



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA MOLECULAR

Giovana Casteluci Moreira

**Avaliação do pH como efeito modulador da interação entre a proteína Grb2
monomérica e a molécula de cumarina (1,2-benzopirona)**

São José do Rio Preto

2022

Giovana Casteluci Moreira

Avaliação do pH como efeito modulador da interação entre a proteína Grb2 monomérica e a molécula de cumarina (1,2-benzopirona)

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

São José do Rio Preto

2022

M838a

Moreira, Giovana Casteluci

Avaliação do pH como efeito modulador da interação entre a proteína Grb2 monomérica e a molécula de cumarina (1,2-benzopirona) / Giovana Casteluci Moreira. -- São José do Rio Preto, 2022

73 f. : il., tabs.

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

Orientador: Fernando Alves de Melo

1. Biofísica. 2. Proteínas. 3. Espectroscopia de fluorescência. 4. Ressonância magnética nuclear. 5. Dicroísmo circular. I. Título.

Giovana Casteluci Moreira

Avaliação do pH como efeito modulador da interação entre a proteína Grb2 monomérica e a molécula de cumarina (1,2-benzopirona)

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo
Universidade Estadual Paulista
Orientador

Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso
Universidade Estadual Paulista
Examinador Interno

Profa. Dra. Rosângela Itri
Universidade de São Paulo
Examinadora Externa

São José do Rio Preto
21 de novembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a mim mesma, por ter me dedicado a este trabalho de domingo a domingo, em meio à uma pandemia, mesmo quando tudo dava errado.

À Vanilce, minha psicóloga, obrigada por me confortar e não me deixar surtar por causa de uma proteína, por me ensinar a ser resiliente, por se interessar na minha pesquisa e por me ajudar a reconhecer cada conquista alcançada.

Agradeço principalmente minha mãe Elaine e minha avó Zeneide, por todo o amor, carinho, apoio e suporte que me deram, sem elas nada do que realizei neste período seria possível.

Ao Raphael, por ser um grande amigo desde o primeiro ano de graduação, por me incentivar a voltar para a pesquisa acadêmica, por ter me indicado o Fernando como orientador, por todas as nossas conversas aleatórias e relevantes para a pesquisa e, por fim, por todas as vezes que jogou como suporte na botlane comigo.

À Naza, que se tornou uma grande amiga e parceira de pesquisa, por ter me ensinado grande parte das rotinas do laboratório e por todas as nossas conversas, risadas, passeios, drinks chiques e combinados de usar rosa às quartas-feiras. Também agradeço por ceder os dados referentes à Grb2 dimérica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Alves de Melo, que enfrentou o desafio de orientar a primeira bióloga em seu laboratório e sempre esteve disposto a discutir e me orientar da melhor maneira possível.

Ao Departamento de Física do IBILCE/UNESP, ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular e aos professores e técnicos que contribuíram de maneira ímpar para a minha formação. Também agradeço aos colegas e parceiros do grupo de pesquisa que estiveram dispostos a me ajudar sempre que necessário.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Quando a vida decepciona, qual é a solução?
Continue a nadar! Continue a nadar! Continue a nadar,
nadar, nadar! Para achar a solução, nadar, nadar!”
Dory (Procurando Nemo, 2003).

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte na atualidade e se manifesta através da proliferação acelerada e descontrolada de células. Uma das principais vias de sinalização ativadas para o desenvolvimento da doença é a via da MAPK/ERK, responsável pelos processos de proliferação e diferenciação celular. O reconhecimento de fatores de crescimento por proteínas de membrana, como a FGFR2, recruta a proteína Grb2, que atua como uma ponte entre a proteína quinase e outras proteínas que ativam a proteína ERK, responsável por ativar fatores de transcrição no núcleo. Apesar de ser classificada como proteína adaptadora, a Grb2 regula a via da MAPK/ERK através de um equilíbrio monômero-dímero, em que o monômero permite a transdução de sinal e o dímero inibe esse processo. Além disso, a Grb2 é capaz de inibir a FGFR2 – que está relacionada com diversos tipos de cânceres, como o câncer de estômago, pele e mama. Desta maneira, a Grb2 é um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias antitumorais. Um dos principais desafios da medicina moderna é o desenvolvimento de medicamentos e estratégias que sejam cada vez menos adversas aos pacientes e, nesse contexto, as moléculas de origem natural têm ganhado destaque no meio científico, devido sua grande biodisponibilidade e inúmeras propriedades benéficas para o ser humano. Devido à pouca literatura disponível a respeito de mecanismos moleculares de interação entre Grb2 e moléculas de origem natural, neste trabalho nós realizamos a caracterização dos mecanismos de interação entre o monômero de Grb2 e a molécula de cumarina (1,2-benzopirona), que possui atividade anticarcinogênica e inibe a proliferação celular. Os estudos biofísicos foram conduzidos em duas condições de pH (7,0 e 8,0) por se aproximarem do pH intracelular de células saudáveis e cancerosas, respectivamente. Os resultados da caracterização estrutural indicam que o monômero é mais flexível e estável em pH 8,0 do que em pH 7,0. A interação entre a proteína e a molécula foi classificada como favorável e hidrofóbica ($\Delta G < 0$; ΔH e $\Delta S > 0$), com constantes de afinidade (K_a) moderadas e da ordem de 10^4 M^{-1} para o pH 7,0 e 10^5 M^{-1} para o pH 8,0. A combinação dos resultados de STD-RMN e análises computacionais mostraram que a molécula de cumarina interage com o sítio de interação por meio de encaixes distintos, comprovando que mudanças conformacionais induzidas pelo aumento de pH modulam o mecanismo de interação de Grb2 com cumarina. Além disso, foi verificado que a estabilidade estrutural do monômero se mostrou

dependente da concentração de cumarina, sendo fortemente perturbada na proporção de [2:1] de cumarina:Grb2. A partir desses resultados, concluímos que a conformação estrutural da Grb2 é sensível às mudanças de pH e isso pode influenciar na interação desta proteína com outras moléculas e proteínas parceiras. Estes resultados, se levados em consideração, podem contribuir para o desenvolvimento de medicamentos e tratamentos, contra o câncer, e baseados em Grb2, mais eficazes.

Palavras-chave: Grb2. Cumarina. Interação proteína-ligante. Modulação estrutural por pH.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death today and is manifested through accelerated and uncontrolled cell proliferation. One of the main signaling pathways involved in the development of the disease is the MAPK/ERK pathway, which is responsible for cell proliferation and differentiation processes. Recognition of growth factors by membrane proteins such as FGFR2 recruits the Grb2 protein, which acts as a bridge between the protein kinase and other proteins that activate ERK, responsible for activating transcription factors in the nucleus. Despite being classified as an adapter protein, Grb2 regulates the MAPK/ERK pathway through a monomer-dimer equilibrium, in which the monomer activates the signaling pathway and the dimer inhibits FGFR2 – which is related to several cancers, such as stomach, skin, and breast cancer. Thus, Grb2 is a promising target for the development of antitumor therapies due to its role in regulating cell signaling pathways related to cancer development. One of the main challenges of modern medicine is the development of drugs and strategies that are less and less adverse to patients. In this context, molecules of natural origin have gained prominence in the scientific community due to their excellent bioavailability and numerous beneficial properties for humans. Due to the limited literature available about the molecular mechanisms of interaction between Grb2 and molecules of natural origin, we carried out in this work the characterization of the mechanisms of interaction between the Grb2 monomer and the coumarin molecule (1,2-benzopyrone), which has anticarcinogenic activity and inhibits cell proliferation. The biophysical studies were conducted under two pH conditions (7.0 and 8.0) as they approximate the intracellular pH of healthy and cancer cells, respectively. Structural characterization results indicate that the Grb2 monomer is more flexible and stable at pH 8.0 when compared to pH 7.0. The interaction between the protein and the molecule was classified as favorable and hydrophobic ($\Delta G < 0$; ΔH and $\Delta S > 0$), with moderate binding constants (K_a) of the order of 10^4 M^{-1} for pH 7.0 and 10^5 M^{-1} for pH 8.0. The combination of STD-NMR results and computational analyses identified two fits of the coumarin molecule within the interaction site, proving conformational changes induced by increasing the pH modulate the interaction mechanism of Grb2 with coumarin. It was also found that the structural stability of the monomer was dependent on the concentration of coumarin, being strongly disturbed in the proportion of [2:1] coumarin:Grb2. From these results, we conclude that the structural

conformation of Grb2 is sensitive to changes in pH, which may influence the interaction of this protein with other molecules and partner proteins. If considered, these results may contribute to developing more effective Grb2-based drugs and treatments against cancer.

Keywords: *Grb2. Coumarin. Structural characterization. Protein-ligand interaction. pH-induced structural modulation.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais tipos de câncer e sua incidência em homens e mulheres no Brasil no ano de 2020.....	14
Figura 2 – Principais características adaptativas adquiridas por células cancerosas.....	15
Figura 3 – Representação das vias de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógenos.....	18
Figura 4 – Representação da via de sinalização da RAS/MEK/ERK.....	19
Figura 5 – Estrutura tridimensional da proteína Grb2.....	20
Figura 6 – Mecanismo de inibição de FGFR2 pelo dímero de Grb2.....	22
Figura 7 – Esquema de regulação de FGFR2 e SHP2 pelo equilíbrio monômero-dímero.....	23
Figura 8 – Estrutura dos aminoácidos fenilalanina e tirosina.....	25
Figura 9 – Possível interface de dimerização da Grb2 ^{Y160F} mediada por ligação ânion- π	26
Figura 10 – Estrutura da molécula de cumarina (1,2-benzopirona)	27
Figura 11 – Perfil da interação entre a cumarina e Grb2 dimérica em pH 8,0.....	28
Figura 12 – Identificação do sítio de interação complexo Cumarina-Grb2.....	29
Figura 13 – Resultados de purificação da Grb2 ^{Y160F}	39
Figura 14 – Gráfico de distribuição por volume referente ao tamanho do diâmetro hidrodinâmico proteína Grb2 ^{Y160F}	40
Figura 15 – Coeficiente de correlação da proteína Grb2 ^{Y160F} em pH 7,0 (vermelho) e pH 8,0 (verde) ao longo do tempo.....	41
Figura 16 – Espectro de dicroísmo circular obtido com 2 μ M de Grb2 ^{Y160F} em 20 mM NaPi; 50 mM NaF.....	42
Figura 17 – Espectro de emissão de fluorescência da proteína Grb2 ^{Y160F} em pH 7,0 a 299 K.....	44
Figura 18 – Espectro de emissão de fluorescência da proteína Grb2 ^{Y160F} em pH 8,0 a 299 K.....	45
Figura 19 – Gráfico de duplo-log com os dados relativos ao efeito da supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2 ^{Y160F} na presença de cumarina.....	48
Figura 20 – Gráfico de van't Hoff para as temperaturas 295, 299, e 303 K.....	

apresentando inclinações positivas nas duas condições de pH.....	49
Figura 21 – Perfil termodinâmico da interação entre Grb2 ^{Y160F} e cumarina.....	50
Figura 22 – Espectro de STD da interação entre Grb2 ^{Y160F} e cumarina em pH 7,0.....	52
Figura 23 – Espectro de STD da interação entre Grb2 ^{Y160F} e cumarina em pH 8,0.....	53
Figura 24 – Mapa de contatos entre a Grb2 ^{Y160F} e a molécula de cumarina.....	55
Figura 25 – Espectro de dicroísmo circular para a Grb2 ^{Y160F} na presença de diferentes concentrações de cumarina.....	56
Figura 26 – Gráfico de distribuição de tamanho referente a proteína Grb2 ^{Y160F} com a adição de cumarina.....	58
Figura 27 – Comparação entre os coeficientes de correlação da proteína Grb2 ^{Y160F} na ausência e presença de cumarina em pHs 7,0 e 8,0 ao longo do tempo.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos teóricos obtidos através da ferramenta <i>online</i> ProtParam.....	38
Tabela 2 – Conteúdo de estrutura secundária da proteína Grb2 ^{Y160F} calculado pelo servidor <i>online</i> BeStSel.....	43
Tabela 3 – Classificação de triptofanos de acordo com o microambiente em que estão inseridos e que podem provocar deslocamentos no espectro de emissão de fluorescência.....	46
Tabela 4 – Valores obtidos para a constante de Stern Volmer (K_{sv}).....	46
Tabela 5 – Constante de associação (K_a) e Coeficiente de Hill (n_H) e constante de calculados a partir do gráfico de duplo-log.....	47
Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos obtidos pela equação de van't Hoff referentes à interação do complexo Cumarina-Grb2 ^{Y160F} nas temperaturas de 295, 299 e 303 K.....	49
Tabela 7 – Comparação de valores de constante de afinidade (K_a) entre a Grb2 ^{Y160F} e o dímero.....	50
Tabela 8 – Comparação de valores de constante de afinidade (K_a) entre a Grb2 ^{Y160F} e o dímero em pH 8,0.....	50
Tabela 9 – Valores dos epítomos da molécula de cumarina nas duas condições de pH.....	51
Tabela 10 – Conteúdo de estrutura secundária da proteína Grb2 ^{Y160F} na presença diferentes concentrações de cumarina.....	57
Tabela 11 – Diâmetro hidrodinâmico da proteína Grb2 em estado dimérico em pH 7,0 e 8,0.....	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Objetivos	13
1.1.1	Objetivos Específicos.....	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	Sinalização celular e as vias de mapk	16
2.2	A proteína <i>growth factor receptor bound 2</i> (grb2)	20
2.2.1	Regulação da via MAPK/ERK pelo equilíbrio monômero-dímero	21
2.2.2	A mutação Y160F	24
2.3	A molécula de cumarina (1,2-benzopirona)	26
2.3.1	Interação entre o dímero de Grb2 e cumarina	28
3	METODOLOGIA.....	30
3.1	Transformação de plasmídeos recombinantes em células de <i>Escherichia coli</i> linhagem TOP10.....	30
3.2	Transformação de plasmídeos recombinantes em células de <i>E. coli</i> linhagem BL21(DE3)	31
3.3	Expressão da proteína Grb2^{Y160F}	31
3.4	Purificação da Grb2^{Y160F}	32
3.5	Espectroscopia de UV-visível para determinação de concentrações	32
3.6	Espalhamento dinâmico de luz (Dynamic light scattering – DLS).....	33
3.7	Espectroscopia de dicroísmo circular	33
3.8	Espectroscopia de fluorescência	34
3.9	Identificação do sítio de ligação por STD-RMN e análises computacionais (docking e dinâmica molecular)	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Purificação da proteína Grb2^{Y160F}	38
4.2	Caracterização estrutural da proteína Grb2^{Y160F}	40
4.2.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS	40
4.2.2	Análise de estruturas secundárias por Dicroísmo Circular	42
4.3	Caracterização da interação entre a proteína Grb2^{Y160F} e a molécula de cumarina (1,2-benzopirona)	44

4.3.1	Determinação do perfil termodinâmico de interação por Espectroscopia de Fluorescência	44
4.3.2	Identificação de epítomos por STD (<i>Saturation Transfer Difference</i>)	51
4.3.3	Análises computacionais – <i>Docking</i> e dinâmica molecular.....	54
4.3.4	Análise de estruturas secundárias na presença de cumarina.....	56
4.3.5	Determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS	58
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	63
	Anexo I – protocolo kit <i>QIAprep Spin Miniprep</i> (Qiagen).....	70

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte ao redor do mundo e, apenas no ano de 2020, provocou aproximadamente 10 milhões de mortes [1]. O termo “câncer” define um grupo de mais de 100 doenças malignas provocadas pelo crescimento acelerado e incontrolável de células, que adquirem diversos mecanismos que favorecem sua sobrevivência e multiplicação, como a desregulação do balanço bioenergético, que provoca uma inversão do gradiente de pH entre o meio intracelular a matriz extracelular, facilitando os processos de invasão e metástase [2-5].

A proteína *Growth factor receptor bound 2* (Grb2) é uma proteína adaptadora presente na via de sinalização da MAPK/ERK, responsável pelos processos de proliferação e diferenciação celular [6]. Sua principal função é realizar a conexão entre receptores de membrana que reconhecem fatores de crescimento e outras proteínas que fornecem energia para a ativação de uma série de reações químicas que induzem a síntese de fatores de transcrição no núcleo [6]. No entanto, diversos estudos descrevem a participação da Grb2 na regulação de outras proteínas através de um equilíbrio monômero-dímero e até mesmo dos processos de reparo de DNA e morte celular, que são burlados pelas células cancerosas [7-14].

Considerando a extensa participação da Grb2 nos processos vitais de uma célula, ela se torna um excelente alvo para o desenvolvimento de terapias anticarcinogênicas; e apenas uma pequena parcela da literatura aborda a caracterização de seus mecanismos moleculares com moléculas bioativas isoladas de fontes naturais, que atualmente garantem 80% da segurança sanitária de economias em desenvolvimento e geram uma receita bilionária para a indústria farmacêutica global [15,16]. Nesse contexto, nós escolhemos a molécula de cumarina (1,2-benzopirona) para o estudo de mecanismos de interação com a Grb2 por ser uma molécula de origem natural de baixa toxicidade e com propriedades anticarcinogênicas bem descritas na literatura, como a inibição da formação de tumores em camundongos e a inibição de potencial proliferativo e indução de apoptose em células humanas de câncer de cólon e pulmão [17-21].

Nesta pesquisa, nós utilizamos a proteína recombinante Grb2 mutante Y160F, que favorece o estado monomérico capaz de dar continuidade às vias de sinalização [8]. Através de uma combinação de técnicas experimentais (supressão de

fluorescência e STD-RMN) e computacionais (docking e dinâmica molecular), identificamos a constante de afinidade e o sítio de interação entre a proteína e a cumarina. A estrutura da Grb2^{Y160F} foi analisada na ausência e presença da molécula pelas técnicas de DLS e dicroísmo circular. Todos os experimentos foram realizados em pH 7,0 e 8,0 por se aproximarem do pH intracelular de células saudáveis e cancerosas, respectivamente [5]. Por fim, baseado nos dados obtidos, constatamos que a Grb2^{Y160F} apresenta uma estrutura mais estável em pH 8,0 e que sua estabilidade estrutural é influenciada pela concentração de cumarina. A interação foi classificada como moderada, hidrofóbica e o pH foi capaz de interferir na afinidade do complexo, favorecendo o pH 8,0.

1.1 Objetivos

O objetivo deste estudo foi caracterizar a estrutura da Grb2 monomérica em pH 7,0 e 8,0 e identificar os parâmetros termodinâmicos de sua interação com a molécula de cumarina.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Expressar a proteína recombinante Grb2^{Y160F};
- Purificar a Grb2^{Y160F} em pH 7,0 e 8,0;
- Avaliar a influência do aumento de pH na estrutura da proteína pelas técnicas de DLS e Dicroísmo Circular;
- Obter os parâmetros termodinâmicos da interação da proteína com a cumarina por supressão de fluorescência;
- Mapear a interação da cumarina com a proteína por STD-RMN;
- Avaliar a estrutura da proteína na presença de diferentes concentrações de cumarina através das técnicas de DLS e Dicroísmo Circular.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 19 milhões de novos casos de câncer foram relatados no ano de 2020 ao redor do mundo. Mesmo com os esforços para a prevenção e inovações em tratamentos, o câncer ainda é uma das principais causas de morte no mundo e provocou aproximadamente 10 milhões de mortes no mesmo ano [1]. No Brasil, foram estimados cerca de 323.540 casos da doença para 2020 entre os dez principais tipos de câncer que acometem brasileiros (figura 1) [2].

Figura 1 – Principais tipos de câncer e sua incidência em homens e mulheres no Brasil no ano de 2020. Os números foram arredondados para múltiplos de 10.

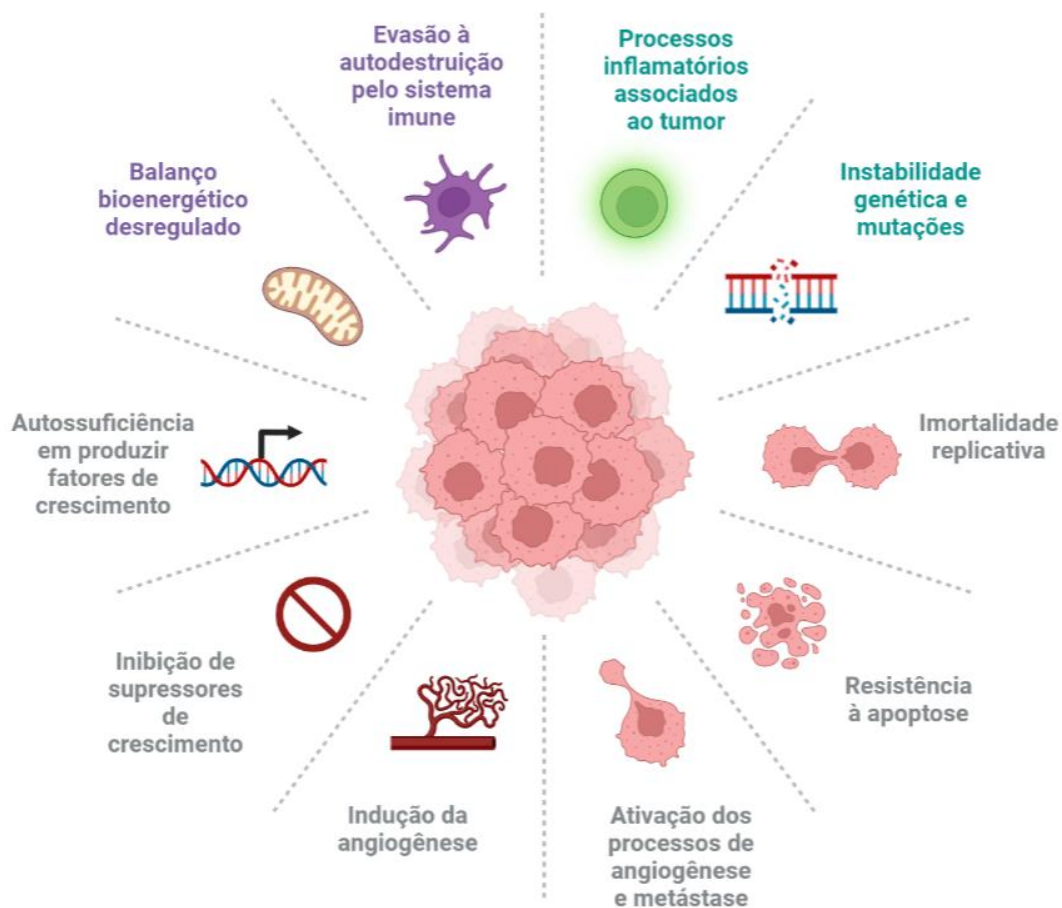
Localização primária		Casos	%
Próstata		65.840	29,2%
Cólon e Reto		20.540	9,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão		17.760	7,9%
Estômago		13.360	5,9%
Cavidade Oral		11.200	5,0%
Esôfago		8.690	3,9%
Bexiga		7.590	3,4%
Linfoma não Hodgkin		6.580	2,9%
Laringe		6.470	2,9%
Leucemias		5.920	2,6%
Localização primária		Casos	%
Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e Reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.710	7,5%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
	Glândula Tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

Fonte: Retirado de [2].

O termo “câncer” define um grupo de mais de 100 doenças malignas caracterizado por defeitos durante o processo de sinalização celular e que causam

um crescimento descontrolado e acelerado de células [3]. Para que isso ocorra, as células cancerosas adquirem uma variedade de características adaptativas (figura 2), com destaque para o aumento do potencial proliferativo [4]. Recentemente, a desregulação do balanço bioenergético foi elencada como uma característica importante, pois é provocada justamente pela rápida multiplicação das células – provocando, consequentemente, uma inversão do gradiente de pH entre os meios intra e extracelular, que é um fator essencial para os processos de invasão e metástase [5,22-24]. Em uma célula saudável, o pH intracelular (pH_i) se mantém em torno de 7,2 enquanto que o pH extracelular (pH_e) se mantém em torno de 7,4. Contudo, estudos mostram que células cancerosas apresentam um pH_i entre 7,4 e 7,6 e um pH_e entre 6,7 e 7,1 [25-28].

Figura 2 – Principais características adaptativas adquiridas por células cancerosas.



Fonte: Adaptado de [4].

O aumento do pH intracelular é consolidado como um estado permissivo para os processos de proliferação e diferenciação celular devido à aceleração de entrada na fase S do ciclo celular [24,29]. A fase S é caracterizada pela síntese de cópias do

DNA, pela duplicação do material genético e pela fabricação de centrômeros e seu adiantamento provoca a supressão de checkpoints de reparo de DNA, favorecendo a instabilidade genética de células cancerosas [30]. A alcalinização do pH ainda favorece a resistência à apoptose, que é liderada pela acidificação do meio intracelular [5,22,31].

Já a acidificação do pH extracelular é uma consequência das adaptações metabólicas necessárias para o crescimento desenfreado de células, que passam a necessitar de muito mais energia para a síntese de nucleotídeos [32]. As células passam a absorver mais glicose para obter energia (ATP) e mudam o regime de quebra da molécula, que passa da quebra oxidativa para a quebra por fermentação, que é mais rápida e forma o ácido láctico como produto final. Com o aumento da concentração de ácido láctico secretado pelas células, o bicarbonato (HCO_3^-) perde sua dinâmica tamponante e, conseqüentemente, o pH extracelular diminui, provocando a remodelação da matriz extracelular através da ativação de proteases, que facilitam os processos de invasão e metástase [32-35].

Considerando as condições fisiológicas de células saudáveis e cancerosas, é de suma importância que os estudos a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão e tratamento do câncer sejam realizados considerando as mudanças adaptativas adquiridas, principalmente em relação a inversão do gradiente de pH, uma vez que proteínas podem sofrer modificações que interfiram em sua estrutura, função ou afinidade de interação e, conseqüentemente, no processo de sinalização celular [5,22].

2.1 Sinalização celular e as vias de mapk

O processo de sinalização celular permite a comunicação auto regulatória de uma célula (autócrina), entre células próximas (parácrina), através da corrente sanguínea para atingir uma célula alvo distante (endócrina) ou envolvendo neurônios (sináptica), gerando alterações fisiológicas induzidas por fatores de crescimento, mudanças de temperatura e oxigênio, fome, resposta à patógenos e etc. [35,36]. A comunicação celular ocorre por meio de sinais químicos (peptídeos, hormônios, glicoproteínas e etc.), que interagem com proteínas receptoras presentes na membrana celular, no citosol e na membrana nuclear e ativam vias de sinalização,

que correspondem a uma série de reações em cadeia que regulam a expressão gênica das células [35].

As proteínas receptoras de membrana podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de transdução de sinal em três categorias: acopladas a canais iônicos, acopladas à proteína G ou associadas a enzimas [37]. No caso das vias de sinalização que promovem o desenvolvimento de câncer, destacam-se as proteínas receptoras associadas a enzimas, que geralmente pertencem ao grupo das quinases e apresentam estruturas transmembrana em α -hélice, com o sítio de interação com o ligante localizado na superfície da região extracelular e o sítio catalítico, na região intracelular [35]. O sítio catalítico fosforila resíduos de serina (S), treonina (T) ou tirosina (Y) de proteínas associadas às proteínas receptoras e, conseqüentemente, altera a função destas proteínas para dar continuidade à transmissão do sinal [35,37].

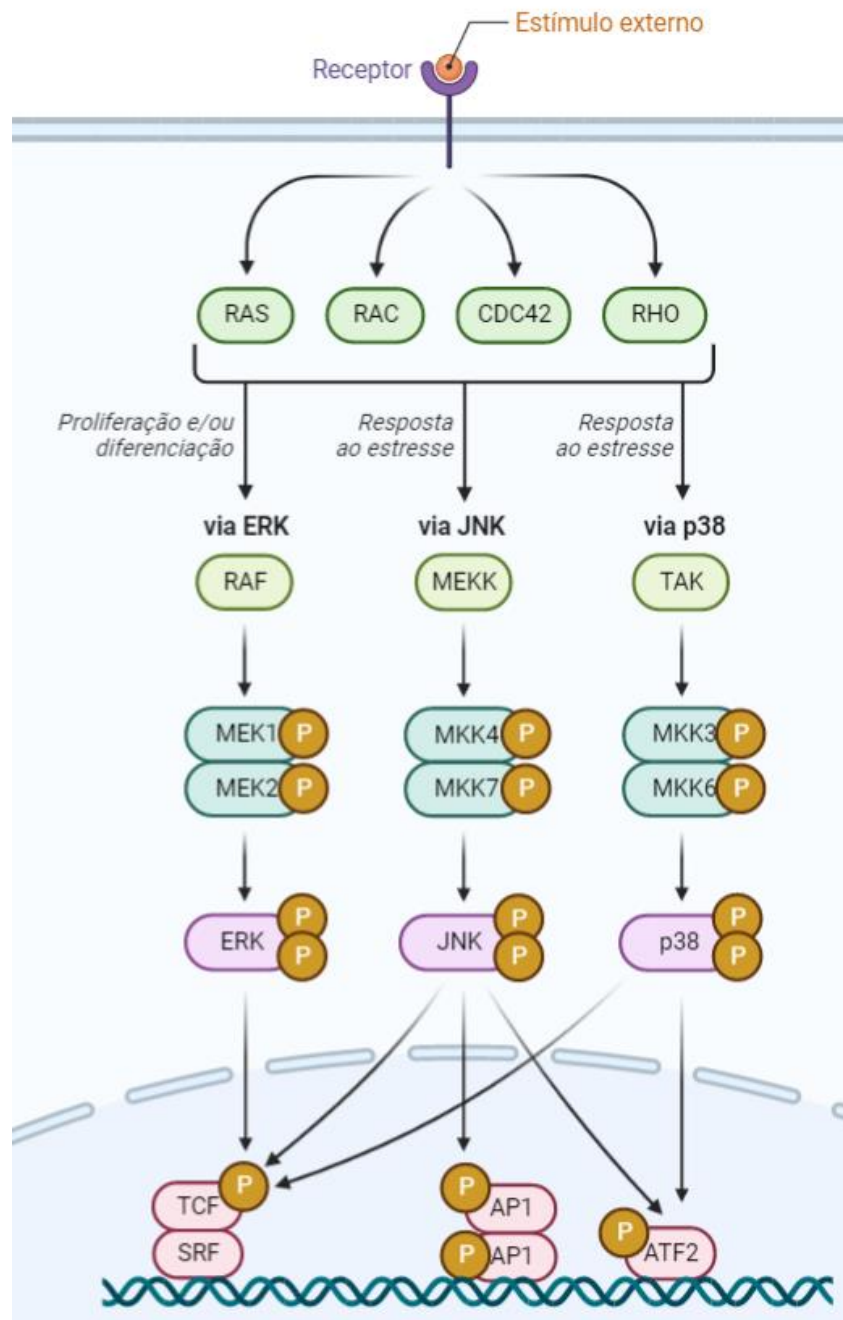
Os processos de proliferação e diferenciação celulares são regulados principalmente pela família das MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) – proteínas quinases ativadas por sinais extracelulares que induzem a mitose e divisão celular (figura 3) [35]. As três principais MAPK que podem ser ativadas são: ERK, JNK e p38 e a especificidade de ativação de cada quinase dá-se por meio do tipo de estímulo externo que interage com as proteínas receptoras de membrana. Os mais comuns são fatores de crescimento para a ERK e citocinas pró-inflamatórias para a JNK e para a p38 [35,38].

Um exemplo de proteína receptora envolvida na ativação da MAPK/ERK é a FGFR2 (*Fibroblast growth factor receptor 2*). Sua ativação ocorre quando um fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é reconhecido pelo proteoglicano de heparan sulfato da proteína, promovendo a estabilização da interação e a dimerização do receptor na membrana celular [39]. Esse processo é essencial para impedir a degradação do fator de crescimento por proteases e para a ativação do domínio quinase da FGFR2, resultando na autofosforilação de forma cruzada de seus resíduos de tirosina, que são essenciais para a formação de sítios de ligação que recrutam outras proteínas para dar continuidade à transmissão do sinal [7,39].

Uma das proteínas que se liga à FGFR2 fosforilada é a Grb2, que atua como uma ponte e recruta a SOS (*Son Of Sevenless homolog protein*) para perto da membrana plasmática, que realiza a catálise de GDP em GTP e ativa a RAS (*RAT Sarcoma virus protein*) (figura 4). A RAS é regulada por um mecanismo *on* e *off*, em

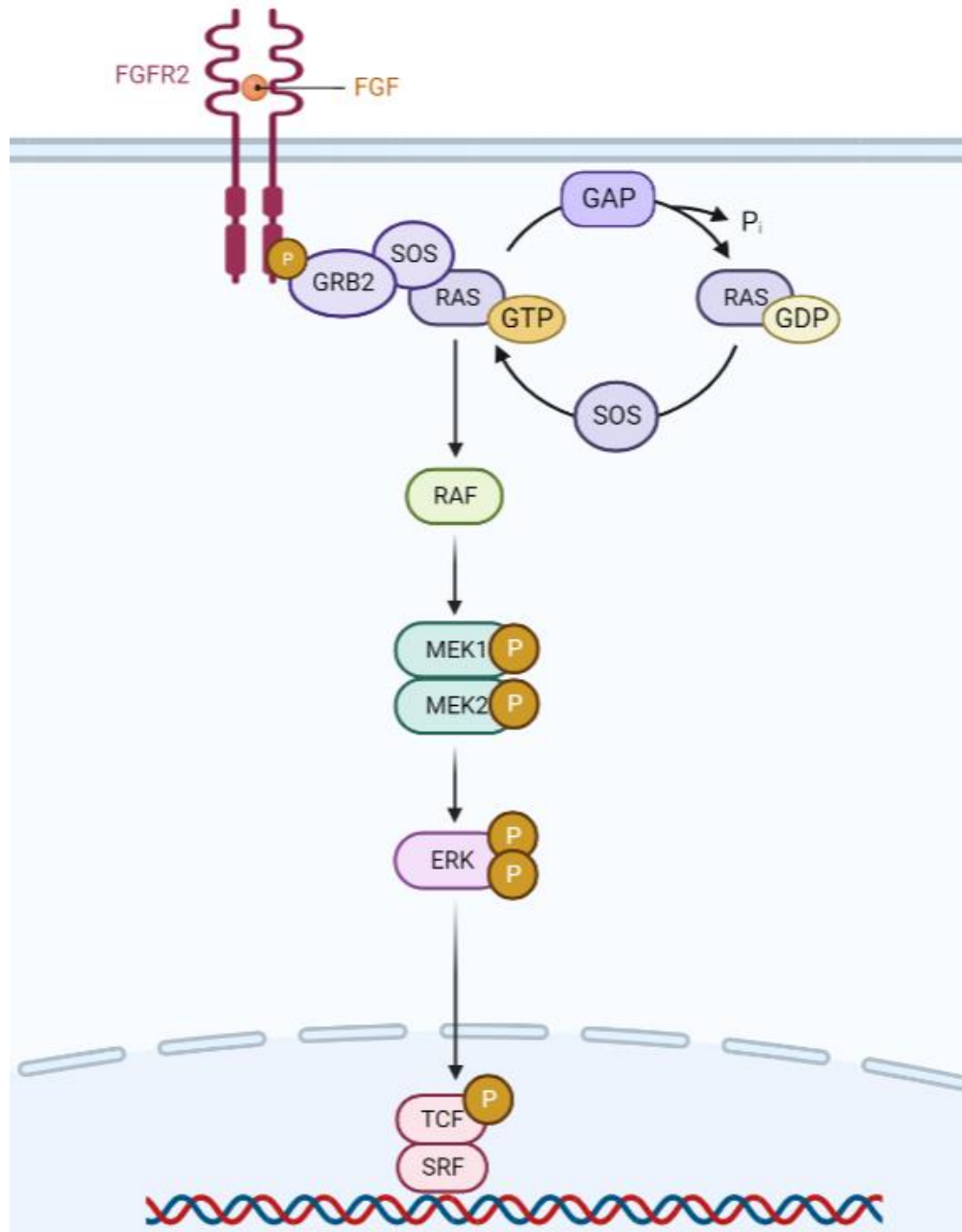
que é ativada pela SOS e inibida pela GAP (*Gtpase-Activating Protein*), que catalisa o GTP em GDP. Quando ativada, a RAS inicia uma sequência em cascata de fosforilações de RAF/MEK/ERK e a ERK se desloca para dentro do núcleo para ativar fatores de transcrição que regulam os genes relacionados à produção de fibroblastos [35-38].

Figura 3 – Representação das vias de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógenos.



Fonte: Elaborado pela autora através do *website* Biorender (2022).

Figura 4 – Representação da via de sinalização da RAS/MEK/ERK. Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) induzem a fosforilação da Grb2 pela FGFR2, promovendo a aproximação da SOS da membrana, proteína responsável por catalisar GDP em GTP e ativar a RAS. A RAS se liga à proteína RAF para ativar a cascata MAPK e induzir a síntese de fatores de transcrição no núcleo.



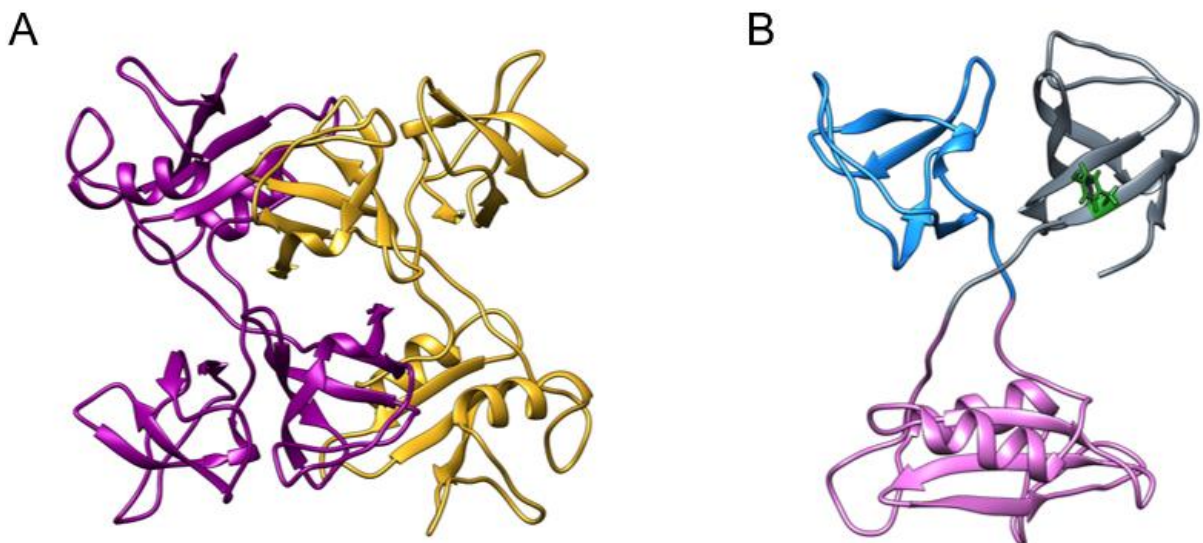
Fonte: Elaborado pela autora através do *website* Biorender (2022).

2.2 A proteína *growth factor receptor bound 2* (grb2)

Dentre várias proteínas que participam dessas vias de sinalização, a proteína *Growth factor receptor-bound 2* (Grb2) tem ganhado notoriedade devido às diversas funções que exerce em uma célula. A Grb2 é ubiquamente expressa em organismos eucariotos e pertence à classe de proteínas adaptadoras, ou seja, que não possuem atividade enzimática, mas atuam reconhecendo sequências específicas para promover interações entre proteínas [6]. Entretanto, apesar desta classificação simplória, a Grb2 atua na regulação da via da MAPK/ERK através de um equilíbrio monômero-dímero, inibindo a FGFR2 e regulando a atividade enzimática da fosfatase SHP2 (*SH2 domain containing tyrosine phosphatase 2*) [7-10]. Além disso, estudos recentes relatam a participação da Grb2 na separação de fase líquido-líquido e nos processos de reparo de DNA e morte celular programada [11-14].

Sua estrutura é composta por 217 aminoácidos, distribuídos em um domínio SH2 (*Src homology domain 2*) flanqueado por dois domínios SH3 (*Src homology domain 3*) N e C terminais, com massa molecular de 25 kDa (figura 5) [40].

Figura 5 – Estrutura tridimensional da proteína Grb2. (A) Em estado dimérico, com os protômeros representados pelas cores roxo e dourado. (B) Em estado monomérico, com o domínio SH3 N-terminal representado pela cor azul, o domínio SH2 pela cor rosa e o SH3 C-terminal pela cor cinza, com o resíduo Y160 destacado em verde. Somente a Grb2 monomérica consegue realizar o reconhecimento e interação com a SOS para dar continuidade às cascatas de sinalização.



Fonte: Cortesia de DIAS, R. V. R. – Adaptado de: *Protein Data Bank* (PDB). PDBid: 1GRI.

Seu domínio SH2 é composto por aproximadamente 100 aminoácidos, que estão organizados em 5 fitas- β antiparalelas localizadas entre 2 hélices α paralelas, que reconhecem resíduos de tirosina fosforilados (pY) em sequências com o motivo pY-x-N (sendo x um resíduo de aminoácido com cadeia lateral hidrofóbica e N, asparagina) de domínios quinase de proteínas receptoras ou resíduos pY de proteínas associadas a estes domínios [6,9]. Já os domínios SH3, são compostos por uma média entre 50 e 75 aminoácidos e estão organizados em 5 fitas- β antiparalelas e uma hélice 3_{10} , que reconhecem e formam complexos com sequências de 9 a 10 aminoácidos com o motivo P-x-x-P (sendo x qualquer outro aminoácido e P, prolina) de outras proteínas [6,37].

Quanto ao equilíbrio monômero-dímero, esse mecanismo ainda não foi completamente elucidado embora seja essencial para a homeostase celular [8]. Sabe-se que a dimerização da Grb2 cria uma interface de contato entre os resíduos E87 e Y160, localizados, respectivamente, nos domínios SH2 e SH3 C-terminal dos protômeros. Esses dois resíduos estabilizam o dímero através de uma ligação de hidrogênio entre si, porém, a fosforilação do Y160 (pY160) ou a interação de sequências com o motivo pY-x-N com domínio SH2 é suficiente para perturbar o microambiente da interface e causar a monomerização da proteína [6,8]. Além disso, o nível de expressão gênica influencia no estado em que a proteína se encontra no citosol, uma vez que o dímero é predominante no citoplasma de células que expressam altas concentrações de Grb2 e o monômero, em células que expressam baixas concentrações [10,11].

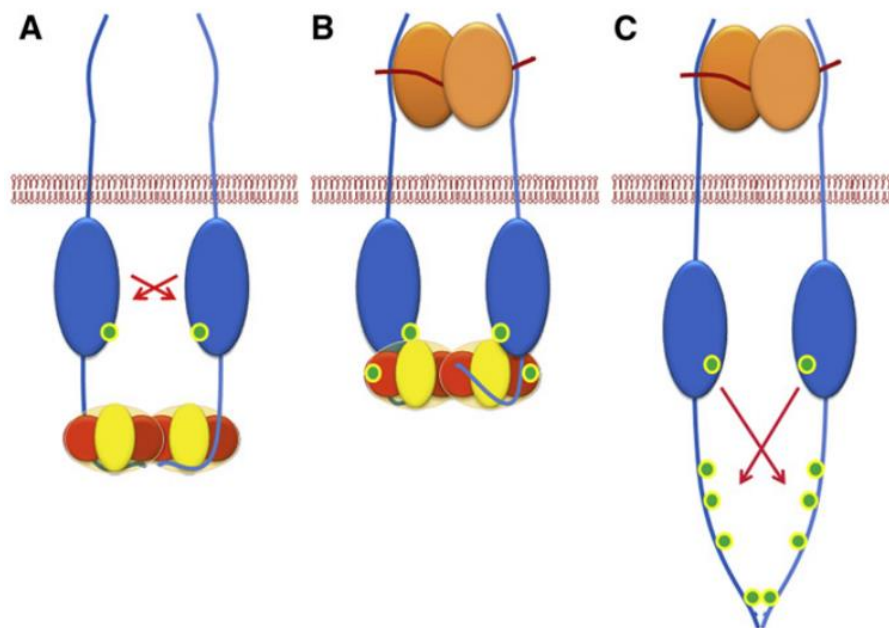
2.2.1 Regulação da via MAPK/ERK pelo equilíbrio monômero-dímero

Geralmente, proteínas receptoras de membrana são encontradas inativas, em estado monomérico ou pré-dimérico e a interação com moléculas estimuladoras lidera a estabilização das proteínas de membrana para que sejam ativadas [11,41,42]. Um exemplo bem descrito na literatura é o da proteína receptora FGFR2, que forma um pré-dímero e possui um nível de fosforilação basal não sinalizante na ausência de fatores de crescimento [7,9].

A cauda C-terminal do domínio quinase da FGFR2 apresenta uma região desordenada e com sequência rica em prolina que interage com o domínio cSH3 da Grb2, formando um heterotetrâmero entre um dímero de Grb2 e duas moléculas do

receptor de membrana (figura 6). Anos depois, experimentos de TROSY-HSQC revelaram uma grande participação do domínio nSH3, mas sua função nessa interação permanece desconhecida [7,39].

Figura 6 – Mecanismo de inibição de FGFR2 pelo dímero de Grb2. (A) Receptor de membrana em conformação pré-dimérica e com estado de fosforilação basal; (B) Reconhecimento de fator de crescimento de fibroblastos (oval em laranja) pelo receptor, promovendo a aproximação da cauda C-terminal do domínio quinase (oval em azul) que fosforila a Grb2; (C) Após a dissociação da Grb2 por repulsão eletrostática, a FGFR2 pode recrutar outras proteínas do citosol.



Fonte: Adaptado de [7].

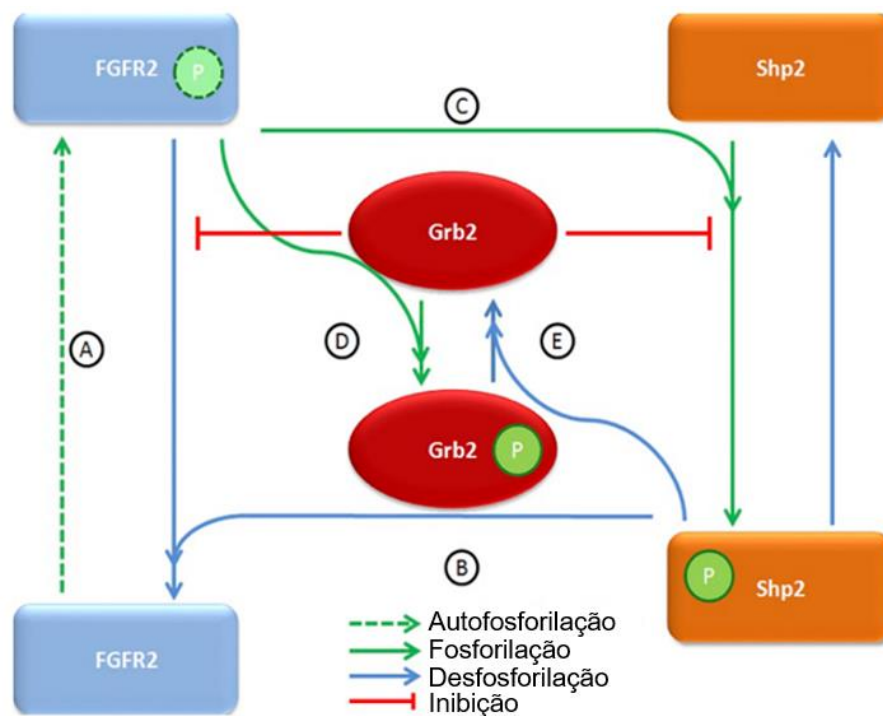
A formação do heterotetrâmero facilita a identificação de fatores de crescimento que, quando reconhecidos pelo proteoglicano de heparan sulfato, estabilizam o dímero de FGFR2 e provocam uma mudança conformacional que aproxima a cauda C-terminal e a Grb2 do domínio quinase ativo. Durante este processo, a Grb2 é fosforilada no resíduo Y209 e se dissocia do complexo por repulsão eletrostática com o resíduo Y812 da FGFR2, permitindo a fosforilação cruzada das caudas C-terminais e o recrutamento de outras proteínas [6].

Todavia, mesmo na ausência de fatores de crescimento, a fosforilação basal da FGFR2 é capaz de ativar seu domínio quinase, sendo este evento algo comum em receptores tirosina quinase [6,8,43]. Quando a Grb2 se dissocia cauda C-terminal da FGFR2, um novo mecanismo regulatório é acionado, agora para ativar a enzima

SHP2, que é responsável por desfosforilar a FGFR2 e a Grb2 para reestabelecer a homeostase celular [8].

Primeiramente, é importante sabermos que em estado dimérico, a Grb2 impede que a FGFR2 fosforile a SHP2, condição essencial para a atividade catalítica da fosfatase. Consequentemente, isso impede que a SHP2 desfosforile os resíduos Y653 e Y654 do loop de ativação do domínio quinase da FGFR2 [8]. Portanto, o dímero de Grb2 é fundamental para manter o nível de fosforilação basal da FGFR2, manter a estabilidade do heterotetrâmero e facilitar o reconhecimento de fatores de crescimento. Ainda, Ahmed e colaboradores verificaram que células deficientes na expressão de Grb2 impedem a ativação da via da MAPK, pois a FGFR2 estimulada fosforila a SHP2, que instantaneamente, desfosforila o receptor e impede a ativação da via de sinalização [9]. A figura 7 apresenta um esquema resumido de todas as interações.

Figura 7 – Esquema de regulação de FGFR2 e SHP2 pelo equilíbrio monômero-dímero. (A) FGFR2 em complexo com a Grb2 dimérica e apresentando nível de fosforilação basal do domínio quinase; (B) SHP2 ativada desfosforila totalmente a FGFR2 na ausência do heterotetrâmero; (C) FGFR2 em condições basais é capaz de fosforilar o resíduo Y542 da SHP2 para ativá-la; (D) FGFR2 fosforila o Y209 da Grb2, provocando a dissociação do heterotetrâmero; (E) SHP2 desfosforila o Y209 da Grb2 para reestabelecer a fosforilação basal da FGFR2.



Fonte: Adaptado de [9].

Em 2021 um novo mecanismo foi descrito para a SHP2, em que foi verificado que a Grb2 é capaz de induzir sua atividade enzimática independente de fosforilação [9]. Para que isso ocorra, é necessário um desequilíbrio que favoreça o estado monomérico da Grb2, seja por fosforilação do Y160 ou pela baixa concentração da proteína no citosol [7,9]. Os domínios SH2 e cSH3 da Grb2 interagem com os domínios nSH2 e PTP da SHP2, respectivamente, provocando uma mudança conformacional que rompe a interface molecular entre nSH2 e PTP que como um mecanismo auto inibitório de sua atividade enzimática em condições basais [9,10].

O entendimento desses mecanismos é importante pois diversos estudos relatam que mutações somáticas na FGFR2 estão relacionadas com o desenvolvimento de cânceres e que mutações em células germinativas provocam anormalidades esqueléticas [44-48]. O evento de *splicing* alternativo na região C-terminal do domínio quinase pode gerar várias isoformas de FGFR2 e em várias delas, ocorre a deleção de sequências de aminoácidos que resultam em sinais aberrantes em linhagens de células cancerosas de estômago, pele e na maioria das linhagens de câncer de mama [45-48]. Além disso, a SHP2 foi o primeiro proto-oncogene identificado e a desregulação de sua atividade enzimática está associada a diversos tipos de leucemia [49].

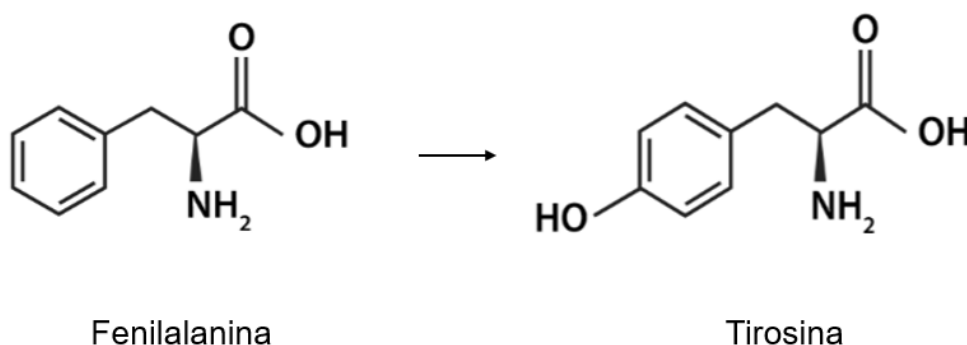
Considerando que os mecanismos apresentados envolvendo a Grb2, sua função na célula é muito mais complexa do que a de uma simples proteína adaptadora. O estabelecimento de um complexo Grb2-SOS também é essencial para prosseguir com a via de sinalização da MAPK/ERK e sua disrupção poderia prevenir não somente os sinais aberrantes derivados de falhas dos mecanismos que envolvem a FGFR2 e a SHP2, mas também impedir a ativação de RAS oncogênicas [50]. Portanto, a busca por moléculas que interajam com Grb2 se torna imprescindível para o desenvolvimento de medicamentos e terapias antitumorais mais eficientes e que causem menos danos colaterais ao organismo.

2.2.2 A mutação Y160F

O resíduo Y160 apresenta uma importância particular para a estrutura da Grb2, pois sua fosforilação provoca a monomerização da proteína e é associada à agressividade de tumores malignos, levando a progressão do câncer para estágios terminais em pacientes que apresentavam altos níveis de pY160 [6]. Alguns exemplos

de quinases oncogênicas fusionadas capazes de fosforilar o Y160 são: BCR-ABL, TPR-MET e TEL-JAK2 [43]. Considerando que o estado monomérico da Grb2 é o único que consegue dar sequência às vias de sinalização, o presente estudo foi realizado com a mutação Y160F (figura 8) com o intuito de mimetizar o estado monomérico para o estudo do mecanismo molecular de interação com a molécula anticarcinogênica de cumarina.

Figura 8 – Estrutura dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. A fenilalanina é um aminoácido essencial obtido através da alimentação e é precursora da tirosina, sendo o grupo hidroxila (-OH) adicionado à cadeia lateral pela enzima fenilalanina hidroxilase.

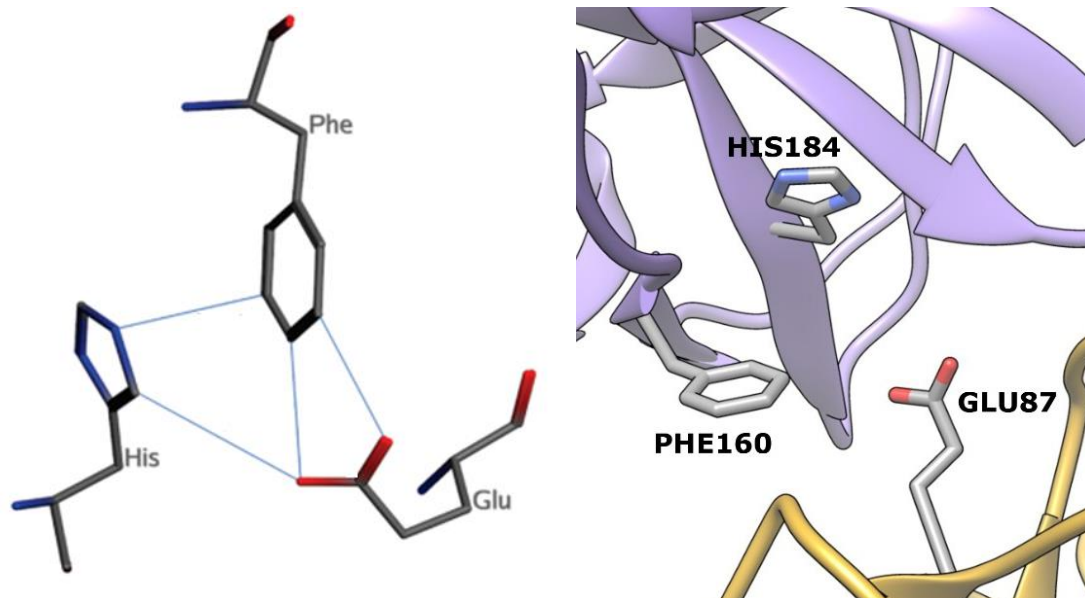


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O resíduo Y160 realiza uma ligação de hidrogênio com o E87 e sua substituição por F160 modifica a interação que forma a interface do dímero, que passa a formar uma ligação ânion- π , realizada principalmente entre ânions e carbonos de anéis aromáticos, em que há uma preferência de ligação entre resíduos de fenilalanina, glutamato, histidina, arginina e asparagina [6,8,51]. As ligações ânion- π são relativamente comuns e ocorrem em mais de 17 mil proteínas depositadas no *Protein Data Bank*. Esse tipo de ligação apresenta um caráter mais fraco do que ligações de hidrogênio e, portanto, favoreceria o estado monomérico da Grb2 em solução [51].

Estudos realizados em células verificaram que a substituição Y160F não interfere na ligação da Grb2 com a FGFR2 e a SHP2 e que o mutante também pode ser encontrado em estado dimérico [7,9]. Uma análise visual da interface de dimerização da Grb2 através do *software* UCSF Chimera revela três resíduos (F160, H184 e E87) que podem interagir para formar um dímero, corroborando com a descrição de Philip *et al.* (2011) (figura 9).

Figura 9 – Possível interface de dimerização da Grb2Y160F mediada por ligação ânion- π . (A) Posição de resíduos de fenilalanina, glutamato e histidina realizando ligação ânion- π , segundo a proposta de Philip *et al.* (2011); (B) Interface de dimerização da Grb2^{Y160F} visualizada pelo software UCSF Chimera.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Baseado em dados experimentais observados pelo nosso grupo, a Grb2^{Y160F} predomina em estado monomérico em solução quando purificada. Deste modo, a mutação permite a realização de um estudo mais próximo de sua estrutura e mecanismos moleculares regulados pelo estado monomérico na ausência de ligantes e fosforilação.

2.3 A molécula de cumarina (1,2-benzopirona)

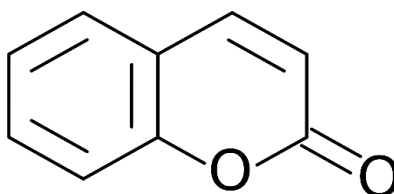
Atualmente, o uso de plantas medicinais garante a segurança sanitária de aproximadamente 80% da população de países em desenvolvimento [15]. Diversos medicamentos utilizados na medicina moderna têm como origem produtos naturais, que provêm de extratos de plantas ou que são análogos sintéticos de moléculas fitoterápicas, movimentando um comércio mundial que estima atingir o valor de 7 trilhões de dólares até o ano de 2050 [15,16].

A molécula de 1,2-benzopirona, popularmente conhecida como cumarina, é um produto do metabolismo secundário de plantas que desperta o interesse da comunidade científica por apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias,

antimutagênicas e anticarcinogênicas [52]. Sua caracterização foi realizada por Vogel em 1820 a partir de sementes de *Dipteryx odorata* selvagem, uma árvore conhecida como Cumaru e nativa do Brasil, Colômbia, Peru e Guiana [52,53].

Sua estrutura é composta por dois anéis fenólicos, um benzeno e um pirano (figura 10). A molécula tem um aroma característico semelhante ao de baunilha e tanto a cumarina como seus derivados são amplamente encontrados em frutos, sementes, raízes e folhas de angiospermas e dicotiledônias, como cenouras, morangos, framboesas, damascos, aipo e agrião [53,54].

Figura 10 – Estrutura da molécula de cumarina (1,2-benzopirona).



Fonte: Adaptado de [53].

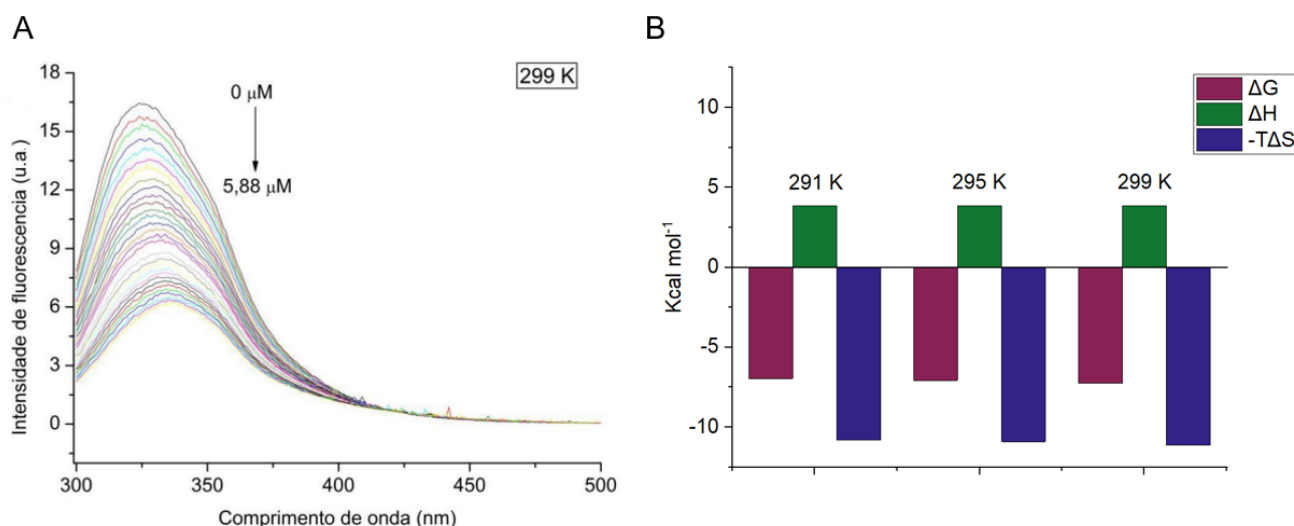
De forma geral, as cumarinas preenchem vários requisitos valorizados para a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos, como: estrutura simples, grande biodisponibilidade, baixa massa molecular, elevada solubilidade em solventes orgânicos e baixa toxicidade [16,54].

Sua ingestão dá origem ao metabólito plasmático 7-hidroxi-cumarina, que também apresenta atividade anticarcinogênica descrita na literatura e, assim como a cumarina, se mostrou eficaz ao combater efeitos colaterais em pacientes submetidos ao tratamento por radioterapia [55-57]. Além disso, o tratamento com cumarina se mostrou eficaz em linhagens de células humanas de câncer de mama e próstata e o estudo mais recente realizado com a molécula mostra resultados promissores de redução de viabilidade e atividade proliferativa, além de um aumento da expressão de genes relacionados com o processo de apoptose em células de câncer de cólon e pulmão [17-21].

2.3.1 Interação entre o dímero de Grb2 e cumarina

Considerando a falta de literatura a respeito de mecanismos moleculares de interação entre Grb2 e cumarina, Sanches e colaboradores realizaram um estudo para verificar a interação entre o dímero de Grb2 e a molécula em pH 8,0 [53]. O perfil de interação obtido através da técnica de espectroscopia de fluorescência apresentou um mecanismo de supressão dinâmico e estático, sendo a supressão dinâmica predominante devido ao aumento de temperatura do sistema (figura 11). A interação foi classificada como hidrofóbica e moderada, com uma constante de associação $K_a \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ e razão molecular de 1:1. Um estudo recente realizado pelo nosso grupo com o dímero em pH 7,0 em mesmas condições experimentais constatou o mesmo perfil de interação, mas com um mecanismo de supressão estático predominante e uma constante de associação $K_a \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ [dados não publicados – manuscrito em andamento].

Figura 11 – Perfil da interação entre a cumarina e Grb2 dimérica em pH 8,0. (A) Supressão da intensidade de fluorescência da Grb2 proporcional ao aumento de concentração de cumarina; (B) Perfil termodinâmico, revelando uma interação entropicamente dirigida guiada por efeitos hidrofóbicos.

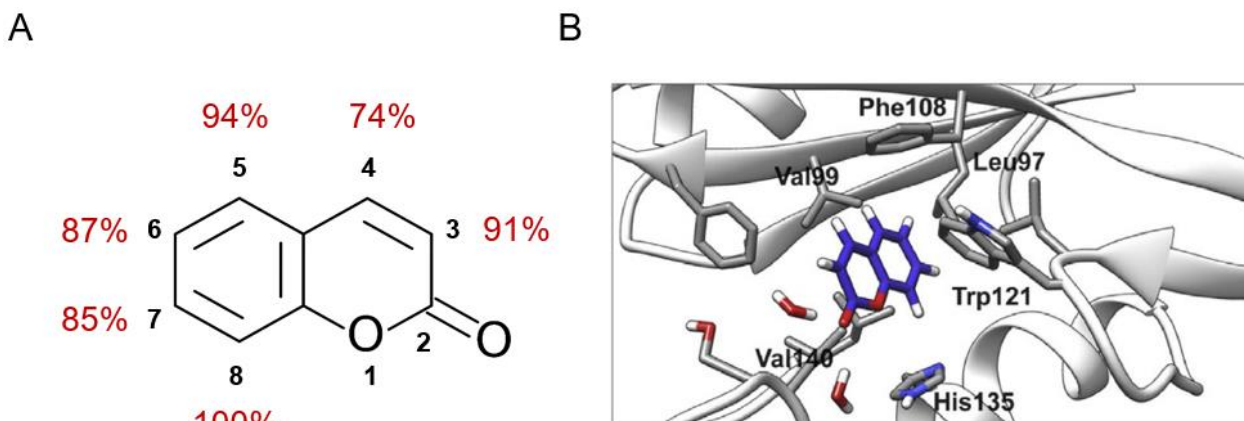


Fonte: Adaptado de [53].

Para a identificação do sítio de interação, o mapeamento da superfície de contato proteína-ligante (figura 12) foi realizado combinando as técnicas de STD (*Saturation Transfer Difference*) por ressonância magnética nuclear, *docking* e

dinâmica molecular. Os resultados obtidos permitiram identificar que a interação entre o dímero e a cumarina ocorre em um bolsão hidrofóbico do domínio SH2, próximo ao resíduo W121 [53].

Figura 12 – Identificação do sítio de interação complexo Cumarina-Grb2. (A) Epítomos da molécula de cumarina em interação com a Grb2 em pH 8,0; (B) Representação tridimensional do sítio de interação.



Fonte: Adaptado de [53].

Considerando a diferença dos valores obtidos para a afinidade de interação entre as duas condições de pH e que o mecanismo foi descrito para o dímero, nós realizamos a mesma caracterização de mecanismo molecular com o monômero de Grb2, visando identificar se a interface de dimerização da molécula interfere em possíveis sítios de ligação e observar o comportamento das constantes de afinidade nas duas condições de pH previamente realizadas pelo grupo, já que se aproximam do pH intracelular de células saudáveis e cancerosas.

3 METODOLOGIA

3.1 Transformação de plasmídeos recombinantes em células de *Escherichia coli* linhagem TOP10

O plasmídeo contendo a sequência que codifica o gene da Grb2^{Y160F} foi adquirido da empresa FastBio, em vetor pET28a+ com cauda de poli histidina, com base a sequência FASTA retirada do banco de dados *Protein Data Bank* (PDBid: 1GRI) (disponível em: <https://www.rcsb.org/>).

Para aumentar a quantidade de plasmídeos recombinantes, incubou-se 1 µL de plasmídeo em células de *Escherichia coli* linhagem TOP10 quimicamente competentes por 30 minutos em gelo. O choque térmico foi realizado a 42 °C por 30 segundos e, em seguida, gelo por 2 minutos. Então, foram adicionados 300 µL de meio LB (L3022 - Sigma Aldrich) às células que permaneceram incubados a 37 °C e sob agitação de 100 RPM por 1 hora. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 8.176 xg por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 20 µL de meio LB e semeadas pela técnica de esgotamento em uma placa de Petri preparada com 25 mL de meio LB sólido contendo 50 µg/mL de Canamicina. Posteriormente o conjunto foi incubado a 37 °C por 16 horas.

Após o período de incubação, colônias uniformes e isoladas foram selecionadas e cultivadas em 10 mL de meio LB líquido com Canamicina (50 µg/mL), a 37 °C por 16 horas e agitação de 100 RPM. Em seguida, os plasmídeos foram purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (anexo I).

3.2 Transformação de plasmídeos recombinantes em células de *E. coli* linhagem BL21(DE3)

O plasmídeo recombinante foi inserido pelo método de transformação do item 3.1 em células quimicamente competentes de *E. coli* linhagem BL21 (DE3). As colônias selecionadas foram transferidas para 10 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de Canamicina e incubadas a 37 °C por 16 horas, sob agitação de 100 RPM. Alíquotas contendo 1 mL de cultura e 1 mL de glicerol 50% (protetor criogênico) foram armazenadas em freezer -80 °C.

3.3 Expressão da proteína Grb2^{Y160F}

A alíquota do estoque de células contendo os plasmídeos codificantes para a Grb2^{Y160F} e armazenada em freezer -80 °C foi rejuvenescida em 100 mL de meio LB com 50 µg/mL de Canamicina e incubada por 16 horas a 37 °C sob agitação de 100 RPM.

Em seguida, a cultura rejuvenescida foi adicionada em 900 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de Canamicina e incubada a 37° C, com agitação de 100 RPM até atingir uma DO_{600 nm} de 0,6. A expressão da proteína foi induzida com a adição de 0,2 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), com a cultura incubada por 16 horas a 20 °C sob agitação de 100 RPM.

Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada a 3.583 xg por 30 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão Tris-NaCl (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM β-Mercaptoetanol) e lisadas através de sonicação pulsada. Após o processo de rompimento da parede e membrana celulares, a solução foi centrifugada a 34.957 xg por 90 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado em seringa com um filtro membrana de 0,45 µm KASVI®.

Alíquotas de 40 µL foram coletadas antes e depois da indução com IPTG para verificar a expressão das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.4 Purificação da Grb2^{Y160F}

A etapa de purificação por afinidade foi realizada em uma coluna de polipropileno com a resina IMAC Sepharose™ carregada previamente com cobalto. A coluna foi lavada com 80 mL de água destilada e equilibrada com solução tampão 50 mM de Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 5 mM Imidazol; 1 mM β-Mercaptoetanol. Em seguida, os lisados de células filtrados foram aplicados à coluna e eluídos gradativamente com soluções de 40 mL de tampão contendo Imidazol nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 100, 200, 500 mM e 1 M.

Posteriormente, as alíquotas foram concentradas para 2 mL e a nova amostra foi injetada em uma coluna de exclusão molecular XK16 com resina Superdex 75, previamente equilibrada com solução tampão 20 mM NaPi pH 7,0 ou 8,0; 50 mM NaCl; 1 mM de β-Mercaptoetanol, no equipamento ÄKTA Purifier – *GE Healthcare Life Sciences* a fim de retirar contaminantes e trocar o tampão da amostra.

Alíquotas de 40 µL de cada etapa de purificação foram coletadas para verificar o grau de pureza das proteínas por SDS-PAGE.

3.5 Espectroscopia de UV-visível para determinação de concentrações

As concentrações de Grb2^{Y160F} e cumarina foram calculadas segundo a equação de Beer-Lambert (equação 1), utilizando como coeficiente de extinção molar em 280 nm o valor de 36.565 cm⁻¹M⁻¹ para a Grb2^{Y160F} e o coeficiente de extinção molar em 277 nm de 11.438 cm⁻¹M⁻¹ para a cumarina [53].

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \text{ Equação 1}$$

Em que A é a absorbância em unidades arbitrárias, ε é o coeficiente de extinção molar (cm⁻¹ M⁻¹), C é a concentração molar (mol L⁻¹) e l é o caminho óptico da cubeta em centímetros [58].

Os espectros de absorção UV-Vis foram coletados entre 200 e 350 nm, em um espectrofotômetro Varian Cary 3E – Palo Alto, CA com auxílio de uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A subtração da linha de base foi realizada utilizando como controle o tampão de purificação para a proteína e etanol para a

cumarina. As soluções de cumarina foram preparadas em etanol absoluto com concentrações ajustadas para cada experimento, respeitando um limite máximo de 5% de etanol presente na solução com proteína, valor inferior ao mínimo necessário (10%) para desnaturar a estrutura terciária [59].

3.6 Espalhamento dinâmico de luz (Dynamic light scattering – DLS)

A técnica de DLS foi utilizada primeiramente para medir o diâmetro hidrodinâmico da proteína em pH 7,0 e pH 8,0 e confirmar a ausência de dímeros. Posteriormente, o objetivo foi avaliar se a molécula de cumarina é capaz de interferir no diâmetro da proteína. Para isso, as amostras foram analisadas em equipamento ZETASIZER NANO Series – Malvern Panalytical em uma cubeta com 1 cm de caminho óptico a 20 °C.

Cada amostra foi analisada em 10 corridas, com 100 acumulações cada. A viscosidade utilizada para os cálculos foi de 1,002 mPas., referente à viscosidade da água destilada utilizada no preparo das soluções tampão. Inicialmente, mediu-se o diâmetro hidrodinâmico da Grb2^{Y160F} concentrada em 1 mL. Para as corridas na presença de cumarina, a mesma foi acrescentada na proporção de concentração [1:1] de ligante:proteína.

3.7 Espectroscopia de dicroísmo circular

Os experimentos foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-710 para avaliar a estrutura secundária da proteína Grb2^{Y160F} em pH 7,0 e 8,0 na ausência e presença de cumarina. As concentrações foram calculadas para que as proporções Cumarina: Grb2^{Y160F} fossem 0:1, 1:1 e 2:1.

Utilizando uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico, os espectros de CD foram coletados na faixa de comprimento de onda de 195 a 250 nm, com velocidade de varredura de 50 nm/min, resposta de 1 segundo e 10 acumulações. As medidas foram realizadas em ambiente climatizado a 20 °C, utilizando 2 µM de Grb2^{Y160F} em solução tampão de 20 mM NaPi pH; 50 mM NaF e com pH ajustado de acordo com a amostra purificada.

As soluções de controle para a subtração de espectros foram preparadas substituindo o volume referente às concentrações da proteína por 20 mM NaPi; 50 mM NaCl. Para os ensaios com cumarina, foi adicionada a proporção de 2 μ M de uma solução estoque de 202 μ M de cumarina diluída em etanol absoluto.

Posteriormente, os resultados foram normalizados para elipticidade molar residual, conforme a equação 2 [60].

$$[\theta]_{EMR} = \frac{\theta_{(\lambda)}}{10 \cdot C \cdot l \cdot nR} \text{ Equação 2}$$

Em que $\theta_{(\lambda)}$ é o sinal de CD em elipticidade, C é a concentração da proteína em mol L⁻¹, l é o caminho óptico da cubeta em cm e nR é o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

Os resultados foram normalizados através da divisão pelo valor máximo obtido na leitura do espectro e a deconvolução para estimativa das porcentagens foi realizada através do servidor *online* BeStSel, que até o presente momento, apresenta a melhor precisão para estimar as porcentagens de proteínas que apresentam estrutura majoritariamente composta por folhas β [61].

3.8 Espectroscopia de fluorescência

Os experimentos de supressão de fluorescência intrínseca do triptofano foram realizados para verificar se há interação entre a Grb2^{Y160F} e a cumarina. Para tal, foi utilizado um espectrofluorímetro ISS PC1 – *Champaign II, USA* acoplado a um banho térmico Nestlab RTE-221 – *Thermo Electron Corporation, USA* para determinar a constante de associação e os parâmetros termodinâmicos da interação. Utilizou-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e 2 μ M de Grb2^{Y160F} em solução tampão 20 mM NaPi; 50 mM NaCl; 1 mM β -Mercaptoetanol. Foram realizadas titulações de 2 μ L de cumarina até que a solução atingisse a razão 1:1 de concentração entre proteína e ligante, com a concentração de cumarina variando de 0 a 2,20 μ M.

O comprimento de onda utilizado para excitação dos triptofanos foi de 290 nm e a faixa de comprimento de onda para coleta dos espectros de emissão, de 300 a 500 nm. As medidas foram feitas nas temperaturas de 295, 299, e 303 K.

A constante de associação (K_a) entre a Grb2^{Y160F} e a cumarina foi calculada conforme a equação 3, 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 proteína e ligante [53,62].

$$K_a = \frac{[PL]}{[P_F][L_F]} \text{ Equação 3}$$

Após o cálculo da constante de associação para as três temperaturas, os valores de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) foram obtidos a partir da inclinação e da ordenada da relação de van't Hoff, que relaciona a constante de equilíbrio com a temperatura (equação 4) [62].

$$-\ln(K_a) = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} \text{ Equação 4}$$

Em que K_a é a constante de ligação, R é a constante universal dos gases (1,98 cal.K⁻¹mol⁻¹), T é a temperatura (Kelvin) e ΔH e ΔS são as contribuições entálpica e entrópica, respectivamente [53,62].

Já a energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada para determinar se a reação é espontânea (equação 5) [62].

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \text{ Equação 5}$$

A constante de Stern Volmer foi calculada conforme a equação 6 para identificar o mecanismo de interação (estático ou dinâmico) [62].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \text{ Equação 6}$$

Em que $\frac{F_0}{F}$ é a intensidade de fluorescência de estado estacionário na presença e ausência do agente supressor $[Q]$, respectivamente; K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, K_q é a constante de supressão molecular e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor [63,64].

Já a fração θ dos sítios de ligação que são ocupados pelo ligante pode ser descrita pela equação 7 [62,76]:

$$\theta = \frac{\text{sítios de ligação ocupados}}{\text{total de sítios de ligação}} = \frac{[PL]}{[PL]+[P]} = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad \text{Equação 7}$$

Em que $K_d = \frac{1}{K_a}$ é a constante de dissociação, que é recíproco da constante de associação. Assumindo que uma proteína tem n sítios de ligação e que seu equilíbrio é descrito por $P + nL \leftrightarrow PL_n$, a fração θ pode ser rearranjada para a equação de Hill, também conhecida por duplo-log, descrita abaixo pela equação 8 [61].

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \rightarrow \log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log [L] - \log K_d \quad \text{Equação 8}$$

A partir da equação de duplo-log, obtemos a um gráfico de $\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)$ em função de $\log [L]$ que fornece como o coeficiente angular, sendo K_d determinado pelo coeficiente linear.

3.9 Identificação do sítio de ligação por STD-RMN e análises computacionais (docking e dinâmica molecular)

Os experimentos de STD (*Saturation Transfer Difference*) foram coletados em um espectrômetro Bruker Avance III 600.13 MHz equipado com uma criossonda de ressonância tripla 5 mm, com o gradiente de campo pulsado ao longo do eixo Z.

Os espectros foram coletados utilizando amostras de 600 μL contendo 15 μM de Grb2 em solução tampão de 20 mM NaPi; 50 mM NaCl ajustado de acordo com a amostra purificada + 10% água deuterada para determinar a melhor condição de saturação. As melhores condições de saturação foram verificadas 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. Após a titulação de cumarina (2 mM diluída em etanol deuterado), o filtro *spin-lock* foi ajustado para 30 ms para supressão do sinal da proteína no espectro.

Posteriormente, os espectros foram tratados através do *software* Bruker TopSpin versão 4.1.4 e o mapeamento dos epítomos foi calculado pela razão entre as intensidades do espectro STD e do espectro de referência (equação 12) [64].

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} = \frac{I_{STD}}{I_0} \quad \text{Equação 12}$$

Em que I_0 é a intensidade do espectro 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 (*off-resonance – on-resonance*). Os valores foram normalizados através da multiplicação do maior valor por 100% e os demais multiplicados de forma relativa ao primeiro.

Os estudos computacionais foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa em Física Biológica Computacional, sob responsabilidade do Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. As análises foram realizadas pelo aluno de doutorado Raphael Vinícius Rodrigues Dias, utilizando como base a sequência FASTA retirada do banco de dados *Protein Data Bank* (PDBid: 1GRI) para a proteína e o CID 323 do banco de dados de moléculas PubChem para a estrutura da cumarina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cálculo dos principais parâmetros físicos e químicos da proteína foram obtidos através da ferramenta *online* ProtParam (disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>), utilizando a sequência de resíduos de aminoácidos da construção do plasmídeo (tabela 1). A partir destes dados, as melhores estratégias foram delineadas para o preparo de soluções, processos de purificação e medição da concentração total de proteína.

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos teóricos obtidos através da ferramenta *online* ProtParam.

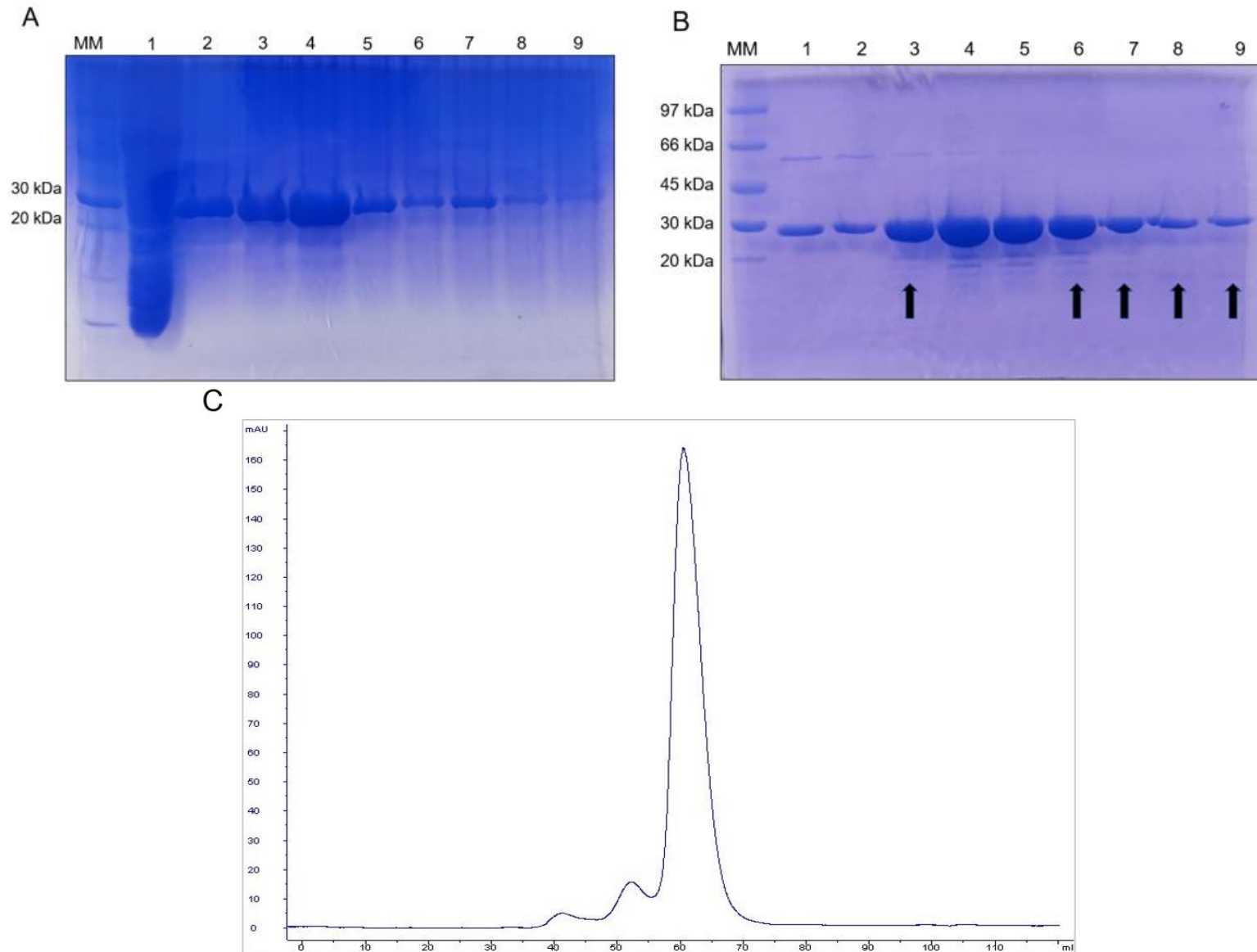
Parâmetros físico-químicos	Grb2^{Y160F}
Nº de resíduos de aminoácidos	217
Massa molecular (kDa)	25,2
Ponto isoeletrico	5,89
Coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1} cm^{-1}$)	36.565

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.1 Purificação da proteína Grb2^{Y160F}

A melhor condição para obtenção da proteína foi expressá-la por 16 horas após a indução com 0,2 mM de IPTG a 20°C e 100 RPM. Os resultados dos processos de purificação podem ser visualizados através dos géis de poliacrilamida e do cromatograma (figura 13).

Figura 13 – Resultados de purificação da Grb2^{Y160F}. (A) SDS-PAGE 15% corado com azul de *comassie* referente à purificação por afinidade em coluna carregada com cobalto. MM) Marcador molecular; 1) *Flow*; Eluições de 2) 20 mM; 3) 40 mM; 4) 60 mM; 5) 80 mM; 6) 100 mM 7) 200 mM; 8) 500 mM; 9) 1M de Imidazol em solução tampão 50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; (B) SDS-PAGE 12% referente à purificação por gel filtração com eluição em solução tampão 20 mM NaPi pH 7,0 ou 8,0; 50 mM NaCl. As setas indicam as frações coletadas; (C) Cromatograma referentes à purificação por gel filtração em ÄKTA Purifier em coluna XK16 com resina Superdex 75. O eixo da ordenada representa a absorbância (mAU – mili-absorbância) e a abcissa o volume (mililitros – mL).

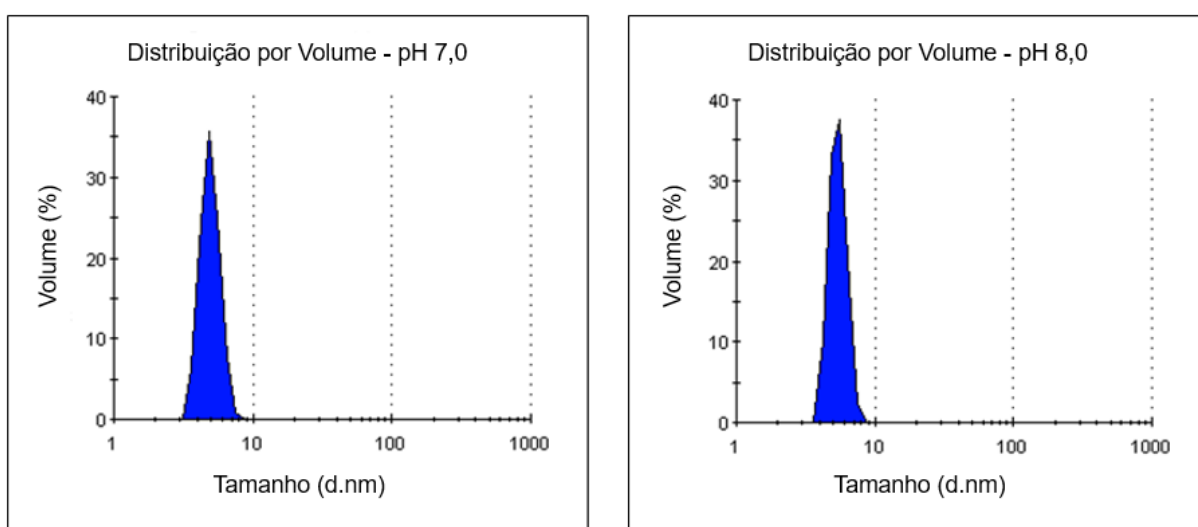


4.2 Caracterização estrutural da proteína Grb2^{Y160F}

4.2.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS

A técnica de DLS confirmou a obtenção da proteína em estado monomérico nas duas condições de pH. As duas amostras apresentaram uma única população, confirmando a pureza da proteína obtida pelo processo de gel filtração (figura 14). Comparativamente, houve um aumento de 0,462 nm no diâmetro da proteína com o aumento do pH.

Figura 14 – Gráfico de distribuição por volume referente ao tamanho do diâmetro hidrodinâmico proteína Grb2^{Y160F}.



Fonte: Relatório de qualidade do equipamento ZETASIZER NANO Series – Malvern Panalytical.

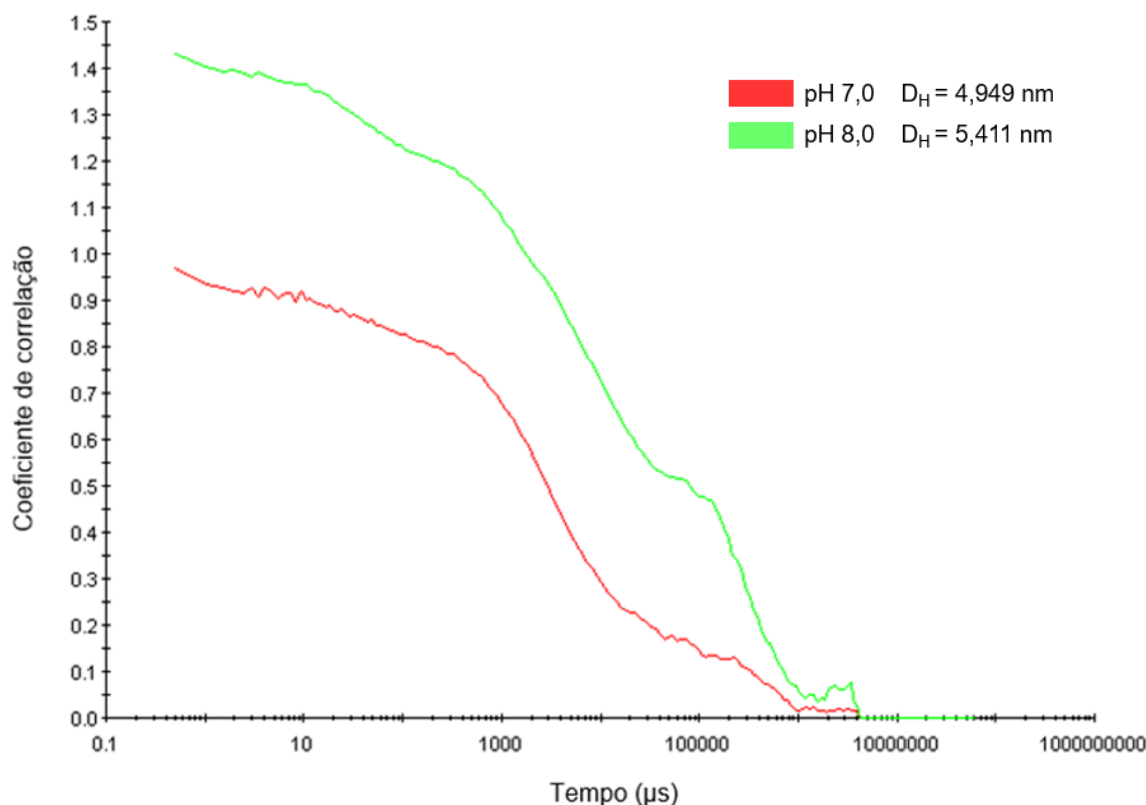
A proteína em pH 7,0 apresentou um diâmetro de 4,949 nm e uma estimativa molecular de 28 kDa, valor muito próximo ao calculado pela ferramenta ProtParam (25,2 kDa), confirmando a prevalência do estado monomérico em solução. Embora o valor estimado para a massa molecular seja um pouco maior do que o valor teórico obtido pela sequência de aminoácidos, a Grb2 apresenta uma estrutura flexível em solução, portanto, o resultado condiz com o do monômero [65].

Em pH 8,0 a proteína apresentou um diâmetro de 5,411 nm e a confirmação da prevalência do estado monomérico se deu por comparação, uma vez que a Grb2 em

estado dimérico apresenta um diâmetro de 6,967 nm no mesmo pH [dado cedido por Tedesco, J. A., 2022].

Recentemente, nosso grupo identificou que a Grb2 dimérica apresenta maior flexibilidade estrutural em pH 8,0, sendo uma das metodologias utilizadas para observar tal fenômeno o tempo de correlação entre as duas condições de pH [artigo em processo de revisão, participação em coautoria]. Para verificar se o mesmo princípio se aplicaria ao monômero, nós utilizamos como parâmetro o coeficiente de correlação obtido através do gráfico de tempo de correlação (figura 15), em que observamos que o decaimento do coeficiente de correlação do pH 7,0 é menor do que a amostra em pH 8,0, principalmente próximo à região de milissegundos (ms) no eixo temporal representado pela abcissa do gráfico.

Figura 15 – Coeficiente de correlação da proteína Grb2^{Y160F} em pH 7,0 (vermelho) e pH 8,0 (verde) ao longo do tempo. A diferença no decaimento do coeficiente de correlação indica que a amostra de proteína em pH 8,0 ocupa um volume maior do que a amostra em pH 7,0. Os valores de D_H referem-se aos diâmetros hidrodinâmicos da proteína.



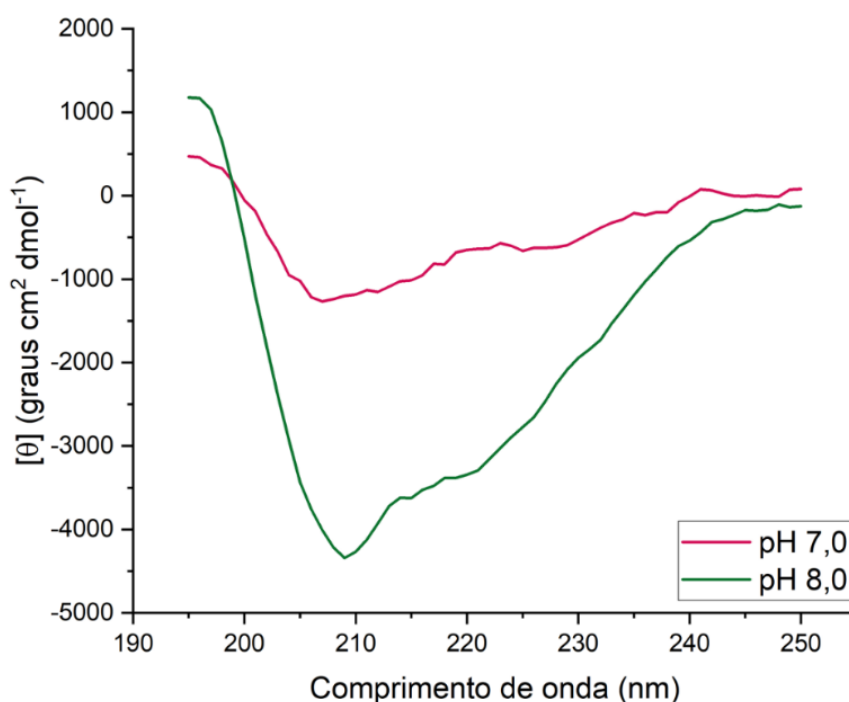
Fonte: Relatório de qualidade do equipamento ZETASIZER NANO Series – Malvern Panalytical.

Somando isso aos trabalhos que mostram que a Grb2 apresenta uma estrutura flexível em solução e que o diâmetro é calculado considerando que a proteína apresenta a mesma velocidade de movimento de uma esfera não permeável ao solvente, podemos concluir que o monômero também apresenta maior flexibilidade estrutural em pH 8,0 [65-68].

4.2.2 Análise de estruturas secundárias por Dicroísmo Circular

A partir dos resultados de DLS, o dicroísmo circular foi utilizado para investigar se o aumento do diâmetro hidrodinâmico da Grb2^{Y160F} estava relacionado com um rearranjo de estruturas secundárias ou somente com um afastamento entre os domínios da proteína. A amostra em pH 8,0 apresentou um aumento da elipticidade próximo aos 208 nm, característico de α hélices (figura 16) [69]. O cálculo das porcentagens realizado pelo servidor BeStSel identificou um aumento de 5,9% de α hélices e de 15,9% de estruturas desordenadas, além de uma diminuição de 20,9% de fitas β para o pH 8,0 em relação ao pH 7,0 (tabela 2).

Figura 16 – Espectro de dicroísmo circular obtido com 2 μ M de Grb2^{Y160F} em 20 mM NaPi; 50 mM NaF.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 2 – Conteúdo de estrutura secundária da proteína Grb2^{Y160F} calculado pelo servidor *online* BeStSel.

pH	Hélice α	Fita β	Volta β	Outros
7,0	0%	42,6%	15,3%	42,1%
8,0	5,9%	21,7%	14,4%	58%

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O aumento da flexibilidade correlacionado ao aumento de estruturas desordenadas está de acordo com os resultados observados pelo nosso grupo para o dímero. Surpreendentemente, a formação de α hélices em pH 8,0 confere maior estabilidade estrutural ao monômero, uma vez que hélices são mais estáveis termodinamicamente e mais fáceis de serem formadas do que outras estruturas, tanto que se formam ao mesmo passo da síntese de proteínas no ribossomo [35,36,70,71].

A ausência de hélices na deconvolução do espectro em pH 7,0 pode estar relacionada à faixa de varredura utilizada, pois α hélices apresentam um pico positivo em 190 nm e o comprimento de onda mínimo considerado foi de 195 nm para evitar ruídos [69]. Portanto, é possível que os resultados tenham sido influenciados por esse fator. Consequentemente, novos estudos utilizando dicroísmo circular com radiação síncrotron devem ser conduzidos para uma caracterização mais assertiva da estrutura em solução a partir da interpretação de dados em uma faixa de varredura de 170 a 250 nm [72].

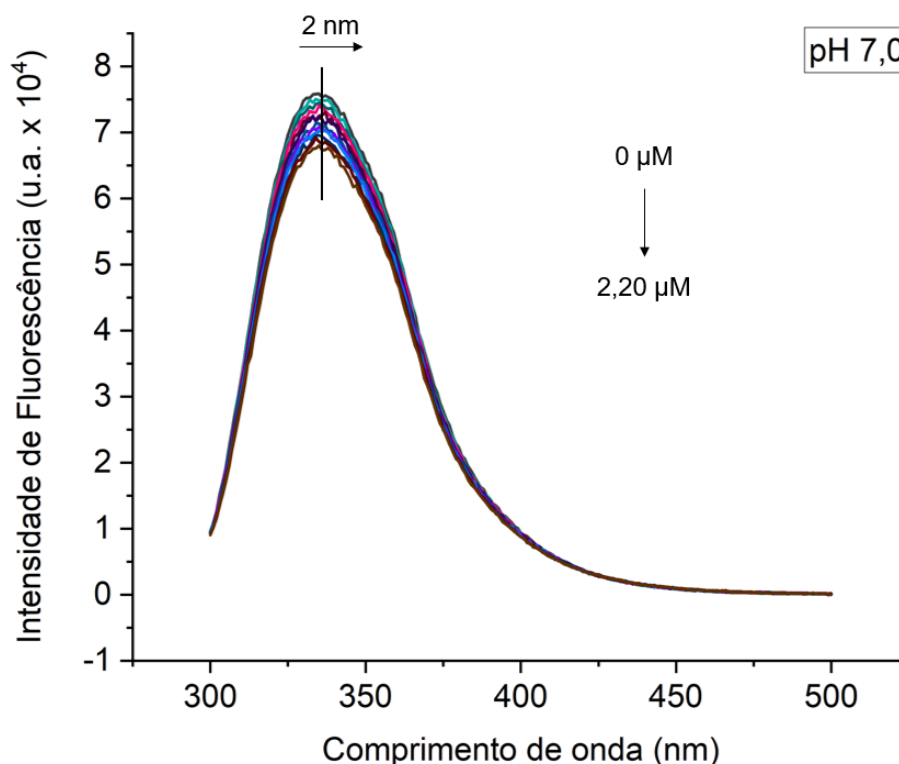
Mesmo que esse estudo apresente uma limitação experimental, a ausência de hélices em pH 7,0 não deve ser ignorada, pois a Grb2 apresenta uma isoforma (Grb3-3) com a deleção dos resíduos 60-100, responsáveis pela formação de uma das α hélices (composta pelos resíduos 67-76) do domínio SH2. A Grb3-3 é essencial em vias de sinalização que induzem apoptose e, consequentemente, a ausência de α hélices da Grb2 pode estar relacionada à mecanismos ainda inexplorados, como a inibição de ativação de vias de sinalização em células que apresentam baixa concentração de Grb2 ou o desempenho de funções da sua isoforma [40,73,74].

4.3 Caracterização da interação entre a proteína Grb2^{Y160F} e a molécula de cumarina (1,2-benzopirona)

4.3.1 Determinação do perfil termodinâmico de interação por Espectroscopia de Fluorescência

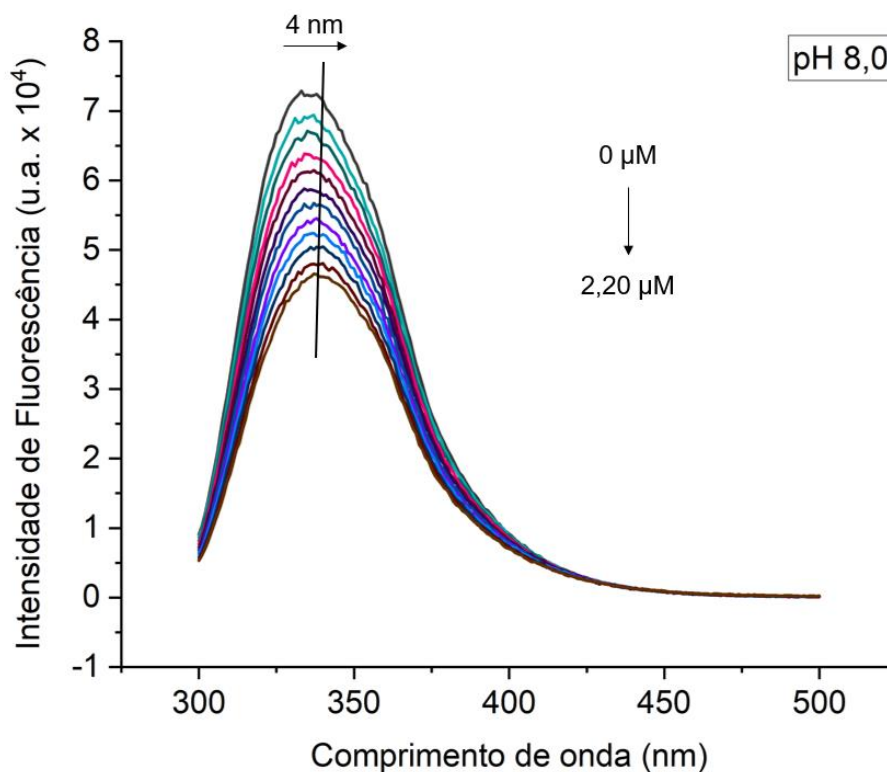
Com base nos resultados anteriores, os mecanismos moleculares de interação foram investigados nas duas condições de pH para verificar como as mudanças conformacionais interferem na interação. A supressão intrínseca do triptofano confirmou a interação entre a Grb2^{Y160F} e a cumarina, com comportamento semelhante entre temperaturas de uma mesma condição de pH (figuras 17 e 18). O perfil termodinâmico foi determinado a partir de 12 titulações, em que a concentração final de cumarina atingiu o valor de 2,20 μM .

Figura 17 – Espectro de emissão de fluorescência da proteína Grb2^{Y160F} em pH 7,0 a 299 K. Conforme a intensidade diminui, o pico de fluorescência sofre um deslocamento de 2 nm para o vermelho.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 18 – Espectro de emissão de fluorescência da proteína Grb2^{Y160F} em pH 8,0 a 299 K. Conforme a intensidade diminui, o pico de fluorescência sofre um deslocamento de 4 nm para o vermelho.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

É possível observar através do espectro que quanto maior a concentração de cumarina no microambiente próximo à região do triptofano, menor é a intensidade de fluorescência da Grb2^{Y160F}. A interação não provoca a supressão total da intensidade de fluorescência pois a proteína possui 5 triptofanos, sendo: 1 no domínio nSH3 (W36), 2 no domínio SH2 (W60 e W121) e 2 no domínio cSH3 (W193 e W194); e o espectro obtido no experimento corresponde a uma somatória da emissão de fluorescência de todos os triptofanos da proteína [40,75].

A interação ainda provoca um deslocamento para o vermelho em ambas as condições de pH, porém mais acentuado em pH 8,0. O mesmo comportamento é observado nos estudos com o dímero e com o domínio SH2 isolado, sugerindo uma exposição do triptofano ao solvente [37,53]. Entretanto, considerando que a interação ocorre em um bolsão hidrofóbico e que a molécula de cumarina também é hidrofóbica, é improvável que ambos estejam sendo expostos ao solvente.

Como a Grb2 apresenta 5 resíduos de triptofano e o espectro é resultante da emissão de fluorescência de todos os triptofanos da proteína, parte do deslocamento

provavelmente ocorre devido a interação da cumarina com um triptofano de classe I (tabela 3), que prejudica em sua contribuição de emissão de fluorescência na região próxima aos 330 nm e provoca um pequeno deslocamento para o vermelho por favorecer a intensidade dos triptofanos que não participam da interação [62,75,76]. Além disso, para que a cumarina interaja com o bolsão hidrofóbico, há uma mudança de solvatação do microambiente em que o triptofano se localiza, que também contribui com o deslocamento observado [77,78].

Tabela 3 – Classificação de triptofanos de acordo com o microambiente em que estão inseridos e que podem provocar deslocamentos no espectro de emissão de fluorescência.

Classe	Descrição
I ($\lambda_m = 330 - 332$ nm, $\Delta\lambda = 48 - 50$ nm)	Enterrado na estrutura proteica
II ($\lambda_m = 340 - 342$ nm, $\Delta\lambda = 53 - 55$ nm)	Parcialmente exposto ao solvente
III ($\lambda_m = 350 - 353$ nm, $\Delta\lambda = 56 - 61$ nm)	Altamente exposto ao solvente

λ_m – intensidade máxima de emissão

Fonte: Adaptado de [75,76].

A constante de Stern Volmer (K_{sv}) foi obtida através do ajuste linear da relação entre a intensidade de fluorescência de cada titulação e a concentração de cumarina no sistema (tabela 4). Os valores obtidos foram proporcionais ao aumento da temperatura, indicando que a redução da viscosidade da solução favoreceu a agitação das moléculas presentes no sistema e, portanto, a colisão entre moléculas de cumarina e o fluoróforo excitado da proteína [37,53,62]. Esse mecanismo de supressão é classificado como dinâmico e é semelhante ao perfil predominante obtido para o dímero de Grb2 em pH 8,0 [53,62].

Tabela 4 – Valores obtidos para a constante de Stern Volmer (K_{sv}). O aumento proporcional em relação à temperatura indica que a supressão de fluorescência ocorre através de um mecanismo dinâmico.

		295 K	299 K	303 K
pH 7,0	$K_{sv} (x 10^4 M^{-1})$	5,16	8,16	8,95
pH 8,0	$K_{sv} (x 10^5 M^{-1})$	2,40	2,62	4,33

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A constante de associação (K_a) e o coeficiente de Hill (n_H) foram calculados a partir do gráfico do método de duplo-log (figura 19), em que é realizada uma relação logarítmica da razão entre a diferença da fração de proteína livre e ligada pela fração ligada em função da concentração de cumarina. A ordem de magnitude da constante de associação é classificada como moderadas nas duas condições de pH (tabela 5) [79].

Tabela 5 – Constante de associação (K_a) e Coeficiente de Hill (n_H) e constante de calculados a partir do gráfico de duplo-log.

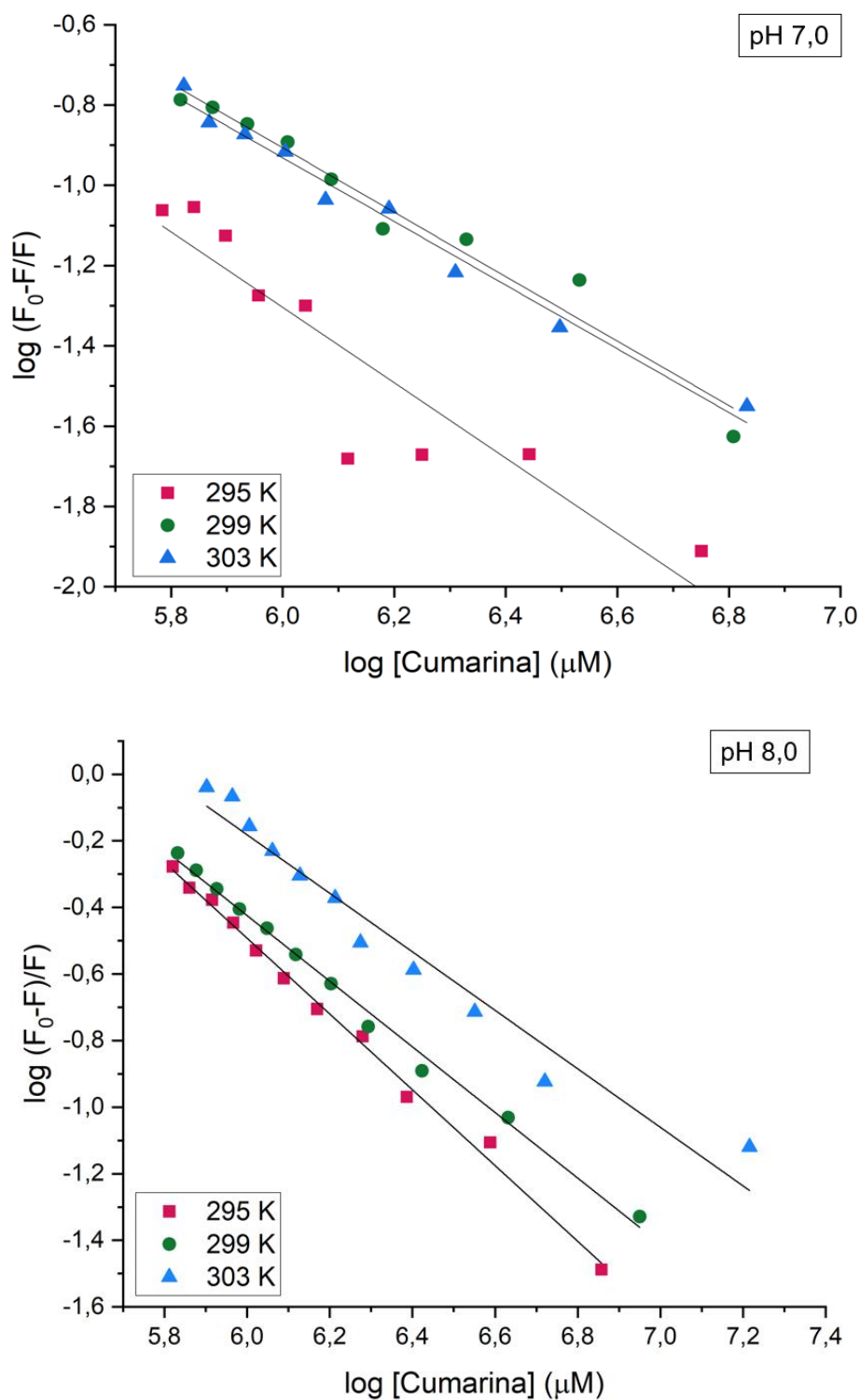
		295 K	299 K	303 K
pH 7,0	$K_a (x 10^4 M^{-1})$	4,15	6,63	8,48
	n_H	0,94	0,77	0,86
pH 8,0	$K_a (x 10^5 M^{-1})$	3,70	3,71	6,22
	n_H	1,14	0,99	0,88

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O n do coeficiente de Hill (n_H) geralmente corresponde ao grau de interação entre o sítio de ligação e o ligante para proteínas que apresentam mecanismos alostéricos de interação, como a interação entre o oxigênio e a hemoglobina [80]. Entretanto, quando $n \approx 1$ em proteínas que não apresentam atividade alostérica ou enzimática, o n_H reflete o número de ligantes por proteína [80]. Portanto, o n_H nos fornece uma estequiometria de 1 molécula de cumarina interagindo por monômero de Grb2^{Y160F}.

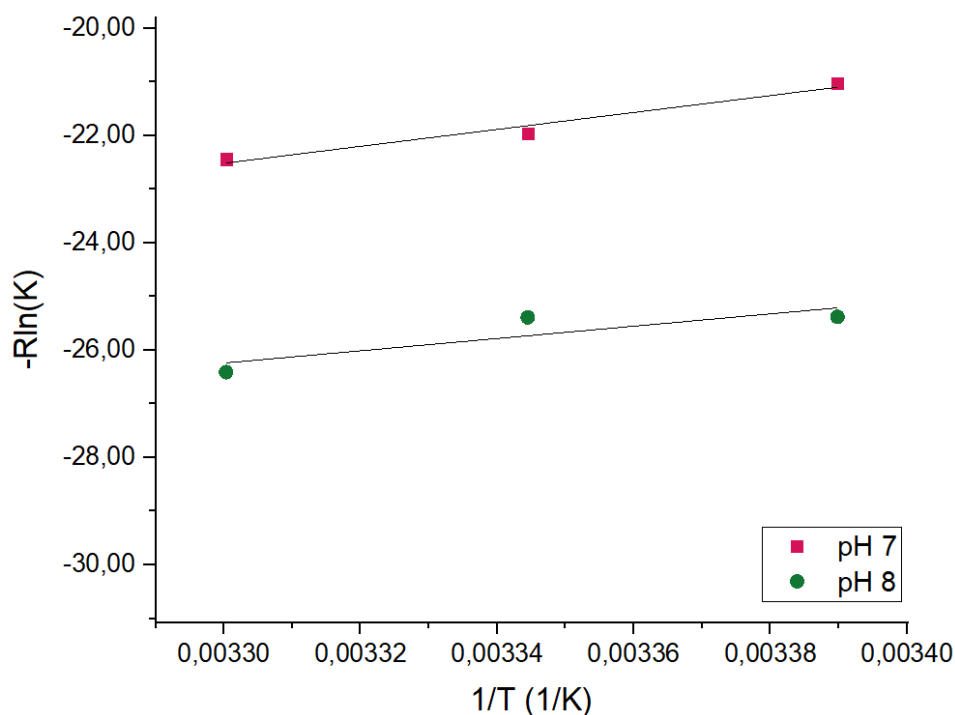
Por fim, a relação de van't Hoff (figura 20, tabela 6) permitiu calcular os parâmetros termodinâmicos, que indicam que a interação é espontânea e entropicamente dirigida, pois a entropia apresenta um valor positivo e predominante no sistema. O valor positivo obtido para a entalpia ($\Delta H > 0$) associado ao $\Delta G < 0$ e $T\Delta S > 0$ caracterizam a interação como hidrofóbica [81]. Esses resultados corroboram com os perfis obtidos para o domínio SH2 isolado e para o dímero de Grb2 nas duas condições de pH [37,53 e dados não publicados].

Figura 19 – Gráfico de duplo-log com os dados relativos ao efeito da supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2Y 160F na presença de cumarina.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 20 – Gráfico de van't Hoff para as temperaturas 295, 299, e 303 K apresentando inclinações positivas nas duas condições de pH.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos obtidos pela equação de van't Hoff referentes à interação do complexo Cumarina-Grb2^{Y160F} nas temperaturas de 295, 299 e 303 K. A interação em pH 8,0 é mais favorável por apresentar um menor valor de ΔG .

pH	Temperatura (K)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
7,0	295	-6,21		-22,0
	299	-6,57	15,8	-22,4
	303	-6,81		-22,6
8,0	295	-7,48		-18,9
	299	-7,59	11,45	-19,0
	303	-8,00		-19,4

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A representação gráfica do perfil termodinâmico pode ser visualizada na figura 21. Considerando a Grb2^{Y160F}, a interação apresenta maior afinidade em pH 8,0. Em relação ao estado dimérico, o monômero em pH 7,0 apresenta 1 ordem de magnitude superior de afinidade e, embora a afinidade de ambos seja da ordem de 10^5 em pH 8,0, o monômero ainda apresenta valores maiores de K_a (tabelas 7 e 8) [53].

Tabela 7 – Comparação de valores de constante de afinidade (K_a) entre a Grb2^{Y160F} e o dímero. Os dados de K_a do dímero em pH 8,0 foram retirados de Sanches *et al.*, (2019).

pH	K_a monômero	K_a dímero
7,0	$\sim 10^4 \text{ M}^{-1}$	$\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$
8,0	$\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$	$\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$

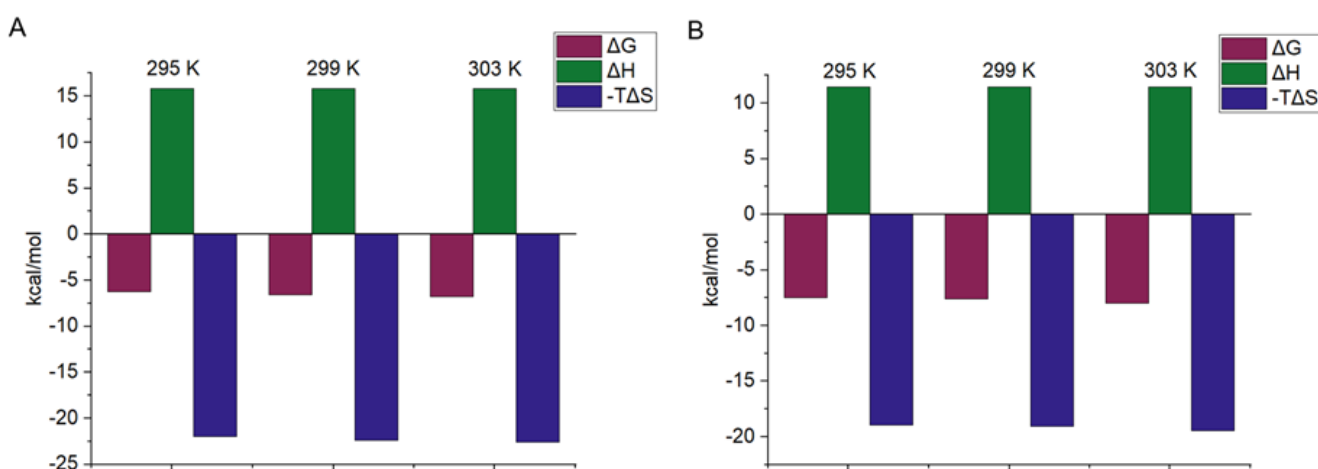
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 8 – Comparação de valores de constante de afinidade (K_a) entre a Grb2^{Y160F} e o dímero em pH 8,0. Os dados de K_a do dímero em pH 8,0 foram retirados de Sanches *et al.*, (2019).

$K_a (\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	295 K	299 K
Monômero	3,70	3,71
Dímero	1,70	2,10

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 21 – Perfil termodinâmico da interação entre Grb2^{Y160F} e cumarina. (A) Para o pH 7,0; (B) para o pH 8,0. As contribuições energéticas sugerem que a interação é entropicamente dirigida e guiada por efeitos hidrofóbicos.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.3.2 Identificação de epítomos por STD (*Saturation Transfer Difference*)

O experimento de STD confirmou a interação entre Grb2^{Y160F} e cumarina por transferência da magnetização, através da diminuição de intensidade do sinal da cumarina (figuras 22 e 23), corroborando com os resultados obtidos por supressão de fluorescência.

A porcentagem dos epítomos (tabela 9) evidencia que em pH 7,0 houve uma maior transferência de magnetização para os hidrogênios 4 e 7 da molécula de cumarina, enquanto que para o pH 8,0 as maiores transferências foram para os hidrogênios 6 e 8.

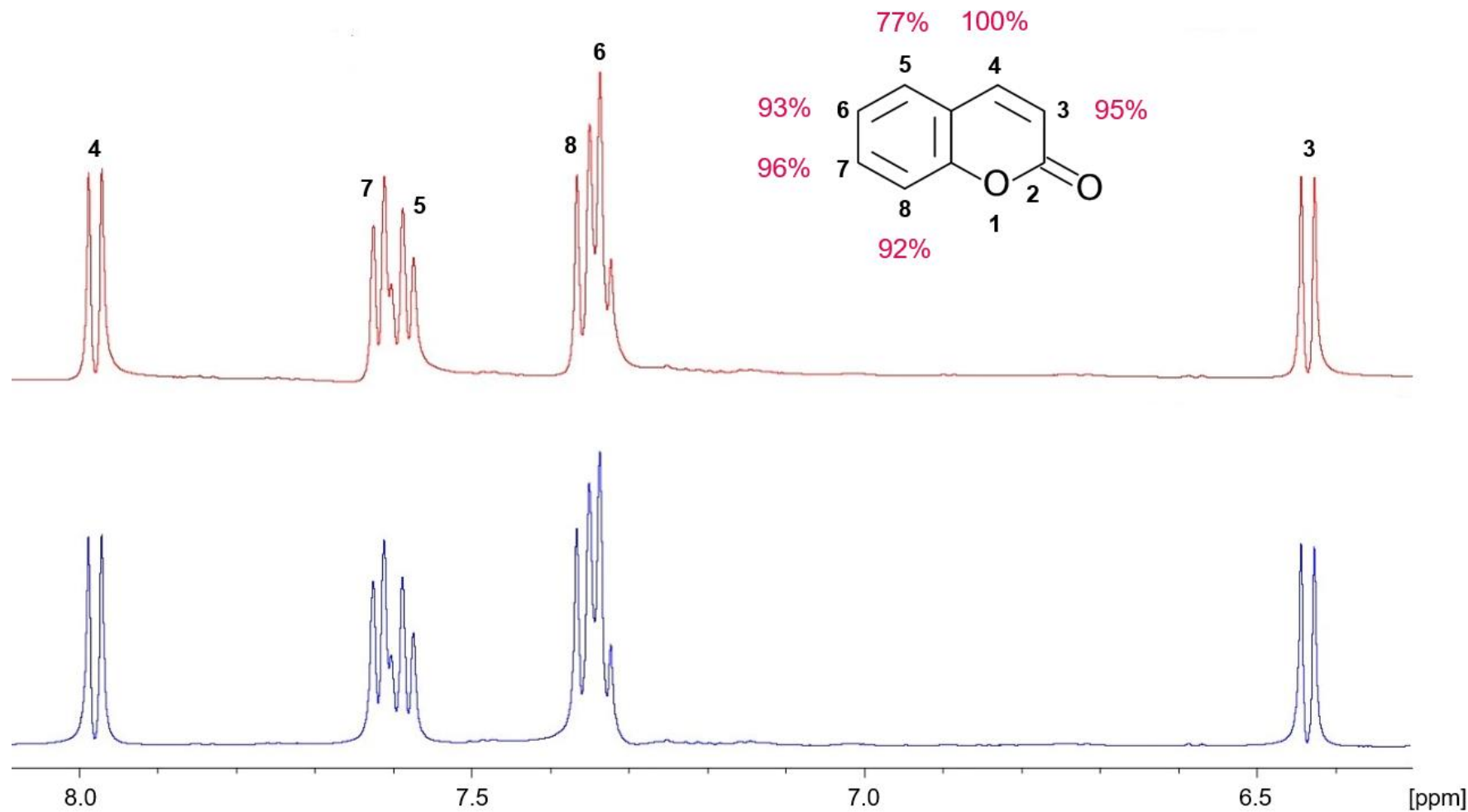
Tabela 9 – Valores dos epítomos da molécula de cumarina nas duas condições de pH.

Hidrogênio	δ (ppm)	Epítomos (%)	
		pH 7,0	pH 8,0
3	6,38	95	25
4	7,9	100	54
5	7,53	77	47
6	7,28	93	100
7	7,56	96	22
8	7,31	92	76

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

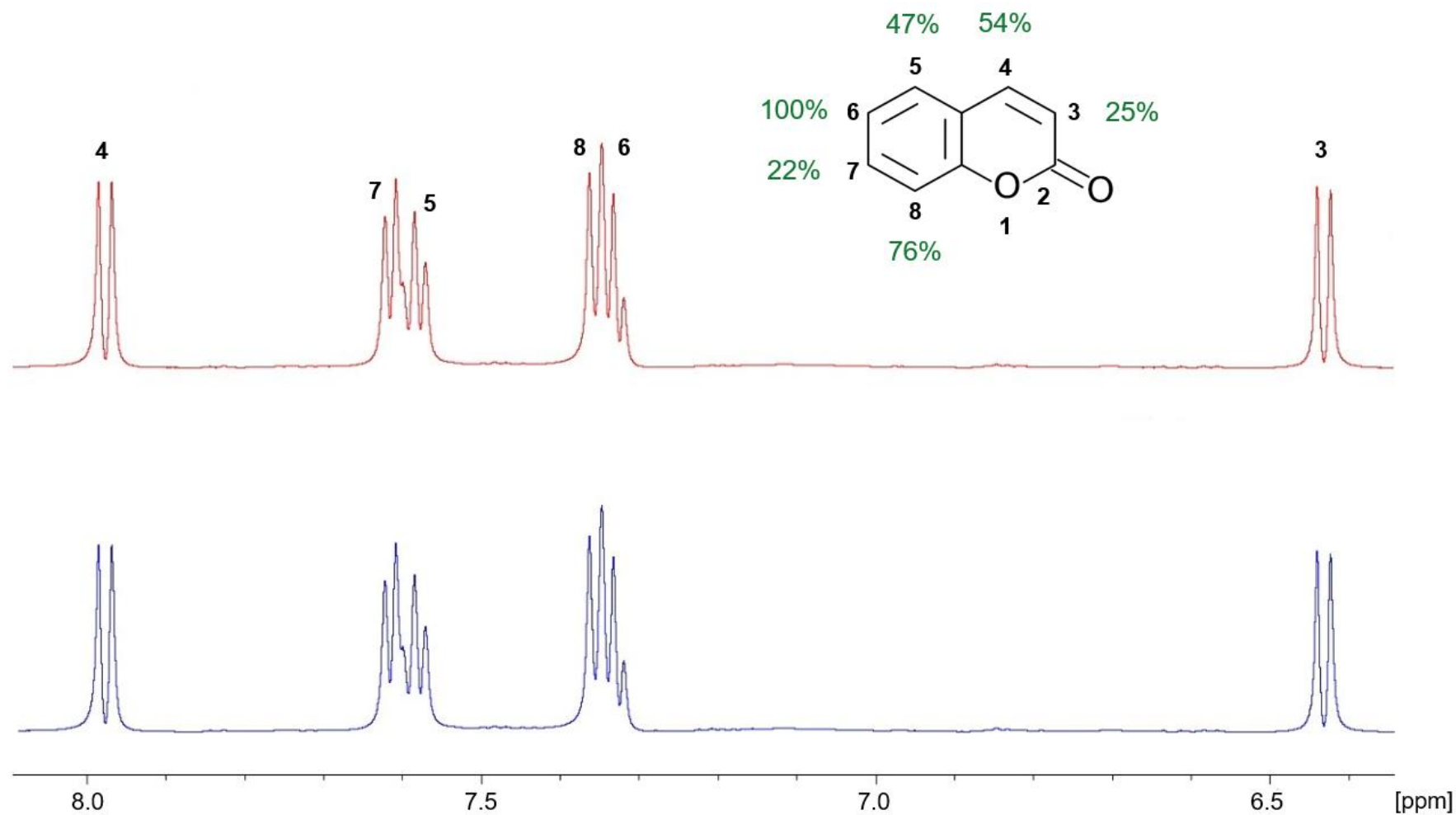
Comparativamente, a saturação dos hidrogênios apresenta diferenças que variam de 7% a 74% com o aumento de pH. Considerando tais mudanças e o fato de que a interação apresenta maior afinidade em pH 8,0, formaram-se duas hipóteses: (1) a cumarina interage com o monômero em diferentes sítios de ligação; ou (2) a interação ocorre em um único sítio de ligação, mas a orientação de encaixe da molécula é diferente para cada pH. A fim de confirmar qual hipótese seria correta, a análise computacional de *docking* molecular foi realizada para encontrar o sítio de ligação mais favorável, considerando os seguintes critérios: valores dos epítomos, hidrofobicidade da molécula de cumarina e regiões hidrofóbicas contendo ao menos 1 triptofano.

Figura 22 – Espectro de STD da interação entre Grb2^{Y160F} e cumarina em pH 7,0. Os experimentos de *off-resonance* (vermelho) e *on-resonance* (azul) indicam que há interação entre a proteína e o ligante. Os números indicam o assinalamento dos hidrogênios da cumarina e as porcentagens são referentes à frequência de contato desses hidrogênios com os resíduos de aminoácido da Grb2.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 23 – Espectro de STD da interação entre Grb2^{Y160F} e cumarina em pH 8,0. Os experimentos de *off-resonance* (vermelho) e *on-resonance* (azul) indicam que há interação entre a proteína e o ligante. Os números indicam o assinalamento dos hidrogênios da cumarina e as porcentagens são referentes à frequência de contato desses hidrogênios com os resíduos de aminoácido da Grb2.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

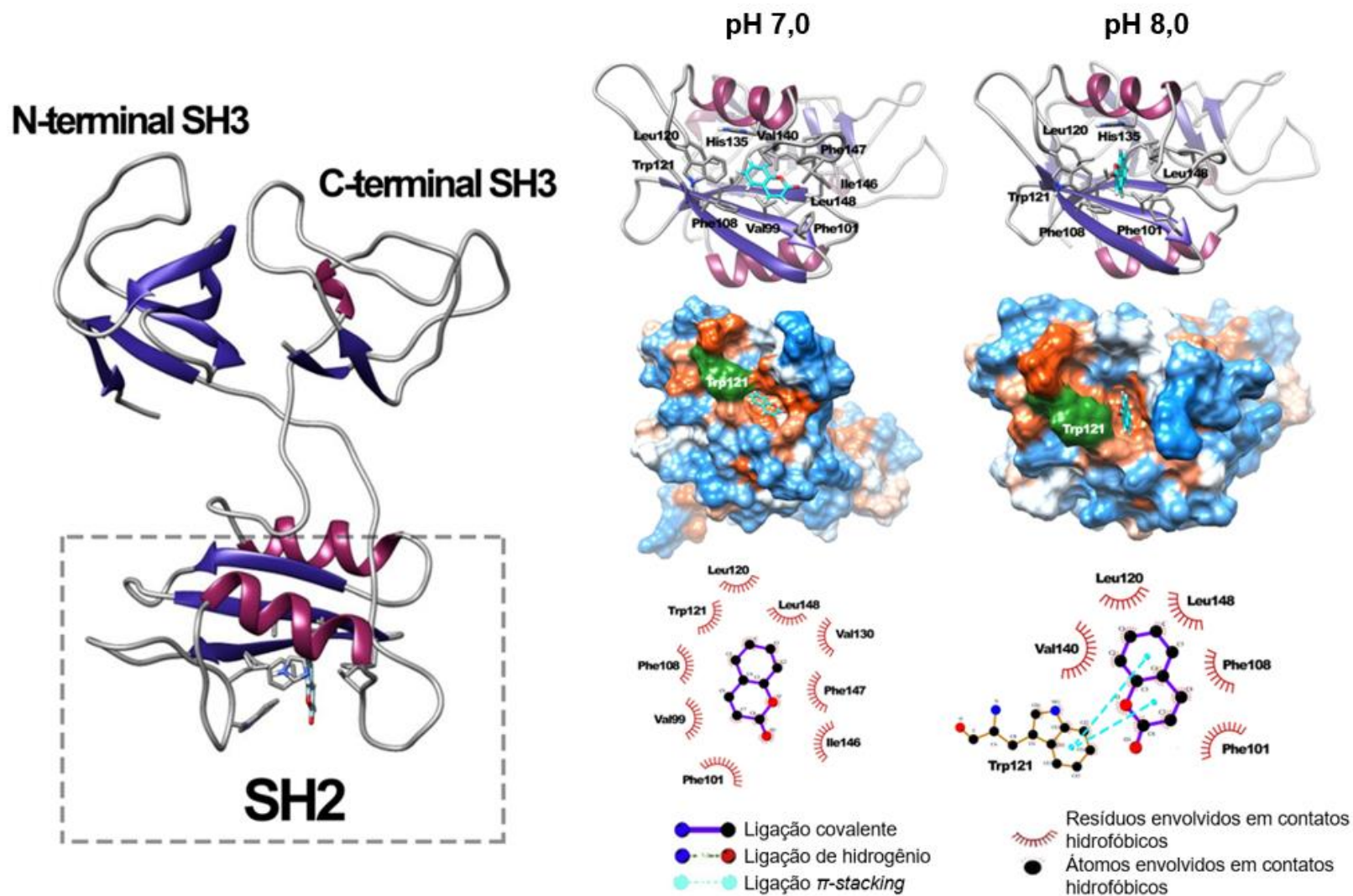
4.3.3 Análises computacionais – *Docking* e dinâmica molecular

A análise de *docking* molecular indicou o bolsão hidrofóbico em que o triptofano 121 está localizado (sítio II do domínio SH2) como o sítio mais favorável para que a interação ocorra. O mesmo local de interação foi proposto para o dímero de Grb2 nas duas condições de pH [56, dados não publicados].

Em seguida, a simulação de dinâmica molecular identificou dois encaixes da cumarina no mesmo sítio, que corroboram com a diferença de porcentagens dos epítomos em pH 7,0 e pH 8,0 (figura 24). As porcentagens obtidas para o pH 7,0 representam um encaixe paralelo da cumarina em relação ao triptofano 121 – e mais fundo no bolsão hidrofóbico. Já as porcentagens para o pH 8,0 representam um encaixe perpendicular da cumarina em relação ao triptofano 121 e semelhante ao do dímero de Grb2 na mesma condição de pH [53].

A predição do encaixe perpendicular para o pH 8,0 é corroborada pela constante de associação, uma vez que o monômero e o dímero apresentam o mesmo encaixe e a mesma ordem de magnitude de K_a ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Além disso, estudos mostram que interações do tipo π -*stacking* são capazes de provocar um *shift* para o vermelho em espectros de fluorescência, que contribui para fenômeno observado de maneira mais acentuada para o dímero (figura 11) e para o monômero (figura 18) em pH 8,0 [53,82-84].

Figura 24 – Mapa de contatos entre a Grb2^{Y160F} e a molécula de cumarina. Os diferentes encaixes da molécula corroboram que a interação é modulada pelo aumento de flexibilidade provocado com a mudança de pH.

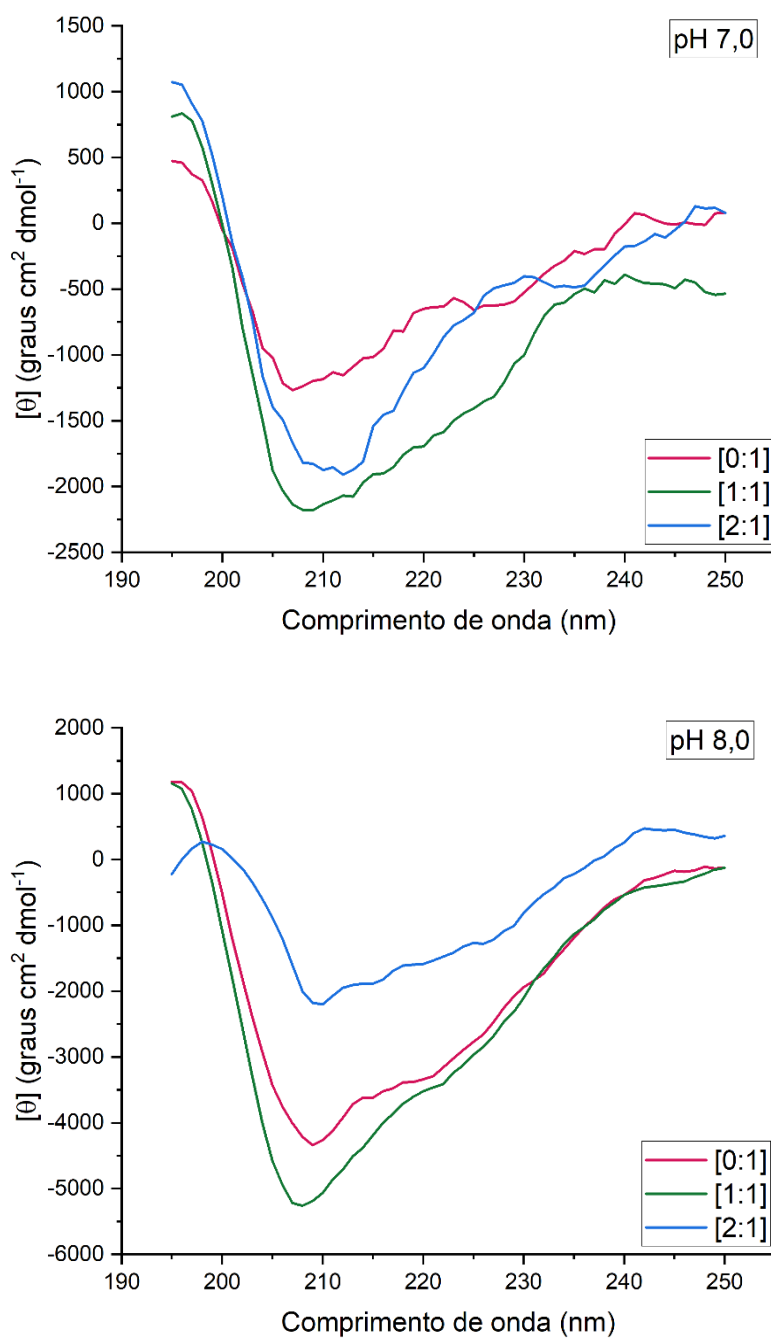


Fonte: Cortesia de DIAS, R. V.R.

4.3.4 Análise de estruturas secundárias na presença de cumarina

Os espectros obtidos mostram que houve remodelação estrutural da proteína na presença de cumarina nas duas condições de pH (figura 25, tabela 10).

Figura 25 – Espectro de dicroísmo circular para a Grb2^{Y160F} na presença de diferentes concentrações de cumarina. O espectro da proteína pura [0:1] foi obtido em solução tampão 20 mM NaPi; 50 mM NaF. A cumarina foi desconsiderada na solução branco de suas respectivas amostras.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 10 – Conteúdo de estrutura secundária da proteína Grb2^{Y160F} na presença diferentes concentrações de cumarina. Em pH 7,0 há uma tendência do aumento da estabilidade estrutural na presença das duas concentrações de cumarina, enquanto para o pH 8,0 a concentração de [2:1] perturba esse padrão.

pH	Concentração Cumarina:Grb2	α Hélice	Fita β	Volta β	Outros
7,0	[0:1]	0%	42,6%	15,3%	42,1%
	[1:1]	0,3%	37,7%	14,5%	47,5%
	[2:1]	1,1%	37,5%	14,4%	47,4%
8,0	[0:1]	5,9%	21,7%	14,4%	58%
	[1:1]	9,1%	11,3%	12,9%	66,6%
	[2:1]	3,3%	32,8%	13,0%	50,9%

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Em pH 7,0 houve uma redução de 4,9% fitas β e um aumento de 5,4% de estruturas desordenadas na proporção de [1:1] entre cumarina:Grb2, indicando que a estrutura se tornou mais flexível. Contudo, na concentração de [2:1] houve um aumento de 1,1% de α hélices, indicando que o aumento da concentração de cumarina, ainda que superior à capacidade de interação com a Grb2^{Y160F}, foi capaz de torná-la mais estável.

Por outro lado, os espectros obtidos para o pH 8,0 mostram que houve um aumento de 3,2% de α hélices junto a um aumento de 8,6% de estruturas desordenadas na concentração de [1:1], tornando a estrutura proteica mais estável e flexível. Já na concentração de [2:1], houve uma desestabilização estrutural provocada pela redução de 5,8% de hélices e de 15,7% de estruturas desordenadas. Esses dados ainda corroboram com o encaixe da cumarina em pH 8,0, pois o monômero mais à esquerda na figura 23 apresenta um domínio cSH3 quase totalmente desestruturado devido à redução de fitas β .

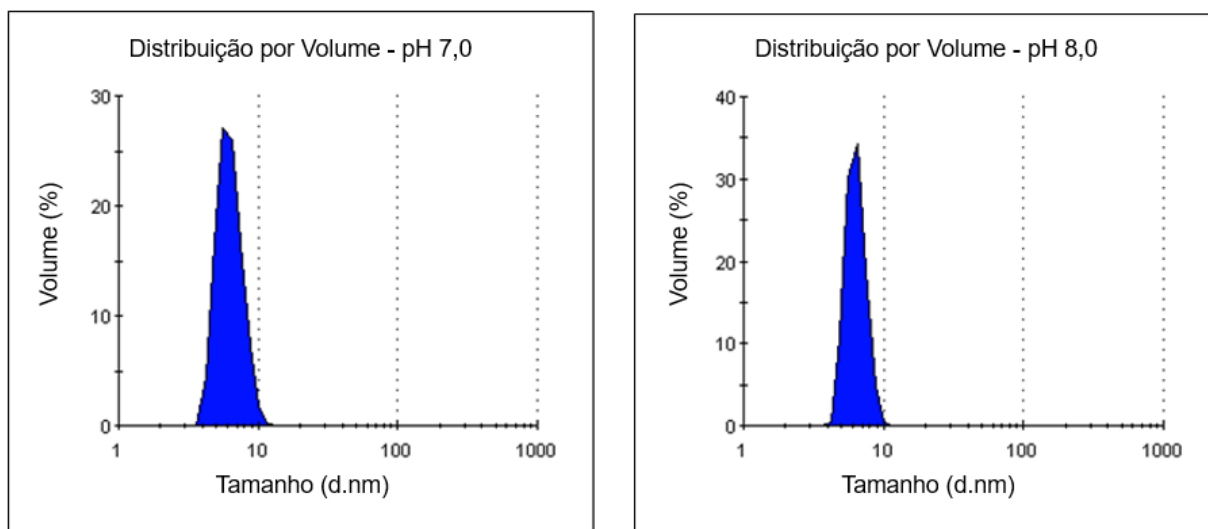
Como a cumarina apresenta efeitos opostos dependentes do pH e da concentração em relação a Grb2, o complexo formado entre proteína e ligante se

mostra um alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos que possam ser utilizados para mais de um propósito. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar se as remodelações estruturais apresentadas são capazes de interferir na estabilidade térmica/química da proteína e na sua ligação com outras proteínas da via de sinalização, como os experimentos de DSC, desnaturação por cloreto de guanidina e competição com outras proteínas por STD podem auxiliar a esclarecer tais dúvidas.

4.3.5 Determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS

Após finalizadas as corridas referentes à proteína em cada pH, a cumarina foi acrescentada nestas amostras em uma proporção de [1:1] de ligante:proteína, considerando a estequiometria obtida através dos experimentos de fluorescência (figura 26).

Figura 26 – Gráfico de distribuição de tamanho referente a proteína Grb2^{Y160F} com a adição de cumarina.



Fonte: Relatório de qualidade do equipamento ZETASIZER NANO Series – Malvern Panalytical.

Em pH 7,0 houve um aumento do diâmetro de 4,949 nm para 6,294 nm, enquanto que para o pH 8,0 houve um aumento de 5,411 nm para 6,362 nm. Surpreendentemente, estes dados estão muito próximos aos valores obtidos pelo nosso grupo para o dímero de Grb2 (tabela 11).

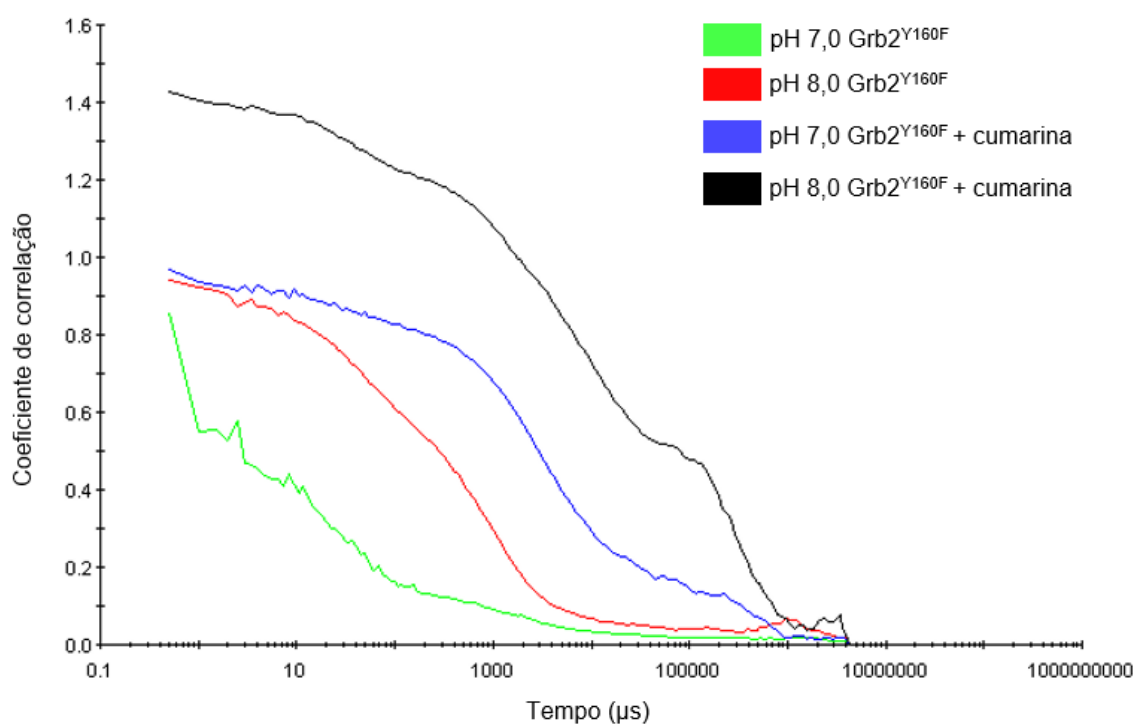
Tabela 11 – Comparação entre valores obtidos para o diâmetro hidrodinâmico da proteína Grb2 em estado monomérico na ausência e presença de cumarina (proporção de 1:1 entre proteína e ligante) e em estado dimérico nos pH 7,0 e 8,0.

pH	Grb2 monomérica	Grb2 + Cumarina	Grb2 dimérica
7,0	4,949 nm	6,294 nm	6,509 nm
8,0	5,411 nm	6,362 nm	6,967 nm

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O gráfico do tempo de correlação corrobora com a dimerização da proteína, pois as amostras acrescidas de cumarina apresentam coeficientes de correlação muito superiores aos observados anteriormente (figura 27). Em ordem decrescente, é possível observar que as amostras em pH 8,0 e pH 7,0 na presença de cumarina apresentam o maior diâmetro, seguido pelas amostras puras em pH 8,0 e 7,0.

Figura 27 – Comparação entre os coeficientes de correlação da proteína Grb2^{Y160F} na ausência e presença de cumarina em pHs 7,0 e 8,0 ao longo do tempo. Quanto menor o valor no eixo da ordenada (coeficiente de correlação), menor é o volume ocupado pela proteína.



Fonte: Relatório de qualidade do equipamento ZETASIZER NANO Series – Malvern Panalytical.

De acordo com a literatura, a molécula de cumarina sofre uma reação fotoquímica de dimerização na presença de radiação eletromagnética acima dos 300 nm, sendo a polaridade e concentração de sal da solução influenciam na estrutura final do dímero, que pode assumir uma configuração cis ou trans [85-88]. É importante ressaltar que a cumarina foi submetida à radiação UV em todos os experimentos, porém, o comprimento de onda utilizado nas técnicas de dicroísmo circular (195-250 nm) e espectroscopia de fluorescência (excitação em 290 nm) não seriam suficientes para a formação de dímeros da molécula [87].

Portanto, é possível que a cumarina tenha formado um dímero que esteja atuando como uma ponte entre os domínios SH2 de duas moléculas de Grb2, formando um dímero da proteína em uma nova configuração estrutural. E a técnica de DLS teria sido a única a detectar a possibilidade de dimerização tanto da cumarina como da proteína devido ao feixe de luz laser do equipamento ser emitido em 638 nm [89]. Entretanto, como o índice de poli dispersividade das amostras foi maior do que o observado antes da adição de cumarina, o valor obtido pode indicar o início da formação de um agregado de proteína. Logo, mais estudos precisam ser realizados para confirmar essa nova hipótese de dimerização, como a análise de estruturas secundárias no UV-próximo por dicroísmo circular e por infravermelho na ausência e presença de cumarina.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nesta pesquisa, nós ressaltamos as diversas funções atribuídas a Grb2 e a utilizamos como objeto de estudo por ser um alvo em potencial para interromper vias de sinalização que promovem o câncer. A molécula de cumarina foi escolhida devido à vasta capacidade anticarcinogênica e, dada a importância da inversão do gradiente de pH entre os meios intra e extracelulares, nós elucidamos os mecanismos de interação da Grb2 com a molécula em duas condições de pH que se aproximam do pH intracelular de uma célula saudável e cancerosa.

O diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS confirmou que mutação Y160F é eficaz para a obtenção de altas concentrações de Grb2 monomérica. Junto tempo de correlação, foi constatada maior flexibilidade estrutural da proteína em pH 8,0. Posteriormente, nós identificamos por meio da técnica de dicroísmo circular que essa flexibilidade está associada a um aumento das porcentagens de α hélices e estruturas desordenadas na estrutura secundária, que implicam em uma conformação estrutural mais estável da Grb2 em um pH próximo ao de uma célula cancerosa.

Tendo em vista esses resultados e que o estado monomérico é o que permite a ativação da via da MAPK/ERK, nós elucidamos os mecanismos moleculares da interação entre a Grb2^{Y160F} e a molécula de cumarina, que é conhecida por inibir a proliferação celular. Os resultados obtidos através da supressão de fluorescência indicam que a interação é favorável, entropicamente dirigida e guiada por efeitos hidrofóbicos ($\Delta G < 0$; ΔH e $\Delta S > 0$), com uma constante de afinidade de 1 ordem de magnitude maior em pH 8,0. Comparativamente, a interação ainda apresenta maior afinidade com o estado monomérico (Y160F) do que com o dimérico (Y160).

A diferença de epítomos entre as duas condições de pH somada às análises computacionais evidenciaram diferentes encaixes da molécula de cumarina em relação ao bolsão hidrofóbico do sítio II do domínio SH2, comprovando que as mudanças conformacionais induzidas pelo aumento de pH modularam a afinidade de interação. Contudo, a estabilidade estrutural da proteína se mostrou dependente da concentração de cumarina, sendo fortemente perturbada na proporção de 2:1 de

concentração de ligante:proteína em pH 8,0 na caracterização realizada por dicroísmo circular.

Por fim, os valores do diâmetro hidrodinâmico e do tempo de correlação na presença de cumarina sugerem a dimerização da molécula e da Grb2 e uma nova hipótese foi levantada: a dimerização fotoquímica da cumarina possivelmente atua como uma ponte e conecta dois protômeros de Grb2 através dos domínios SH2.

Com base nesses resultados, é evidente que a conformação estrutural da Grb2 é sensível às mudanças de pH e que isso pode influenciar na interação com outras moléculas e proteínas parceiras na via de sinalização, portanto, tais mudanças devem ser levadas em consideração para o desenvolvimento de novas terapias anticarcinogênicas e medicamentos mais eficazes no combate ao câncer.

As perspectivas para os próximos trabalhos incluem continuar a caracterização estrutural da Grb2^{Y160F} nas duas condições de pH por SAXS e dicroísmo circular com radiação síncrotron; verificar a estabilidade térmica e química da interação através de calorimetria diferencial de varredura e supressão de fluorescência com cloreto de guanidina; verificar a dimerização da cumarina e posteriormente da proteína na presença da molécula por infravermelho; iniciar testes em cultura celular.

REFERÊNCIAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The Global Cancer Observatory**: All cancers fact sheet. International Agency for Research on Cancer. 2020. 2 p. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. Acesso em: 18 set. 2022.
- [2] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. Acesso em: 15 set. 2022.
- [3] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). O que é câncer? 30 nov. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 15 fev. 2022.
- [4] HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- [5] WEBB, Bradley A. et al. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 9, p. 671-677, 2011.
- [6] TARI, Ana M.; LOPEZ-BERESTEIN, Gabriel. GRB2: a pivotal protein in signal transduction. In: **Seminars in oncology**. WB Saunders, 2001. p. 142-147.
- [7] LIN, Chi-Chuan et al. Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2. **Cell**, v. 149, n. 7, p. 1514-1524, 2012.
- [8] AHMED, Zamal et al. Grb2 monomer–dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2015.
- [9] AHMED, Zamal et al. Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 493-504, 2013.
- [10] LIN, Chi-Chuan et al. Grb2 binding induces phosphorylation-independent activation of Shp2. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2021.
- [11] LIN, Chun-Wei et al. A two-component protein condensate of the EGFR cytoplasmic tail and Grb2 regulates Ras activation by SOS at the membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 19, p. e2122531119, 2022.
- [12] HUANG, William YC et al. Phosphotyrosine-mediated LAT assembly on membranes drives kinetic bifurcation in recruitment dynamics of the Ras activator SOS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 29, p. 8218-8223, 2016.
- [13] YE, Zu et al. GRB2 enforces homology-directed repair initiation by MRE11. **Science Advances**, v. 7, n. 32, p. eabe9254, 2021.

- [14] HOU, Bolin et al. Grb2 interacts with necrosome components and is involved in rasfonin-induced necroptosis. **Cell death discovery**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2022.
- [15] LAVANIA, Umesh C. Evolving trends in plant-based drug discovery. **Plant Genetic Resources**, v. 14, n. 4, p. 243-245, 2016.
- [16] DZOBO, Kevin. The role of natural products as sources of therapeutic agents for innovative drug discovery. **Comprehensive Pharmacology**, p. 408, 2022.
- [17] MOHLER, J. L. et al. Coumarin (1, 2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 120, n. 1, p. S35-S38, 1994.
- [18] LOPEZ-GONZALEZ, Jose Sullivan et al. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung cancer**, v. 43, n. 3, p. 275-283, 2004.
- [19] MUSA, Musiliyu A.; COOPERWOOD, John S.; KHAN, M. Omar F. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 26, p. 2664-2679, 2008.
- [20] HOVEIZI, Elham; HUSHMANDI, Kiavash. Evaluation of the Effects of Coumarin on Apoptotic Genes Expression in Lung and Colorectal Cancer Cells. **Cancer Cells**, v. 29, n. 3, p. 330-343, 2022.
- [21] MYERS, R. B.; PARKER, M.; GRIZZLE, W. E. The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 120, n. 1, p. S11-S13, 1994.
- [22] SRIVASTAVA, Jyoti; BARBER, Diane L.; JACOBSON, Matthew P. Intracellular pH sensors: design principles and functional significance. **Physiology**, 2007.
- [23] L'ALLEMAIN, G.; PARIS, Sonia; POUYSSEGUR, Jacques. Growth factor action and intracellular pH regulation in fibroblasts. Evidence for a major role of the Na⁺/H⁺ antiport. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5809-5815, 1984.
- [24] MOOLENAAR, Wouter H. Effects of growth factors on intracellular pH regulation. **Annual Review of Physiology**, v. 48, n. 1, p. 363-376, 1986.
- [25] BUSCO, Giovanni et al. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 10, p. 3903-3915, 2010.
- [26] GILLIES, Robert J. et al. MRI of the tumor microenvironment. **Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine**, v. 16, n. 4, p. 430-450, 2002.
- [27] GALLAGHER, Ferdia A. et al. Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ¹³C-labelled bicarbonate. **Nature**, v. 453, n. 7197, p. 940-943, 2008.

- [28] STÜWE, Laura et al. pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. **The Journal of Physiology**, v. 585, n. 2, p. 351-360, 2007.
- [29] POUYSSEUR, J. et al. Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. **FEBS letters**, v. 190, n. 1, p. 115-119, 1985.
- [30] CROSBY, Meredith E. Cell cycle: principles of control. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 80, n. 3, p. 141, 2007.
- [31] LAGADIC-GOSSMANN, D.; HUC, Laurence; LECUREUR, V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, n. 9, p. 953-961, 2004.
- [32] LIBERTI, Maria V.; LOCASALE, Jason W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211-218, 2016.
- [33] ROBEY, Ian F. et al. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. **Cancer research**, v. 69, n. 6, p. 2260-2268, 2009.
- [34] STOCK, Christian; SCHWAB, Albrecht. Protons make tumor cells move like clockwork. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 458, n. 5, p. 981-992, 2009.
- [35] NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.
- [36] VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.
- [37] SANCHES, Karoline. Dinâmica estrutural da proteína adaptadora Grb2, seu domínio SH2 e a interação com cumarina por ressonância magnética nuclear e fluorescência. 2019.
- [38] KIM, Eun Kyung; CHOI, Eui-Ju. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010.
- [39] TEDESCO, Jéssica Andrade. Caracterização biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua dinâmica de interação. 2019.
- [40] MAIGNAN, Sebastien et al. Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. **Science**, v. 268, n. 5208, p. 291-293, 1995.
- [41] BELOV, Artur A.; MOHAMMADI, Moosa. Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling. **Science signaling**, v. 5, n. 249, p. pe49-pe49, 2012.

- [42] MARUYAMA, Ichiro N. Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. **Cells**, v. 3, n. 2, p. 304-330, 2014.
- [43] RIERA, Ludovica et al. Involvement of Grb2 adaptor protein in nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK)-mediated signaling and anaplastic large cell lymphoma growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 34, p. 26441-26450, 2010.
- [44] WILKIE, Andrew OM et al. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. **Nature genetics**, v. 9, n. 2, p. 165-172, 1995.
- [45] ITOH, Hiroshi et al. Preferential alternative splicing in cancer generates a K-sam messenger RNA with higher transforming activity. **Cancer Research**, v. 54, n. 12, p. 3237-3241, 1994.
- [46] HATTORI, Yutaka et al. Immunohistochemical detection of K-sam protein in stomach cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 2, n. 8, p. 1373-1381, 1996.
- [47] GARTSIDE, Michael G. et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 41-54, 2009.
- [48] CHA, Jiyoun Y. et al. Involvement of fibroblast growth factor receptor 2 isoform switching in mammary oncogenesis. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 435-445, 2008.
- [49] CHAN, Gordon; KALAITZIDIS, Demetrios; NEEL, Benjamin G. The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. **Cancer and metastasis reviews**, v. 27, n. 2, p. 179-192, 2008.
- [50] PYLAYEVA-GUPTA, Yuliya; GRABOCKA, Elda; BAR-SAGI, Dafna. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761-774, 2011.
- [51] PHILIP, Vivek et al. A survey of aspartate-phenylalanine and glutamate-phenylalanine interactions in the protein data bank: Searching for anion- π pairs. **Biochemistry**, v. 50, n. 14, p. 2939-2950, 2011.
- [52] ANNUNZIATA, Francesca et al. An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4618, 2020.
- [53] SANCHES, Karoline et al. Grb2 dimer interacts with Coumarin through SH2 domains: A combined experimental and molecular modeling study. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02869, 2019.
- [54] OJALA, Tiina et al. Biological screening of plant coumarins. 2001.

- [55] KÜPELİ AKKOL, Esra et al. Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1959, 2020.
- [56] GRÖTZ, K. A. et al. Prophylaxis of radiogenic sialadenitis and mucositis by coumarin/troxerutine in patients with head and neck cancer—a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind study. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 1, p. 34-39, 2001.
- [57] WEBER, U. S.; STEFFEN, B.; SIEGERS, C. P. Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, v. 99, n. 2, p. 193-206, 1998.
- [58] AITKEN, Alastair; LEARMONTH, Michèle P. Protein determination by UV absorption. In: **The protein protocols handbook**. Humana Press, Totowa, NJ, 2009. p. 3-6.
- [59] TABOADA, Pablo et al. Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous–alcohol mixed solvents. **Chemical Physics**, v. 340, n. 1-3, p. 59-68, 2007.
- [60] KELLY, Sharon M.; JESS, Thomas J.; PRICE, Nicholas C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.
- [61] MICSONAI, András et al. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, 2022.
- [62] LAKOWICZ, Joseph R. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy**. Boston, MA: springer US, 2006.
- [63] SANCHES, Karoline et al. Thermodynamic profile and molecular modeling of the interaction between Grb2 dimer and flavonoids Rutin and Morin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1234, p. 130164, 2021.
- [64] SILVA, Paulo Henrique da. Estudos da interação da proteína adaptadora Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) com os flavonoides morina e rutina. 2017.
- [65] YUZAWA, Satoru et al. Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for target recognition. **Journal of molecular biology**, v. 306, n. 3, p. 527-537, 2001.
- [66] NICO, J. et al. Changes in structural dynamics of the Grb2 adaptor protein upon binding of phosphotyrosine ligand to its SH2 domain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1700, n. 1, p. 53-64, 2004.
- [67] LIAO, Tsung-Jen et al. SOS1 interacts with Grb2 through regions that induce closed nSH3 conformations. **The Journal of Chemical Physics**, v. 153, n. 4, p. 045106, 2020.

- [68] ARZENŠEK, Dejan; PODGORNIK, Rudolf; KUZMAN, Drago. Dynamic light scattering and application to proteins in solutions. In: **Seminar, Department of Physics, University of Ljubljana**. 2010. p. 1-18.
- [69] MICSONAI, András; BULYÁKI, Éva; KARDOS, József. BeStSel: from secondary structure analysis to protein fold prediction by circular dichroism spectroscopy. In: **Structural Genomics**. Humana, New York, NY, 2021. p. 175-189.
- [70] CHAKRABARTTY, Avijit; BALDWIN, Robert L. Stability of α -helices. **Advances in protein chemistry**, v. 46, p. 141-176, 1995.
- [71] MAKHATADZE, George I. Thermodynamics of α -helix formation. **Advances in protein chemistry**, v. 72, p. 199-226, 2005.
- [72] WALLACE, Bonnie A. et al. Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) spectroscopy: An emerging method in structural biology for examining protein conformations and protein interactions. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 649, n. 1, p. 177-178, 2011.
- [73] FATH, Isabelle et al. Cloning of a Grb2 isoform with apoptotic properties. **Science**, v. 264, n. 5161, p. 971-974, 1994.
- [74] ROMERO, Francisco et al. Grb2 and its apoptotic isoform Grb3-3 associate with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, and these interactions are modulated by poly (U) RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 13, p. 7776-7781, 1998.
- [75] RESHETNYAK, Yana K.; BURSTEIN, Edward A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. **Biophysical journal**, v. 81, n. 3, p. 1710-1734, 2001.
- [76] BURSTEIN, E. A.; VEDENKINA, N. S.; IVKOVA, i MN. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. **Photochemistry and photobiology**, v. 18, n. 4, p. 263-279, 1973.
- [77] SCHIEBEL, Johannes et al. Intriguing role of water in protein-ligand binding studied by neutron crystallography on trypsin complexes. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2018.
- [78] OLSSON, Tjelvar SG et al. The thermodynamics of protein–ligand interaction and solvation: insights for ligand design. **Journal of molecular biology**, v. 384, n. 4, p. 1002-1017, 2008.
- [79] DING, Fei et al. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4083-4089, 2009.

[80] WEISS, James N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 11, p. 835-841, 1997.

[81] LADBURY, John E.; DOYLE, Michael L. (Ed.). **Biocalorimetry 2: applications of calorimetry in the biological sciences**. John Wiley & Sons, 2004.

[82] WANG, Wen-Jie et al. Red-shift in fluorescence emission of D–A type asymmetrical Zn (ii) complexes by extending the π – π stacking interaction. **RSC advances**, v. 7, n. 33, p. 20488-20493, 2017.

[83] HINOUE, Tomoaki et al. Regulation of π -Stacked Anthracene Arrangement for Fluorescence Modulation of Organic Solid from Monomer to Excited Oligomer Emission. **Chemistry–A European Journal**, v. 18, n. 15, p. 4634-4643, 2012.

[84] CAO, Xinhua et al. Large red-shifted fluorescent emission via intermolecular π – π stacking in 4-ethynyl-1, 8-naphthalimide-based supramolecular assemblies. **Langmuir**, v. 30, n. 39, p. 11753-11760, 2014.

[85] D'AURIA, Maurizio; RACIOPPI, Rocco. The photodimerisation of coumarin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 163, n. 3, p. 557-559, 2004.

[86] HAMMOND, George S.; STOUT, Charles A.; LAMOLA, Angelo A. Mechanisms of photochemical reactions in solution. XXV. The photodimerization of coumarin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 15, p. 3103-3106, 1964.

[87] CAZIN, Ines et al. Recent advances in functional polymers containing coumarin chromophores. **Polymers**, v. 13, n. 1, p. 56, 2020.

[88] YU, Xiuling et al. Selectivity in the Photodimerization of 6-Alkylcoumarins. **The Journal of organic chemistry**, v. 68, n. 19, p. 7386-7399, 2003.

[89] MALVERN PANALYTICAL. **ZETASIZER NANO BASIC GUIDE**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/br/learn/knowledge-center/user-manuals/MAN0486EN>. Acesso em: 26 set. 2022.

ANEXO I – PROTOCOLO KIT *QIAPREP SPIN MINIPREP* (QIAGEN)

Purificação de plasmídeos recombinantes

1. Centrifugar a cultura de bactérias a 8.000 RPM por 3 minutos a 25°C e coletar o pellet;
2. Ressuspender o pellet em 250 µL da solução P1 e transferir para um micro tubo de centrífuga;
3. Adicionar 250 µL da solução P2 e homogeneizar por inversão (4-6 vezes) até a solução ficar clara;
4. Adicionar 350 µL da solução N3 e homogeneizar por inversão (4-6 vezes);
5. Centrifugar o micro tubo a 13.000 RPM por 10 minutos;
6. Coletar 800 µL do sobrenadante e aplicar na coluna QIAprep 2.0 spin;
7. Centrifugar por 1 minuto e descartar o líquido decantado;
8. Lavar a coluna com 750 µL da solução PE e centrifugar por 1 min e descartar o líquido decantado;
9. Centrifugar por 1 minuto novamente para remover a solução residual;
10. Transferir a coluna para um micro tubo autoclavado de 1,5 mL e adicionar 60 µL do tampão EB;
11. Aguardar 1 minuto em repouso e centrifugar novamente por 1 minuto.