

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 15/09/2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Jéssica Andrade Tedesco

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

São José do Rio Preto

2023

Jéssica Andrade Tedesco

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

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

São José do Rio Preto

2023

T256e

Tedesco, Jéssica Andrade

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

Tedesco. -- São José do Rio Preto, 2023

179 p. : il., tabs.

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

Orientador: Fernando Alves de Melo

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Jéssica Andrade Tedesco

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

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

Financiadora: CAPES

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida

Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

USP - Ribeirão Preto

Profa. Dra. Rosângela Itri

USP - São Paulo

Prof. Dra. Eneida de Paula

UNICAMP

São José do Rio Preto

15 de setembro de 2023

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

À banca por aceitar avaliar e contribuir com este trabalho.

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

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

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”
(George Bernard Shaw)*

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

Figura 9 –	Representação da estrutura cristalográfica da proteína Grb2 dimérica (domínio cSH3 em vermelho, SH2 em verde e nSH3 em azul).	50
Figura 10 –	Estrutura tridimensional do domínio cSH3 adaptada da estrutura cristalográfica da proteína adaptadora Grb2 através do PDB ID: 1GRI.	51
Figura 11 –	Estrutura tridimensional do domínio SH2 com a nomenclatura de suas respectivas estruturas secundárias e a alça EF.	52
Figura 12 –	Estrutura tridimensional cristalográfica do dímero de SH2 formado através de <i>domain-swapping</i> . Os protômeros foram identificados de cores diferentes para evidenciar a troca da hélice $\alpha 3$ e o alongamento da alça EF.	53
Figura 13 –	Estrutura tridimensional do dímero da proteína Grb2 mediado pelo <i>domain-swapping</i> dos domínios SH2.	54
Figura 14 –	Exemplos de Cumarinas com suas respectivas estruturas planares.	55
Figura 15 –	(A) Espectro de emissão de fluorescência de 2 μ M de proteína Grb2 dimérica em pH 8.0 na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula de Cumarina.	57
Figura 16 –	Epítomos da molécula de Cumarina interagindo com a proteína Grb2 em pH 8.0 computados através da técnica de STD.	57
Figura 17 –	Representação do complexo Grb2-Cumarina para a interação com os aminoácidos destacados do domínio SH2 obtidos computacionalmente.	58

Figura 18 –	Espectro de emissão de fluorescência de 2 μ M de proteína Grb2 Y160F em pH 7.0 e 8.0 na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula de Cumarina.	59
Figura 19 –	Epítomos da molécula de Cumarina interagindo com a proteína Grb2 Y160F em pH 7.0 (A) e 8.0 (B) computados através da técnica de STD.	60
Figura 20 –	Representação do complexo Grb2 Y160F-Cumarina para a interação em pH 7.0 e 8.0 com os aminoácidos destacados do domínio SH2 obtidos computacionalmente.	61
Figura 21 –	Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 WT por afinidade ao Cobalto. MM – Marcador de massa molecular (kDa); Flow – proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 – 1000 mM – concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.	74
Figura 22 –	Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 WT em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). Nota-se um deslocamento no volume de eluição dependente do pH.	75

- Figura 23 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 WT obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas do DSC para a proteína Grb2 WT foram obtidas entre 20 e 80 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min. Em preto, tem-se a curva experimental obtida, em vermelho seu respectivo *fit*. Em verde tem-se a primeira deconvolução, seguida da segunda em azul e da terceira em ciano. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para se ajustar à curva experimental e cada uma delas pode ser associada aos três domínios da proteína. (A) Em pH 7.0 é observado um termograma estreito, correspondente à uma maior cooperatividade entre os domínios durante o processo de desnaturação térmica. (B) Um termograma mais amplo pode ser observado em pH 8.0, significando que os domínios desnaturam mais independente uns dos outros em um processo no qual a cooperatividade térmica é significativamente baixa. 76
- Figura 24 – Gráfico de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 WT em diferentes pHs básicos: 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho). Nota-se em ambas as curvas a presença de dois picos, sendo o primeiro muito mais presente com porcentagem em massa perto de 100%, o qual foi considerado neste trabalho. 79
- Figura 25 – Coeficiente de correlação da proteína Grb2 WT em pH 7.0 (preto) e pH 8.0 (vermelho) ao longo do tempo. O menor decaimento do coeficiente em pH 8.0 indica um volume maior ocupado pela proteína quando comparado com a amostra em pH 7.0, a qual apresenta um decaimento mais rápido do coeficiente de correlação. 80

Figura 26 –	Parâmetros de relaxação T1 e T2 para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) para 7.54 ppm adquiridos por medidas de ^1H – RMN. Ambos os parâmetros foram ajustados exponencialmente pelas equações presentes em cada gráfico.	81
Figura 27 –	Espectro de Infravermelho da proteína Grb2 WT nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).	83
Figura 28 –	Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 7. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta ($\sim 1680\text{ cm}^{-1}$), em verde alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}).	84
Figura 29 –	Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 8. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em verde é característica de alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}).	85

- Figura 30 – Espectro 2D ^1H , ^{15}N -HSQC de 350 μM de Grb2 WT em 87
20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0 contendo 50 mM
NaCl, 1 mM BME, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O . Os
assinalamentos foram realizados através de
comparação com assinalamentos dos domínios SH2 e
cSH3 isolados depositados no *Biological Magnetic
Resonance Bank* com IDs 27781 (SH2) e 18748 (cSH3).
- Figura 31 – Espectro 2D ^1H , ^{15}N -HSQC de 350 μM de Grb2 WT em 88
20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 8.0 contendo 50 mM
NaCl, 1 mM BME, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O . Os
assinalamentos foram realizados através de
comparação com assinalamentos dos domínios SH2 e
cSH3 isolados depositados no *Biological Magnetic
Resonance Bank* com IDs 27781 (SH2) e 18748 (cSH3).
- Figura 32 – Sobreposição dos espectros 2D ^1H , ^{15}N -HSQC da 89
proteína Grb2 WT com concentração de 350 μM em 20
mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0 (verde) e pH 8.0 (roxo)
contendo 50 mM NaCl, 1 mM BME, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O .
Os resíduos de aminoácidos em comum de ambos os
pHs são mostrados na figura e as setas indicam os que
apresentam maior deslocamento. Tais resíduos de
aminoácidos são mostrados em maior resolução na
parte inferior da figura.
- Figura 33 – ^{15}N perturbação do deslocamento químico (CSP) por 90
resíduo de aminoácido de Grb2 WT. Os valores de CSP
foram obtidos através do *software* CcpNMR por
comparação entre os espectros do pH 7.0 e pH 8.0 e
plotados no programa Origin Pro 8. A linha cheia faz
referência à média dos deslocamentos (0.012 ppm) e tal
média acrescida do desvio padrão é definida pela linha
pontilhada (0.019 ppm).

Figura 34 –	Estrutura da proteína Grb2 WT cristalográfica (PDB: 1GRI). Os resíduos de aminoácido com maiores valores de CSP estão destacados em amarelo. A grande maioria destes estão localizados em estruturas secundárias ordenadas (hélices-alfa para o SH2 e fitas-beta para o cSH3).	91
Figura 35 –	Diferenças de cargas teóricas em pH 7.0 e 8.0 para a proteína Grb2 WT. A) Estrutura cristalográfica dimérica da proteína Grb2 WT (PDB: 1GRI). As cores representam os domínios cSH3 (azul), SH2 (vermelho) e nSH3 (laranja), assim como as cadeias A (azul) e B (cinza). Os resíduos destacados apresentam mudanças na protonação em pH 7.0 e 8.0. B) Representação da superfície da estrutura cristalográfica de Grb2 WT colorida de acordo com o potencial eletrostático e mostrando as regiões que são afetadas pelas mudanças de protonação.	93
Figura 36 –	Análise da dinâmica molecular. A) <i>Root-Mean-Square Fluctuations</i> (RMSF) da proteína Grb2 WT e sobreposição das estruturas durante os 500 ns da dinâmica molecular. B) Área Acessível ao Solvente (SASA). C) Raio de giro. Todos os gráficos e estruturas foram coloridos de acordo com a protonação relativa ao pH.	94
Figura 37 –	Decomposição do movimento da dinâmica molecular. A) Vetores representando dois movimentos com maior amplitude de Grb2 WT durante a dinâmica molecular. As estruturas representam o movimento calculado por esses vetores. Estas foram coloridas de acordo com a direção do movimento indicado pela flecha na barra de cores. B) Vetores com maior intensidade são mostrados,	96

indicando a direção e movimento da estrutura da proteína.

- Figura 38 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μ M de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 295 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 98
- Figura 39 – Espectro de emissão de fluorescência de 2 μ M de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 295 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo de fluorescência em maior resolução. 99
- Figura 40 – Gráfico de Stern-Volmer. Supressão da fluorescência de Grb2 WT nas temperaturas 291 (preto), 295 (azul) e 299 K (vermelho) pela concentração de Cumarina. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. 100
- Figura 41 – Gráfico Duplo-log. Dados relativos ao efeito da supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2 WT na presença de Cumarina, para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B), nas temperaturas 291 (preto), 295 (vermelho) e 299 (azul) K. Inserido no canto superior direito encontra-se o gráfico de van't Hoff, responsável pela determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação. 101
- Figura 42 – Parâmetros termodinâmicos caracterizados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B). Em rosa está a contribuição da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde a entalpia (ΔH), e em roxo a 104

entropia (ΔS) levando em consideração a temperatura analisada.

- Figura 43 – Espectro de STD do complexo Grb2 WT – Cumarina em pH 7.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre Grb2 WT e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 WT. 106
- Figura 44 – Espectro de STD do complexo Grb2 WT – Cumarina em pH 8.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre Grb2 WT e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 WT. 106
- Figura 45 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 7 contendo o dobro de Cumarina em concentração. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. As deconvoluções em vermelho e verde são características de voltas beta (~ 1680 e 1680 cm^{-1}), em azul alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em ciano representam estruturas desordenadas ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e em rosa e amarelo duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}). 108

- Figura 46 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 WT em pH 8 com o dobro da concentração de Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em vermelho é característico de voltas beta ($\sim 1690\text{ cm}^{-1}$), em verde alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$), em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}) e em amarelo estruturas de agregados de fita beta ($\sim 1610\text{ cm}^{-1}$). 110
- Figura 47 – Domínio SH2 da proteína Grb2 (PDB: 1GHU) [60] com os triptofanos 60 (vermelho) e 121 (azul) destacados. 114
- Figura 48 – Frustração conformacional da proteína Grb2 WT (acima) e com a mutação W60A (abaixo). As linhas em vermelho demonstram regiões frustradas conformacionalmente da proteína, enquanto que em verde, as regiões não-frustradas. 115
- Figura 49 – Contatos realizados pelo resíduo 60 da proteína Grb2 em sua estrutura cristalográfica quando este é um triptofano (contatos específicos em vermelho) e quando este é uma alanina (contatos específicos em verde). Os resíduos marcados em azul são comuns para os dois resíduos (triptofano e alanina). Cada resíduo em contato está especificado na parte direita da imagem, assim como a distância deste ao resíduo 60 e a porcentagem em que o contato acontece durante a dinâmica molecular. 116

Figura 50 –	Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 W60A por afinidade ao Cobalto. MM - Marcador de massa molecular (kDa); Flow - proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 - 1000 mM - concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.	117
Figura 51 –	Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).	118
Figura 52 –	Sobreposição dos perfis cromatográficos da proteína Grb2 WT (preto) e Grb2 W60A (vermelho) em pH 7.0.	118
Figura 53 –	Gráfico de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 W60A nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).	119
Figura 54 –	Coeficiente de correlação da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) ao longo do tempo.	120
Figura 55 –	Gráfico de espalhamento dinâmico da luz comparativo das proteínas Grb2 WT e W60A em pH 8.0 demonstrando um maior diâmetro hidrodinâmico para a proteína.	121
Figura 56 –	Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 7.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta ($\sim 1680\text{ cm}^{-1}$), em verde alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas (~ 1650	122

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

- Figura 57 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de alfa-hélices ($\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}). 124
- Figura 58 – Espectro de emissão de fluorescência de $2 \mu\text{M}$ de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 295 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito a região de máximo da fluorescência encontra-se em maior resolução. 127
- Figura 59 – Espectro de emissão de fluorescência de $2 \mu\text{M}$ de proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 290 nm e temperatura de 295 K. No canto superior direito apresenta-se a região de máximo de fluorescência em maior resolução. 128
- Figura 60 – Gráfico de Stern-Volmer. Supressão da fluorescência de Grb2 W60A nas temperaturas 291 (preto), 295 (azul) e 299 K (vermelho) pela concentração de Cumarina. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. 129

- Figura 61 – Gráfico Duplo-log. Dados relativos ao efeito da supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2 W60A na presença de Cumarina, para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B), nas temperaturas 291 (preto), 295 (vermelho) e 299 K (azul). Inserido no canto superior direito encontra-se o gráfico de van't Hoff, responsável pela determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação. 131
- Figura 62 – Parâmetros termodinâmicos caracterizados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff para pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B). Em rosa está a contribuição da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde a entalpia (ΔH), e em roxo a entropia (ΔS) levando em consideração a temperatura analisada. 133
- Figura 63 – Espectro de STD do complexo Grb2 W60A - Cumarina em pH 7.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento de *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre a proteína e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 W60A. 135
- Figura 64 – Espectro de STD do complexo Grb2 W60A - Cumarina em pH 8.0. Em vermelho, o experimento de *off-resonance* e em azul, o experimento de *on-resonance* indicando que ocorre a interação entre a proteína e a molécula de Cumarina. Os números indicam os assinalamentos dos hidrogênios da Cumarina e as porcentagens referentes à proximidade destes hidrogênios da proteína Grb2 W60A. 135

- Figura 65 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 7 contendo a mesma concentração de Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta ($\sim 1690\text{ cm}^{-1}$), em verde alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}). 137
- Figura 66 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. A deconvolução em verde é característico de alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$), em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}). 139
- Figura 67 – Frustração conformacional da proteína Grb2 WT (acima) e com a mutação W121A (abaixo). As linhas em vermelho mostram regiões frustradas conformacionalmente da proteína, enquanto que em verde, as regiões não-frustradas. 144

Figura 68 –	Contatos realizados pelo resíduo 121 da proteína Grb2 em sua estrutura cristalográfica quando este é um triptofano (contatos específicos em vermelho) e quando este é uma alanina (contatos específicos em verde). Os resíduos marcados em azul são comuns para os dois resíduos (triptofano e alanina). Cada resíduo em contato está especificado na parte direita da imagem, assim como a distância deste ao resíduo 121 e a porcentagem em que o contato acontece durante a dinâmica molecular.	145
Figura 69 –	Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 W121A por afinidade ao Cobalto. MM - Marcador de massa molecular (kDa); Flow - proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 - 1000 mM - concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.	146
Figura 70 –	Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 W121A em pH 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho).	146
Figura 71 –	Sobreposição dos perfis cromatográficos das proteínas Grb2 WT (preto), W60A (vermelho) e W121A (azul) em pH 7.0 evidenciando a diferença no volume de eluição de cada uma das proteínas e a diferença em relação à proteína W121A.	147
Figura 72 –	Gráficos de espalhamento dinâmico da luz: distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico (esquerda) e coeficiente de correlação (direita) da proteína Grb2 W121A em diferentes pHs básicos: 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) referentes ao primeiro pico de eluição da cromatografia por exclusão molecular.	148

Figura 73 –	Gráficos de espalhamento dinâmico da luz: distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico (esquerda) e coeficiente de correlação (direita) da proteína Grb2 W121A nos pHs 7.0 (preto) e 8.0 (vermelho) para o segundo pico de eluição da cromatografia por exclusão molecular.	149
Figura 74 –	Distribuição de volume por diâmetro hidrodinâmico das proteínas Grb2 WT e Grb2 W121A nos pHs 7.0 (esquerda) e 8.0 (direita).	150
Figura 75 –	Gráfico da variação do diâmetro das estruturas Grb2 WT dimérica (preto) e Grb2 W121A monomérica (vermelho) ao longo dos 300 ns de dinâmica molecular.	151
Figura 76 –	Estrutura mais representativa do dímero de Grb2 WT (esquerda) e do monômero de Grb2 W121A (direita) e seu diâmetro associado.	151
Figura 77 –	Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W121A em pH 7.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em vermelho é característica de voltas beta ($\sim 1680\text{ cm}^{-1}$), em verde alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}).	153

- Figura 78 – Espectro de Infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W121A em pH 8.0. O espectro obtido experimentalmente está representado em preto, enquanto o calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro. As deconvoluções foram realizadas no número mínimo necessário para a melhor representação do espectro experimental. A deconvolução em verde é característica de alfa-hélices ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$), em azul representam estruturas desordenadas ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e em ciano e rosa duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620 cm^{-1}). 154
- Figura 79 – Espectro de emissão de fluorescência de $2\text{ }\mu\text{M}$ de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 291 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 170
- Figura 80 – Espectro de emissão de fluorescência de $2\text{ }\mu\text{M}$ de proteína Grb2 WT na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 299 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 171
- Figura 81 – Espectro de emissão de fluorescência de $2\text{ }\mu\text{M}$ de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 291 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução. 172

Figura 82 –	Espectro de emissão de fluorescência de 2 μ M de proteína Grb2 WT em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 299 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.	173
Figura 83 –	Espectro de emissão de fluorescência de 2 μ M de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 291 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.	174
Figura 84 –	Espectro de emissão de fluorescência de 2 μ M de proteína Grb2 W60A na ausência e presença de diferentes volumes de etanol absoluto em 299 K. (A) pH 7.0 e (B) pH 8.0. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.	175
Figura 85 –	Espectro de emissão de fluorescência de 2 μ M de proteína Grb2 W60A em pH 7.0 (A) e pH 8.0 (B) na ausência e na presença de diferentes concentrações da molécula supressora Cumarina com excitação em 295 nm e temperatura de 291 K. No canto superior direito encontra-se a região de máximo da fluorescência em melhor resolução.	176

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros termodinâmicos dos experimentos de DSC. Cada deconvolução em ambos os pHs estão associadas a diferentes temperaturas de <i>melting</i> e entalpias calorimétricas. As temperaturas de <i>melting</i> foram retiradas do valor máximo de C_p correspondente, enquanto as entalpias calorimétricas foram calculadas através da integração de cada deconvolução.	78
Tabela 2 –	Mudanças de entalpia de van't Hoff associadas a cada curva de deconvolução nos pHs 7.0 e 8.0. A entalpia foi calculada pela equação de van't Hoff para cada deconvolução assim como para o termograma completo.	78
Tabela 3 –	Valores médios de T_1 e T_2 dos 13 pontos analisados de 7.0 a 9.0 ppm em ambos os pHs. O valor maior razão T_1/T_2 em pH 8.0 indica que este possui um diâmetro maior do que a proteína em pH 7.0.	82
Tabela 4 –	Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 7.0. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.	85
Tabela 5 –	Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho evidenciando o aumento percentual de estruturas desordenadas acompanhado com um decréscimo de folhas β .	86
Tabela 6 –	Resíduos de aminoácidos com valores de perturbação de deslocamento químico maiores do que a média acrescida do desvio padrão e seus respectivos valores.	91

Tabela 7 –	Constantes de supressão de Stern-Volmer. Valores obtidos para o complexo Grb2 WT – Cumarina nas temperaturas de 291 K, 295 K e 299 K através da inclinação da reta do ajuste linear para ambos os pHs.	101
Tabela 8 –	Coeficiente de Hill (n_H) e constante de associação (K_a) determinados através dos gráficos de duplo-log para as três temperaturas em ambos pHs.	103
Tabela 9 –	Parâmetros termodinâmicos para os pHs 7.0 e 8.0 determinados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff.	105
Tabela 10 –	Valores dos epítomos da molécula de Cumarina na interação com Grb2 WT nos pHs 7.0 e 8.0.	107
Tabela 11 –	Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 7.0 com o dobro da concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.	109
Tabela 12 –	Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 WT em pH 8.0 com o dobro da concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.	110

Tabela 13 –	Comparação das porcentagens de estruturas secundárias (α hélices, folhas β e estruturas desordenadas) da proteína Grb2 WT pura nos pHs 7.0 e 8.0 e da interação entre Cumarina e Grb2 WT em pH 8,0 na proporção 2:1.	111
Tabela 14 –	Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W60A em pH 7.0 com seus respectivos centros e porcentagens.	123
Tabela 15 –	Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com seus respectivos centros e porcentagens.	125
Tabela 16 –	Constantes de supressão de Stern-Volmer. Valores obtidos para o complexo Grb2 W60A – Cumarina nas temperaturas de 291, 295 e 299 K através da inclinação da reta do ajuste linear para ambos os pHs.	130
Tabela 17 –	Coeficiente de Hill (n_H) e constante de associação (K_a) determinados através dos gráficos de duplo-log para as três temperaturas em ambos pHs.	132
Tabela 18 –	Parâmetros termodinâmicos para os pHs 7.0 e 8.0 determinados através do ajuste linear do gráfico de van't Hoff.	134
Tabela 19 –	Valores dos epítomos da molécula de Cumarina na interação com Grb2 W60A nos pHs 7.0 e 8.0.	136
Tabela 20 –	Porcentagens calculadas através das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 W60A em pH 7.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi	138

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

Tabela 21 –	Porcentagens retiradas das deconvoluções do espectro de infravermelho para a proteína Grb2 W60A em pH 8.0 com a mesma concentração do ligante Cumarina. Os números de onda representam o centro da deconvolução e a porcentagem de cada estrutura foi calculada através da porcentagem da área de cada deconvolução em relação à área total do espectro.	140
Tabela 22 –	Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W121A em pH 7.0 com seus respectivos centros e porcentagens.	153
Tabela 23 –	Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W121A em pH 8.0 com seus respectivos centros e porcentagens.	155

LISTA ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ε - Coeficiente de extinção molar

l - Caminho Óptico

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

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

ΔG - Energia Livre de Gibbs

ΔH - Entalpia

ΔH_{cal} - Entalpia calorimétrica

ΔH_{VH} - Entalpia de van't Hoff

ΔS - Entropia

Abs_{277} - Absorção da luz em 277 nm

Abs_{280} - Absorção da luz em 280 nm

I_0 - intensidade do espectro de *off-resonance*

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

I_{STD} - intensidade do espectro da diferença

t_{HN} - Tempo de aquisição para o Hidrogênio

T_m - Temperatura de *melting*

t_N - Tempo de aquisição para o Nitrogênio

A/ALA - Alanina

aa - Aminoácido

ATR - Reflexão Total Atenuada

BME - β -mercaptoetanol

BMRB - *Biological Magnetic Resonance Bank*

C - concentração

C/CIS - Cisteína

CcpNMR - *Collaborative Computational Project for NMR*

CPMG - *Carr-Purcell-Meiboom-Gill*

CSP, $\Delta\sigma$ - *Chemical Shift Perturbations*

D/ASP - Aspartato

D_H - Diâmetro hidrodinâmico

DLS - Espalhamento Dinâmico da Luz

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade Óptica

DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura

E/GLU - Glutamato

F/PHE - Fenilalanina

FGFR - Proteína receptora de fatores de crescimento tirosina quinase

FGFR2 - *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*

FRET - Transferência Ressonante de Energia por Fluorescência

FSD - Deconvolução de Fourier

G/GLY - Glicina

GAP - *Gtpase-Activating Protein*

Grb2 - *Growth Factor Receptor Bound Protein 2*

Grb2 W121A - Grb2 mutação Triptofano 121 por Alanina

Grb2 W60A - Grb2 mutação Triptofano 60 por Alanina

Grb2 WT - Grb2 *wildtype*

GST - Glutathione-S-transferase

H/HIS - Histina

HSPG - *Heparan Sulfate Proteoglycan*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*

I/ILE - Isoleucina

IPTG - Isopropil β -D-tiogalactopiranosida

ITC - Calorimetria de Titulação Isotérmica

K/LYS - Lisina

K_a - constante de afinidade

K_{sv} - Constante de Stern-Volmer

L/LEU - Leucina

LB - Meio Líquido Luria-Bertani

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

M/MET - Metionina

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*

MM - Marcador de massa molecular

N/ASN - Asparagina

NF1 - *neurofibromin*

n_H - Coeficiente de Hill

OMS - Organização Mundial de Saúde

P/PRO - Prolina

PCA - *Principal component analysis*

PDB - *Protein Data Bank*

pH_e - pH extracelular

pH_i - pH intracelular

PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

pY - resíduo de tirosina fosforilada

Q/GLN - Glutamina

R/ARG - Arginina

Ras - *Rat Sarcoma virus protein*

RMSD - *Root mean square deviation*

RMSF - *Root mean square fluctuation*

RPM - Rotações por minuto

S/SER - Serina

SASA - *Accessible surface area*

SAXS - Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

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

SH2 - *Src homology domain 2*

SH3 - *Src homology domain 3*

SOS - *Son of Sevenless*

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

T/THR - Treonina

T1 - *Time-Lattice Relaxation*

T2 - *Transverse Relaxation*

V/Val - Valina

W/TRP - Triptofano

Y/TYR - Tirosina

SUMÁRIO

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

3.12.	Dinâmica e análises computacionais	72
4.	RESULTADOS	74
4.1.	Grb2 WT	74
4.1.1.	Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0	74
4.1.1.1.	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	75
4.1.1.2.	Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)	79
4.1.1.3.	T1 e T2 - ^1H -RMN	81
4.1.1.4.	Estrutura Secundária por Infravermelho	82
4.1.1.5.	$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC - RMN	86
4.1.1.6.	Estudos Computacionais	92
4.1.2.	Interação Grb2 WT e Cumarina nos pHs 7.0 e 8.0	97
4.1.2.1.	Espectroscopia de Fluorescência	97
4.1.2.2.	STD-RMN (<i>Saturation Transfer Difference</i>)	105
4.1.2.3.	Estrutura Secundária por Infravermelho	107
4.1.3.	Conclusões preliminares	111
4.2.	Grb2 W60A	114
4.2.1.	Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0	117
4.2.1.2.	Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)	119
4.2.1.3.	Estrutura Secundária por Infravermelho	121
4.2.2.	Interação Grb2 W60A e Cumarina pHs 7.0 e 8.0	125
4.2.2.1.	Espectroscopia de Fluorescência	126
4.2.2.2.	STD-RMN (<i>Saturation Transfer Difference</i>)	134
4.2.2.3.	Estrutura Secundária por Infravermelho	136
4.2.3.	Conclusões preliminares	140
4.3.	Grb2 W121A	143
4.3.1.	Caracterização estrutural e dinâmica nos pHs 7.0 e 8.0	145
4.3.1.2.	Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)	147

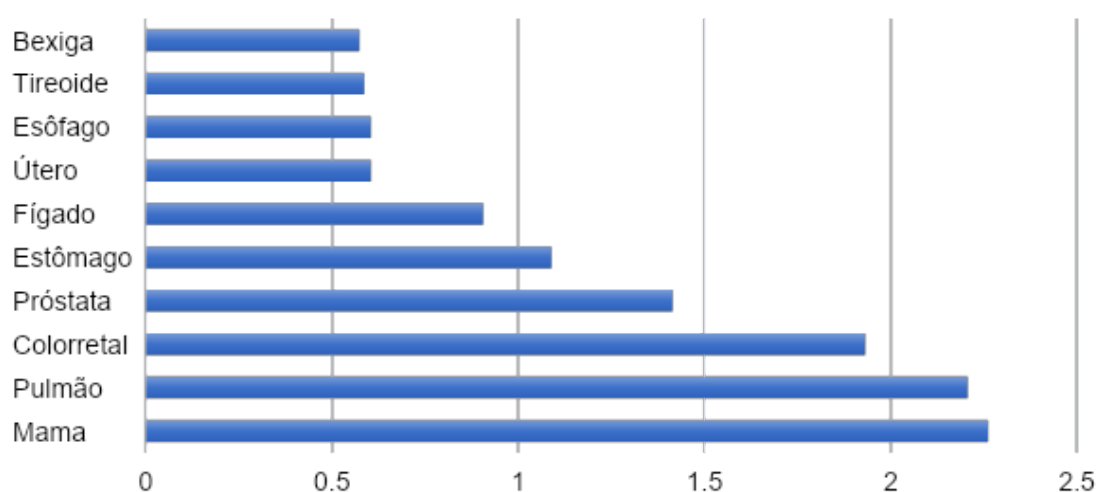
4.3.1.3.	Dinâmica Computacional	150
4.3.1.4.	Estrutura Secundária por Infravermelho	152
4.3.2.	Conclusões preliminares	155
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	157
	REFERÊNCIAS	161
	ANEXO A	170

1. INTRODUÇÃO

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

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

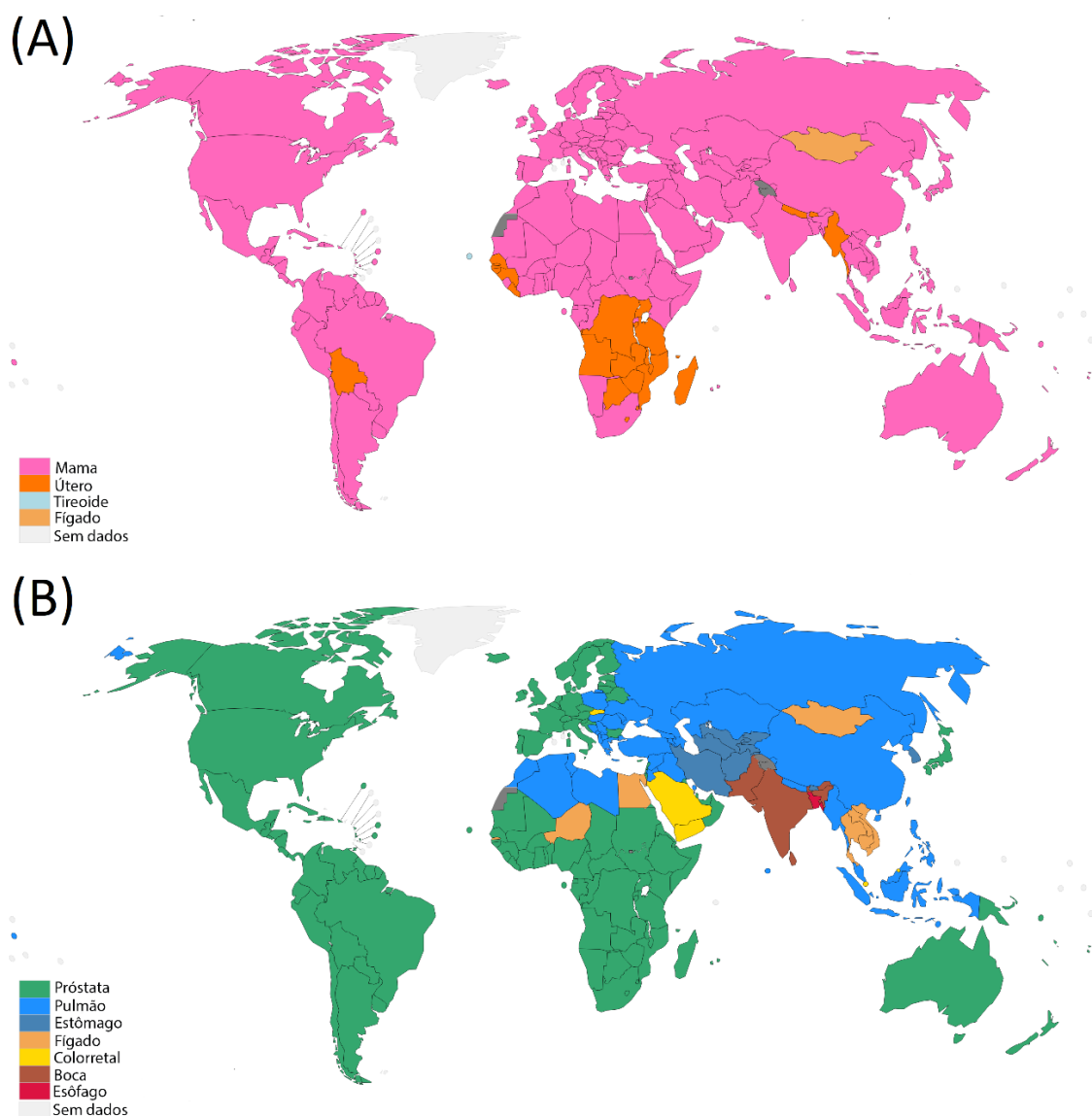
Figura 1 – Número estimado de casos incidentes de câncer mundialmente em 2020 para ambos os sexos. Mama (2.2 milhões), Pulmão (2.2 milhões), Colorretal (1.9 milhão), Próstata (1.4 milhão), Estômago (1.0 milhão), Fígado (0.9 milhão), Útero (0.8 milhão), Esôfago (0.6 milhão), Tireoide (0.58 milhão) e Bexiga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



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

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

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



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

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

- [1] R. SEVER e J. S. BRUGGE, “Signal Transduction in Cancer”, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 5, nº 4, p. a006098–a006098, abr. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a006098.
- [2] H. SUNG *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, nº 3, p. 209–249, maio 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [3] J. FERLAY *et al.*, “Cancer statistics for the year 2020: An overview”, *Int. J. Cancer*, vol. 149, nº 4, p. 778–789, ago. 2021, doi: 10.1002/ijc.33588.
- [4] G. KRAUSS, *Biochemistry of signal transduction and regulation*, 5., Completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2014.
- [5] A. L. LEHNINGER, D. L. NELSON, e M. M. COX, *Lehninger principles of biochemistry*, 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2005.
- [6] D. HANAHAN e R. A. WEINBERG, “Hallmarks of Cancer: The Next Generation”, *Cell*, vol. 144, nº 5, p. 646–674, mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [7] G. BUSCO *et al.*, “NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space”, *FASEB J.*, vol. 24, nº 10, p. 3903–3915, out. 2010, doi: 10.1096/fj.09-149518.
- [8] F. A. GALLAGHER *et al.*, “Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ¹³C-labelled bicarbonate”, *Nature*, vol. 453, nº 7197, p. 940–943, jun. 2008, doi: 10.1038/nature07017.
- [9] R. J. GILLIES, “In vivo molecular imaging”, *J. Cell. Biochem.*, vol. 87, nº S39, p. 231–238, 2002, doi: 10.1002/jcb.10450.
- [10] L. STÜWE *et al.*, “pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution: Migration correlates with a proton gradient at the plasma membrane”, *J. Physiol.*, vol. 585, nº 2, p. 351–360, dez. 2007, doi: 10.1113/jphysiol.2007.145185.
- [11] L. K. PUTNEY e D. L. BARBER, “Na-H Exchange-dependent Increase in Intracellular pH Times G2/M Entry and Transition”, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, nº 45, p. 44645–44649, nov. 2003, doi: 10.1074/jbc.M308099200.
- [12] H. J. PARK, J. C. LYONS, T. OHTSUBO, e C. W. SONG, “Cell cycle progression and apoptosis after irradiation in an acidic environment”, *Cell Death Differ.*, vol. 7, nº 8, p. 729–738, ago. 2000, doi: 10.1038/sj.cdd.4400702.

- [13] Y. ZHAO e A. A. ADJEI, “Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor”, *The Oncologist*, vol. 20, nº 6, p. 660–673, 2015, doi: 10.1634/theoncologist.2014-0465.
- [14] D. LIAO e R. S. JOHNSON, “Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer”, *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 26, nº 2, p. 281–290, jul. 2007, doi: 10.1007/s10555-007-9066-y.
- [15] A. K. ABBAS, A. H. LICHTMAN, S. PILLAI, e D. L. BAKER, *Cellular and molecular immunology*, Tenth edition. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2022.
- [16] D. VOET, J. G. VOET, e C. W. PRATT, *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*, 5th edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2016.
- [17] C. LEITE, J. COSTA, R. CALLADO, J. TORRES, R. LIMA JÚNIOR, e R. RIBEIRO, “Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in cancer”, *Braz. J Clin Oncol*, vol. 8, p. 29, 2012.
- [18] J. SCHLESSINGER, “Signal transduction by allosteric receptor oligomerization”, *Trends Biochem. Sci.*, vol. 13, nº 11, p. 443–447, nov. 1988, doi: 10.1016/0968-0004(88)90219-8.
- [19] B. ALBERTS, *Molecular biology of the cell*, Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015.
- [20] Z. AHMED *et al.*, “Direct binding of Grb2 SH3 domain to FGFR2 regulates SHP2 function”, *Cell. Signal.*, vol. 22, nº 1, p. 23–33, jan. 2010, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.08.011.
- [21] Z. AHMED *et al.*, “Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity”, *J. Cell Biol.*, vol. 200, nº 4, p. 493–504, fev. 2013, doi: 10.1083/jcb.201204106.
- [22] C. C. LIN *et al.*, “Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2”, *Cell*, vol. 149, nº 7, p. 1514–1524, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.033.
- [23] L. BUDAY e J. DOWNWARD, “Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor”, *Cell*, vol. 73, nº 3, p. 611–620, maio 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90146-H.
- [24] P. SHAPIRO, “Ras-MAP Kinase Signaling Pathways and Control of Cell Proliferation: Relevance to Cancer Therapy”, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 39, nº 4–5, p. 285–330, jan. 2002, doi: 10.1080/10408360290795538.

- [25] A. TARI, “GRB2: A pivotal protein in signal transduction”, *Semin. Oncol.*, vol. 28, p. 142–147, out. 2001, doi: 10.1016/S0093-7754(01)90291-X.
- [26] S. MAIGNAN, J.-P. GUILLOTEAU, N. FROMAGE, B. ARNOUX, J. BECQUART, e A. DUCRUIX, “Crystal Structure of the Mammalian Grb2 Adaptor”, *Science*, vol. 268, n° 5208, p. 291–293, abr. 1995, doi: 10.1126/science.7716522.
- [27] Z. AHMED *et al.*, “Grb2 monomer–dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function”, *Nat. Commun.*, vol. 6, n° 1, p. 7354, jun. 2015, doi: 10.1038/ncomms8354.
- [28] C. C. LIN *et al.*, “Receptor tyrosine kinases regulate signal transduction through a liquid-liquid phase separated state”, *Mol. Cell*, vol. 82, n° 6, p. 1089–1106.e12, 2022, doi: 10.1016/j.molcel.2022.02.005.
- [29] Z. YE *et al.*, “GRB2 enforces homology-directed repair initiation by MRE11”, *Sci. Adv.*, vol. 7, n° 32, p. 1–18, 2021, doi: 10.1126/sciadv.abe9254.
- [30] A. K. STAINTHORP *et al.*, “Regulation of microRNA expression by the adaptor protein GRB2”, *Sci. Rep.*, vol. 13, n° 1, p. 9784, jun. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-36996-3.
- [31] D. C. FLYNN, “Adaptor proteins”, *Oncogene*, vol. 20, n° 44, p. 6270–6272, out. 2001, doi: 10.1038/sj.onc.1204769.
- [32] R. REN, B. J. MAYER, P. CICCETTI, e D. BALTIMORE, “Identification of a Ten-Amino Acid Proline-Rich SH3 Binding Site”, *Science*, vol. 259, n° 5098, p. 1157–1161, fev. 1993, doi: 10.1126/science.8438166.
- [33] P. CHARDIN, D. CUSSAC, S. MAIGNAN, e A. DUCRUIX, “The Grb2 adaptor”, *FEBS Lett.*, vol. 369, n° 1, p. 47–51, ago. 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)00578-W.
- [34] A. GIUBELLINO, T. R. BURKE, e D. P. BOTTARO, “Grb2 signaling in cell motility and cancer”, *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 12, n° 8, p. 1021–1033, ago. 2008, doi: 10.1517/14728222.12.8.1021.
- [35] H. F. LODISH, Org., *Molecular cell biology*, 7th ed. New York: W.H. Freeman and Co, 2013.
- [36] N. SCHIERING, E. CASALE, P. CACCIA, P. GIORDANO, e C. BATTISTINI, “Dimer formation through domain swapping in the crystal structure of the Grb2-SH2-Ac-pYVNV complex”, *Biochemistry*, vol. 39, n° 44, p. 13376–13382, nov. 2000, doi: 10.1021/bi0012336.
- [37] P. NIOCHE *et al.*, “Crystal structures of the SH2 domain of Grb2: Highlight on

- the binding of a new high-affinity inhibitor”, *J. Mol. Biol.*, vol. 315, n° 5, p. 1167–1177, 2002, doi: 10.1006/jmbi.2001.5299.
- [38] A. P. BENFIELD, B. B. WHIDDON, J. H. CLEMENTS, e S. F. MARTIN, “Structural and energetic aspects of Grb2-SH2 domain-swapping”, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 462, n° 1, p. 47–53, jun. 2007, doi: 10.1016/j.abb.2007.03.010.
- [39] D. PAPAIOANNOU, S. GEIBEL, M. B. A. KUNZE, C. W. M. KAY, e G. WAKSMAN, “Structural and biophysical investigation of the interaction of a mutant Grb2 SH2 domain (W121G) with its cognate phosphopeptide”, *Protein Sci.*, vol. 25, n° 3, p. 627–637, mar. 2016, doi: 10.1002/pro.2856.
- [40] Y. HOSOE *et al.*, “Structural and functional properties of Grb2 SH2 dimer in CD28 binding”, *Biophys. Physicobiology*, vol. 16, p. 80–88, 2019, doi: 10.2142/biophysico.16.0_80.
- [41] M. J. BENNETT, S. CHOE, e D. EISENBERG, “Domain swapping: entangling alliances between proteins.”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, n° 8, p. 3127–3131, abr. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.8.3127.
- [42] Y. LIU e D. EISENBERG, “3D domain swapping: As domains continue to swap”, *Protein Sci.*, vol. 11, n° 6, p. 1285–1299, jun. 2002, doi: 10.1110/ps.0201402.
- [43] M. E. NEWCOMER, “Protein folding and three-dimensional domain swapping: a strained relationship?”, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 12, n° 1, p. 48–53, fev. 2002, doi: 10.1016/S0959-440X(02)00288-9.
- [44] A. SANDOUK *et al.*, “GRB2 dimerization mediated by SH2 domain-swapping is critical for T cell signaling and cytokine production”, *Sci. Rep.*, vol. 13, n° 1, dez. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-30562-7.
- [45] A. S. DHILLON, S. HAGAN, O. RATH, e W. KOLCH, “MAP kinase signalling pathways in cancer”, *Oncogene*, vol. 26, n° 22, p. 3279–3290, maio 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210421.
- [46] R. X.-D. SONG *et al.*, “Linkage of Rapid Estrogen Action to MAPK Activation by ER α -Shc Association and Shc Pathway Activation”, *Mol. Endocrinol.*, vol. 16, n° 1, p. 116–127, jan. 2002, doi: 10.1210/mend.16.1.0748.
- [47] I. S. BABINA e N. C. TURNER, “Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, n° 5, p. 318–332, maio 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.8.
- [48] K. SANCHES *et al.*, “Grb2 dimer interacts with Coumarin through SH2 domains:

- A combined experimental and molecular modeling study”, *Heliyon*, vol. 5, n° 11, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02869.
- [49] K. SANCHES *et al.*, “Thermodynamic profile and molecular modeling of the interaction between Grb2 dimer and flavonoids Rutin and Morin”, *J. Mol. Struct.*, vol. 1234, p. 130164, 2021, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130164.
- [50] A. THAKUR, R. SINGLA, e V. JAIRAK, “Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies”, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 101, p. 476–495, ago. 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.07.010.
- [51] M. E. MARSHALL *et al.*, “Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study.”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 5, n° 6, p. 862–866, jun. 1987, doi: 10.1200/JCO.1987.5.6.862.
- [52] K. N. VENUGOPALA, V. RASHMI, e B. ODHAV, “Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity”, *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 1–14, 2013, doi: 10.1155/2013/963248.
- [53] J. L. MOHLER *et al.*, “Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma”, *The Prostate*, vol. 20, n° 2, p. 123–131, 1992, doi: 10.1002/pros.2990200208.
- [54] J. S. LOPEZ-GONZALEZ, H. PRADO-GARCIA, D. AGUILAR-CAZARES, J. A. MOLINA-GUARNEROS, J. MORALES-FUENTES, e J. J. MANDOKI, “Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines”, *Lung Cancer*, vol. 43, n° 3, p. 275–283, mar. 2004, doi: 10.1016/j.lungcan.2003.09.005.
- [55] A. MAUCHER e E. VON ANGERER, “Antitumour activity of coumarin and 7-hydroxycoumarin against 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary carcinomas”, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 120, n° 8, p. 502–504, ago. 1994, doi: 10.1007/BF01191806.
- [56] M. MUSA, J. COOPERWOOD, e M. O. KHAN, “A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer”, *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, n° 26, p. 2664–2679, nov. 2008, doi: 10.2174/092986708786242877.
- [57] M. B. MOREIRA, D. S. FRANCISCATO, K. C. F. TOLEDO, J. R. B. D. SOUZA, H. S. NAKATANI, V. R. D. SOUZA, “Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by Ruthenium complex”, *Quím. Nova*, 2014, doi: 10.5935/0100-4042.20140315.

- [58] J. M. WALKER, Org., *The Protein Protocols Handbook*. em Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. doi: 10.1007/978-1-59745-198-7.
- [59] S. P. SKINNER, R. H. FOGH, W. BOUCHER, T. J. RAGAN, L. G. MUREDDU, e G. W. VUISTER, “CcpNmr AnalysisAssign: a flexible platform for integrated NMR analysis”, *J. Biomol. NMR*, vol. 66, nº 2, p. 111–124, out. 2016, doi: 10.1007/s10858-016-0060-y.
- [60] K. SANCHES, I. P. CARUSO, F. C. ALMEIDA, e F. A. MELO, “NMR assignment of free ¹H, ¹⁵N and ¹³C-Grb2-SH2 domain”. Biological Magnetic Resonance Bank, 2019. doi: 10.13018/BMR27781.
- [61] R. GHOSH e J. LADBURY, “Backbone chemical shift assignments of the C-terminal SH3 domain of Grb2”. Biological Magnetic Resonance Bank, 2012. doi: 10.13018/BMR18748.
- [62] S. GRZESIEK, S. J. STAHL, P. T. WINGFIELD, e A. BAX, “The CD4 Determinant for Downregulation by HIV-1 Nef Directly Binds to Nef. Mapping of the Nef Binding Surface by NMR”, *Biochemistry*, vol. 35, nº 32, p. 10256–10261, jan. 1996, doi: 10.1021/bi9611164.
- [63] P. H. DA SILVA, “Estudos da Interação da Proteína Adaptadora Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) com os Flavonoides Morina e Rutina”, *Universidade Estadual Paul. “Júlio Mesquita Filho”*, vol. 2, p. 1–72, 2017.
- [64] J. KOWALEWSKI, “Nuclear spin relaxation in liquids and gases”, em *Nuclear Magnetic Resonance*, K. Kamienska-Trela e J. Wojcik, Orgs., 1º edThe Royal Society of Chemistry, 2012, p. 196–243. doi: 10.1039/9781849734851-00196.
- [65] G. WEBER, “van’t Hoff revisited: enthalpy of association of protein subunits”, *J. Phys. Chem.*, vol. 99, nº 3, p. 1052–1059, jan. 1995, doi: 10.1021/j100003a031.
- [66] B. J. BERNE, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Dover Publications, 2013.
- [67] J. R. LAKOWICZ, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, nº 1. 1983. doi: 10.1007/BF02629943.
- [68] T. WANG, L. H. ZENG, e D. L. LI, “A review on the methods for correcting the fluorescence inner-filter effect of fluorescence spectrum”, *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 52, nº 10, p. 883–908, nov. 2017, doi: 10.1080/05704928.2017.1345758.
- [69] A. DONG, J. M. MALECKI, L. LEE, J. F. CARPENTER, e J. C. LEE, “Ligand-induced conformational and structural dynamics changes in Escherichia

- coli cyclic AMP receptor protein”, *Biochemistry*, vol. 41, n° 21, p. 6660–6667, 2002, doi: 10.1021/bi020036z.
- [70] A. DONG, P. HUANG, e W. S. CAUGHEY, “Redox-dependent changes in .beta.-extended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra”, *Biochemistry*, vol. 31, n° 1, p. 182–189, jan. 1992, doi: 10.1021/bi00116a027.
- [71] H. YANG, S. YANG, J. KONG, A. DONG, e S. YU, “Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy”, *Nat. Protoc.*, vol. 10, n° 3, p. 382–396, 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.024.
- [72] A. WATERHOUSE *et al.*, “SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, n° W1, p. W296–W303, jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky427.
- [73] M. VARADI *et al.*, “AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 50, n° D1, p. D439–D444, jan. 2022, doi: 10.1093/nar/gkab1061.
- [74] C. R. SØNDERGAARD, M. H. M. OLSSON, M. ROSTKOWSKI, e J. H. JENSEN, “Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pK_a Values”, *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, n° 7, p. 2284–2295, jul. 2011, doi: 10.1021/ct200133y.
- [75] LINDAHL, ABRAHAM, HESS, e V. D. SPOEL, “GROMACS 2020 Source code”. Zenodo, 1º de janeiro de 2020. doi: 10.5281/ZENODO.3562495.
- [76] J. LOSCHWITZ, A. JÄCKERING, M. KEUTMANN, M. OLANGUJU, O. O. OLUBIYI, e B. STRODEL, “Dataset of AMBER force field parameters of drugs, natural products and steroids for simulations using GROMACS”, *Data Brief*, vol. 35, p. 106948, abr. 2021, doi: 10.1016/j.dib.2021.106948.
- [77] P. T. LANG *et al.*, “DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes”, *RNA*, vol. 15, n° 6, p. 1219–1230, jun. 2009, doi: 10.1261/rna.1563609.
- [78] S. R. BROZELL, S. MUKHERJEE, T. E. BALIUS, D. R. ROE, D. A. CASE, e R. C. RIZZO, “Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool”, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 26, n° 6, p. 749–773, jun. 2012, doi: 10.1007/s10822-012-9565-y.

- [79] R. G. PARRA *et al.*, “Protein Frustratometer 2: a tool to localize energetic frustration in protein molecules, now with electrostatics”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, n° W1, p. W356–W360, jul. 2016, doi: 10.1093/nar/gkw304.
- [80] J. C. HINDMAN, A. SVIRMICKAS, e M. WOOD, “Relaxation processes in water. A study of the proton spin-lattice relaxation time”, *J. Chem. Phys.*, vol. 59, n° 3, p. 1517–1522, ago. 1973, doi: 10.1063/1.1680209.
- [81] S. NGARIZE, H. HERMAN, A. ADAMS, e N. HOWELL, “Comparison of Changes in the Secondary Structure of Unheated, Heated, and High-Pressure-Treated β -Lactoglobulin and Ovalbumin Proteins Using Fourier Transform Raman Spectroscopy and Self-Deconvolution”, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, n° 21, p. 6470–6477, out. 2004, doi: 10.1021/jf030649y.
- [82] P. TABOADA, S. BARBOSA, E. CASTRO, M. GUTIÉRREZ-PICHEL, e V. MOSQUERA, “Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous–alcohol mixed solvents”, *Chem. Phys.*, vol. 340, n° 1–3, p. 59–68, nov. 2007, doi: 10.1016/j.chemphys.2007.07.027.
- [83] F. DING, G. ZHAO, J. HUANG, Y. SUN e L. ZHANG, “Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme”, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, n° 10, p. 4083–4089, out. 2009, doi: 10.1016/j.ejmech.2009.04.047.
- [84] J. N. WEISS, “The Hill equation revisited: uses and misuses”, *FASEB J.*, vol. 11, n° 11, p. 835–841, 1997, doi: 10.1096/fasebj.11.11.9285481.
- [85] Í. P. CARUSO, W. VILEGAS, F. P. DE SOUZA, M. A. FOSSEY, e M. L. CORNÉLIO, “Binding of antioxidant flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 98, p. 100–106, set. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.05.015.
- [86] M. AKBARIAN *et al.*, “Inhibitory effect of coumarin and its analogs on insulin fibrillation /cytotoxicity is depend on oligomerization states of the protein”, *RSC Adv.*, vol. 10, n° 63, p. 38260–38274, 2020, doi: 10.1039/D0RA07710K.
- [87] M. D. BOERSMA, J. D. SADOWSKY, Y. A. TOMITA, e S. H. GELLMAN, “Hydrophile scanning as a complement to alanine scanning for exploring and manipulating protein-protein recognition: Application to the Bim BH3 domain”, *Protein Sci.*, vol. 17, n° 7, p. 1232–1240, jul. 2008, doi: 10.1110/ps.032896.107.
- [88] Q. TANG e A. W. FENTON, “Whole-protein alanine-scanning mutagenesis of allostery: A large percentage of a protein can contribute to mechanism”, *Hum.*

- Mutat.*, vol. 38, n° 9, p. 1132–1143, set. 2017, doi: 10.1002/humu.23231.
- [89] L.J. MA, I. OHMERT, e V. VARDANYAN, “Allosteric Features of KCNQ1 Gating Revealed by Alanine Scanning Mutagenesis”, *Biophys. J.*, vol. 100, n° 4, p. 885–894, fev. 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2010.12.3726.
- [90] N. CHOPRA *et al.*, “Dynamic Allostery Mediated by a Conserved Tryptophan in the Tec Family Kinases”, *PLOS Comput. Biol.*, vol. 12, n° 3, p. e1004826, mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004826.
- [91] F. LEFEVRE, “Alanine-stretch scanning mutagenesis: a simple and efficient method to probe protein structure and function”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, n° 2, p. 447–448, jan. 1997, doi: 10.1093/nar/25.2.447.
- [92] B. C. CUNNINGHAM e J. A. WELLS, “High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis”, *Science*, vol. 244, n° 4908, p. 1081–1085, jun. 1989, doi: 10.1126/science.2471267.
- [93] L. E. M. MARENGERE *et al.*, “SH2 domain specificity and activity modified by a single residue”, *Nature*, vol. 369, p. 502–505, 1994.
- [94] Y. LIU, H. JANG, M. ZHANG, C. J. TSAI, R. MALONEY, e R. NUSSINOV, “The structural basis of BCR-ABL recruitment of GRB2 in chronic myelogenous leukemia”, *Biophys. J.*, vol. 121, n° 12, p. 2251–2265, jun. 2022, doi: 10.1016/j.bpj.2022.05.030.