

Diferentemente do comportamento observado para a proteína Grb2 WT, a mutação do Triptofano 60 por uma Alanina apresenta um aumento de estruturas ordenadas em pH mais básico. Comparativamente ao pH 7.0, o mutante apresenta um aumento de 6% em hélices e 12% em folhas β. Este aumento de estruturas ordenadas, principalmente de hélices, pode ser correlacionado com o aumento do diâmetro hidrodinâmico em pH 8.0, visto que hélices apresentam um volume maior do que estruturas desordenadas.

O comportamento observado demonstra uma menor flexibilidade do mutante em pH 8.0 quando comparado à proteína *wildtype* em mesmo pH, devido à diminuição de estruturas desordenadas. No entanto, essa diminuição de flexibilidade acompanha um aumento na estabilidade da proteína decorrente do aumento de hélices α.

4.2.2. Interação Grb2 W60A e Cumarina pHs 7.0 e 8.0

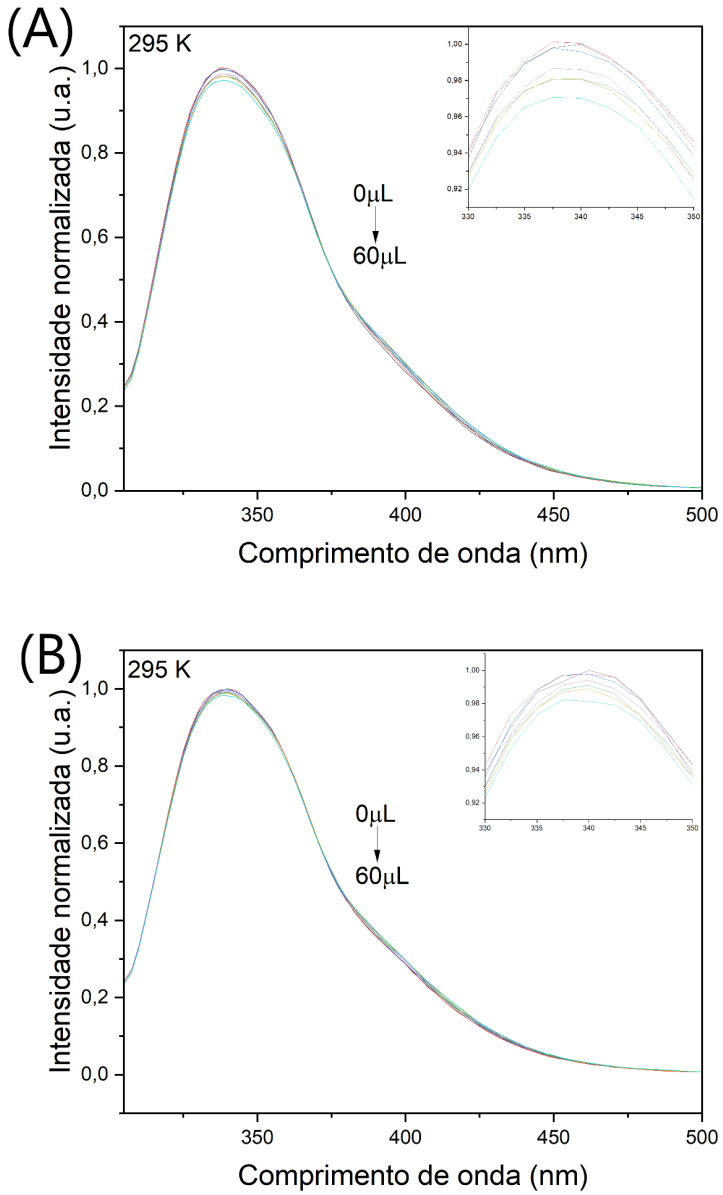
A mutação do Triptofano 60 no domínio SH2 da proteína Grb2 WT tem o intuito de auxiliar na caracterização do sítio de interação entre a proteína e a molécula de Cumarina. Estudos computacionais apontam que a molécula interage com o sítio próximo ao Triptofano 121 no domínio SH2 porém, o sítio próximo ao Triptofano 60 pode estar sendo acessado durante a interação visto que para a proteína Grb2 WT não existe um limite de saturação da supressão da fluorescência. Sendo assim, estudos da interação com o mutante são fundamentais para uma melhor caracterização do sítio de interação proteína-ligante e, visto que a proteína apresentou diferenças estruturais com a mudança de pH, a caracterização da interação em ambos os pHs também se faz importante no presente estudo.

4.2.2.1. Espectroscopia de Fluorescência

Os parâmetros utilizados para a espectroscopia de fluorescência para o mutante Grb2 W60A foram os mesmos selecionados para a proteína Grb2 WT. Visto que o comportamento foi semelhante em todas as temperaturas, serão mostrados apenas os gráficos referentes à temperatura de 295 K e os gráficos das demais temperaturas encontram-se no Anexo A.

Novamente, foi realizada uma titulação prévia de etanol para determinar sua influência na proteína. Neste experimento, titulou-se etanol até um volume máximo de 60 µL (2% do volume total de proteína). A Figura 58 mostra o espectro de emissão de fluorescência a 295 K com adição de etanol absoluto em ambos os pHs.

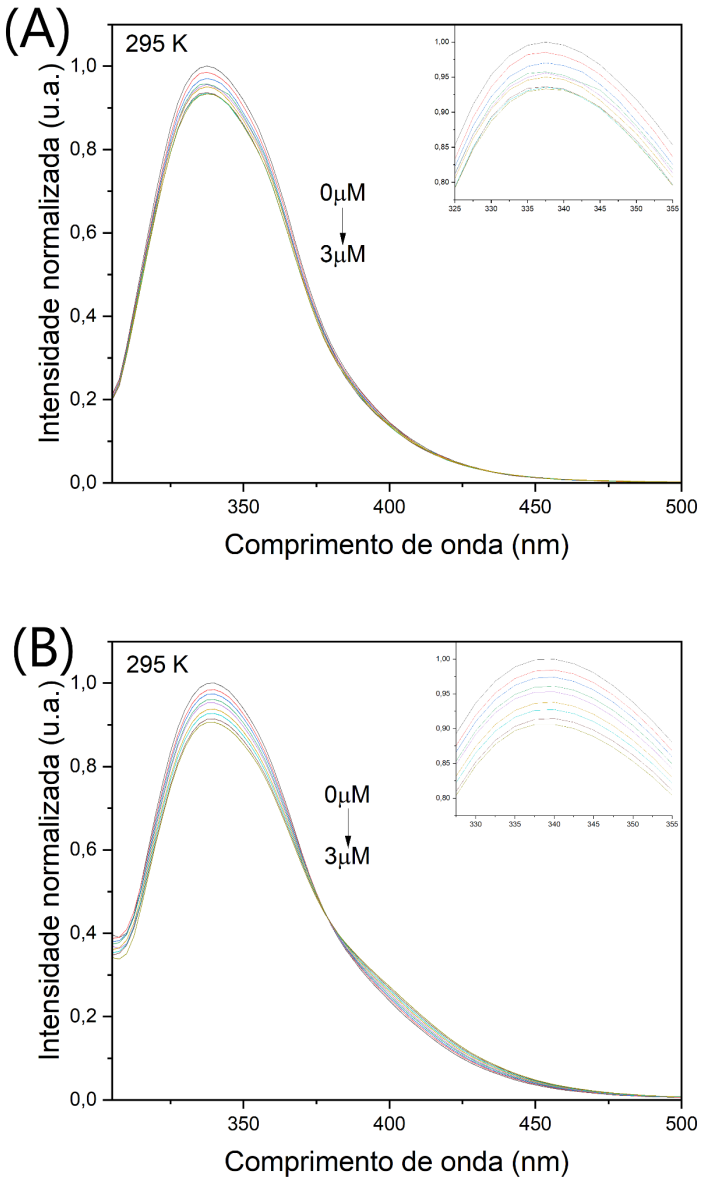
Figura 58 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 µM de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 295 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito a região de máximo da fluorescência encontra-se em maior resolução.



A titulação de etanol na proteína W60A provocou uma supressão da fluorescência de 4,6% da intensidade total da proteína pura, sendo muito abaixo do limite de 10% considerado para a possível desnaturação da proteína. Desta forma, seguiu-se o experimento com a titulação de Cumarina.

A supressão de fluorescência da proteína em ambos os pHs na presença de Cumarina é apresentado na Figura 59.

Figura 59 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 290 nm e temperatura de 295 K. No canto superior direito apresenta-se a região de máximo de fluorescência em maior resolução.

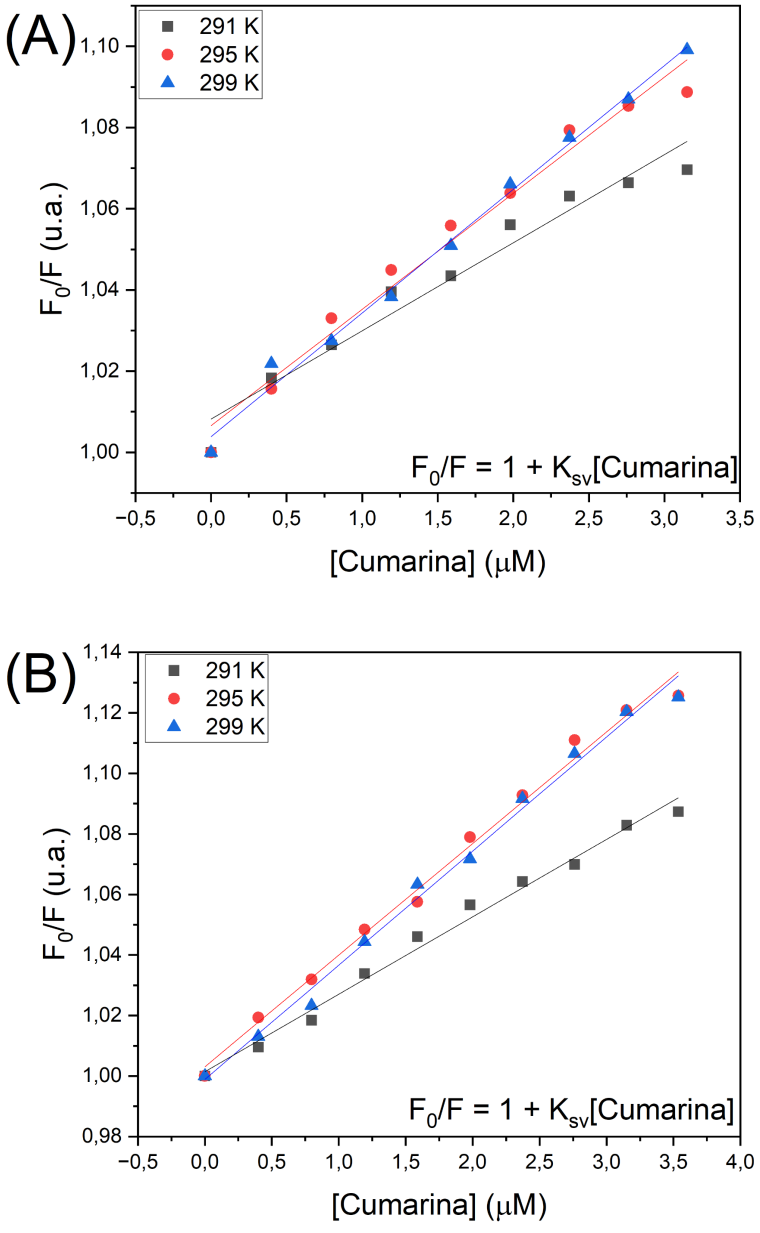


Os gráficos acima apresentados indicam que há interação entre W60A e a molécula de Cumarina em ambos os pHs, visto que quanto maior a concentração de Cumarina no microambiente próximo ao triptofano, menor é a intensidade da Grb2 W60A. No entanto, diferentemente da proteína Grb2 *wildtype*, o mutante apresenta saturação do sinal com uma concentração próxima de 3 μM, indicando que a região do Triptofano 60 seria um possível sítio de interação da proteína Grb2 WT.

Percentualmente, a supressão da fluorescência em 295 K foi de 7% em pH 7.0 e 10,5% em pH 8.0.

A Figura 60 demonstra que os valores de supressão obtidos estão de acordo com a equação de Stern-Volmer nas temperaturas estudadas, apresentando uma linearidade da intensidade de fluorescência da proteína na presença de Cumarina (F_0/F) [67].

Figura 60 - Gráfico de Stern-Volmer. Supressão da fluorescência de Grb2 W60A nas temperaturas 291 (preto), 295 (azul) e 299 K (vermelho) pela concentração de Cumarina. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0.



As constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) nas correspondentes temperaturas foram obtidas através de ajuste linear dos pontos. Os valores das constantes para o

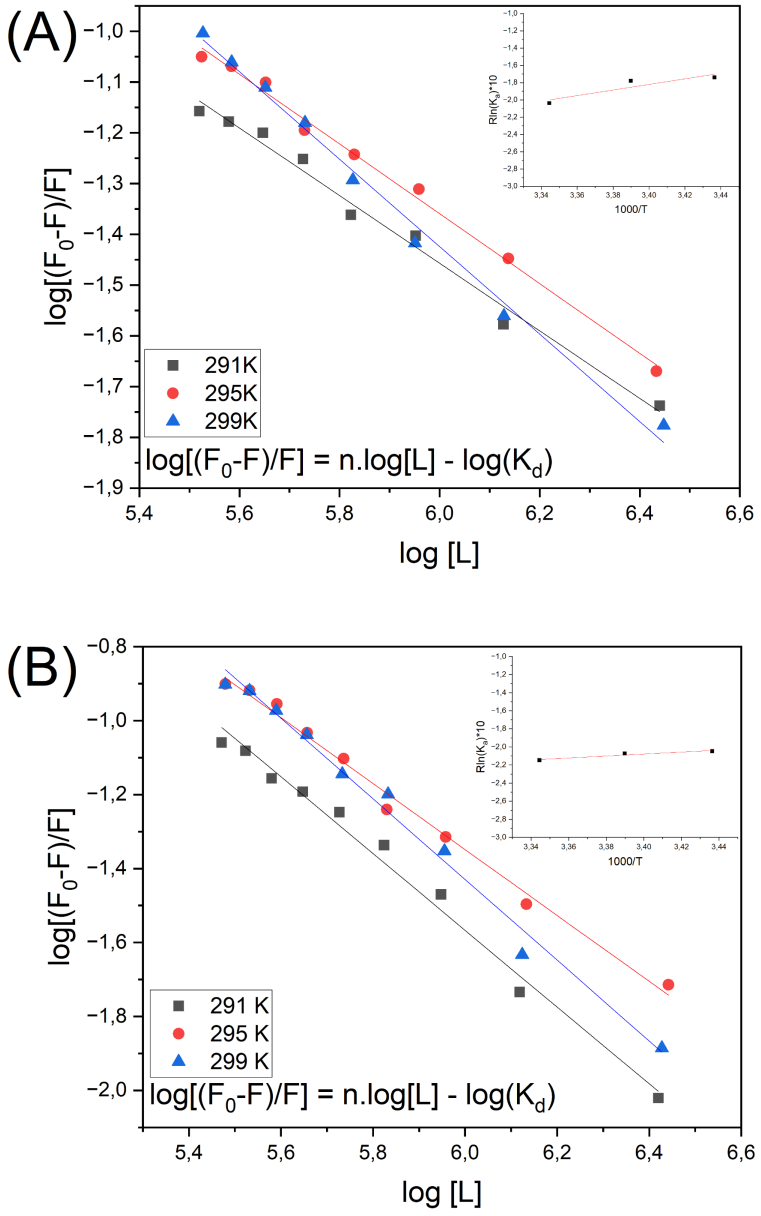
sistema Grb2 W60A - Cumarina, mostrados na Tabela 16, indicam o mesmo mecanismo para ambos os pHs. O aumento do K_{sv} com o aumento da temperatura indica um mecanismo dinâmico, iniciado pelo aumento das colisões decorrente do aumento da temperatura.

Tabela 16 – Constantes de supressão de Stern-Volmer. Valores obtidos para o complexo Grb2 W60A – Cumarina nas temperaturas de 291, 295 e 299 K através da inclinação da reta do ajuste linear para ambos os pHs.

T (K)	**pH 7.0 - K_{sv} (10^4 M^{-1})**	**pH 8.0 - K_{sv} (10^4 M^{-1})**
291	2,36	2,56
295	2,52	3,63
299	2,93	3,79

A partir dos dados de supressão de fluorescência, as constantes de associação (K_a) e o coeficiente de Hill (n_H) foram estimados, de acordo com o método de duplo-log. Tal método fornece uma relação logarítmica da razão da diferença entre a fração da proteína livre e ligada pela fração ligada em função da concentração de Cumarina [67], [84]. Na Figura 61 encontram-se os gráficos de duplo-log assim como os gráficos de van't Hoff, utilizado para determinar os parâmetros termodinâmicos referentes ao complexo, para ambos os pHs.

Figura 61 - Gráfico Duplo-log. Dados relativos ao efeito da supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2 W60A na presença de Cumarina, para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B), nas temperaturas 291 (preto), 295 (vermelho) e 299 K (azul). Inserido no canto superior direito encontra-se o gráfico de van't Hoff, responsável pela determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação.



Os valores de K_a e n_H são obtidos através da inclinação da reta ajustada e da intersecção das ordenadas em cada temperatura e estão expostos na Tabela 17. É importante ressaltar que o valor de n_H obtido experimentalmente não reflete o número de sítios de ligação e sim o grau de interação entre eles.

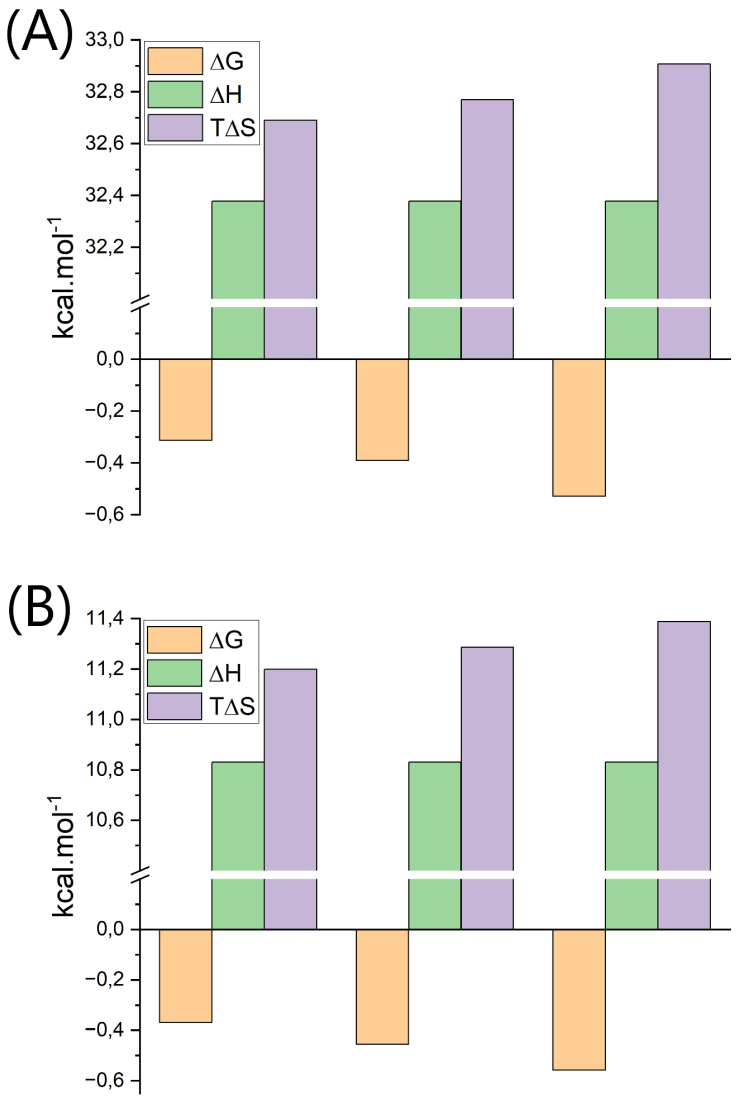
Tabela 17 - Coeficiente de Hill (n_H) e constante de associação (K_a) determinados através dos gráficos de duplo-log para as três temperaturas em ambos pHs.

	pH 7.0		**pH 8.0**	
T (K)	**n_H**	**K_a (10^4 M^{-1})**	**n_H**	**K_a (10^4 M^{-1})**
291	0,68	0,72	1,06	3,35
295	0,67	0,94	0,99	4,10
299	0,95	2,97	1,16	5,76

Embora o mecanismo de interação seja diferente entre o mutante e a proteína Grb2 WT, as constantes de Hill para ambos os pHs são compatíveis com a proteína não mutada, apresentando uma cooperatividade negativa em pH 7.0 e uma ligação não-cooperativa em pH 8.0. Em relação à constante de associação, embora próximas de 10^4 M^{-1}, a proteína W60A em pH 7.0 apresenta constantes de associação menores quando comparadas ao pH 8.0 e às constantes encontradas para a proteína *wildtype*, indicando que a retirada do triptofano 60 influencia na associação da proteína com a molécula de Cumarina.

Para a caracterização do tipo predominante de interação existente, foi novamente utilizada a equação de van't Hoff através da determinação dos parâmetros termodinâmicos do complexo Grb2 W60A - Cumarina. Através do ajuste linear do gráfico mostrado na Figura 62, obteve-se os parâmetros termodinâmicos para as temperaturas analisadas (Figura 62).

Figura 62 - Parâmetros termodinâmicos caracterizados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B). Em rosa está a contribuição da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde a entalpia (ΔH), e em roxo a entropia (ΔS) levando em consideração a temperatura analisada.



Na Tabela 18 encontram-se os valores dos parâmetros termodinâmicos determinados a partir do gráfico de van't Hoff para ambos os pHs.

Tabela 18 - Parâmetros termodinâmicos para os pHs 7.0 e 8.0 determinados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff.

	pH 7.0			pH 8.0		
T (K)	**ΔG (kcal/mol)**	**ΔH (kcal/mol)**	**-TΔS (kcal/mol)**	**ΔG (kcal/mol)**	**ΔH (kcal/mol)**	**-TΔS (kcal/mol)**
291	-0,371	8,9	-9,27	-0,353	8,33	-8,68
295	-0,463		-9,36	-0,457		-8,78
299	-0,558		-9,45	-0,530		-8,86

A variação da entalpia se mantém constante, conforme a tabela acima, uma vez que o intervalo de temperatura trabalhado não é apreciável. Observa-se, assim como para a proteína Grb2 WT, que a energia livre de Gibbs obtida é negativa ($\Delta G < 0$), indicando que a interação entre a proteína e a molécula de Cumarina é uma reação espontânea. Os valores positivos das contribuições entálpicas ($\Delta H > 0$) e entrópicas ($-T\Delta S < 0$) são característicos de interações hidrofóbicas. Desta forma, a interação do complexo Grb2 W60A - Cumarina em ambos os pHs é caracterizada como espontânea e dirigida por efeitos hidrofóbicos.

4.2.2.2. STD-RMN (*Saturation Transfer Difference)*

A proteína Grb2 W60A foi submetida a experimentos de RMN para verificar a interação com Cumarina por transferência da magnetização e, portanto, corroborar os resultados de supressão de fluorescência que indicam a interação entre elas.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 63 (pH 7.0) e 64 (pH 8.0), é verificada a interação entre Cumarina e Grb2 W60A, devido à transferência de saturação da proteína para o ligante, marcada pela diminuição da intensidade do sinal da Cumarina.

Figura 63 - Espectro de STD do complexo Grb2 W60A - Cumarina em pH 7.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento de *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre a proteína e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 W60A.

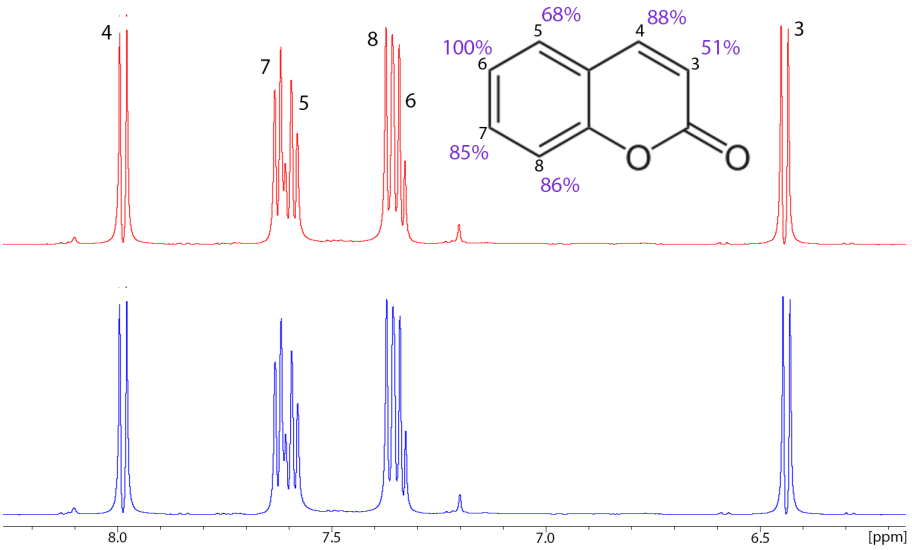
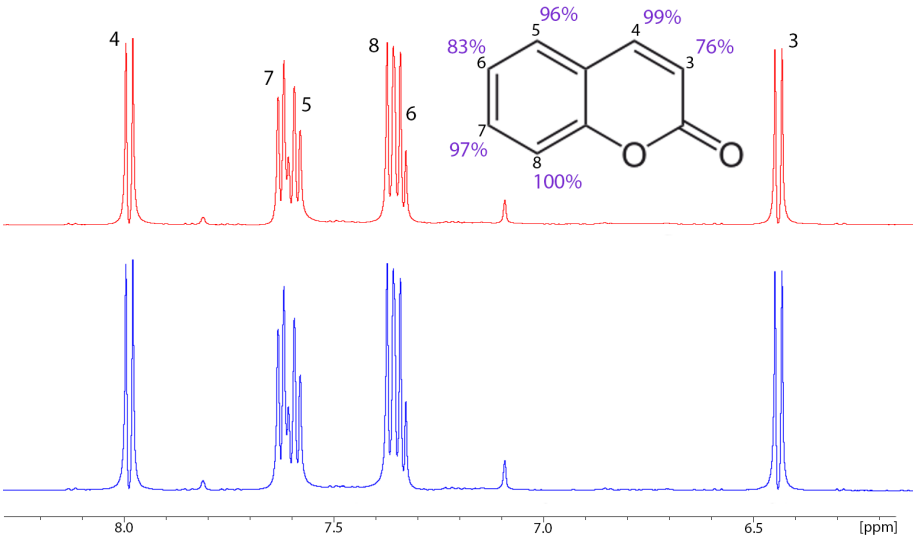


Figura 64 - Espectro de STD do complexo Grb2 W60A - Cumarina em pH 8.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento de *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre a proteína e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 W60A.



Na Tabela 19 é mostrado um comparativo das porcentagens encontradas para os hidrogênios da molécula de Cumarina em ambos os pHs.

Tabela 19 - Valores dos epítopos da molécula de Cumarina na interação com Grb2 W60A nos pHs 7.0 e 8.0.

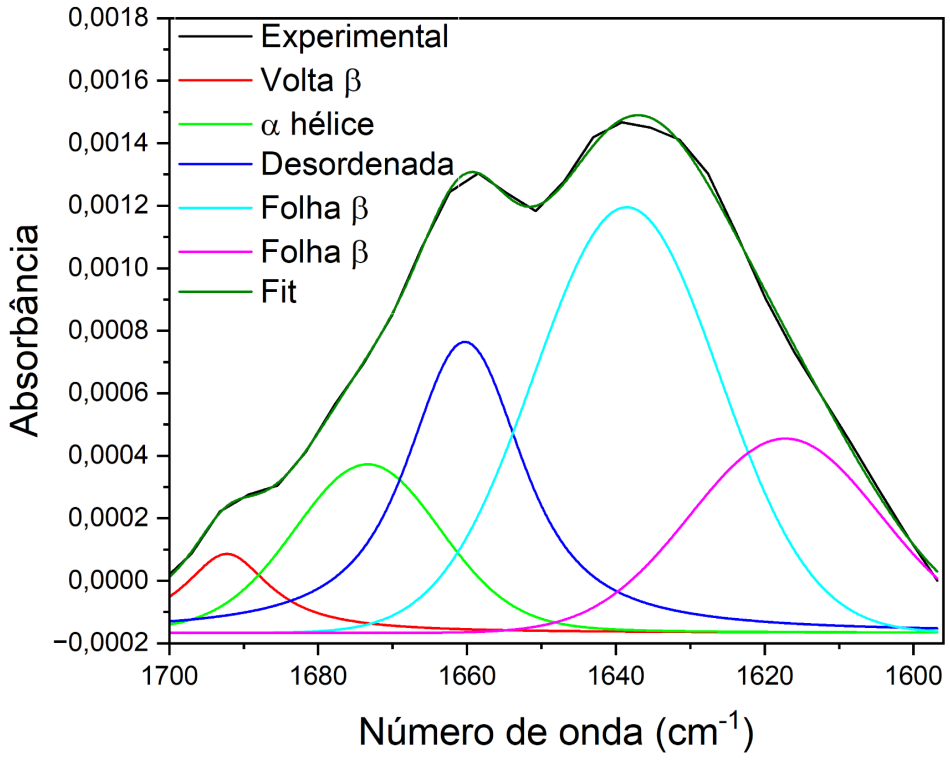
		pH 7.0		pH 8.0	
Hidrogênio	**δ (ppm)**	**A_{std}**	**%**	**A_{std}**	**%**
3	6.43	0.007	51	0.032	76
4	7.97	0.012	88	0.042	99
5	7.56	0.009	68	0.041	96
6	7.31	0.013	100	0.035	83
7	7.62	0.011	85	0.041	97
8	7.37	0.012	86	0.0042	100

A partir dos valores acima, é possível salientar duas diferenças importantes decorrentes do pH: os hidrogênios com maior porcentagem em pH 7.0 são H6 (100%) e H4 (88), enquanto que em pH 8.0 são H8 (100%) e H4 (99%); e a intensidade do STD para pH 8.0 é uma ordem maior do que em pH 7.0. Esta maior intensidade de STD em pH 8.0 nos informa que a interação é mais forte neste pH, porém com um encaixe diferente da molécula, evidenciado pela diferença dos epítopos com maior porcentagem (H6 - pH 7.0 e H8 - pH 8.0).

4.2.2.3. Estrutura Secundária por Infravermelho

A fim de caracterizar possíveis mudanças na estrutura secundária da proteína Grb2 W60A quando esta interage com a molécula de Cumarina, a técnica de Infravermelho por Transformada de Fourier foi realizada na condição de equilíbrio 1:1 [Cumarina]:[Grb2 W60A] em ambos os pHs. Na Figura 65 tem-se o espectro da região da Amida I (1600 - 1700 cm^{-1}) da interação Grb2 W60A - Cumarina em pH 7.0. Assim como realizado anteriormente, a caracterização foi realizada através da deconvolução do espectro em curvas gaussianas e lorentzianas no número mínimo necessário para satisfazer a curva experimental.

Figura 65 - Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 7 contendo a mesma concentração de Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta (~1690 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



Na Tabela 20 encontram-se as porcentagens calculadas para pH 7.0 assim como os números de onda do centro de cada deconvolução utilizada para a determinação da estrutura avaliada.

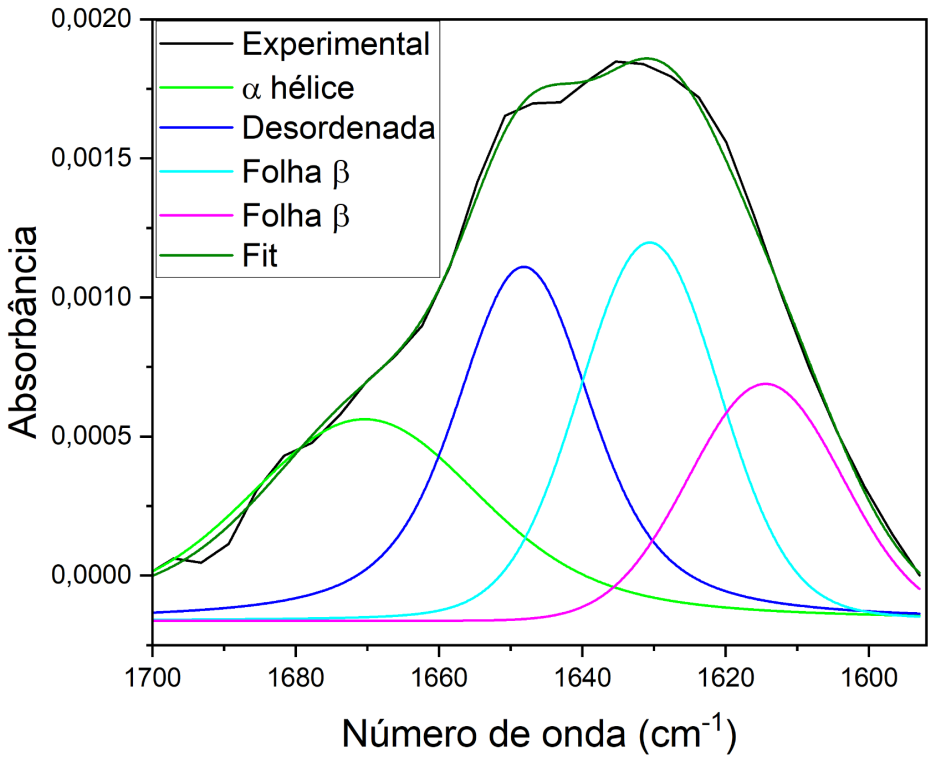
Tabela 20 - Porcentagens calculadas através das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 W60A em pH 7.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1692 ± 8	Volta β	5%
1673 ± 8	α hélice	12%
1660 ± 8	Desordenada	24%
1638, 1617 ± 8	Folha β	59%

Assim como observado para a proteína Grb2 WT, a molécula de Cumarina apresenta um caráter de estruturação da proteína, demonstrado para a proteína Grb2 W60A em pH 7.0 através de uma diminuição de 8% em estruturas desordenadas acompanhada de um aumento proporcional de folhas β.

Para a proteína em pH 8.0 (Figura 66) foram realizados os mesmos métodos de deconvolução empregados para o pH 7.0, assim como o cálculo das porcentagens estruturais a partir da área relativa de cada curva deconvoluída.

Figura 66 - Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em verde é característico de alfa-hélices (~1670 cm-1), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}), em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



Assim como observado para a proteína na ausência do ligante Cumarina, o espectro não apresenta uma influencia de voltas β em sua composição. Na Tabela 21 encontram-se as porcentagens relacionadas a cada estrutura secundária presente no espectro de infravermelho, assim como o centro de cada deconvolução.

Tabela 21 - Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1670 ± 8	α hélice	27%
1648 ± 8	Desordenada	29%
1630, 1614 ± 8	Folha β	44%

Novamente, observa-se uma tendência de ordenação da estrutura secundária da proteína Grb2 W60A na presença do ligante. No entanto, resultados anteriores apresentaram uma maior influência na ordenação de folhas β, o que não é o caso da proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com a mesma concentração do ligante. Nesta configuração, observa-se um aumento expressivo na porcentagem de α hélices (aumento de 10% quando comparado com a proteína na ausência do ligante).

4.2.3. Conclusões preliminares

A mutação de um resíduo por Alanina é uma técnica muito utilizada para caracterizar a contribuição de uma cadeia lateral em particular, como é o caso do Triptofano [87], [91], [92]. Tal “deleção” pode contribuir significativamente para uma mudança estrutural da proteína estudada, além de mapear possíveis efeitos alostéricos do resíduo em questão [88]–[90].

A interação caracterizada na seção 4.1.2. entre a proteína Grb2 WT e a molécula de Cumarina indica a presença de um triptofano no sítio de interação, sendo este predominantemente hidrofóbico. O domínio SH2 da proteína Grb2 apresenta 2 triptofanos que atendem estes requisitos (W60 e W121). Visto que estudos computacionais indicaram a associação da molécula de Cumarina próximo ao triptofano 121 [48], a mutação do triptofano 60 por um resíduo de alanina foi realizada no intuito de retirar um possível sítio de interação da molécula de Cumarina, além de verificar se existe algum efeito alostérico entre os triptofanos presentes neste domínio.

Estudos computacionais de frustração conformacional identificaram a região do domínio SH2 como sendo o mais frustrado na proteína Grb2 WT. Tal região não apresentou modificações significativas com a substituição do triptofano pelo resíduo de Alanina. No entanto, análises de contato mostram uma alteração com a substituição por Alanina principalmente na região de α hélice próxima ao triptofano 60. Esta perda de contatos pode influenciar significativamente na estabilidade e flexibilidade da proteína, visto que tanto a hélice quando o *coil* em que o resíduo 60 está localizado apresentam maior independência de movimento, o que não era possível na proteína Grb2 WT devido à restrição de interação hélice-*coil*.

Estruturalmente, a proteína Grb2 W60A apresentou um aumento de ~1.0 nm em seu diâmetro hidrodinâmico com a elevação do pH, como evidenciado pelos experimentos de DLS. O alargamento da distribuição de volume em pH 8.0 infere que o mutante apresenta uma maior flexibilidade em pH mais básico. Tal flexibilidade, no entanto, não é refletida na composição de estrutura secundária da proteína W60A atestada pela técnica de Infravermelho por Transformada de Fourier. A elevação do pH do meio ocasionou um aumento de 6% em estruturas de α hélice e 12% em folhas β, o que sugere uma maior estabilidade da proteína em pH 8.0.

Comparativamente com a estrutura de Grb2 WT, a mutação do triptofano 60 indica um alargamento no diâmetro hidrodinâmico da proteína em ambos os pHs de aproximadamente 1.0 nm e uma mudança considerável em sua estrutura secundária. Em pH 7.0, o mutante apresentou um aumento de 8% em estruturas desordenadas acompanhado por um decaimento de 6% em folhas β. No entanto, em pH 8.0, com o aumento de estruturas ordenadas, o mutante se assemelha à proteína Grb2 WT.

No âmbito da interação do mutante com a molécula de Cumarina, a retirada do Triptofano 60 levou à uma saturação da supressão de fluorescência próximo à razão 1:1 [Cumarina]:[Grb2 W60A]. Tal comportamento indica que a região do triptofano 60, ainda que não preferencial, é um possível sítio de ligação na proteína Grb2 WT.

A retirada de tal sítio não afetou a ordem de associação da molécula de Cumarina com a proteína, permanecendo na ordem de ~10^4 M^{-1}, assim como não

alterou a constante de Hill para ambos os pHs. Tais resultados indicam que a região do Triptofano 121 é o sítio preferencial da interação entre a molécula de Cumarina e a proteína Grb2 WT. No entanto, em pH 7.0, a mudança do mecanismo de supressão anteriormente estático para dinâmico no mutante, indica uma alosteria entre os sítios hidrofóbicos da proteína Grb2. Tal alosteria também pode ser notada com a mudança nos epítopos da molécula de Cumarina, indicando uma mudança no encaixe da molécula no bolsão hidrofóbico do Triptofano 121.

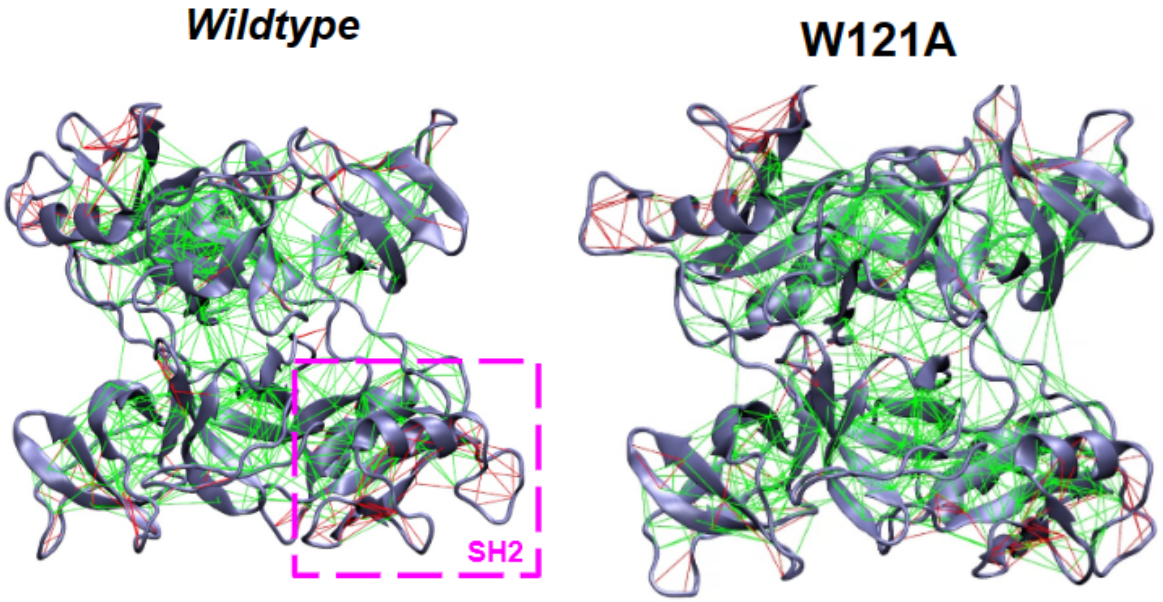
Por fim, em relação à estrutura secundária do mutante na presença da molécula de Cumarina, foi observada a mesma tendência de estruturação analisada para a proteína Grb2 WT. No mutante, em pH 7.0, foi observado um aumento de 8% em folhas β e, em pH 8.0, 10% em α hélices. Confirmando o caráter de ordenação estrutural provocado pela molécula de Cumarina mostrado para a proteína Grb2 WT e já registrado na literatura para a Insulina [86].

4.3. Grb2 W121A

O triptofano 121, localizado no domínio SH2, é fundamental para a dimerização da proteína Grb2 WT visto que seus ângulos diedrais são desfavoráveis para a estrutura cristalográfica do monômero [33]. No entanto, a importância deste resíduo na dimerização da proteína Grb2 só foi estudada através de mutações no domínio SH2 isolado, as quais não levaram à monomerização do mesmo [39], [40], [93]. Desta forma, a mutação do resíduo de triptofano 121 por um resíduo de alanina foi realizada com o intuito de mapear a importância de tal resíduo no processo de dimerização da proteína Grb2 *full-length*. Além disso, como reportado na seção anterior, a região do triptofano 121 é propícia para a ligação hidrofóbica da molécula de Cumarina, porém parece não ser a única presente na proteína Grb2 WT. Neste sentido, a mutação do resíduo pela alanina nos auxiliará a mapear a importância de tal resíduo na interação com a molécula.

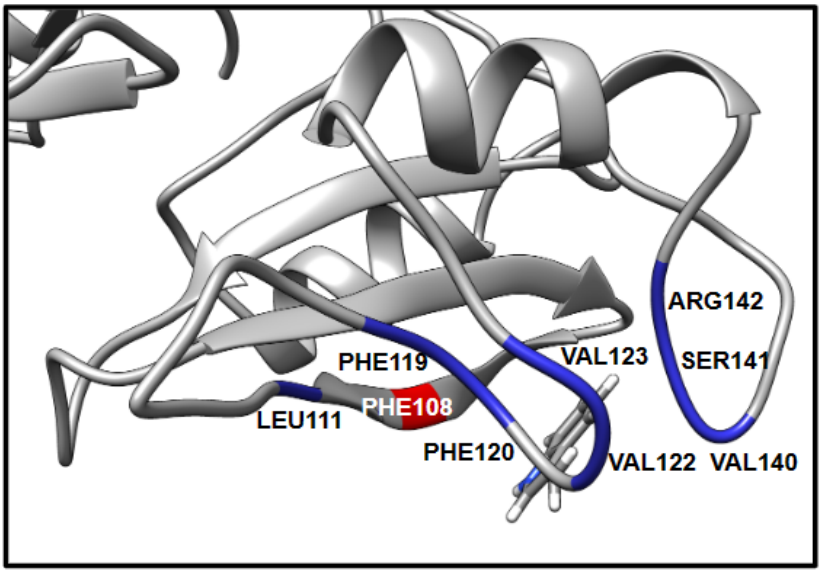
Assim como para o mutante W60A, análises computacionais foram realizadas em colaboração com o Dr. Raphael Vinicius Rodrigues Dias com o intuito de mapear possíveis mudanças ocasionadas pela mutação proposta. Primeiramente, foi realizada a etapa de dinâmica molecular, na qual foram retiradas as estruturas mais representativas dos *ensembles*, e que foram utilizadas para as análises de frustração. Na Figura 67 estão apresentadas as estruturas da proteína Grb2 em sua forma dimérica cristalográfica com e sem a mutação W121A. As regiões em vermelho mostram as regiões frustradas em ambas as estruturas.

Figura 67 - Frustração conformacional da proteína Grb2 WT (acima) e com a mutação W121A (abaixo). As linhas em vermelho mostram regiões frustradas conformacionalmente da proteína, enquanto que em verde, as regiões não-frustradas.



Como pode ser observado na figura acima, a substituição do triptofano 121 por uma alanina na região frustrada da proteína Grb2 WT provoca uma aproximação das alças, diminuindo a frustração desta região. Este decaimento na frustração é acompanhado por uma menor diferença de contatos da proteína Grb2 WT e na conformação W121A, como pode ser analisado na Figura 68.

Figura 68 - Contatos realizados pelo resíduo 121 da proteína Grb2 em sua estrutura cristalográfica quando este é um triptofano (contatos específicos em vermelho) e quando este é uma alanina (contatos específicos em verde). Os resíduos marcados em azul são comuns para os dois resíduos (triptofano e alanina). Cada resíduo em contato está especificado na parte direita da imagem, assim como a distância deste ao resíduo 121 e a porcentagem em que o contato acontece durante a dinâmica molecular.



W121

		d (Å)	%
PHE	108	7.589	44.7
LEU	111	7.668	28.6
PHE	119	7.571	73.6
LEU	120	5.336	100
VAL	122	5.973	100
VAL	123	7.519	26.0
VAL	140	7.580	57.4
SER	141	7.361	31.5
ARG	142	6.631	22.2

A121

		d (Å)	%
LEU	111	7.408	57.2
PHE	119	6.025	100
LEU	120	4.873	100
VAL	122	4.333	100
VAL	123	6.499	100
VAL	140	6.481	71.8
SER	141	6.306	47.0
ARG	142	5.500	38.8

Contatos Comum

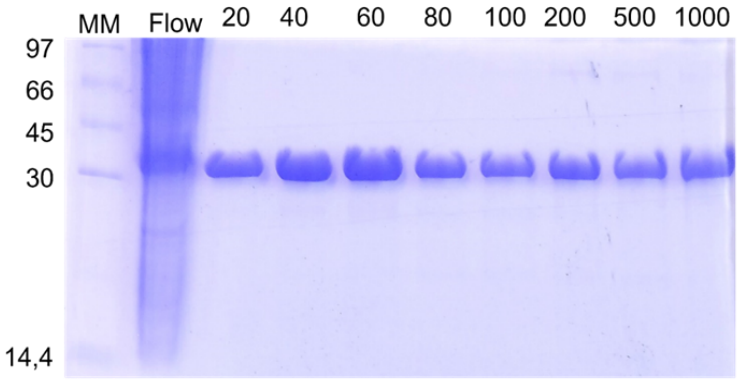
Como pode ser observado na figura acima, a troca do Triptofano 121 por um resíduo de Alanina influencia apenas no resíduo F108, presente na α hélice. Comparativamente com o W60A, a troca do triptofano 121 não acarreta perdas significativas de contato na estrutura de Grb2 WT, o que não deve afetar significativamente a flexibilidade e estabilidade da estrutura dimérica da proteína.

4.3.1. Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0

A proteína Grb2 W121A foi expressa seguindo protocolo das seções 3.3 e 3.4. O processo de purificação foi realizado em duas etapas: afinidade por Cobalto e exclusão molecular automatizada.

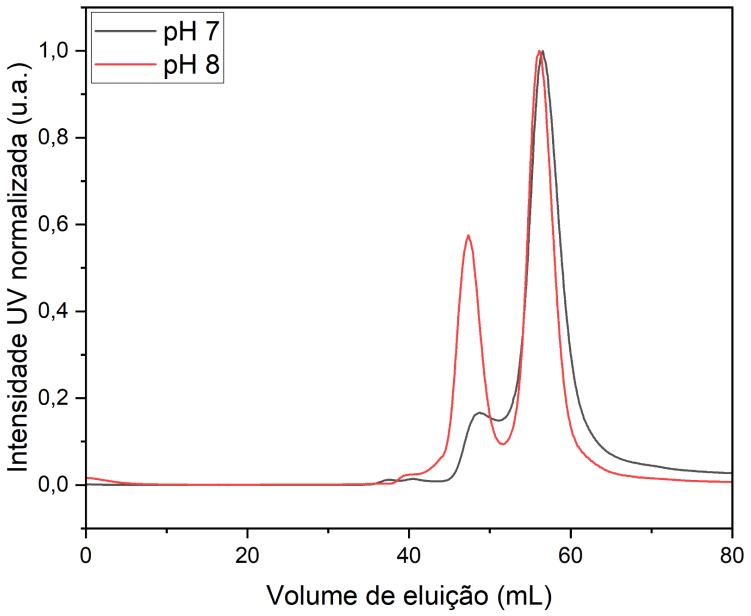
A purificação por afinidade ao Cobalto foi realizada com concentrações gradativas de Imidazol (20 - 1000 mM) e as amostras coletadas para aplicação em gel SDS-PAGE (Figura 69).

Figura 69 - Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 W121A por afinidade ao Cobalto. MM - Marcador de massa molecular (kDa); Flow - proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 - 1000 mM - concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.



Visto que as amostras já se encontravam puras, estas foram concentradas e aplicadas em coluna *Superdex 75* apenas para troca de tampão nos pHs desejados. Mais uma vez, pode-se observar abaixo (Figura 70) que as proteínas apresentam deslocamento no volume de eluição dependente do pH utilizado, seguindo-se a mesma tendência do pH mais elevado ser eluído primeiro.

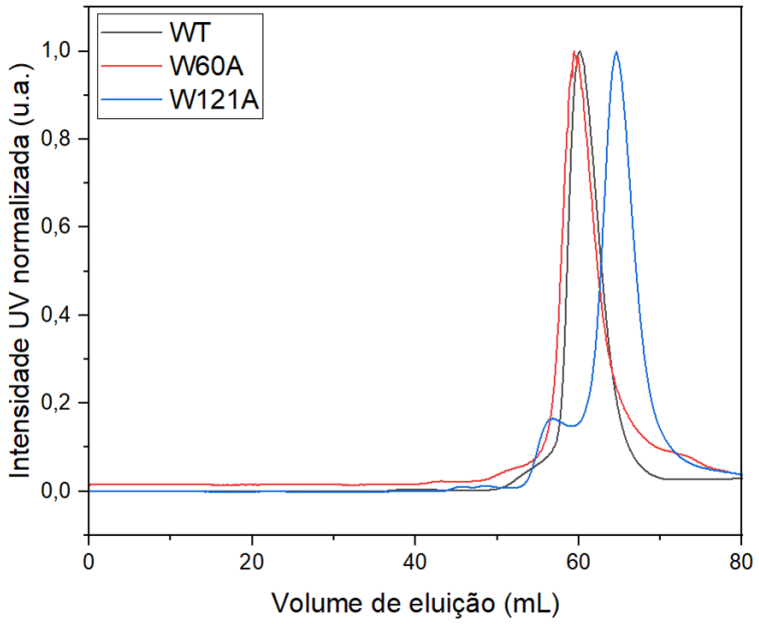
Figura 70 - Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 W121A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).



Diferentemente das duas proteínas já analisadas, a proteína W121A apresenta 2 picos com volumes diferentes de eluição em ambos os pHs. Novamente, os dois picos foram inicialmente coletados para análise em gel

SDS-PAGE e atestado serem estados oligoméricos da mesma proteína. Comparativamente com o perfil apresentado para Grb2 WT e Grb2 W60A (Figura 71), o volume de eluição do segundo pico (mais proeminente) é menor do que o esperado para um estado dímero da proteína.

Figura 71 - Sobreposição dos perfis cromatográficos das proteínas Grb2 WT (preto), W60A (vermelho) e W121A (azul) em pH 7.0 evidenciando a diferença no volume de eluição de cada uma das proteínas e a diferença em relação à proteína W121A.



Desta forma, visto que o primeiro pico do cromatograma da proteína W121A elui na região do dímero de Grb2 WT e W60A, é provável que este pico seja uma forma dimérica da proteína W121A enquanto o segundo pico, mais pronunciado, o qual elui a partir de 60 mL de coluna, seja a forma monomérica da proteína.

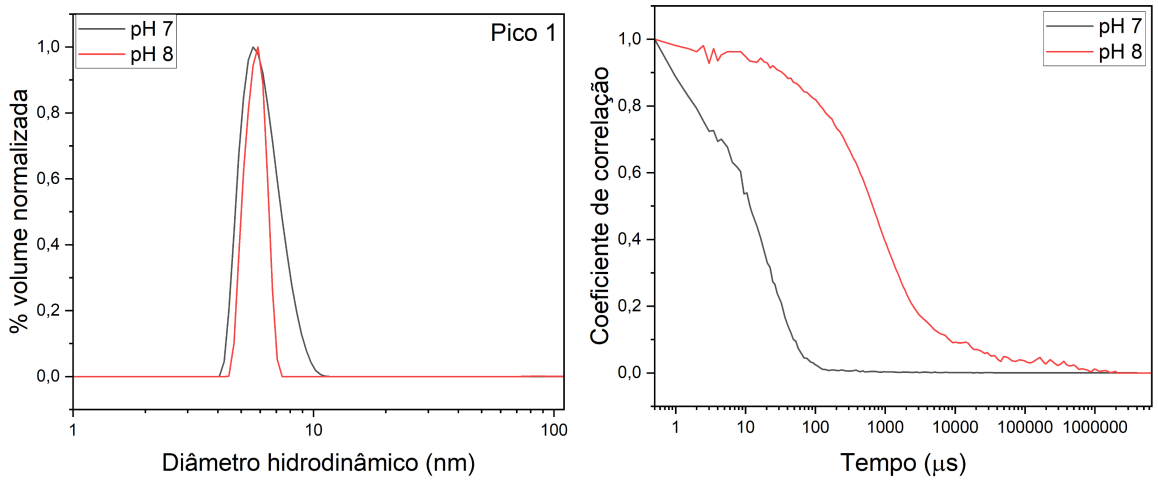
4.3.1.2. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

Como visto pelo perfil cromatográfico, a proteína W121A apresenta um deslocamento no volume de eluição entre os pHs 7.0 e 8.0, indicando uma diferença em seu diâmetro hidrodinâmico. Além disso, o deslocamento no volume de eluição do pico mais proeminente quando comparado com a proteína Grb2 WT e W60A indica uma diferença de estado oligomérico entre as proteínas.

Experimentos de DLS foram realizados com ambos os picos da proteína W121A para determinar a diferença de diâmetro entre os pHs analisados e a mudança de diâmetro causada pela mutação do triptofano 121. A Figura 72

apresenta os gráficos de porcentagem em volume por tamanho em nanômetro e o coeficiente de correlação das amostras em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) do primeiro pico de eluição da cromatografia por exclusão molecular.

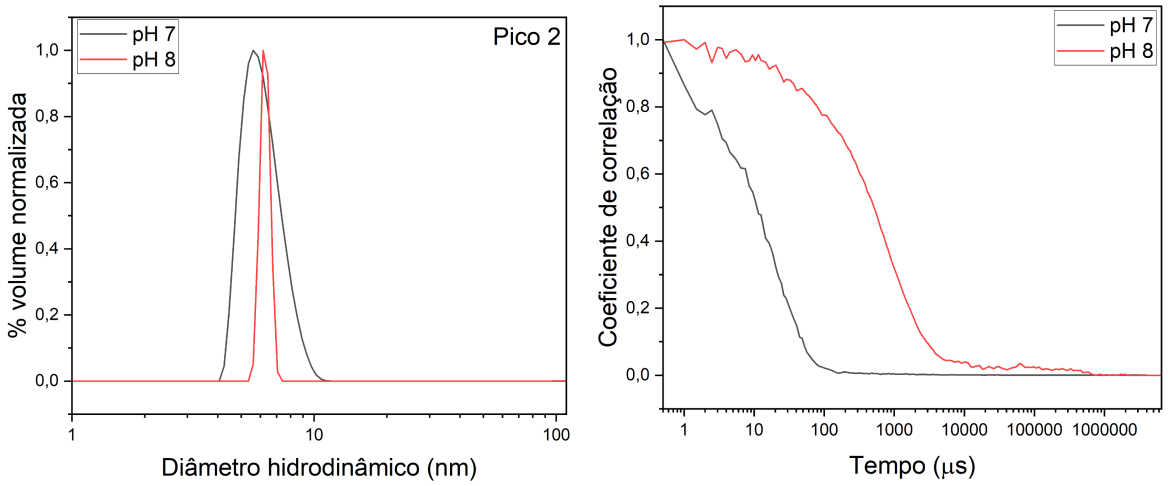
Figura 72 - Gráficos de espalhamento dinâmico da luz: distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico (esquerda) e coeficiente de correlação (direita) da proteína Grb2 W121A em diferentes pHs básicos: 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) referentes ao primeiro pico de eluição da cromatografia por exclusão molecular.



Ambos os picos apresentam uma população acima de 99% e nota-se um pequeno aumento no diâmetro hidrodinâmico para o pH mais alto. Numericamente, em pH 7.0, a proteína apresenta um diâmetro de 7,166 nm e desvio padrão de 0,691 nm, enquanto que para pH 8, o diâmetro encontrado foi de 7,934 nm e desvio padrão de 0.317 nm. Assim como o relatado para a proteína W60A, o aumento do pH acarreta em um aumento de aproximadamente 1 nm, reafirmando a tendência de aumento do diâmetro hidrodinâmico com a elevação do pH. Esta diferença no diâmetro da proteína pode também ser observado pelo maior decaimento do coeficiente de correlação em pH 7, quando comparado ao pH 8, inferindo que a proteína possui um diâmetro menor em pH mais baixo.

O segundo pico do cromatograma de exclusão molecular, com um volume mais proeminente, também foi submetido à técnica de DLS e os gráficos de porcentagem em volume por tamanho em nanômetros e do coeficiente de correlação podem ser observados na Figura 73.

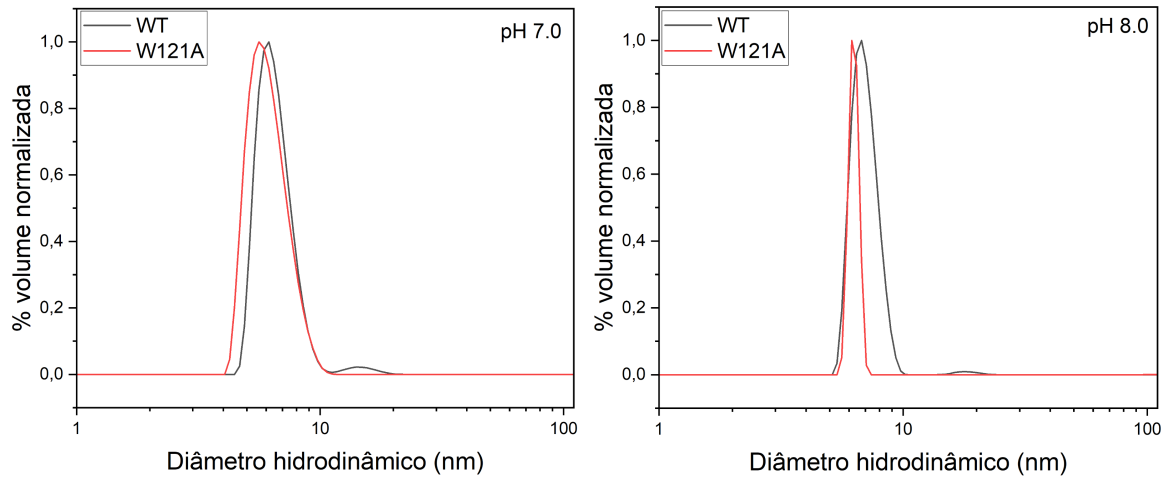
Figura 73 - Gráficos de espalhamento dinâmico da luz: distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico (esquerda) e coeficiente de correlação (direita) da proteína Grb2 W121A nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) para o segundo pico de eluição da cromatografia por exclusão molecular.



Assim como observado para o primeiro pico, ambas as amostras apresentam população superior a 99% e nota-se um deslocamento do pico em pH 8 para valores mais elevados de diâmetro hidrodinâmico. Em pH 7.0, observa-se uma maior flexibilidade da proteína demonstrado pela maior largura do pico, com valores médios de 6,144 nm e desvio padrão de 1.113 nm, enquanto que em pH 8.0 obteve-se um valor médio de 6,281 nm e desvio padrão de 0.286 nm. Esta diferença de diâmetro também pode ser constatada pelo gráfico do coeficiente de correlação através do maior decaimento da amostra em pH 7.0.

Comparativamente com Grb2 WT (Figura 74), o segundo pico apresenta valores de diâmetro hidrodinâmico 5,6% menor em pH 7.0 (6,509 nm para Grb2 WT) e 9,3% menor em pH 8.0 (6,927 nm para Grb2 WT). Este decaimento no valor do diâmetro hidrodinâmico, juntamente com o deslocamento observado no cromatograma de exclusão molecular, levando em consideração a separação de picos por estados oligoméricos diferentes, nos leva a inferir que o segundo pico é referente ao estado monomérico da proteína Grb2 W121A.

Figura 74 - Distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico das proteínas Grb2 WT e Grb2 W121A nos pHs 7.0 (esquerda) e 8.0 (direita).

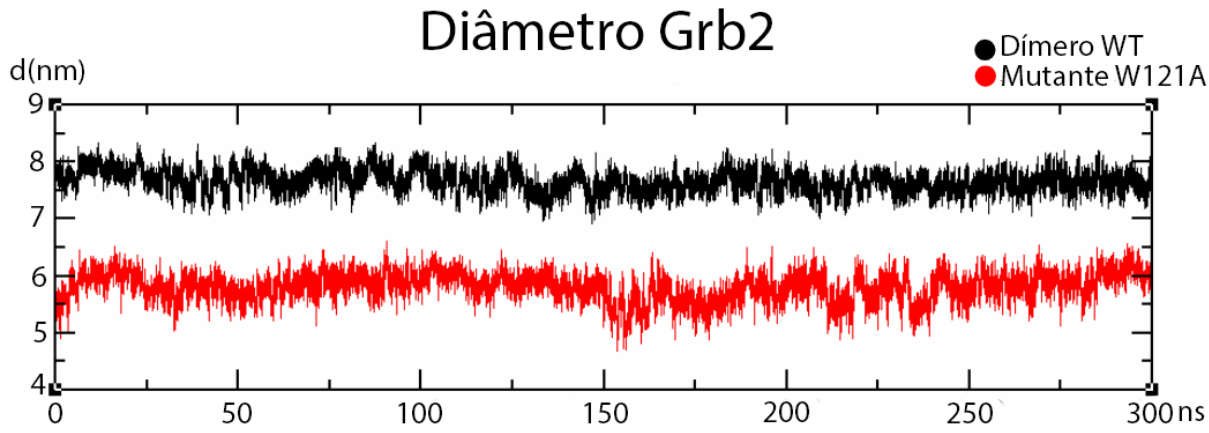


4.3.1.3. Dinâmica Computacional

Como visto na seção anterior, embora as proteínas Grb2 WT e Grb2 W121A estejam em estados oligoméricos diferentes, a diferença no diâmetro hidrodinâmico nos leva a supor um alongamento na estrutura do monômero e uma compactação na estrutura do dímero, visto que a diferença de diâmetro entre as estruturas é de 5,6% em pH 7.0.

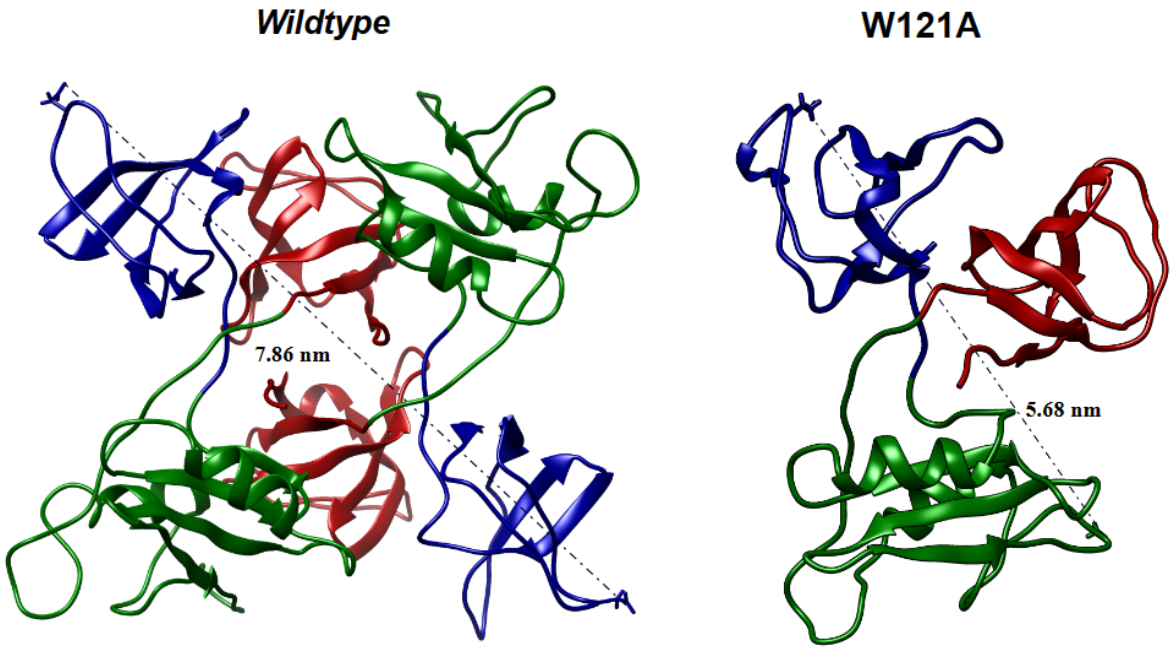
Estudos computacionais foram realizados em parceria com o Dr. Raphael Vinícius Rodrigues Dias para auxiliar a elucidação de tal mecanismo de alongamento/compactação entre as estruturas dímero/monômero. A partir da estrutura cristalográfica da proteína Grb2 WT (PDB: 1GRI) foi realizada a separação das cadeias e a mutação do resíduo 121 por uma alanina. A dinâmica molecular foi realizada durante 300 ns e fixou-se dois resíduos da extremidade de cada estrutura para o cálculo da distância entre os mesmos (dímero - resíduo ASP 14 de cada protômero; monômero - resíduos THR 12 e GLN 114). A distância entre estes resíduos durante todo o tempo de dinâmica pode ser observado na Figura 75.

Figura 75 - Gráfico da variação do diâmetro das estruturas Grb2 WT dimérica (preto) e Grb2 W121A monomérica (vermelho) ao longo dos 300 ns de dinâmica molecular.



Como era esperado, o monômero apresenta diâmetro menor do que o dímero. Observa-se, para o dímero, uma variação do diâmetro entre 6.91 e 8.35 $\pm$ 0.20 nm, enquanto que, para o monômero, esta variação é entre 4.69 e 6.61 $\pm$ 0.25 nm. As estruturas mais representativas foram retiradas da dinâmica molecular e podem ser visualizadas na Figura 76 juntamente com o diâmetro associado à cada uma delas.

Figura 76 - Estrutura mais representativa do dímero de Grb2 WT (esquerda) e do monômero de Grb2 W121A (direita) e seu diâmetro associado.



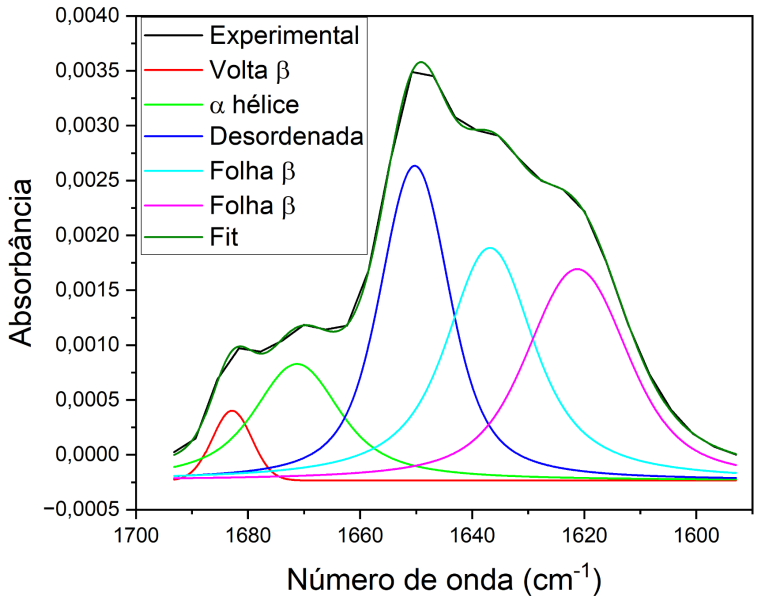
Desta forma, embora a redução do diâmetro para o monômero observada através da técnica de DLS seja de apenas 5,6% em pH 7.0, a flexibilidade das duas estruturas durante a dinâmica corrobora com os resultados apresentados na seção anterior.

Visto a importância do Triptofano 121 para a dimerização da proteína Grb2 WT e a falta de relatos de mutações que provoquem a prevalência do monômero em solução, optou-se por realizar os estudos já relatados nas seções 4.1 e 4.2 com a forma monomérica da proteína.

4.3.1.4. Estrutura Secundária por Infravermelho

Experimentos de Infravermelho foram realizados em ambos os pHs com o intuito de monitorar possíveis mudanças estruturais ocasionadas pela mutação do Triptofano e a conservação da estrutura secundária no estado monomérico da proteína. A caracterização da estrutura secundária foi realizada através da deconvolução da banda Amida I (1600 - 1700 cm^{-1}). Na Figura 77 tem-se o espectro da região da Amida I para a proteína em pH 7.0 e suas deconvoluções correlacionadas às estruturas secundárias.

Figura 77 - Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W121A em pH 7.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta (~1680 cm^{-1}), em verde alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



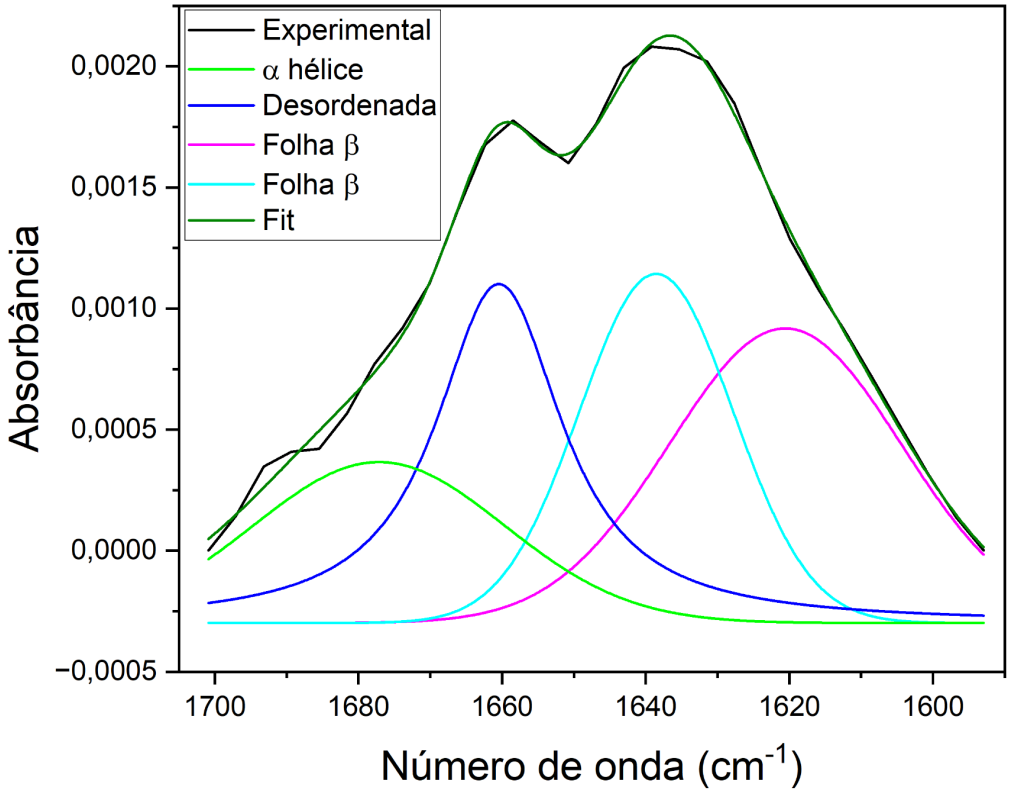
Na Tabela 22 encontram-se as porcentagens calculadas para o pH 7.0 assim como os números de onda do centro de cada deconvolução utilizada para a determinação da estrutura estudada.

Tabela 22 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W121A em pH 7.0 com seus respectivos centros e porcentagens.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1682 ± 8	Volta β	3%
1670 ± 8	α hélice	14%
1649 ± 8	Desordenada	28%
1637, 1622 ± 8	Folha β	55%

Para a proteína em pH 8.0 (Figura 78) foram realizados os mesmos métodos de deconvolução empregados para o pH 7.0, assim como o cálculo das porcentagem estruturais a partir da área relativa de cada curva deconvoluída.

Figura 78 - Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W121A em pH 8.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em verde é característica de alfa-hélices (~1670 cm^{-1}), em azul representam estruturas desordenadas (~1650 cm^{-1}) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~1630 e 1620 cm^{-1}).



Assim como o observado para as proteínas anteriores, não foi possível observar uma influência de voltas beta no espectro em pH 8.0. No entanto, nota-se uma semelhança nos perfis associados às deconvoluções de estruturas desordenadas e folhas β, como pode ser observado na Tabela 23.

Tabela 23 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W121A em pH 8.0 com seus respectivos centros e porcentagens.

Número de onda (cm^{-1})	Estrutura	Porcentagem
1677 ± 8	α hélice	17%
1660 ± 8	Desordenada	28%
1638, 1620 ± 8	Folha β	55%

O pequeno aumento observado na porcentagem de α hélices (3%) com o aumento de pH pode não ser expressivo, visto que não foi possível associar uma deconvolução de voltas β presentes na mesma região.

A semelhança da composição secundária entre os pHs 7.0 e 8.0 é compatível com o pequeno aumento de diâmetro hidrodinâmico observado pelos experimentos de DLS de apenas 0.137 nm com o aumento do pH. Isto indica que, diferentemente das proteínas relatadas anteriormente na forma dimérica, o monômero apresenta uma expressiva estabilidade conformacional independente da variação de pH do meio.

4.3.2. Conclusões Preliminares

O Triptofano 121 da proteína Grb2 tem sido apontado há muitos anos como o resíduo chave para a dimerização da proteína, visto que seus ângulos diedrais não são energeticamente favoráveis para o monômero [26], [33], [39]. No entanto, todos os estudos relacionados a este resíduo presentes na literatura levam em consideração apenas mutações no domínio SH2 isolado e resultaram em estruturas diméricas [39], [40], [93], [94]. A falta de estudos acerca da importância do Trp121 para a dimerização de Grb2 nos levou à mutação deste resíduo por uma Alanina, no intuito de verificar a importância de uma cadeia lateral robusta, como a do Triptofano, para a formação do dímero.

O processo de purificação por cromatografia de exclusão molecular nos indicou a presença de dois estados oligoméricos da proteína em solução, sendo o primeiro, e menor, com um volume de eluição próximo dos dímeros de Grb2 WT e

Grb2 W60A, e o segundo, muito mais proeminente, em um volume de eluição menor, indicando um estado oligomérico inferior ao dímero.

As amostras de cada pico foram então submetidas à técnica de DLS para verificação do diâmetro hidrodinâmico em ambos os pHs e constatou-se uma diminuição do diâmetro em ambos os pHs para o segundo pico do cromatograma. O segundo pico apresentou um diâmetro médio de 6.144 nm em pH 7.0 e 6.281 nm em pH 8.0, enquanto o primeiro pico apresentou diâmetro compatível com os dímeros estudados até então (7.166 para pH 7.0 e 7.934 para pH 8.0). Para auxiliar a determinação do estado oligomérico da proteína, dinâmicas moleculares foram realizadas tanto para o dímero quanto para o monômero e foi realizada a determinação dos possíveis diâmetros acessíveis durante a dinâmica. O monômero de Grb2 com o resíduo W121 mutado por alanina apresenta uma variação de diâmetro entre 4.69 e 6.61 $\pm$ 0.25 nm, calculado computacionalmente, compatível com os dados obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz. Um ponto importante, evidenciado pelas técnicas de DLS e Infravermelho é a estabilidade deste monômero em ambos os pHs, com alterações mínimas em seu diâmetro hidrodinâmico e composição da estrutura secundária.

A mutação W121A, neste sentido, introduz na literatura uma forma monomérica de Grb2 estável estruturalmente em ambos os pHs, abrindo possibilidades para estudos de interação com outras proteínas e ligantes, visto que, atualmente, existem na literatura apenas dois monômeros estáveis de Grb2 [27], sendo um deles formado através de uma dupla mutação introduzindo diferenças de carga na estrutura da proteína, o que podem interferir em experimentos de interação.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Grb2 é uma importante proteína expressa ubiquamente no interior das células. Seu papel fundamental em várias vias de sinalização e seu reconhecimento em diversos tipos de câncer a torna um alvo importante para a avaliação de diferenças conformacionais e termodinâmicas em condições que possam mimetizar células tumorais e normais. Uma das principais características de células cancerígenas é a habilidade de mudar seu pH intracelular por volta de 7.0 em células normais para em torno de 8.0 em células cancerígenas.

A basificação do pH para a proteína Grb2 WT ocasionou um aumento de seu diâmetro hidrodinâmico, levando à uma menor cooperatividade entre os domínios da proteína. A alteração no diâmetro hidrodinâmico foi relacionada à uma alteração na composição da estrutura secundária da proteína, apresentando uma diminuição de folhas β e aumento de estruturas desordenadas em pH mais alto, possibilitando uma maior flexibilidade da proteína devido à redução de pontes de hidrogênio, ligação restritiva de curto alcance, responsáveis pela estabilização de folhas β.

Experimentos de HSQC revelaram um equilíbrio nas perturbações do deslocamento químico para os domínios SH2 e cSH3. No caso do domínio nSH3, a falta de assinalamento impediu tal visualização, optando-se por uma metodologia computacional, a qual revelou movimentos periféricos dos domínios SH3 em pH 8.0 e movimentos centrais em pH 7.0, corroborando com o aumento do diâmetro hidrodinâmico dependente do aumento de pH.

A Cumarina, por apresentar propriedades anticancerígenas comprovadas, é uma molécula importante para a realização de estudos de interação com proteínas relacionadas com carcinomas. A interação entre a molécula e a proteína Grb2 já foi caracterizada na literatura em pH 8.0 porém, visto que a proteína Grb2 apresenta mudanças conformacionais em diferentes pHs, é de fundamental importância entender como tal estruturação afeta a interação com a molécula.

Neste sentido, a interação entre a proteína Grb2 e a molécula de Cumarina foi realizada em ambos os pHs. Utilizando a propriedade intrínseca do fluoróforo triptofano, foi possível acompanhar a supressão da intensidade de fluorescência com a adição de Cumarina no sistema. Observou-se a mesma ordem na constante

de associação em ambos os pHs (10^4 M^{-1}), apresentando mudanças no seu mecanismo de supressão, estático para pH 7.0 e dinâmico para pH 8.0, assim como diferentes constantes de Hill, próximo de 0,6 para o pH 7.0 e próximo de 1.0 para pH 8.0. A interação também foi analisada através da técnica de STD no intuito de caracterizar o encaixe da molécula no sítio de ligação, apresentando diferentes encaixes nos pHs estudados, evidenciado pela mudança nas porcentagem dos epítopos mais próximos da proteína (H8 e H6 - pH 7.0; H6 e H1 - pH 8.0). Por fim, a análise da estrutura secundária da proteína na presença da molécula de Cumarina através da técnica de Infravermelho mostrou uma reestruturação mediante a interação, evidenciada pelo aumento de folhas β em pH 8.0 acompanhado por uma diminuição da porcentagem de estruturas desordenadas.

A caracterização do sítio de interação entre a proteína e a molécula apresentada na literatura [48], indica um sítio de docagem próximo ao triptofano 121. Para uma melhor elucidação de tal sítio, optou-se pela mutação dos triptofanos 60 e 121 presentes no domínio SH2 de Grb2 por um resíduo de alanina, a fim de estudar a influência da cadeia lateral na estrutura da proteína e na interação com a molécula.

O mutante W60A apresentou características estruturais semelhantes à Grb2 WT, com aumento do diâmetro hidrodinâmico em pH 8.0 e decaimento de estruturas ordenadas. No entanto, a mutação gerou uma perda de contatos significativa com a hélice α adjacente ao resíduo, ocasionando em uma maior flexibilidade da proteína e maior diâmetro hidrodinâmico, quando comparada à Grb2 WT.

No âmbito da interação, foi verificada a mesma ordem da constante de associação da proteína Grb2 WT, assim como coeficientes de Hill compatíveis, evidenciando a interação da proteína *wildtype* no sítio de ligação próximo ao triptofano 121.

O triptofano 121 apresenta um papel fundamental na dimerização da proteína Grb2, visto que seus ângulos diedrais são desfavoráveis na conformação monomérica. No entanto, estudos com o domínio SH2 isolado mostram que, apesar de diversas mutações diferentes, a dimerização ainda é prevalecida. Neste sentido, a mutação por alanina, apresentada neste trabalho, tem o intuito de caracterizar a

importância da cadeia lateral do resíduo em questão no processo de dimerização da proteína.

Dados de Cromatografia por Exclusão Molecular demonstram uma maior prevalência do monômero no processo de purificação, o que foi verificado através da técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz, caracterizando um diâmetro hidrodinâmico próximo a 6.1 nm para este estado oligomérico. Visto que percentualmente esta diminuição representa 5,6% do diâmetro hidrodinâmico do dímero, especulou-se a possibilidade de uma alta flexibilidade do monômero, podendo acessar estados abertos com diâmetro próximo ao do dímero. Tal hipótese foi corroborada com estudos de dinâmica molecular, os quais mostraram uma variação no diâmetro do monômero de 1.92 nm.

A proximidade das porcentagem de estrutura secundária em ambos os pHs, analisada por Transformada de Fourier no Infravermelho, juntamente com uma variação na ordem de 0,1 nm do diâmetro, demonstram uma grande estabilidade estrutural do monômero nesta configuração.

Com base nos resultados apresentados, é evidente que a conformação estrutural dimérica das proteínas Grb2 WT e W60A é sensível às alterações de pH e que tal conformação pode influenciar de forma significativa na interação com outras moléculas e proteínas parceiras nas vias de sinalização. Além disso, foi possível avaliar a importância dos triptofanos 60 e 121 localizados no domínio SH2. O triptofano 121, anteriormente citado na literatura pelo seu papel crucial na dimerização da proteína Grb2, ainda não havia sido correlacionado com uma estrutura monomérica, visto que todas as mutações existentes são do domínio SH2 isolado e nenhuma delas provocou a monomerização do domínio. Este estudo auxilia no maior entendimento da proteína Grb2 como um todo, além de aprofundar os conhecimentos da sua interação com o ligante Cumarina, sendo os dois muito importantes para o desenvolvimento de pesquisas e novas terapias anticancerígenas.

- PERSPECTIVAS
  - Assinalamento da proteína Grb2 WT;
  - Monitoramento dos deslocamentos químicos do domínio nSH3;
  - Assinalamento e estrutura do monômero W121A;
  - Determinação da estrutura de Grb2 WT em ambos os pHs (cristal ou *domain-swap*);
  - Estudos computacionais de docking para caracterizar o sítio de interação de cada proteína;
  - DLS da interação Grb2-Cumarina.

REFERÊNCIAS

[1] R. SEVER e J. S. BRUGGE, “Signal Transduction in Cancer”, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 5, nº 4, p. a006098–a006098, abr. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a006098.

[2] H. SUNG *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, nº 3, p. 209–249, maio 2021, doi: 10.3322/caac.21660.

[3] J. FERLAY *et al.*, “Cancer statistics for the year 2020: An overview”, *Int. J. Cancer*, vol. 149, nº 4, p. 778–789, ago. 2021, doi: 10.1002/ijc.33588.

[4] G. KRAUSS, *Biochemistry of signal transduction and regulation*, 5., Completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2014.

[5] A. L. LEHNINGER, D. L. NELSON, e M. M. COX, *Lehninger principles of biochemistry*, 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2005.

[6] D. HANAHAN e R. A. WEINBERG, “Hallmarks of Cancer: The Next Generation”, *Cell*, vol. 144, nº 5, p. 646–674, mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

[7] G. BUSCO *et al.*, “NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space”, *FASEB J.*, vol. 24, nº 10, p. 3903–3915, out. 2010, doi: 10.1096/fj.09-149518.

[8] F. A. GALLAGHER *et al.*, “Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized 13C-labelled bicarbonate”, *Nature*, vol. 453, nº 7197, p. 940–943, jun. 2008, doi: 10.1038/nature07017.

[9] R. J. GILLIES, “In vivo molecular imaging”, *J. Cell. Biochem.*, vol. 87, nº S39, p. 231–238, 2002, doi: 10.1002/jcb.10450.

[10] L. STÜWE *et al.*, “pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution: Migration correlates with a proton gradient at the plasma membrane”, *J. Physiol.*, vol. 585, nº 2, p. 351–360, dez. 2007, doi: 10.1113/jphysiol.2007.145185.

[11] L. K. PUTNEY e D. L. BARBERr, “Na-H Exchange-dependent Increase in Intracellular pH Times G2/M Entry and Transition”, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, nº 45, p. 44645–44649, nov. 2003, doi: 10.1074/jbc.M308099200.

[12] H. J. PARK, J. C. LYONS, T. OHTSUBO, e C. W. SONG, “Cell cycle progression and apoptosis after irradiation in an acidic environment”, *Cell Death Differ.*, vol. 7, nº 8, p. 729–738, ago. 2000, doi: 10.1038/sj.cdd.4400702.

[13] Y. ZHAO e A. A. ADJEI, “Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor”, *The Oncologist*, vol. 20, nº 6, p. 660–673, 2015, doi: 10.1634/theoncologist.2014-0465.

[14] D. LIAO e R. S. JOHNSON, “Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer”, *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 26, nº 2, p. 281–290, jul. 2007, doi: 10.1007/s10555-007-9066-y.

[15] A. K. ABBAS, A. H. LICHTMAN, S. PILLAI, e D. L. BAKER, *Cellular and molecular immunology*, Tenth edition. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2022.

[16] D. VOET, J. G. VOET, e C. W. PRATT, *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*, 5th edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2016.

[17] C. LEITE, J. COSTA, R. CALLADO, J. TORRES, R. LIMA JÚNIOR, e R. RIBEIRO, “Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in cancer”, *Braz. J Clin Oncol*, vol. 8, p. 29, 2012.

[18] J. SCHLESSINGER, “Signal transduction by allosteric receptor oligomerization”, *Trends Biochem. Sci.*, vol. 13, nº 11, p. 443–447, nov. 1988, doi: 10.1016/0968-0004(88)90219-8.

[19] B. ALBERTS, *Molecular biology of the cell*, Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015.

[20] Z. AHMED *et al.*, “Direct binding of Grb2 SH3 domain to FGFR2 regulates SHP2 function”, *Cell. Signal.*, vol. 22, nº 1, p. 23–33, jan. 2010, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.08.011.

[21] Z. AHMED *et al.*, “Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity”, *J. Cell Biol.*, vol. 200, nº 4, p. 493–504, fev. 2013, doi: 10.1083/jcb.201204106.

[22] C. C. LIN *et al.*, “Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2”, *Cell*, vol. 149, nº 7, p. 1514–1524, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.033.

[23] L. BUDAY e J. DOWNWARD, “Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor”, *Cell*, vol. 73, nº 3, p. 611–620, maio 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90146-H.

[24] P. SHAPIRO, “Ras-MAP Kinase Signaling Pathways and Control of Cell Proliferation: Relevance to Cancer Therapy”, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 39, nº 4–5, p. 285–330, jan. 2002, doi: 10.1080/10408360290795538.

[25] A. TARI, “GRB2: A pivotal protein in signal transduction”, *Semin. Oncol.*, vol. 28, p. 142–147, out. 2001, doi: 10.1016/S0093-7754(01)90291-X.

[26] S. MAIGNAN, J.-P. GUILLOTEAU, N. FROMAGE, B. ARNOUX, J. BECQUART, e A. DUCRUIX, “Crystal Structure of the Mammalian Grb2 Adaptor”, *Science*, vol. 268, nº 5208, p. 291–293, abr. 1995, doi: 10.1126/science.7716522.

[27] Z. AHMED *et al.*, “Grb2 monomer–dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function”, *Nat. Commun.*, vol. 6, nº 1, p. 7354, jun. 2015, doi: 10.1038/ncomms8354.

[28] C. C. LIN *et al.*, “Receptor tyrosine kinases regulate signal transduction through a liquid-liquid phase separated state”, *Mol. Cell*, vol. 82, nº 6, p. 1089-1106.e12, 2022, doi: 10.1016/j.molcel.2022.02.005.

[29] Z. YE *et al.*, “GRB2 enforces homology-directed repair initiation by MRE11”, *Sci. Adv.*, vol. 7, nº 32, p. 1–18, 2021, doi: 10.1126/sciadv.abe9254.

[30] A. K. STAINTHORP *et al.*, “Regulation of microRNA expression by the adaptor protein GRB2”, *Sci. Rep.*, vol. 13, nº 1, p. 9784, jun. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-36996-3.

[31] D. C. FLYNN, “Adaptor proteins”, *Oncogene*, vol. 20, nº 44, p. 6270–6272, out. 2001, doi: 10.1038/sj.onc.1204769.

[32] R. REN, B. J. MAYER, P. CICCHETTI, e D. BALTIMORE, “Identification of a Ten-Amino Acid Proline-Rich SH3 Binding Site”, *Science*, vol. 259, nº 5098, p. 1157–1161, fev. 1993, doi: 10.1126/science.8438166.

[33] P. CHARDIN, D. CUSSAC, S. MAIGNAN, e A. DUCRUIX, “The Grb2 adaptor”, *FEBS Lett.*, vol. 369, nº 1, p. 47–51, ago. 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)00578-W.

[34] A. GIUBELLINO, T. R. BURKE, e D. P. BOTTARO, “Grb2 signaling in cell motility and cancer”, *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 12, nº 8, p. 1021–1033, ago. 2008, doi: 10.1517/14728222.12.8.1021.

[35] H. F. LODISH, Org., *Molecular cell biology*, 7th ed. New York: W.H. Freeman and Co, 2013.

[36] N. SCHIERING, E. CASALE, P. CACCIA, P. GIORDANO, e C. BATTISTINI, “Dimer formation through domain swapping in the crystal structure of the Grb2-SH2-Ac-pYVNV complex”, *Biochemistry*, vol. 39, nº 44, p. 13376–13382, nov. 2000, doi: 10.1021/bi0012336.

[37] P. NIOCHE *et al.*, “Crystal structures of the SH2 domain of Grb2: Highlight on

the binding of a new high-affinity inhibitor", *J. Mol. Biol.*, vol. 315, nº 5, p. 1167–1177, 2002, doi: 10.1006/jmbi.2001.5299.

[38] A. P. BENFIELD, B. B. WHIDDON, J. H. CLEMENTS, e S. F. MARTIN, "Structural and energetic aspects of Grb2-SH2 domain-swapping", *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 462, nº 1, p. 47–53, jun. 2007, doi: 10.1016/j.abb.2007.03.010.

[39] D. PAPAIOANNOU, S. GEIBEL, M. B. A. KUNZE, C. W. M. KAY, e G. WAKSMAN, "Structural and biophysical investigation of the interaction of a mutant Grb2 SH2 domain (W121G) with its cognate phosphopeptide", *Protein Sci.*, vol. 25, nº 3, p. 627–637, mar. 2016, doi: 10.1002/pro.2856.

[40] Y. HOSOE *et al.*, "Structural and functional properties of Grb2 SH2 dimer in CD28 binding", *Biophys. Physicobiology*, vol. 16, p. 80–88, 2019, doi: 10.2142/biophysico.16.0_80.

[41] M. J. BENNETT, S. CHOE, e D. EISENBERG, "Domain swapping: entangling alliances between proteins.", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, nº 8, p. 3127–3131, abr. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.8.3127.

[42] Y. LIU e D. EISENBERG, "3D domain swapping: As domains continue to swap", *Protein Sci.*, vol. 11, nº 6, p. 1285–1299, jun. 2002, doi: 10.1110/ps.0201402.

[43] M. E. NEWCOMER, "Protein folding and three-dimensional domain swapping: astrained relationship?", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 12, nº 1, p. 48–53, fev. 2002, doi: 10.1016/S0959-440X(02)00288-9.

[44] A. SANDOUK *et al.*, "GRB2 dimerization mediated by SH2 domain-swapping is critical for T cell signaling and cytokine production", *Sci. Rep.*, vol. 13, nº 1, dez. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-30562-7.

[45] A. S. DHILLON, S. HAGAN, O. RATH, e W. KOLCH, "MAP kinase signalling pathways in cancer", *Oncogene*, vol. 26, nº 22, p. 3279–3290, maio 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210421.

[46] R. X.-D. SONG *et al.*, "Linkage of Rapid Estrogen Action to MAPK Activation by ERα-Shc Association and Shc Pathway Activation", *Mol. Endocrinol.*, vol. 16, nº 1, p. 116–127, jan. 2002, doi: 10.1210/mend.16.1.0748.

[47] I. S. BABINA e N. C. TURNER, "Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer", *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, nº 5, p. 318–332, maio 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.8.

[48] K. SANCHES *et al.*, "Grb2 dimer interacts with Coumarin through SH2 domains:

A combined experimental and molecular modeling study", *Heliyon*, vol. 5, nº 11, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02869.

[49] K. SANCHES *et al.*, "Thermodynamic profile and molecular modeling of the interaction between Grb2 dimer and flavonoids Rutin and Morin", *J. Mol. Struct.*, vol. 1234, p. 130164, 2021, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130164.

[50] A. THAKUR, R. SINGLA, e V. JAITAK, "Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies", *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 101, p. 476–495, ago. 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.07.010.

[51] M. E. MARSHALL *et al.*, "Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study.", *J. Clin. Oncol.*, vol. 5, nº 6, p. 862–866, jun. 1987, doi: 10.1200/JCO.1987.5.6.862.

[52] K. N. VENUGOPALA, V. RASHMIi, e B. ODHAV, "Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity", *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 1–14, 2013, doi: 10.1155/2013/963248.

[53] J. L. MOHLER *et al.*, "Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma", *The Prostate*, vol. 20, nº 2, p. 123–131, 1992, doi: 10.1002/pros.2990200208.

[54] J. S. LOPEZ-GONZALEZ, H. PRADO-GARCIA, D. AGUILAR-CAZARES, J. A. MOLINA-GUARNEROS, J. MORALES-FUENTES, e J. J. MANDOKI, "Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines", *Lung Cancer*, vol. 43, nº 3, p. 275–283, mar. 2004, doi: 10.1016/j.lungcan.2003.09.005.

[55] A. MAUCHER e E. VON ANGERER, "Antitumour activity of coumarin and 7-hydroxycoumarin against 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary carcinomas", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 120, nº 8, p. 502–504, ago. 1994, doi: 10.1007/BF01191806.

[56] M. MUSA, J. COOPERWOOD, e M. O. KHAN, "A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer", *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, nº 26, p. 2664–2679, nov. 2008, doi: 10.2174/092986708786242877.

[57] M. B. MOREIRA, D. S. FRANCISCATO, K. C. F. TOLEDO, J. R. B. D. SOUZA, H. S. NAKATANI, V. R. D. SOUZA, "Investigation of the fluoerscence quenching of bovine and human serum albumin by Ruthenium complex", *Quím. Nova*, 2014, doi: 10.5935/0100-4042.20140315.

[58] J. M. WALKER, Org., *The Protein Protocols Handbook*. em Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. doi: 10.1007/978-1-59745-198-7.

[59] S. P. SKINNER, R. H. FOGH, W. BOUCHER, T. J. RAGAN, L. G. MUREDDU, e G. W. VUISTER, "CcpNmr AnalysisAssign: a flexible platform for integrated NMR analysis", *J. Biomol. NMR*, vol. 66, nº 2, p. 111–124, out. 2016, doi: 10.1007/s10858-016-0060-y.

[60] K. SANCHES, I. P. CARUSO, F. C. ALMEIDA, e F. A. MELO, "NMR assignment of free 1H, 15N and 13C-Grb2-SH2 domain". Biological Magnetic Resonance Bank, 2019. doi: 10.13018/BMR27781.

[61] R. GHOSH e J. LADBURY, "Backbone chemical shift assignments of the C-terminal SH3 domain of Grb2". Biological Magnetic Resonance Bank, 2012. doi: 10.13018/BMR18748.

[62] S. GRZESIEK, S. J. STAHL, P. T. WINGFIELD, e A. BAX, "The CD4 Determinant for Downregulation by HIV-1 Nef Directly Binds to Nef. Mapping of the Nef Binding Surface by NMR", *Biochemistry*, vol. 35, nº 32, p. 10256–10261, jan. 1996, doi: 10.1021/bi9611164.

[63] P. H. DA SILVA, "Estudos da Interação da Proteína Adaptadora Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) com os Flavonoides Morina e Rutina", *Universidade Estadual Paul. "Júlio Mesquita Filho"*, vol. 2, p. 1–72, 2017.

[64] J. KOWALEWSKI, "Nuclear spin relaxation in liquids and gases", em *Nuclear Magnetic Resonance*, K. Kamienska-Trela e J. Wojcik, Orgs., 1º edThe Royal Society of Chemistry, 2012, p. 196–243. doi: 10.1039/9781849734851-00196.

[65] G. WEBER, "van't Hoff revisited: enthalpy of association of protein subunits", *J. Phys. Chem.*, vol. 99, nº 3, p. 1052–1059, jan. 1995, doi: 10.1021/j100003a031.

[66] B. J. BERNE, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Dover Publications, 2013.

[67] J. R. LAKOWICZ, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, nº 1. 1983. doi: 10.1007/BF02629943.

[68] T. WANG, L. H. ZENG, e D. L. LI, "A review on the methods for correcting the fluorescence inner-filter effect of fluorescence spectrum", *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 52, nº 10, p. 883–908, nov. 2017, doi: 10.1080/05704928.2017.1345758.

[69] A. DONG, J. M. MALECKI, L. LEE, J. F. CARPENTER, e J. C. LEE, "Ligand-induced conformational and structural dynamics changes in Escherichia

coli cyclic AMP receptor protein", *Biochemistry*, vol. 41, nº 21, p. 6660–6667, 2002, doi: 10.1021/bi020036z.

[70] A. DONG, P. HUANG, e W. S. CAUGHEY, "Redox-dependent changes in .beta.-extended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra", *Biochemistry*, vol. 31, nº 1, p. 182–189, jan. 1992, doi: 10.1021/bi00116a027.

[71] H. YANG, S. YANG, J. KONG, A. DONG, e S. YU, "Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy", *Nat. Protoc.*, vol. 10, nº 3, p. 382–396, 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.024.

[72] A. WATERHOUSE *et al.*, "SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes", *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, nº W1, p. W296–W303, jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky427.

[73] M. VARADI *et al.*, "AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models", *Nucleic Acids Res.*, vol. 50, nº D1, p. D439–D444, jan. 2022, doi: 10.1093/nar/gkab1061.

[74] C. R. SøNDERGAARD, M. H. M. OLSSON, M. ROSTKOWSKI, e J. H. JENSEN, "Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of p K_a Values", *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, nº 7, p. 2284–2295, jul. 2011, doi: 10.1021/ct200133y.

[75] LINDAHL, ABRAHAM, HESS, e V. D. SPOEL, "GROMACS 2020 Source code". Zenodo, 1º de janeiro de 2020. doi: 10.5281/ZENODO.3562495.

[76] J. LOSCHWITZ, A. JÄCKERING, M. KEUTMANN, M. OLANGUJU, O. O. OLUBIYI, e B. STRODEL, "Dataset of AMBER force field parameters of drugs, natural products and steroids for simulations using GROMACS", *Data Brief*, vol. 35, p. 106948, abr. 2021, doi: 10.1016/j.dib.2021.106948.

[77] P. T. LANG *et al.*, "DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes", *RNA*, vol. 15, nº 6, p. 1219–1230, jun. 2009, doi: 10.1261/rna.1563609.

[78] S. R. BROZELL, S. MUKHERJEE, T. E. BALIUS, D. R. ROE, D. A. CASE, e R. C. RIZZO, "Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool", *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 26, nº 6, p. 749–773, jun. 2012, doi: 10.1007/s10822-012-9565-y.

[79] R. G. PARRA *et al.*, “Protein Frustratometer 2: a tool to localize energetic frustration in protein molecules, now with electrostatics”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, nº W1, p. W356–W360, jul. 2016, doi: 10.1093/nar/gkw304.

[80] J. C. HINDMAN, A. SVIRMICKAS, e M. WOOD, “Relaxation processes in water. A study of the proton spin-lattice relaxation time”, *J. Chem. Phys.*, vol. 59, nº 3, p. 1517–1522, ago. 1973, doi: 10.1063/1.1680209.

[81] S. NGARIZE, H. HERMAN, A. ADAMS, e N. HOWELL, “Comparison of Changes in the Secondary Structure of Unheated, Heated, and High-Pressure-Treated β-Lactoglobulin and Ovalbumin Proteins Using Fourier Transform Raman Spectroscopy and Self-Deconvolution”, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, nº 21, p. 6470–6477, out. 2004, doi: 10.1021/jf030649y.

[82] P. TABOADA, S. BARBOSA, E. CASTRO, M. GUTIÉRREZ-PICHEL, e V. MOSQUERA, “Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous–alcohol mixed solvents”, *Chem. Phys.*, vol. 340, nº 1–3, p. 59–68, nov. 2007, doi: 10.1016/j.chemphys.2007.07.027.

[83] F. DING, G. ZHAO, J. HUANG, Y. SUN e L. ZHANG, “Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme”, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, nº 10, p. 4083–4089, out. 2009, doi: 10.1016/j.ejmech.2009.04.047.

[84] J. N. WEISS, “The Hill equation revisited: uses and misuses”, *FASEB J.*, vol. 11, nº 11, p. 835–841, 1997, doi: 10.1096/fasebj.11.11.9285481.

[85] Í. P. CARUSO, W. VILEGAS, F. P. DE SOUZA, M. A. FOSSEY, e M. L. CORNÉLIO, “Binding of antioxidant flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 98, p. 100–106, set. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.05.015.

[86] M. AKBARIAN *et al.*, “Inhibitory effect of coumarin and its analogs on insulin fibrillation /cytotoxicity is depend on oligomerization states of the protein”, *RSC Adv.*, vol. 10, nº 63, p. 38260–38274, 2020, doi: 10.1039/D0RA07710K.

[87] M. D. BOERSMA, J. D. SADOWSKY, Y. A. TOMITA, e S. H. GELLMAN, “Hydrophile scanning as a complement to alanine scanning for exploring and manipulating protein-protein recognition: Application to the Bim BH3 domain”, *Protein Sci.*, vol. 17, nº 7, p. 1232–1240, jul. 2008, doi: 10.1110/ps.032896.107.

[88] Q. TANG e A. W. FENTON, “Whole‐protein alanine‐scanning mutagenesis of allostery: A large percentage of a protein can contribute to mechanism”, *Hum.*

Mutat., vol. 38, nº 9, p. 1132–1143, set. 2017, doi: 10.1002/humu.23231.

[89] L.J. MA, I. OHMERT, e V. VARDANYAN, “Allosteric Features of KCNQ1 Gating Revealed by Alanine Scanning Mutagenesis”, *Biophys. J.*, vol. 100, nº 4, p. 885–894, fev. 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2010.12.3726.

[90] N. CHOPRA *et al.*, “Dynamic Allostery Mediated by a Conserved Tryptophan in the Tec Family Kinases”, *PLOS Comput. Biol.*, vol. 12, nº 3, p. e1004826, mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004826.

[91] F. LEFEVRE, “Alanine-stretch scanning mutagenesis: a simple and efficient method to probe protein structure and function”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, nº 2, p. 447–448, jan. 1997, doi: 10.1093/nar/25.2.447.

[92] B. C. CUNNINGHAM e J. A. WELLS, “High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis”, *Science*, vol. 244, nº 4908, p. 1081–1085, jun. 1989, doi: 10.1126/science.2471267.

[93] L. E. M. MARENGERE *et al.*, “SH2 domain specificity and activity modified by a single residue”, *Nature*, vol. 369, p. 502–505, 1994.

[94] Y. LIU, H. JANG, M. ZHANG, C. J. TSAI, R. MALONEY, e R. NUSSINOV, “The structural basis of BCR-ABL recruitment of GRB2 in chronic myelogenous leukemia”, *Biophys. J.*, vol. 121, nº 12, p. 2251–2265, jun. 2022, doi: 10.1016/j.bpj.2022.05.030.

ANEXO A

Figura 79 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 291 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.

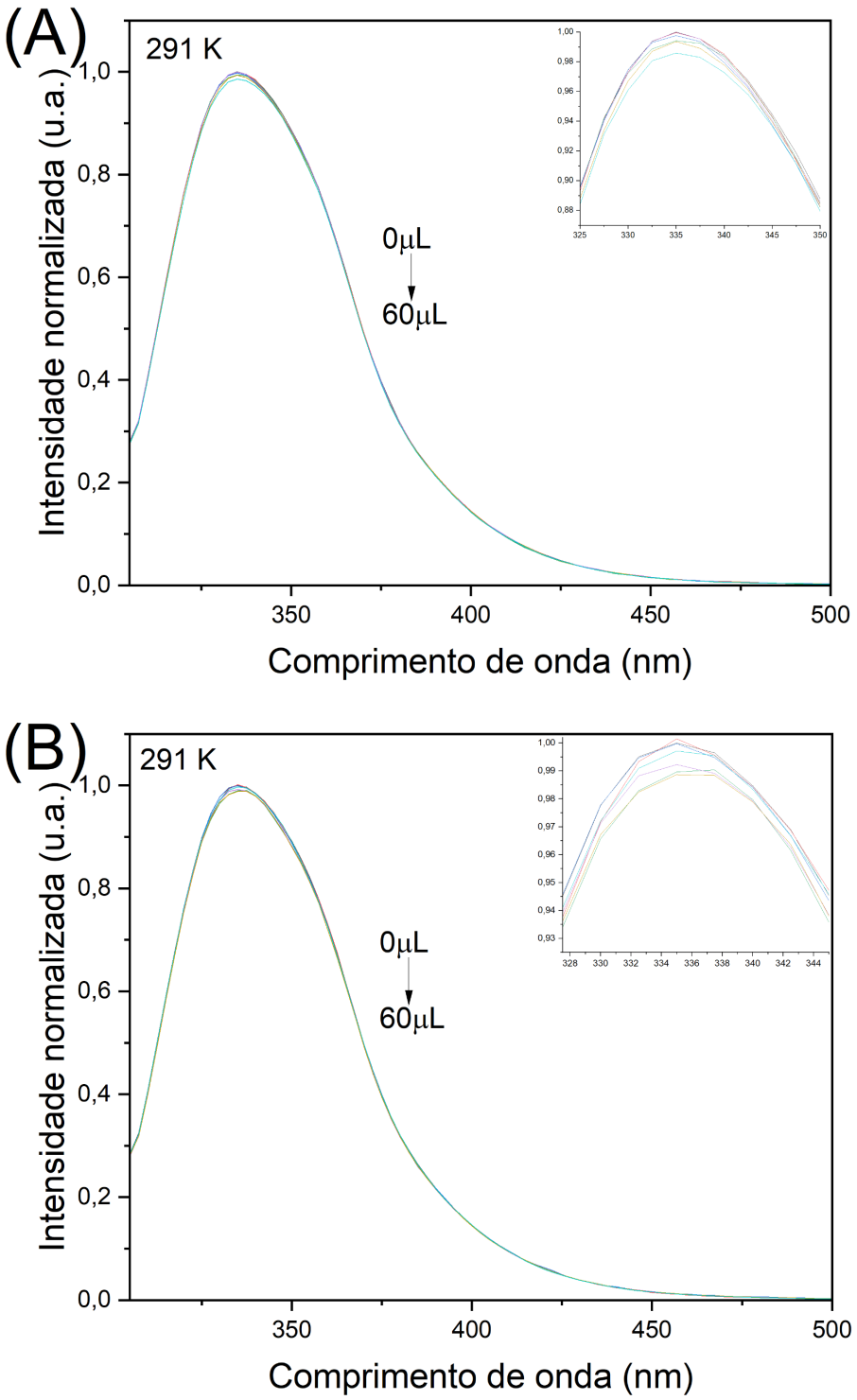


Figura 80 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 μM de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 299 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.

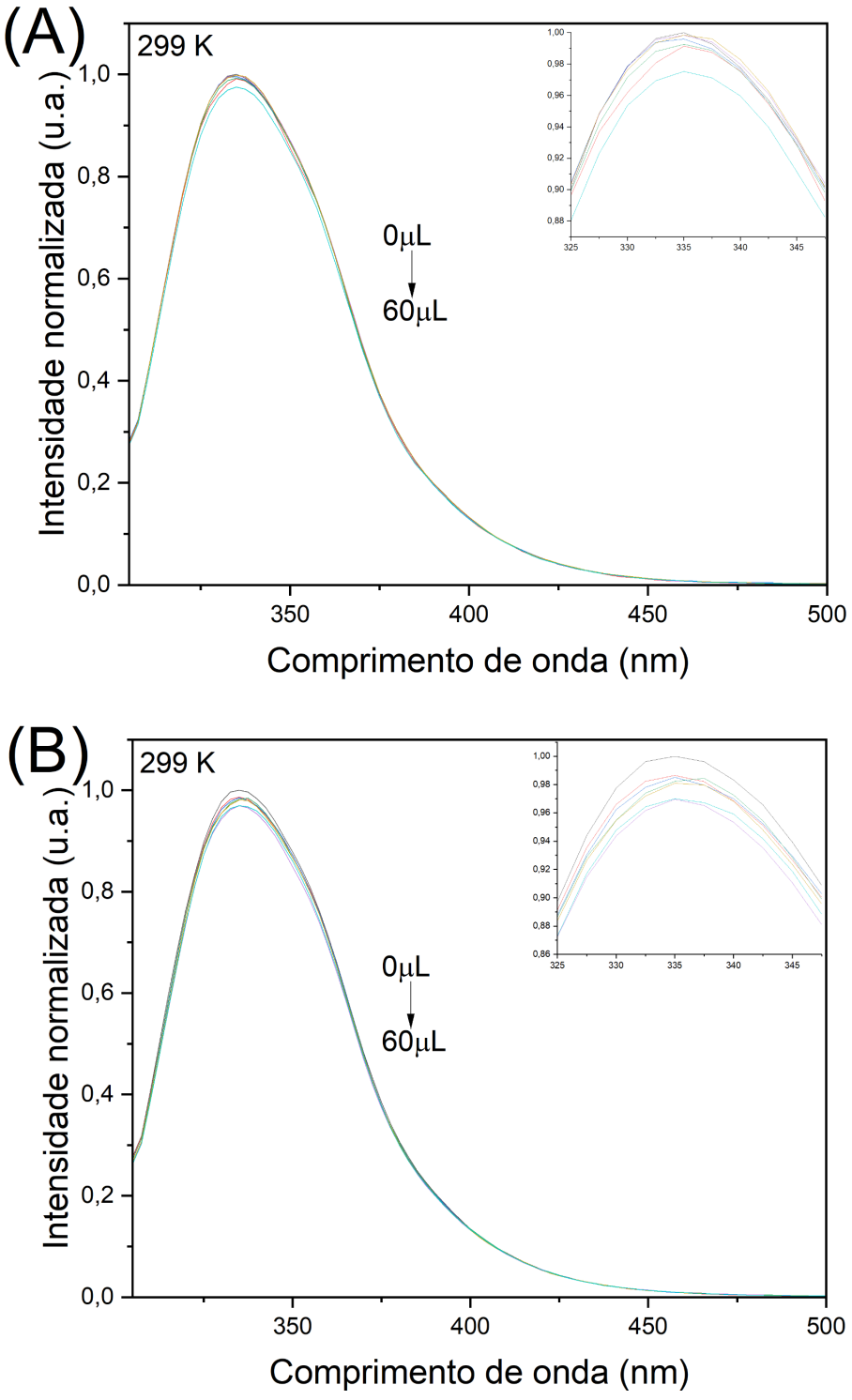


Figura 81 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 µM de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 291 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.

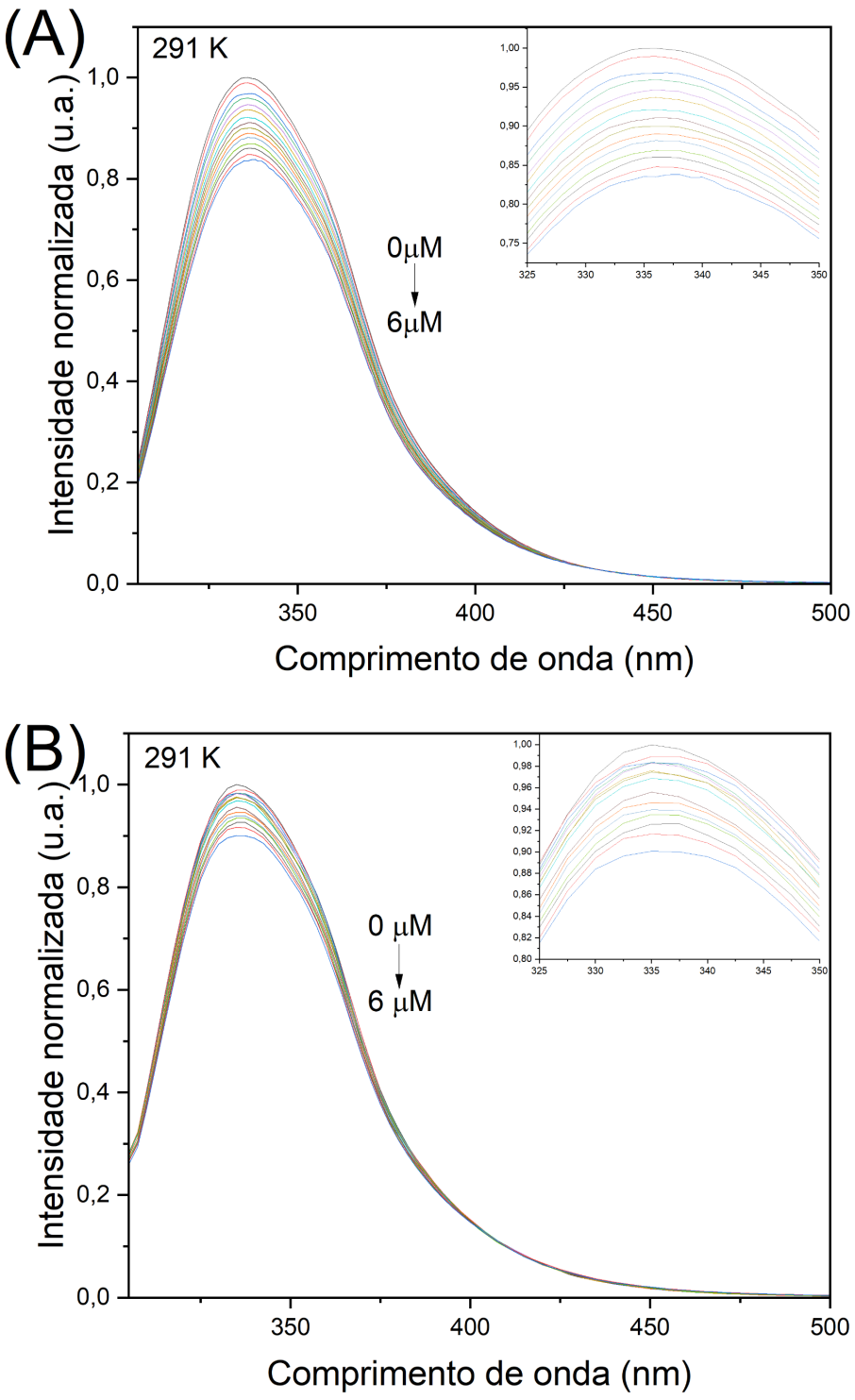


Figura 82 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 µM de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 299 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.

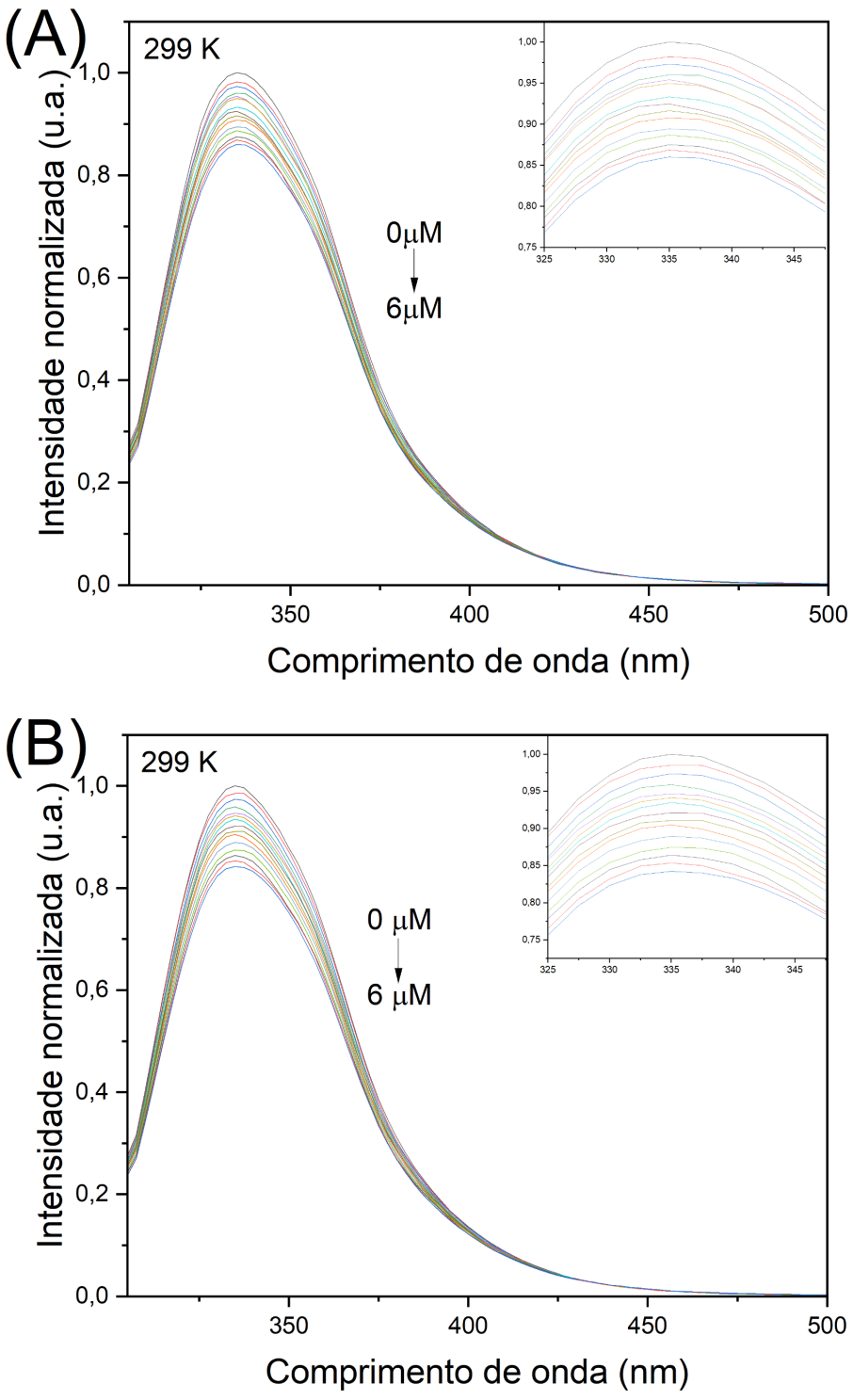


Figura 83 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 µM de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 291 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.

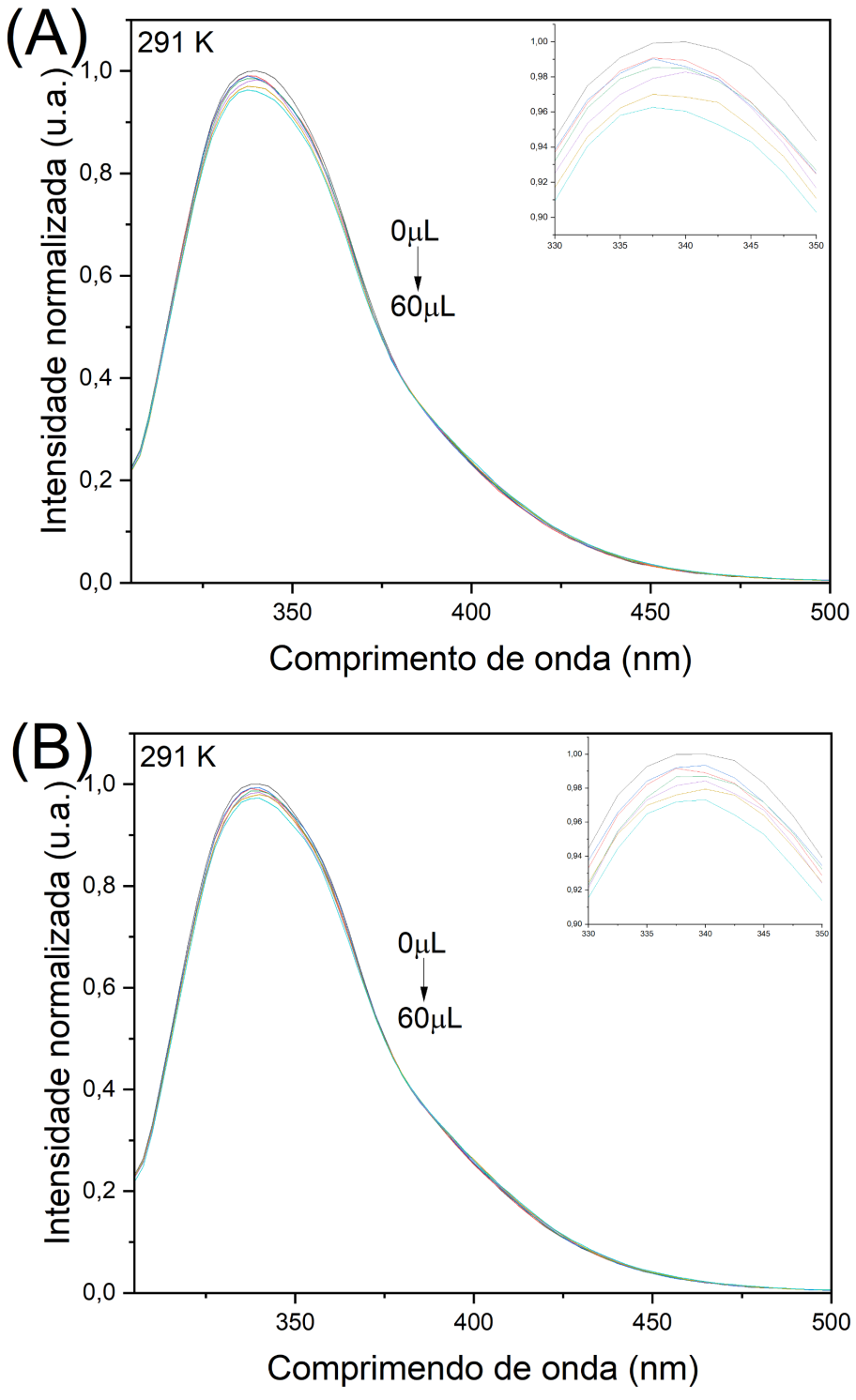


Figura 84 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 µM de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 299 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.

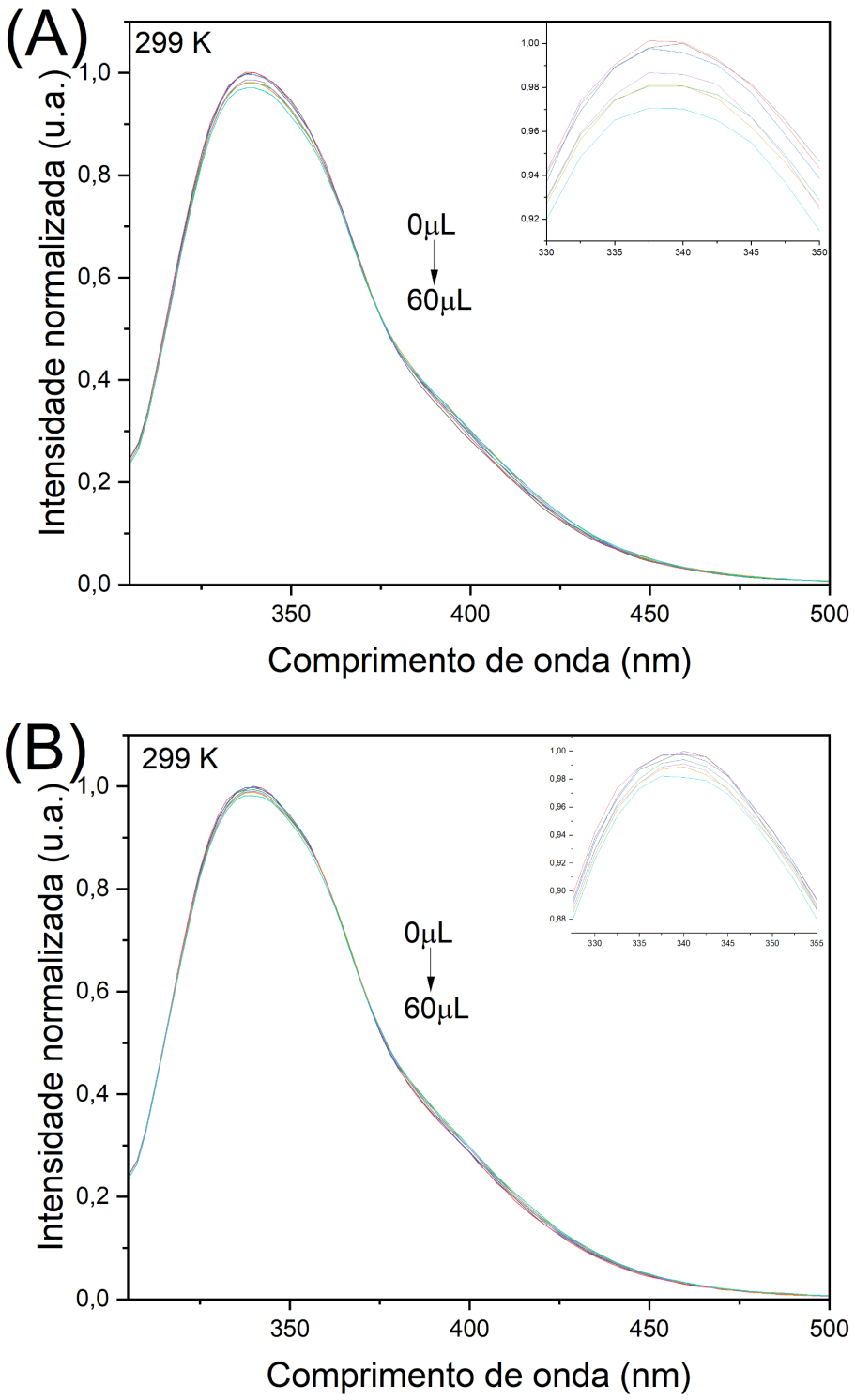


Figura 85 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 µM de proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 291 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.

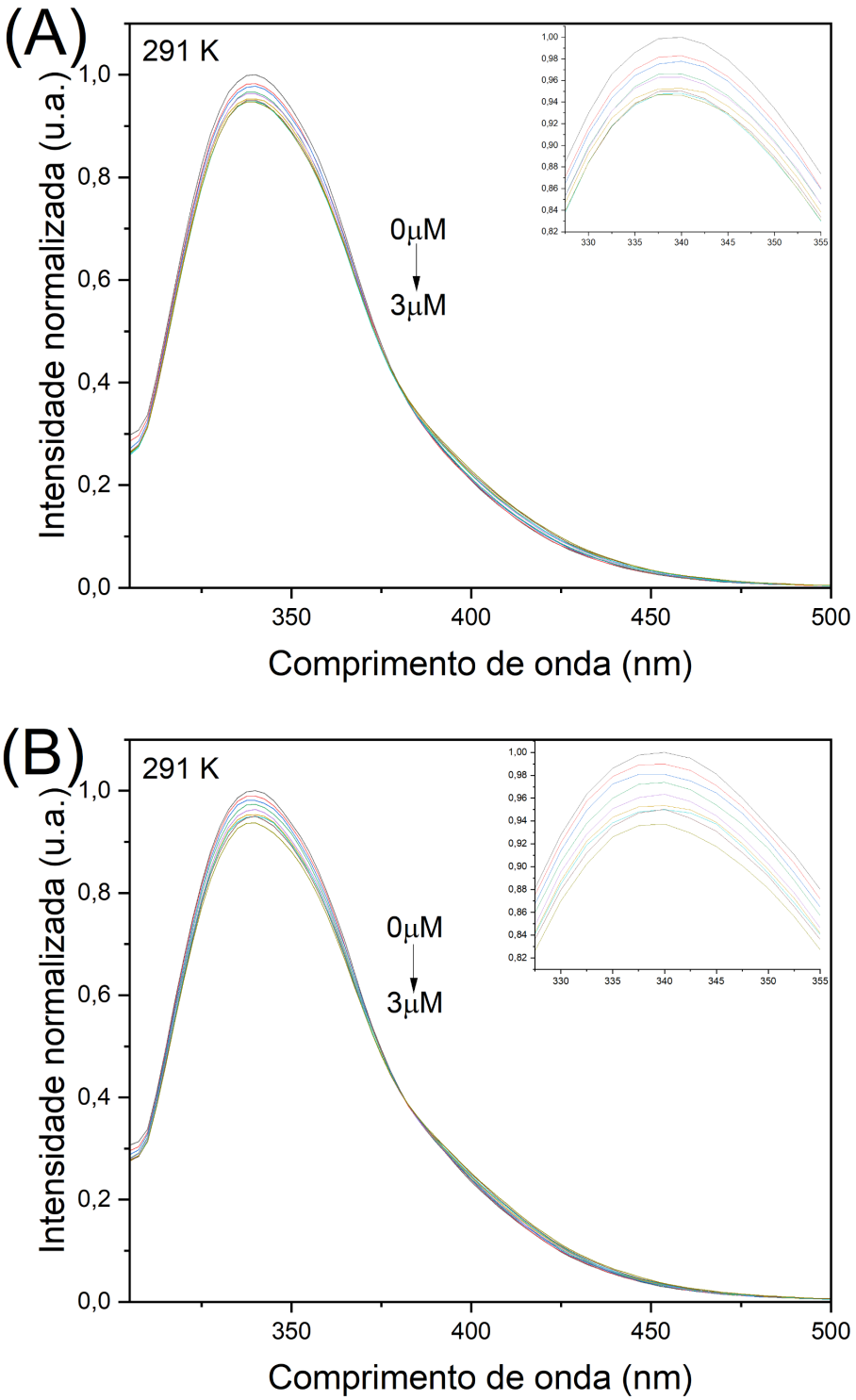


Figura 86 - Espectro de emissão de fluorescência de 2 µM de proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 299 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.

