

## RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/04/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Jéssica Andrade Tedesco

Caracterização biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua  
dinâmica de interação

São José do Rio Preto

2019

Jéssica Andrade Tedesco

Caracterização biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua  
dinâmica de interação

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação de 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

2019

T256c Tedesco, Jéssica Andrade  
Caracterização Biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua  
dinâmica de interação / Jéssica Andrade Tedesco. -- São José do Rio Preto,  
2019  
75 p. : 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. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Proteínas. 3. Espalhamento Dinâmico  
da Luz. 4. Calorimetria Diferencial de Varredura. 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

Caracterização biofísico-química das proteínas FGFR2 e Grb2 e sua  
dinâmica de interação

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Dr. Ícaro Putinhon Caruso  
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira  
UNICAMP - Campinas

São José do Rio Preto

23 de abril de 2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, minha mãe Claudia Maria da Silva Andrade, por todo apoio ao longo destes 27 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 por 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 que eu precisava desabafar e compartilhar minhas frustrações e minhas vitórias.

Agradeço ao meu pai, Evaldo Tedesco, que mesmo de longe, sempre me apoiou e me ajudou a ser a pessoa que sou hoje. Todos os conselhos sobre eletricidade e mecânica. Ah, e não posso deixar de citar os dias incríveis que passamos juntos quando veio me visitar nessa cidade interiorana.

Agradeço ao meu gordinho, Matheus Tedesco, por todas as risadas compartilhadas e todas as comidas deliciosas. Mesmo de longe, eu sempre quero compartilhar do seu crescimento e das suas conquistas.

Agradeço a minha ‘avó’ de coração e criação, Enedi Andrade Silveira, por todo o majestoso apoio que vem me dando desde pitiquinha. É muito bom poder compartilhar as minhas conquistas com você e sempre aprender com a sua bondade para comigo e minha família. Com certeza, sem você nada disso seria possível.

Agradeço a minha maravilhosa prima, Flávia Lobo, 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.

Karoline Sanches, obrigado por todo o companheirismo desde 2012. Todos as conversas amorosas (e puxões de orelha também). Todas as horas estudando juntas e, principalmente, toda a paciência para me ensinar sobre essa vida de proteínas que era uma área totalmente nova para mim. Obrigado por todas as viagens incríveis que nós fizemos e por ser essa pessoa iluminada que você é.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Renan e Ingrid, obrigado por todas as ajudas, por descorarem os meus géis, desligarem a autoclave e, sem dúvidas, por partilharem as frustrações com a centrífuga.

Aos meus amigos de departamento, Raphael, Carol, Ingrid, Kenneth e Hugo, obrigado por todas as risadas, principalmente nas nossas aulinhas de inglês. E nunca se esqueçam: “There is a bitch on the beach doing a bit of beats”.

Às minhas eternas colegas de trabalho, Monique e Andreia, obrigado por continuarem sendo essas amigas incríveis, mesmo que não estejamos trabalhando no mesmo laboratório. Obrigado por serem a minha porta de entrada para esse mundo experimental.

Ao Acerola, vulgo Alessandro, obrigado por todos os momentos incríveis que compartilhamos desde 2012. Obrigado por ser essa pessoa indispensável na minha vida. Obrigado por todos os churrascos, todas as conversas, todos os conselhos. Só não vou agradecer pelas piadas porque já é abusar demais. Você sabe o quão importante é para mim.

Ao Edoardo, só tenho a agradecer todos os momentos de desabafo. Eu sei que às vezes eu pego você pra Cristo pra ouvir os meus problemas, obrigado por sempre me escutar. Obrigado por todos os almoços de domingo após algumas aulas de inglês. Obrigado por compartilhar o seu conhecimento e seus problemas comigo.

Wilton e Karina, mais conhecidos como Tiú e Baguete, obrigado pelo apoio e amizade. Obrigado por todas as festas, conversas, barzinhos, almoços e jantãs. É sempre maravilhoso passar o tempo com vocês, mesmo que seja só conversando.

Agradeço meu orientador Ferdinando, quer dizer, Fernando Alves de Melo, por toda paciência durante esses 18 meses e todo o aprendizado. Obrigado por ser essa pessoa leve e rígida em momentos cruciais. Obrigado por confiar em mim e sempre me encorajar em momentos que eu acreditava que nada daria certo.

Agradeço ao Professor Doutor Fabio Ceneviva por me receber tão prontamente no seu laboratório. Por toda a paciência empregada em me ensinar um pouco desse universo da Ressonância Magnética Nuclear. Sem dúvidas, este trabalho não seria possível sem o seu apoio e conhecimento.

Agradeço aos amigos que fiz no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear. Ramon, Felipe, Vitor, Karen, Chris e Mari, obrigado por toda a ajuda e por serem tão receptivos na minha estadia no Rio de Janeiro. Em especial, obrigado

Ramon e Felipe pelos momentos em Bento Gonçalves. Foi muito bom poder conhecer um pouco mais de vocês e compartilhar risadas e histórias incríveis.

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

*“We’ve all got both dark and light inside us.*

*What matters is the part we choose to act on.*

*That’s who we really are.”*

*Harry Potter and the Order of the Phoenix [1]*

## RESUMO

FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) é uma proteína receptora que apresenta um papel crucial na regulação do metabolismo celular, expressão gênica, crescimento, divisão e diferenciação celular. Vias de sinalização se iniciam com a ligação de fatores de crescimento aos seus receptores localizados na porção extracelular proteína FGFR2, induzindo sua fosforilação seguida de recrutamento de proteínas parceiras do citosol. Uma destas parceiras é a proteína adaptadora Grb2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*). O mecanismo de interação entre estas duas proteínas é fundamental para o funcionamento da via de sinalização MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Elucidar tal mecanismo é crucial para o estudo da sinalização celular e seus comportamentos aberrantes.

Experimentos TROSY-based de taxas de relaxação transversa foram realizados em colaboração com o Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN). Os espectros 1D  $^1\text{H}$  do domínio quinase demonstram uma boa estruturação e dinâmica de acordo com a proteína. Tempos de relaxação aparente entre 16,2 e 23,5 ns foram encontrados, sendo compatíveis com proteínas que apresentam massa molecular entre  $38,508 \pm 7,709\text{kDa}$ , coerentes com a massa molecular de 40kDa do domínio quinase. Os espectros 2D  $^{15}\text{N}$  da interação entre FGFR2 e Grb2 mostram uma perda de sinal relacionado os domínios SH3-Grb2 quando comparados aos espectros da proteína Grb2 pura. Esta perda de sinal demonstra que ambos os domínios C- e N-terminal SH3-Grb2 estão participando da interação com FGFR2, enquanto o domínio SH2-Grb2 permanece dinâmico.

Experimentos de DSC e DLS foram realizados com Grb2 em diferentes pHs para a determinação de possíveis alterações na sua estrutura devido à mudança entre pHs ácidos e bases. Constatou-se boa conformação, congruente com resultados observados na literatura, para pHs básicos. No entanto, em pHs ácidos foi observado um aumento na turbidez da solução impossibilitando a realização das análises. Tal comportamento gera duas hipóteses: a agregação da proteína devido à mudança significativa na carga total da proteína e a formação de transições de fase líquido-líquido.

Palavras-chave: FGFR2, Grb2, Interação, Dinâmica, RMN, DSC, DLS.

## ABSTRACT

*FGFR2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2) is a receptor protein playing a crucial role in regulating cellular metabolism, genetic expression, growth, division and cellular differentiation. Signaling upstream starts when growth factors bind to receptors localized on the extracellular portion of FGFR2 which induce its phosphorylation followed by recruitment of protein partners from cytosol. One of these partners is the adaptor protein Grb2 (Growth Factor Receptor Bound Protein 2) which interaction mechanism between those proteins is fundamental for the health operation of MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Elucidating such mechanism is crucial for the study of that signaling pathway and its aberrant behavior.*

*TROSY-based studies of transverse relaxation rates were performed in collaboration with Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN). 1D <sup>1</sup>H spectrums of kinase domain demonstrate a good structure and dynamic of the protein. Apparent relaxation times between 16,2 and 23,5 ns were found, being compatible with proteins which present molecular weight of 38,508 ± 7,709kDa, coherent with the 40kDa molecular weight of kinase domain. 2D spectrums of FGFR2-Grb2 interaction showed a loss of signal related to SH3 domains in the compared spectrums of <sup>15</sup>N isotopic labeled Grb2 and the mixture of labeled Grb2 and cytosolic FGFR2. This signal loss demonstrates that both N- and C-terminal Grb2-SH3 domains take place on the interaction with FGFR2 while Grb2-SH2 domain remains dynamic. This result adds a new figure to the FGFR2-Grb2 interaction tale which early was thought to be a role exclusively done by C-terminus Grb2-SH3 domain.*

*DSC and DLS experiments were carried on with Grb2 in different pH buffers to determine possible alterations on its structure due to acid and basic pH changes. On basic pH, Grb2 presents good conformation being consistent with results observed on the literature. However, on acid pH, an increase in the turbidity of the solution was observed, making impossible the analysis. Such behavior leads us to two hypotheses: aggregation of the protein due to significant change on the net charge and the formation of liquid-liquid phase transition.*

*Key-words: FGFR2, Grb2, Interaction, Dynamic, NMR, DSC, DLS.*

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 – Número estimado de casos incidentes de câncer mundialmente em 2012 para ambos os sexos. Pulmão (1.8 milhões), mama (1.6 milhões), colorretal (1.3 milhões), próstata (1 milhão), estômago (0.9 milhões), fígado (0.7 milhões), útero (0.5 milhões), esôfago (0.45 milhões), bexiga (0.42 milhões) e linfoma (0.38 milhões). 19
- Figura 2 – 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) – o sinal age na própria célula que o produz. 20
- Figura 3 – Estrutura básica (fora de escala) do complexo FGF-FGFR compreende duas moléculas de receptores, dois FGFs e uma cadeia HSPG. FGFs se ligam com baixa afinidade à superfície celular das HSPGs (azul claro) e com alta afinidade aos FGFRs específicos. Os FGFRs, que são filogeneticamente próximos aos *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs), consistem em três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, uma única hélice transmembrana e um domínio tirosina quinase dividido em duas partes. O segundo (D2) e terceiro (D3) domínio do tipo Ig formam o sítio de ligação com ligantes e tem domínios distintos para a ligação de FGFs e HSPGs [8]. 22
- Figura 4 – Isoformas da FGFR2 geradas por *splicing* alternativo de FGFR transcrita. As duas formas são geradas através de *splicing* alternativo dos exons 8 e 9. A metade C-terminal do domínio D3 é codificada pelo exon 8, gerando a isoforma FGFR2b, enquanto a metade C-terminal do domínio D3 codificada pelo exon 9 gera a isoforma FGFR2c [8], [11], [14]. 23
- Figura 5 – Representação das estruturas cristalográficas do domínio quinase (a) e D2 (b) de FGFR2. 25
- Figura 6 – Esquema representativo da via de sinalização da RAS-MAPK. Inicialmente, FGFR2 é ativada pela ligação de um fator de crescimento, ativando a proteína RAS através da molécula adaptadora Grb2 que recruta um fator de troca do nucleotídeo guanina (Sos), o qual realiza a catálise, induzindo RAS a trocar seu GDP por um GTP. O processo se segue pela estimulação sequencial de proteínas quinases, como a Raf, 28

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 7 – Estrutura da proteína Grb2 em sua forma dimérica (SH2 em amarelo, C-SH3 em azul e N-SH3 em vermelho). 29

Figura 8 – Esquema representativo da formação do complexo heterotetrâmero do dímero Grb2 (domínios SH3 em amarelo; domínio SH2 em vermelho) e FGFR2 (preto e verde). O complexo inicial com excesso de Grb2 2:1 Grb2:FGFR2. Com adição de FGFR2, o complexo 2:2 é formado. 30

Figura 9 – Representação do mecanismo de controle da ativação de FGFR2 por Grb2. (A) Estado basal do completo FGFR2-Grb2. Grb2 (domínios SH3 em amarelo; domínio SH2 em vermelho) se liga através de seu domínio C-SH3 na região C-terminal de FGFR2, resultando no heterotetrâmero 2:2. O domínio quinase (verde) possui mobilidade suficiente para a fosforilação de alguns resíduos de tirosina (incluindo Y653 e Y654). Receptor ativo, sinalização inativa. (B) Fatores de crescimento extracelular (azul) e HSPG (azul claro) se ligam à 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 Grb2-FGFR2 por transfosforilação. Receptor ativo, sinalização ativa. 31

Figura 10 – Representação esquemática dos passos utilizados no processo de expressão e purificação das proteínas Grb2 e FGFR2<sub>Q</sub> em meio mínimo enriquecido com <sup>15</sup>N. 34

Figura 11 – Representação esquemática do processo de expressão das proteínas FGFR2<sub>C</sub> e Grb2 em meio LB. 36

Figura 12 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a expressão da proteína FGFR2 quinase em *E.coli* BL21 (DE3) em duas diferentes temperaturas: a) 20°C e B) 37°C. Os valores na lateral do gel indicam referências de massa molar ( 97 kDa – Fosfolipase B; 40

66kDa – Albumina; 45kDa – Ovoalbumina; 30kDa – Anidride Carbônica; 20,1kDa – Inibidor de Tripsina e 14,4kDa – Lactoalbumina- $\alpha$ ), MM : marcador de massa molar; A.I: antes da indução (onde não se nota a presença da proteína) e D.I: depois da indução (presença da proteína no gel).

Figura 13 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue 41  
referente à expressão da proteína FGFR2 $\alpha$  com adição em 0,5 M de Sorbitol em duas temperaturas distintas: A) 20 °C e B) 37 °C. MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da Indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.

Figura 14 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue 42  
referente à expressão da proteína FGFR2 $\alpha$  em duas temperaturas diferentes: A) 20 °C e B) 37 °C; com adição de diferentes concentrações de Triton X-100 na etapa de lise celular (1 – 0,2% Triton X-100; 2 – 1,0% Triton X-100; 3 – 2,0% Triton X-100). MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.

Figura 15 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue 43  
referente à expressão da proteína FGFR2 $\alpha$  em duas temperaturas distintas: A) 20°C e B) 37°C; com adição de 10% de Glicerol na etapa de lise celular. MM – Marcador de massa molar; A.I – Antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.

Figura 16 – Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue 44  
referente à expressão da proteína FGFR2 $\alpha$  em duas temperaturas distintas: A) 20 °C e B) 37 °C; com adição de 0,5mg/mL de Lisozima na etapa de lise celular. MM – Marcador de massa molar; A.I – antes da indução; D.I – Depois da indução; Pel – Pellet; Sob – Sobrenadante. Em vermelho, destaca-se a proteína FGFR2 quinase.

Figura 17 – Gel SDS-PAGE 20% referente à purificação por afinidade de 45  
FGFR2 quinase. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não apresentam afinidade por cobalto; 10-100mM – concentrações de

Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. Em vermelho, destaca-se a porção proteica utilizada para a etapa seguinte de gel filtração.

Figura 18 – Espectro da purificação de FGFR2<sub>Q</sub> por exclusão molecular 46 através do sistema AKTA-*purifier*. As amostras são coletadas devido ao aumento na luz UV. Tais amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE para constatação de sua pureza e concentradas para futuros experimentos.

Figura 19 – Espectros 1D <sup>1</sup>H dos experimentos de TROSY-*based* de R<sub>1</sub> 47 (a) e R<sub>2</sub> (b) do domínio quinase de FGFR2. Em vermelho temos o espectro das intensidades (I) e, em azul, o espectro das intensidades de referência (I<sub>0</sub>). As linhas verticais especificam os pontos que foram utilizados para os cálculos do tempo de relaxação aparente através das fórmulas (6) e (7).

Figura 20 – Espectro TROSY-HSQC 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N do domínio quinase de 48 FGFR2 à 298 K, o qual apresenta uma estrutura parcialmente enovelada.

Figura 21 – Gel SDS-PAGE 15% referente à purificação por afinidade de 49 FGFR2 citoplasmática. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não apresentam afinidade por cobalto; 10-100 mM – concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína. Em vermelho, destaca-se a porção proteica utilizada para a etapa seguinte de gel filtração.

Figura 22 – Espectro da purificação de FGFR2<sub>C</sub> por exclusão molecular 50 através do sistema AKTA-*purifier*. As amostras são coletadas de acordo com o aumento da absorção da luz UV. Tais amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE para constatação de sua pureza e concentradas para futuros experimentos.

Figura 23 – Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% da solução utilizada 51 nos experimentos TROSY-*based* da interação de FGFR2<sub>C</sub> e Grb2. A proteína Grb2 pura foi utilizada como marcador de massa molar para comparação das alturas no gel.

Figura 24 – Sobreposição dos espectros de TROSY-HSQC das proteínas 52 Grb2 pura (em rosa) e interagindo com FGFR2 (em marrom).

Figura 25 – Sobreposição dos espectros do domínio SH2 (em azul) e da 53 interação entre FGFR2 + Grb2 (em marrom).

Figura 26 – Identificação dos aminoácidos (em vermelho) presentes no 54  
espectro da interação entre FGFR2-Grb2 na estrutura dimérica da  
proteína Grb2. (D45, K64, I65, K69, A70, E71, E72, L74, K76, Q77, G81,  
A82, L84, I85, S88, R89, S90, A91, G93, D94, S96, L97, S98, V99, K100,  
F101, G102, D104, V105, Q106, H107, F108, V110, L111, R112, D113,  
A115, G116, F119, V122, V123, K124, F125, N126, S127, L128, N129,  
E130, L131, Y134, R136, T138, S141, N143, Q144, Q145, I146, F147,  
D150). Estrutura gerada com o auxílio do programa UCSF – *Chimera* a  
partir do PDB 1gri.

Figura 27 – Estrutura proposta após o *domain-swap* apresentado pela 55  
proteína Grb2 evidenciando uma conformação aberta do domínio SH2.

Figura 28 – Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 por afinidade ao 56  
Cobalto. MM – Marcador de massa molar; Flow – proteínas que não  
apresentam afinidade por cobalto; 10-500mM – concentrações de  
Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.

Figura 29 – Cromatograma referente à troca de tampão para NaPi pH 7,0 57  
da proteína Grb2. As amostras foram coletadas com base no aumento da  
absorção UV.

Figura 30 – Cromatograma referente à troca de tampão para NaK pH 8,0 57  
da proteína Grb2. As amostras coletadas levam em consideração o  
aumento da absorção de luz UV.

Figura 31 – Espectro referente à troca de tampão para Acetato pH 4,0 da 58  
proteína Grb2. Nota-se uma diferença na forma do espectro, tendo este  
sido deslocado quando comparado aos espectros de pHs básicos.

Figura 32 – Espectro referente à troca de tampão para Acetato pH 5,0 da 58  
proteína Grb2. Assim como em pH 4,0, nota-se uma alteração no perfil  
do espectro, sendo este mais evidente do que o anterior. Devido ao  
deslocamento do pico, as amostras coletadas apresentavam tampão  
diferente do esperado, além de apresentar grande perda na  
concentração de proteína quando comparado aos pHs básicos.

Figura 33 – Amostras de Grb2 pura em pH 7,0 e 5,0 (a) evidenciando o 59  
aumento da turbidez em pH ácido após o processo de diálise. Em (b)

observa-se a formação do pellet azulado após centrifugação de 1 minuto à 10.000RPM.

Figura 34 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 pH 7,0 obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas de DSC para a proteína Grb2 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, com os respectivos picos correlacionados com os três domínios de Grb2. 61

Figura 35 – Termograma de desnaturação da proteína Grb2 pH 8,0 obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas de DSC para a proteína Grb2 foram obtidas entre 20 e 80 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min. Em ciano tem-se a curva experimental obtida, em azul escuro seu respectivo *fit*. Em preto tem-se a primeira deconvolução, seguida da segunda em verde e da terceira em vermelho, com os respectivos picos correlacionados com os três domínios de Grb2. 62

Figura 36 – Gráficos de espalhamento dinâmico da luz da proteína Grb2 em diferentes pHs básicos: 7,0 (a) e 8,0 (b). Nota-se em ambos os gráficos a presença de dois picos, sendo o primeiro muito mais presente com porcentagem em massa perto de 100%. 64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificidade de FGFs para as diferentes isoformas de FGFRs.	24
Tabela 2 – Variações genéticas e alterações de FGFR2 em síndromes.	26
Tabela 3 – Variações genéticas e alterações de FGFR2 em cânceres.	26
Tabela 4 – Dados dos tempos de correlação rotacionais compilados por J. Aramini. Todos os dados foram coletados em espectrômetro Bruker 600 MHz a 25 °C, exceto os assinalados com asterisco, coletados em campo de 800 MHz.	39
Tabela 5 - Valores das intensidades e seus respectivos $R_1$ e $R_2$ , calculados através da fórmula (6) e o tempo de relaxação aparente através da fórmula (7). A estimativa da massa molecular foi calculada através da fórmula (8).	47
Tabela 6 – Carga da proteína Grb2 em função da mudança de pH gerada pela plataforma <i>Protein Calculator</i> . Observa uma mudança no sinal da carga entre pHs ácidos e básicos podendo influenciar na conformação da proteína em seu ambiente químico.	59
Tabela 7 – Valores das temperaturas de <i>melting</i> ( $T_m$ ) e da entalpia calorimétrica de cada um dos picos presentes no termograma da proteína Grb2 em pH 7,0. A temperatura de <i>melting</i> é determinada pelo máximo de $C_p$ e a entalpia calorimétrica associada é obtida através da integração das gaussianas.	62

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

- ADP** – Adenosina difosfato
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- CcpNMR** – *Collaborative Computacional Project for NMR*
- DLS** – Espectroscopia Dinâmica da Luz
- DSC** – Calorimetria Diferencial de Varredura
- FGF** – *Fibroblast growth factors*
- FGFR2** – *Fibroblast growth factor receptor 2*
- FGFR2<sub>c</sub>** – Porção citoplasmática da proteína FGFR2
- FGFR2<sub>q</sub>** – Domínio quinase da proteína FGFR2
- FGFRs** – *Fibroblast growth factor receptors*
- Gab** – *Grb2-associated binding*
- GAP** – *GTPase-activating protein*
- Grb2** – *Growth-factor-receptor bound protein 2*
- GTP** – Trifosfato de guanosina
- HSPG** – Heparan sulfato
- IDR** – Regiões Intrinsecamente Desordenadas
- IPTG** – Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
- ITC** – *Isothermal Titration Calorimetry*
- JAK/STAT** – *Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*
- LCD** – Domínios de Baixa Complexidade
- LLPS** – Separação de Fase Líquido-Líquido
- MM** – Marcador Molecular
- MW** – Massa Molecular
- NF1** – *neurofibromin*
- PONDR<sup>®</sup>** – *Predictor of Natural Disordered Regions*
- Pi** – Fosfato inorgânico
- PI3K** – *Phosphoinositide 3-kinase*
- PLCγ** – *Phospholipase C-γ*
- Ras** – *Rat Sarcoma*

**MAPK** – *Mitogen Activated Protein Kinase*

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**RTKs** – *Receptor Tyrosine Kinase*

**Ser** – Serina

**SHC** – *Src Homology and Collagen containing protein*

**Shp2** – *Src-homology 2 domain containing phosphatase 2*

**Sos** – *Son of Sevenless*

**T<sub>2</sub>** – Tempo de relaxação transversa

**Thr** – Treonina

**TK** – Domínio tirosina quinase

**TROSY** – *Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*

**Tyr** – Tirosina

**WHO** – Organização Mundial de Saúde

**$\nu_N$**  – Frequência de precessão do nitrogênio

**$\tau_c$**  – Tempo de relaxação aparente

## SUMÁRIO

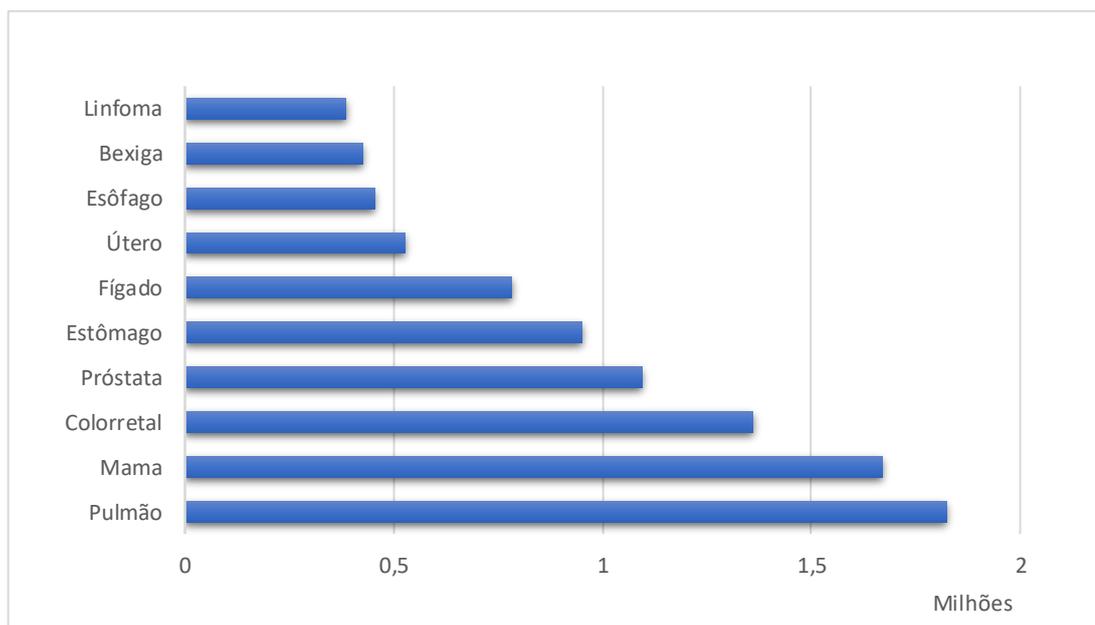
<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	<b>19</b>
<b>1.1.</b>	<b>Sinalização Celular</b>	<b>20</b>
<b>1.2.</b>	<b><i>Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs)</i></b>	<b>21</b>
1.2.1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2)</i>	24
<b>1.3.</b>	<b>Via de Sinalização RAS-MAPK (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)</b>	<b>27</b>
<b>1.4.</b>	<b>Interação FGFR2 – Grb2</b>	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>Motivação e Objetivos</b>	<b>32</b>
<b>3.</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>33</b>
<b>3.1.</b>	<b>Testes de Solubilidade FGFR2<sub>Q</sub></b>	<b>33</b>
<b>3.2.</b>	<b>Expressão das proteínas Grb2 e FGFR2<sub>Q</sub></b>	<b>33</b>
<b>3.3.</b>	<b>Expressão FGFR2<sub>C</sub></b>	<b>34</b>
<b>3.4.</b>	<b>Purificação das proteínas FGFR2<sub>Q</sub>, FGFR2<sub>C</sub> e Grb2</b>	<b>36</b>
<b>3.5.</b>	<b>Amostras para ressonância</b>	<b>37</b>
<b>3.6.</b>	<b>Amostras e tratamento dos dados de DSC</b>	<b>37</b>
<b>3.7.</b>	<b>Amostras para DLS</b>	<b>38</b>
<b>3.8.</b>	<b>Cálculos de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e tempo de relaxação aparente <math>\tau_c</math></b>	<b>38</b>
<b>3.9.</b>	<b>Estimativa da massa molecular a partir do <math>\tau_c</math></b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados e Discussões</b>	<b>40</b>
<b>4.1.</b>	<b>FGFR2 domínio quinase (FGFR2<sub>Q</sub>)</b>	<b>40</b>
4.1.1.	Expressão e Purificação FGFR2 <sub>Q</sub>	40
4.1.2.	Dinâmica estrutural FGFR2 <sub>Q</sub>	46
<b>4.2.</b>	<b>Interação FGFR2 citoplasmática (FGFR2<sub>C</sub>) e Grb2</b>	<b>49</b>
4.2.1.	Expressão e Purificação FGFR2 <sub>C</sub>	49
4.2.2.	TROSY-HSQC da interação entre FGFR2 <sub>C</sub> e Grb2	50
<b>4.3.</b>	<b>Grb2</b>	<b>55</b>
4.3.1.	Expressão e Purificação	55
4.3.2.	Grb2 – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	60
4.3.3.	Grb2 – Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)	63
<b>5.</b>	<b>Conclusões e Perspectivas futuras</b>	<b>66</b>
	<b>Referências</b>	<b>69</b>

## 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 aberrantemente 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) [2].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2012, haviam 14,1 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões de mortes registradas e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer com diagnóstico de 5 anos. Dentre as maiores ocorrências (Figura 1), podem ser citados os cânceres de pulmão (1,8 milhões), mama (1,6 milhões), colorretal (1,3 milhões), próstata (1 milhão) e estômago (0,95 milhões) [3].

Figura 1 – Número estimado de casos incidentes de câncer mundialmente em 2012 para ambos os sexos. Pulmão (1.8 milhões), mama (1.6 milhões), colorretal (1.3 milhões), próstata (1 milhão), estômago (0.9 milhões), fígado (0.7 milhões), útero (0.5 milhões), esôfago (0.45 milhões), bexiga (0.42 milhões) e linfoma (0.38 milhões).



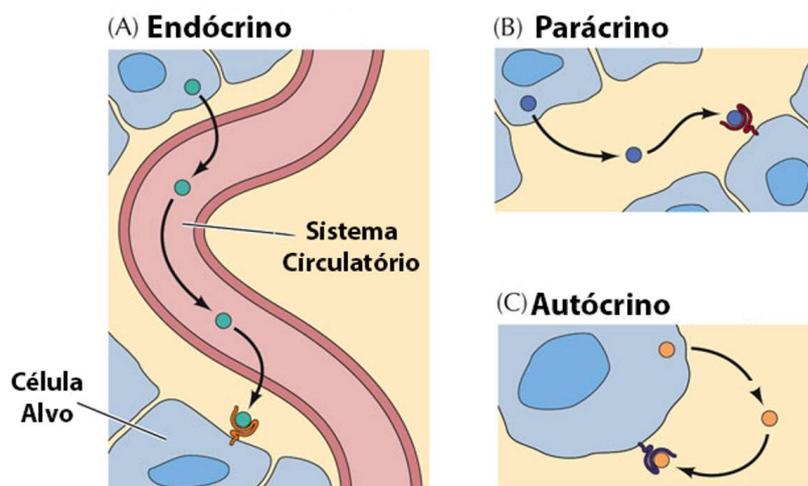
Fonte: [3].

Células tumorais desenvolvem características muito bem definidas como aumento da proliferação celular, incluindo a resistência à apoptose e outras formas de morte celular, mudanças metabólicas, instabilidade genética, indução de angiogênese e aumento da capacidade migratória. Tal sequência linear é, claramente, uma simplificação dos eventos complexos associados ao câncer; no entanto, auxilia no entendimento do papel crucial da sinalização desregulada em processos associados à iniciação e progressão do câncer [2].

### 1.1. Sinalização Celular

A capacidade das células em receber e responder a sinais para além da membrana plasmática é fundamental para a manutenção da vida. Células bacterianas recebem sinais constantes de proteínas de membrana que atuam como receptores de informação, monitorando o meio externo em relação ao oxigênio, disponibilidade de alimento, pH, força osmótica, luz e presença de substâncias químicas nocivas, predadores ou competidores por alimento. Tais sinais geram respostas apropriadas, como o movimento na direção do alimento ou oposto a substâncias nocivas. Em animais, observam-se três categorias de sinais: autócrinos (agem na própria célula que o produz), endócrinos (transportados pela corrente sanguínea até uma célula alvo), ou parácrinos (agem em uma célula vizinha) (Figura 2). Em qualquer um dos casos, o sinal é detectado por um receptor específico e convertido em uma resposta celular [4], [5].

Figura 2 – 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) – o sinal age na própria célula que o produz.



A fosforilação reversível da cadeia lateral de aminoácidos é um meio de regulação da atividade de enzimas e sinalização de proteínas vastamente utilizado pelas células. Para essas reações, quantidades substanciais de energia são exigidas nos processos metabólicos e grande parte da energia livre é obtida pela oxidação de nutrientes e substratos disponíveis ao decorrer do catabolismo. Tal energia é conservada e transferida por meio de reações acopladas à produção de Adenosina difosfato (ADP) e Fosfato inorgânico (Pi) a partir de Adenosina trifosfato (ATP), sendo assim sistemas de transmissão de energia e vínculos entre as reações consumidoras e produtoras de energia [4].

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em alguns casos, de Trifosfato de guanosina (GTP), para serina, treonina (quinases específicas para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina. A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas [6].

A reação entre ATP, que contém grupos  $\beta$ - e  $\gamma$ -fosfatos, e uma hidroxila de álcool ou fenol produz quantidades muito pequenas de éster fosfato em água, pois este solvente compete como nucleófilo. Entretanto, a atividade catalítica das proteínas quinases pode favorecer cineticamente a reação. A hidrólise espontânea de monoéster fosfato, de maneira semelhante, tem cinética lenta nas condições fisiológicas normais, tornando necessária a ação de fosfatases para que a reação seja acelerada [7]. Assim, a fosforilação de proteínas é reversível e controlada por enzimas em ambas as direções.

## **1.2. *Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs)***

*Fibroblast growth factors* (FGF) e seus receptores (FGFRs) regulam uma vasta gama de processos fisiológicos celulares, como desenvolvimento embrionário, diferenciação, proliferação, sobrevivência, migração e angiogênese [8]. Componentes sinalizadores de FGFRs, estão frequentemente alterados em cânceres humanos.

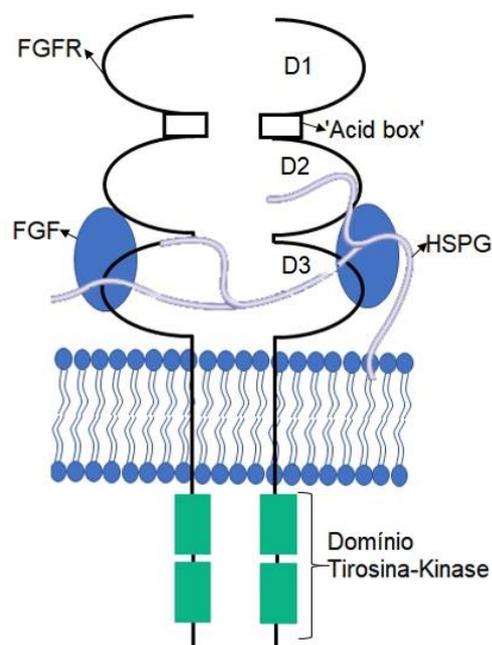
FGFs são glicoproteínas secretadas e rapidamente sequestradas pela matriz extracelular e superfície celular por proteoglicanas de heparan sulfato (HSPG), as quais estabilizam a interação entre o fator de crescimento e seu receptor através da proteção dos FGFs de degradação mediada por proteases. Embora os FGFs variem de tamanho entre 17-34 kDa, todos os membros da família compartilham de uma

sequência conservada de 120 resíduos de aminoácidos com similaridade sequencial entre 16-65% [9].

Em mamíferos, a família FGF compreende 18 ligantes, os quais exercem suas ações através de quatro receptores de tirosina quinase altamente conservados (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4). Um quinto receptor relacionado (FGFR5) pode ligar FGFs mas não possui domínio tirosina quinase, podendo regular negativamente a sinalização [9].

Na Figura 3, pode-se identificar o domínio de ligação extracelular dos FGFR, que é composto por três domínios do tipo imunoglobulina (*Ig-like*), designados D1-D3; um trecho de sete a oito resíduos ácidos na conexão entre D1 e D2, chamado de *acid box* e uma região positivamente carregada em D2 que tem como finalidade a ligação com heparinas [10]. Um domínio transmembrana, um domínio de tirosina quinase (TK) dividido em duas partes (TK1 e TK2) e uma cauda carboxil-terminal contendo 58 aminoácidos concluem a estrutura dos FGFR [11].

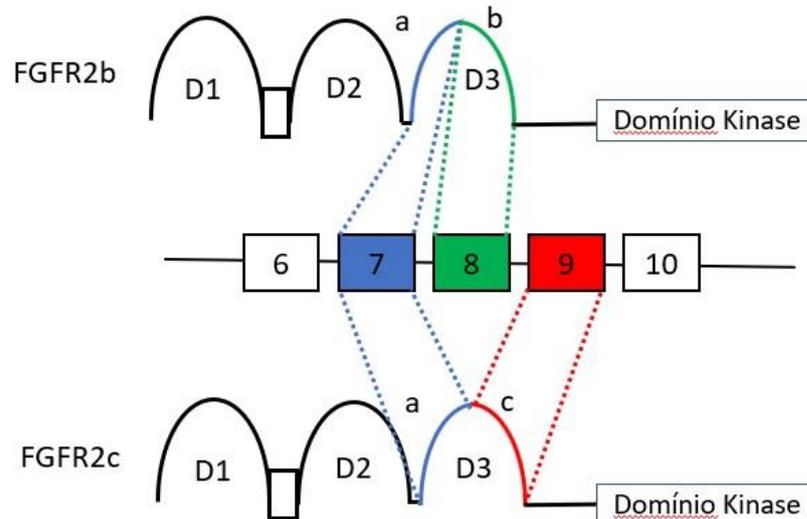
Figura 3 – Estrutura básica (fora de escala) do complexo FGF-FGFR compreende duas moléculas de receptores, dois FGFs e uma cadeia HSPG. FGFs se ligam com baixa afinidade à superfície celular das HSPGs (azul claro) e com alta afinidade aos FGFRs específicos. Os FGFRs, que são filogeneticamente próximos aos *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs), consistem em três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, uma única hélice transmembrana e um domínio tirosina quinase dividido em duas partes. O segundo (D2) e terceiro (D3) domínio do tipo Ig formam o sítio de ligação com ligantes e tem domínios distintos para a ligação de FGFs e HSPGs [9].



Fonte própria.

Uma importante marca registrada da família FGFR é a sua variedade de isoformas, geradas por *splicing* alternativo das FGFR transcritas [9], [12]. As diferentes isoformas incluem FGFRs com domínio extracelular composto por dois ou três domínios do tipo Ig, formas solúveis secretadas, assim como *splicing* alternativo no terceiro domínio do tipo Ig (D3) que mudam profundamente a especificidade da ligação entre FGFRs e ligantes [13], [14]. O *splicing* alternativo em D3 ocorre em FGFR1, FGFR2 e FGFR3 mas não em FGFR4 [9], [12], [15]. Foi mostrado que o exon 7 do gene FGFR2 (Figura 4) codifica a metade N-terminal do D3 (designada 'a'), enquanto os exons 8 e 9 codificam a metade C-terminal (respectivamente designadas 'b' e 'c'). As duas formas apresentam características distintas quando à ligação com FGFs, como pode ser visto na tabela 1. Por exemplo, enquanto FGFR2b liga FGF7 e FGF10, mas não FGF2, a isoforma FGFR2c liga FGF2 e FGF18, mas não FGF7 e FGF10.

Figura 4 – Isoformas da FGFR2 geradas por *splicing* alternativo de FGFR transcrita. As duas formas são geradas através de *splicing* alternativo dos exons 8 e 9. A metade C-terminal do domínio D3 é codificada pelo exon 8, gerando a isoforma FGFR2b, enquanto a metade C-terminal do domínio D3 é codificada pelo exon 9 gera a isoforma FGFR2c [9], [12], [15].



Fonte própria.

Tabela 1 – Especificidade de FGFs para as diferentes isoformas de FGFRs.

Isoformas FGFR	Especificidade FGFs
FGFR1b	FGF1, -2, -3 e -10
FGFR1c	FGF1, -2, -4, -5 e -6
FGFR2b	FGF1, -3, -7, -10 e -22
FGFR2c	FGF1, -2, -4, -6, -9, -17 e -18
FGFR3b	FGF1 e -9
FGFR3c	FGF1, -2, -4, -8, -9, -17, -18 e -23
FGFR4	FGF1, -2, -4, -6, -8, -9, -16, -17, -18 e -19

Fonte: [12].

A sinalização aberrante de FGFRs contribui para o desenvolvimento e progressão de carcinomas em três situações principais: (i) “mutações dirigidas”, nas quais a aquisição de alterações moleculares direcionadas estimulam diretamente a proliferação e sobrevivência de células cancerígenas; (ii) neoangiogênese; e (iii) resistência à agentes anticancerígenos [8], [15]. De forma geral, diversos modelos pré-clínicos providenciaram evidências convincentes do potencial oncogênico da sinalização aberrante de FGFRs na carcinogênese através de terapias por agentes específicos para FGFRs podendo ser utilizados para contra-atacar o crescimento tumoral, a angiogênese e reverter, ou prevenir, a aquisição de resistência à drogas anticancerígenas [15]–[20].

### 1.2.1. *Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2)*

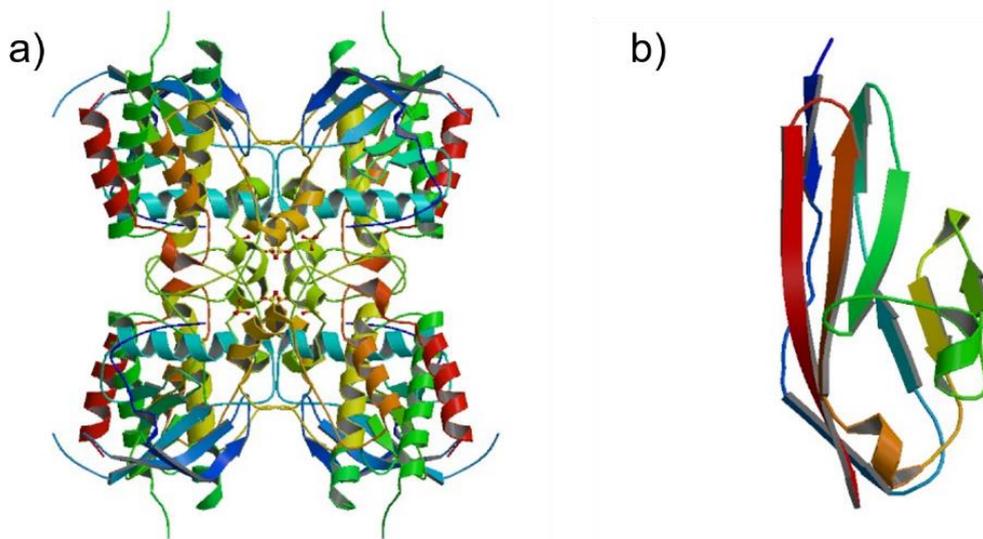
O gene FGFR2 está localizado no cromossomo 10q26 e contém 20 exons em humanos. Este codifica duas isoformas através de *splicing* alternativo, FGFR2b e FGFR2c, as quais possuem funções distintas no reconhecimento específico de fatores de crescimento (FGFs). FGFR2 são proteínas receptoras (RTKs – *Receptor Tyrosine Kinase*) e exercem um papel fundamental na regulação do metabolismo celular, na expressão gênica, no crescimento, divisão e diferenciação celular, na qual muitas cascatas de transdução de sinais são encaminhadas da membrana celular para o núcleo [22].

A proteína FGFR2 possui 821 aminoácidos (resíduos de aminoácido) em sua estrutura completa (massa molar 92 kDa) e 420 resíduos de aminoácido em sua porção citoplasmática – FGFR2c – (47,6 kDa) – sendo 354 resíduos de aminoácido

do domínio quinase – FGFR2<sub>Q</sub> – (40,2 kDa) e 58 resíduos de aminoácido da sequência complementar (6,4 kDa).

Devido ao seu elevado número de aminoácidos e sua baixa solubilidade, por ser uma proteína de membrana, a resolução de sua estrutura se torna um desafio tanto por métodos cristalográficos quanto por ressonância magnética nuclear. Na literatura, pode-se encontrar partes de sua estrutura resolvidas, com foco no domínio quinase [23], [24] e domínio D2 (Figura 5) [25], [26].

Figura 5 – Representação das estruturas cristalográficas do domínio quinase (a) e D2 (b) de FGFR2.



Fonte: [24], [25].

Mutações na região C-terminal de FGFR2 foram identificadas em diversas síndromes como Crouzon, Melanoma, Pfeiffer, Apert e Beare-Stevenson. Além disso, muitas displasias como câncer de mama, próstata, ovário, bexiga e pulmão estão relacionadas à atividade enzimática aberrante de FGFR2. As tabelas 2 e 3 mostram, respectivamente, um resumo das desordens genéticas relacionadas com síndromes e cânceres associados com FGFR2.

Tabela 2 – Variações genéticas e alterações de FGFR2 em síndromes.

<b>Síndrome</b>	<b>Mutação</b>	<b>Referências</b>
Crouzon	A315T/S, A344G/P, C278F, F276V, G338R, K526E, N549D/K/H, Q289P, S267P, S347C, S354C, Y105C, Y281C, Y340C/H	[27]–[32]
Jackson-Weiss	R344G	[32]
Apert	M186T, P252S/W/F/L, P253L/R, S267P	[28], [33], [34]
Pfeiffer	A172F, A314D, C278F, C342F/R/S, K641R, N549D/K, S267P, T341P, W290C, Y340C/H	[28], [29], [35], [36]
Beare-Stevenson	Y375C, S372C	[37]

Fonte: Adaptado de [15], [38]

Tabela 3 – Variações genéticas e alterações de FGFR2 em cânceres.

<b>Câncer</b>	<b>Mutação</b>	<b>Referências</b>
Mama	R203C, N550K, S588C, K660M	[27], [39]–[42]
Gástrico	S267P, Q212K, G463E	[43, p. 2], [44], [45]
Útero	D101Y, G227E, 2252W, P253R, F276V, K310R, S373C, Y376C, C383R, A390T, M393R, V396D, L398M, I548D/V, N550H/K, K660E/M/N, C383R	[27], [39], [42], [46]
Pulmão	E116K, P253L, I381V, C383R, K421I, D480N, H454Q, G584V, I591M, Q621K, R626T, D138N, N211I, D247N, W290C, G302W, S320C, E471Q, M538I, G584W, D603E, K660N/E, L773F, T787K	[40], [42], [47], [48], [48]–[51]
Melanoma	S24F, V77M, H213Y, E219K, G227E, V248D, R251Q, G271E, G305R, T371R, E476K, D531N, E575K, E637K, M641I, I643V, A649T, S689F, G702S, P709S	[52]
Próstata	Mudança de FGFR2b para FGFR2c	[53]
Bexiga	M186T	[54]
Colorretal	R203H, R210Q, D334N, Q361R, L552I, P583L, R665W, E778K	[43], [55], [56]

Fonte: Adaptado de [12], [15].

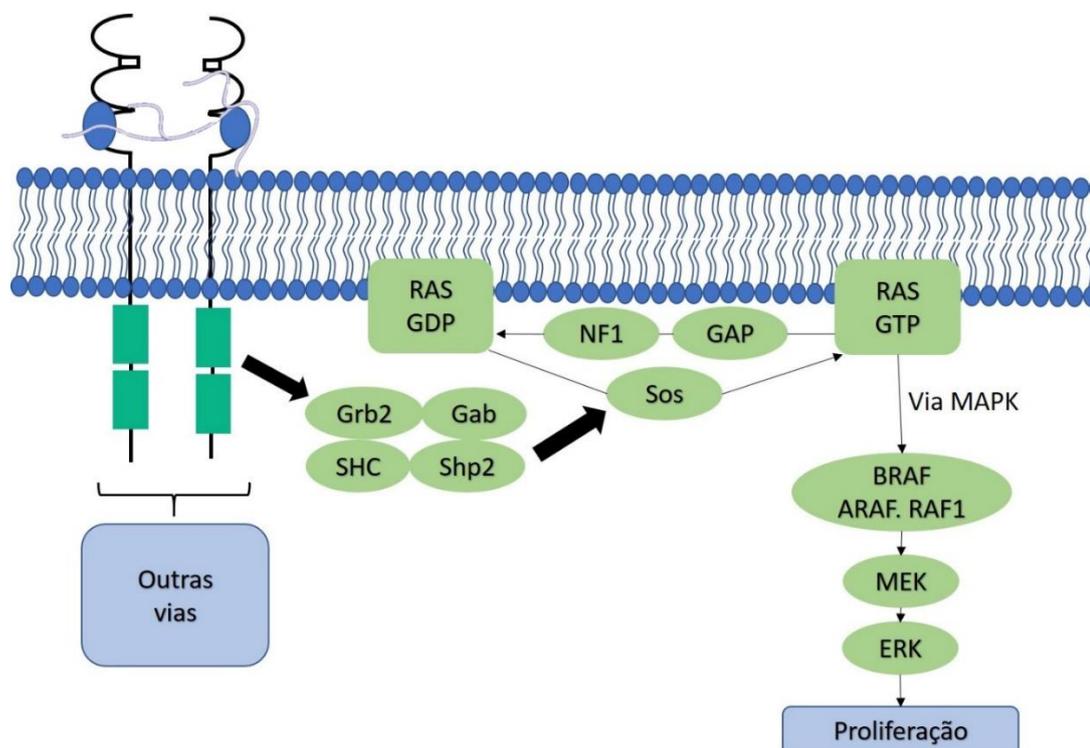
As vias de sinalização de FGFR2 se dividem em dois fluxos. O primeiro é dependente do substrato FGFR2 2 $\alpha$  (FGFR2 $\alpha$ ), enquanto o outro não. FGFR2 está envolvida em 4 vias principais, incluindo MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), PLC $\gamma$  (*Phospholipase C- $\gamma$* ), PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) e JAK/STAT (*Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*). Atua em múltiplas vias de sinalização *downstream* representando um papel crucial na proliferação, sobrevivência, diferenciação e resistência a drogas [15].

### **1.3. Via de Sinalização MAPK**

Um dos mecanismos envolvidos na sinalização celular é a interação entre proteínas responsáveis por transmitir estímulos extracelulares através de receptores da membrana plasmática até o núcleo celular. Proteínas que respondem à fosforilação de resíduos de Tirosina possuem domínios que mediam tal interação através do reconhecimento de sequências polipeptídicas específicas em proteínas adjacentes.

Na via de sinalização MAPK, como representado na Figura 6, FGFs se ligam aos HSPGs na superfície celular promovendo a dimerização do receptor. O processo de dimerização de FGFR2 é essencial para a ativação da quinase, resultando em um aumento da regulação de tal atividade e autofosforilação de resíduos de tirosina (Tyr) na região C-terminal. A autofosforilação dos resíduos de Tyr localizados em seu sítio ativo é essencial para a manutenção da sua forma ativa, porém sua sinalização continua inativa [57], [58]. A fosforilação de outros resíduos no domínio citoplasmático é essencial para a formação de sítios de ligação que recrutam proteínas adaptadoras como Grb2 (*Growth-factor-receptor bound protein 2*), SHC (*Src Homology and Collagen Containing Protein*) e Gab (*Grb2-associated binding*), possibilitando a ativação da sinalização do receptor, como será visto ao longo do texto.

Figura 6 – Esquema representativo da via de sinalização da RAS-MAPK. Inicialmente, FGFR2 é ativada pela ligação de um fator de crescimento, ativando a proteína RAS através da molécula adaptadora Grb2 que recruta um fator de troca do nucleotídeo guanina (Sos), o qual realiza a catálise, induzindo RAS a trocar seu GDP por um GTP. O processo se segue pela estimulação sequencial de proteínas quinases, como a Raf, MEK e ERK. As ERK migram para o núcleo celular fosforilando um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, dando início ao processo de proliferação celular.



Fonte própria.

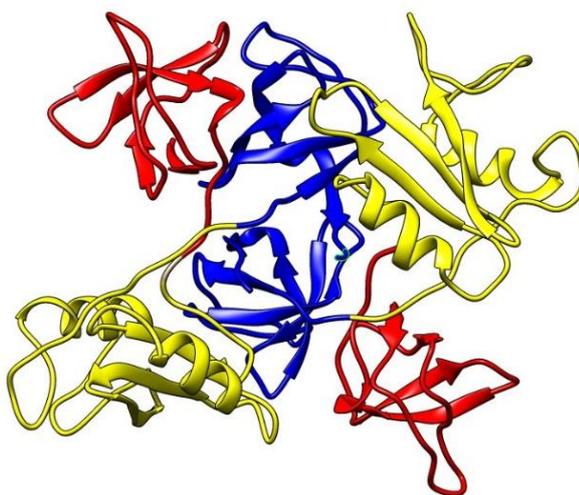
A via se segue com o recrutamento de Shp2 (*Src-homology 2 domain containing phosphatase 2*) e Sos (*“Son of Sevenless” – Pro-rich domain of GTP-GDP exchange factor*). Esta última, quando ligada a Grb2, atua na catálise de substituição do GDP ligado em Ras (*Rat Sarcoma*) por GTP. Em seguida, o complexo formado por GAP (*GTPase-activating protein*) e NF1 (*neurofibromin*) se ligam a Ras-GTP, catalisando sua conversão para Ras-GDP, finalizando a sinalização com a ativação da via de sinalização MAPK [59], [60].

Sendo assim, é de fundamental importância o estudo das proteínas FGFR2, responsável pela transdução do sinal, e da proteína Grb2, a qual atua diretamente na regulação da primeira proteína. A regulação da transdução do sinal para o interior da membrana é essencial para o controle de sinalizações aberrantes, responsáveis por uma série de carcinomas e síndromes anteriormente citadas.

#### 1.4. Interação FGFR2 – Grb2

A proteína Grb2 (*Growth-factor-receptor bound protein 2*) é uma proteína adaptora, envolvida na transdução e sinalização celular [61], [62]. Possui 217 resíduos de aminoácidos (25,2 kDa) compreendendo um domínio SH2 entre dois domínios SH3, C- e N- terminal [61], [63], [64]. Foi cristalizada como um dímero, sendo observado em soluções com concentração de Grb2 maior que 10 mg/mL (Figura 7) [65].

Figura 7 – Estrutura da proteína Grb2 em sua forma dimérica (SH2 em amarelo, C-SH3 em azul e N-SH3 em vermelho).



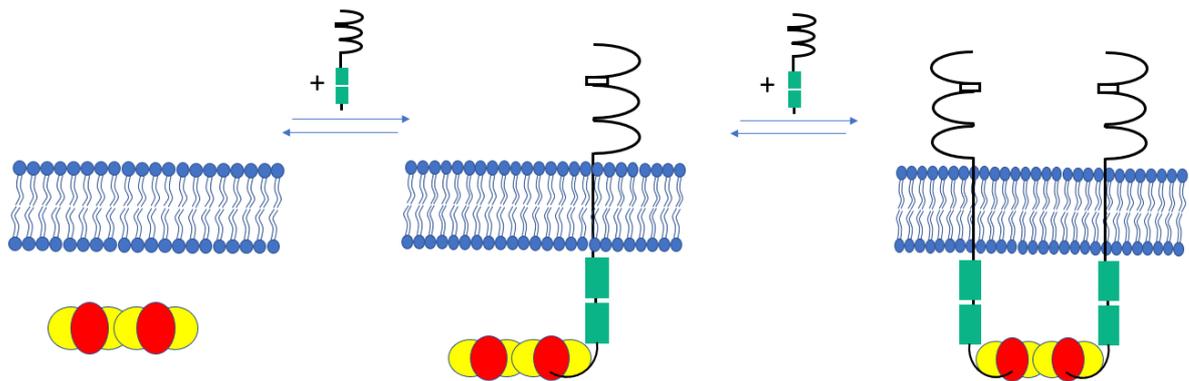
Fonte: adaptado de PDB 1GRI.

Estudos de ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*), DLS (*Differential Light Scattering*) e FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) realizados anteriormente determinaram propriedades acerca da interação entre Grb2 e a cauda terminal de FGFR2[57], [66]. Domínios SH3 se ligam com sequências ricas em prolina na forma de *motifs* PxxP. A região C-terminal de FGFR2 apresenta vários destes *motifs*, provendo sítios de interação para o domínio C-SH3 de Grb2, o domínio N-SH3 não mostrou nenhum tipo de interação nos estudos citados acima. Ahmed *et al.* (2010) determinou a constante de ligação, através de estudos de interação, entre sequências peptídicas equivalentes à cauda terminal de FGFR2 e Grb2. Grb2 C-SH3 se liga à sequência C-terminal de FGFR2 com constante de dissociação na ordem de 10-100 $\mu$ M, enquanto o domínio SH2 não se ligou a nenhum dos peptídeos estudados.

Lin *et al.* (2012) apresenta em seu trabalho dois mecanismos regulatórios cruciais na interação entre tais proteínas. Primeiramente, Grb2 induz a dimerização de FGFR2 anterior à estímulos extracelulares. À medida que FGFR2 (150  $\mu$ M) é titulada em Grb2

dimérica (15  $\mu\text{M}$ ), um complexo inicial é formado com estequiometria 2:1 Grb2:FGFR2. Com o aumento da concentração de FGFR2, o complexo 2:1 é saturado por FGFR2 dando origem à uma estequiometria 2:2. Devido à condição dimérica de Grb2 utilizada nos experimentos e sua ligação à FGFR2 ser detectada somente no domínio C-SH3, os dados de ITC podem ser elucidados assumindo-se que quanto maior a quantidade de FGFR2 titulada no complexo 2:1 Grb2:FGFR2, os domínios Grb2 C-SH3 recrutam uma molécula adicional de FGFR2, formando um heterotetrâmero (Figura 8).

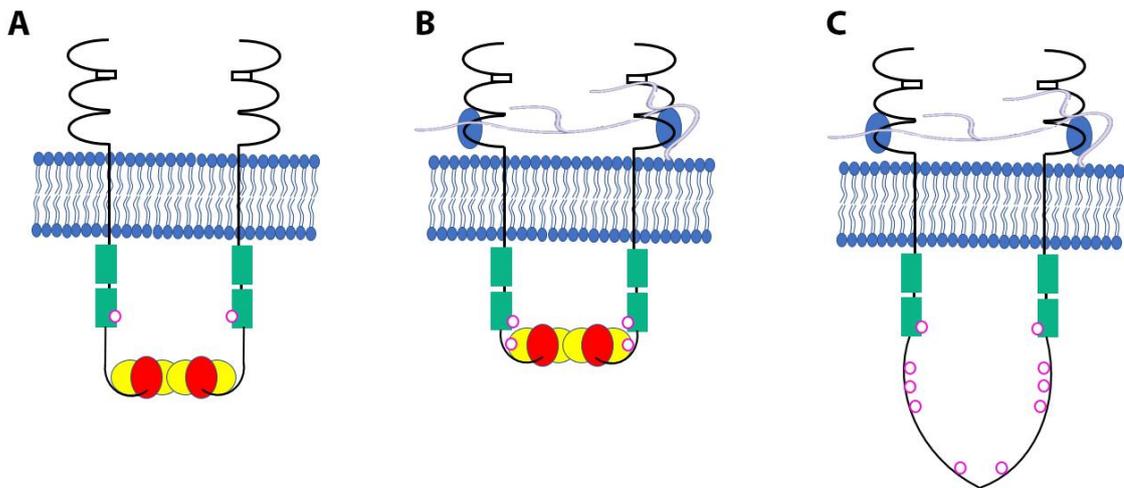
Figura 8 – Esquema representativo da formação do complexo heterotetrâmero do dímero Grb2 (domínios SH3 em amarelo; domínio SH2 em vermelho) e FGFR2 (preto e verde). O complexo inicial com excesso de Grb2 2:1 Grb2:FGFR2. Com adição de FGFR2, o complexo 2:2 é formado.



Fonte própria.

O heterotetrâmero (Figura 9), em seu estado basal, apresenta baixos níveis de atividade da quinase mas sem nenhum efeito sob a via de sinalização. A ligação de Grb2 com a região C-terminal de FGFR2 inibe o acesso à resíduos de tirosina que, na fosforilação, formam sítios de ligação para o recrutamento de proteínas parceiras. Quando ocorre a estimulação do receptor por fatores de crescimento externos à membrana, a atividade da quinase é regulada positivamente pela fosforilação do resíduo Y209 da Grb2. Neste estado fosforilado, Grb2 se dissocia do complexo devido à repulsão eletrostática entre as proteínas. O receptor então, é capaz de realizar mudanças conformacionais necessárias para adquirir um estado fosforilado e uma sinalização ativa [66].

Figura 9 – Representação do mecanismo de controle da ativação de FGFR2 por Grb2. (A) Estado basal do completo FGFR2-Grb2. Grb2 (domínios SH3 em amarelo; domínio SH2 em vermelho) se liga através de seu domínio C-SH3 na região C-terminal de FGFR2, resultando no heterotetrâmero 2:2. O domínio quinase (verde) possui mobilidade suficiente para a fosforilação de alguns resíduos de tirosina (incluindo Y653 e Y654). Receptor ativo, sinalização inativa. (B) Fatores de crescimento extracelular (azul) e HSPG (azul claro) se ligam à 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 Grb2-FGFR2 por transfosforilação. Receptor ativo, sinalização ativa.



Fonte própria.

## 5. Conclusões e Perspectivas futuras

A proteína FGFR2, sendo uma proteína de membrana, é fundamental para a transdução do sinal extra/intracelular de diversas vias de sinalização como MAPK, PI3K, JAK/STAT, entre outras. Sua desregulação está relacionada com muitas síndromes, como Crouzon, Pfeifer, Craniossinostose, e em muitos cânceres, como mama, próstata e bexiga. Elucidar sua estruturação e dinâmica é de fundamental importância para o completo entendimento de seu mecanismo regulatório dentro do organismo humano.

Após testes de solubilidade, foi possível tornar grande parte do domínio quinase da proteína FGFR2 solúvel através da adição de 0,5 M de Sorbitol na etapa de expressão. A purificação de ambas porções (quinase e citoplasmática) foi bem-sucedida, fornecendo uma concentração plausível (103  $\mu$ M) para a realização dos experimentos de ressonância magnética nuclear.

Dados de  $R_1$  e  $R_2$  demonstram uma boa estruturação do domínio quinase da proteína FGFR2. Os tempos de relaxação aparentes encontrados entre 16,2 e 23,5ns são compatíveis com proteínas com massa molecular de  $38,508 \pm 7,709$ kDa, sendo coerente com o domínio quinase que apresenta massa molecular de 40kDa. No entanto, devido ao peso molecular da proteína, estudos mais criteriosos e em maior concentração de FGFR2<sub>Q</sub> devem ser realizados para um maior entendimento da sua dinâmica.

O mecanismo de interação entre FGFR2 e Grb2 é fundamental para o funcionamento da via de sinalização MAPK. Elucidar este mecanismo é de grande importância para o estudo de tais vias de sinalização e seus comportamentos aberrantes.

Um novo mecanismo de interação entre as proteínas FGFR2 e Grb2, evidenciado pela perda de sinal nos espectros de TROSY-HSQC, é proposto neste trabalho. Sabe-se da literatura que Grb2 se liga através do domínio C-SH3 à FGFR2, porém a ligação ao domínio N-SH3 era inexistente. Os espectros de  $R_2$  TROSY-*based* da interação inferem uma forte ligação entre os domínios SH3 e FGFR2 com uma maior dinâmica do domínio SH2. Comparações entre os espectros da interação e da proteína Grb2 pura evidenciam que o domínio N-SH3 também participa, em sua grande maioria, desta interação. Este novo mecanismo pode ser explicado pela propriedade de *domain-swap* da proteína Grb2, no qual mudanças conformacionais fazem com que

esta adquira uma estrutura mais aberta, expondo o domínio SH2, levando à uma aproximação dos domínios C- e N-SH3.

No intuito de caracterizar mudanças conformacionais da proteína Grb2, um estudo foi realizado em 4 diferentes pHs: dois ácidos (4,0 e 5,0) e dois básicos (7,0 e 8,0).

Em pH ácido, a proteína Grb2 apresentou uma desestabilização evidenciada pela mudança de perfil de purificação por exclusão molecular em sistema automatizado AKTA. Na tentativa de amenizar tal desestabilização, a proteína foi submetida à troca de tampão por diálise por ser uma técnica mais sutil no momento da troca de pH. Após diálise, Grb2 apresentou um aumento considerável na turbidez, impossibilitando análises estruturais de DSC e DLS. Tal comportamento levanta duas hipóteses quanto à mudança de estabilidade em pHs ácidos. A primeira se baseia na troca brusca da carga total da proteína, sendo negativa em pHs básicos e positiva em pHs básicos. Esta mudança na carga da proteína pode alterar a interação entre os domínios de Grb2 e a interação que pode ocorrer entre as proteínas isoladas na amostra, podendo a força de interação entre as proteínas, aumentando o fator de agregação. Na segunda hipótese, tem-se a possibilidade da proteína Grb2 apresentar uma transição de fase líquido-líquido característico de algumas proteínas que apresentam domínios intrinsecamente desordenados, como é o caso de Grb2. Tal transição faz com que a proteína se torne altamente concentrada formando *droplets*.

Para Grb2 em pHs básicos, foi possível realizar a caracterização biofísico-química através das técnicas de Calorimetria Diferencial de Varredura e Espalhamento Dinâmico da Luz. Através da técnica de DSC, foi observado um perfil semelhante entre os dois pHs estudados. Cada termograma apresentou 3 diferentes picos, os quais podem ser correlacionados com os diferentes domínios da proteína. Em pH 7,0 observa-se uma maior cooperatividade e uma necessidade de maior gasto energético para que as temperaturas de *melting* dos seguintes picos sejam acessadas, apesar destas serem menores quando comparadas às temperaturas de *melting* em pH 8,0. Para o pH mais básico, as  $T_m$ s foram de 39,7°C, 52,4°C e 60,2°C, enquanto para pH 7,0 tem-se 42,8°C, 46,7°C e 49,5°C.

Estudos de DLS para ambos os pHs básicos mostram uma pequena variação no tamanho da proteína em d.nm. Para pH 8,0, a proteína apresenta um tamanho de 6,967 d.nm característico de proteínas com massa molecular em torno de 62,4kDa.

Em pH 7,0 tal tamanho foi de 6,509 d.nm, com massa molecular aproximada de 53,2 kDa, coerente com a massa molecular de Grb2 em sua forma dimérica.

Visto que ambas as proteínas estão envolvidas com uma enorme gama de carcinomas, propõe-se estudos de fluorescência e ressonância magnética nuclear para a determinação de propriedades da interação de FGFR2 com compostos comprovadamente anticarcinogênicos, como flavonoides e cumarinas. Além disso, estudos de ressonância magnética nuclear serão empregados para uma continuação da caracterização do mecanismo de interação entre as proteínas FGFR2 e Grb2. Desta forma, possibilitando uma maior elucidação acerca das propriedades regulatórias de tais proteínas nas vias de sinalização envolvidas.

Estudos mais aprofundados de Grb2 em pHs ácidos serão realizados para comprovar qual hipótese melhor se enquadra na mudança conformacional apresentada por Grb2 em tais pHs. Propõe-se também a realização de estudos microscópicos para determinar se a proteína Grb2 apresenta transição de fase líquido-líquido em pHs ácidos, visto que ambientes tumorais apresentam pHs mais ácidos.

## Referências

- [1] Yates, David, *Harry Potter and the Order of the Phoenix*. Warner Bros. Pictures, 2007.
- [2] R. Sever e J. S. Brugge, “Signal Transduction in Cancer”, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 5, nº 4, p. a006098–a006098, abr. 2015.
- [3] J. Ferlay *et al.*, “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012”, *Int. J. Cancer*, vol. 136, nº 5, p. E359–E386, mar. 2015.
- [4] D. L. Nelson e M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 6th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2013.
- [5] G. Krauss, *Biochemistry of signal transduction and regulation*, 5., completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2014.
- [6] S. R. Hubbard e J. H. Till, “Protein Tyrosine Kinase Structure and Function”, *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 69, nº 1, p. 373–398, jun. 2000.
- [7] A. J. Bridges, “Chemical Inhibitors of Protein Kinases”, *Chem. Rev.*, vol. 101, nº 8, p. 2541–2572, ago. 2001.
- [8] M. Touat, E. Ileana, S. Postel-Vinay, F. Andre, e J.-C. Soria, “Targeting FGFR Signaling in Cancer”, *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, nº 12, p. 2684–2694, jun. 2015.
- [9] N. Turner e R. Grose, “Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, nº 2, p. 116–129, fev. 2010.
- [10] J. Schlessinger *et al.*, “Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization”, *Mol. Cell*, vol. 6, nº 3, p. 743–750, set. 2000.
- [11] S.-G. Gong, “Isoforms of Receptors of Fibroblast Growth Factors: FGFR ISOFORMS”, *J. Cell. Physiol.*, vol. 229, nº 12, p. 1887–1895, dez. 2014.
- [12] V. P. Eswarakumar, I. Lax, e J. Schlessinger, “Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors”, *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 16, nº 2, p. 139–149, abr. 2005.

- [13] T. Miki *et al.*, “Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, n° 1, p. 246–250, jan. 1992.
- [14] A. Yayon, Y. Zimmer, G. H. Shen, A. Avivi, Y. Yarden, e D. Givol, “A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold”, *EMBO J.*, vol. 11, n° 5, p. 1885–1890, maio 1992.
- [15] H. Lei e C.-X. Deng, “Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Signaling in Breast Cancer”, *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 13, n° 9, p. 1163–1171, 2017.
- [16] J.-C. Soria *et al.*, “A phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors.”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, n° 15\_suppl, p. 2500–2500, maio 2014.
- [17] F. Andre *et al.*, “Abstract LB-145: Results of a phase I study of AZD4547, an inhibitor of fibroblast growth factor receptor (FGFR), in patients with advanced solid tumors .”, *Cancer Res.*, vol. 73, n° 8 Supplement, p. LB-145-LB-145, abr. 2013.
- [18] A. L. Di Stefano *et al.*, “Detection, Characterization, and Inhibition of FGFR-TACC Fusions in IDH Wild-type Glioma”, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 21, n° 14, p. 3307–3317, jul. 2015.
- [19] J. Tabernero *et al.*, “Phase I Dose-Escalation Study of JNJ-42756493, an Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, n° 30, p. 3401–3408, out. 2015.
- [20] M. Javle *et al.*, “Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, n° 3, p. 276–282, jan. 2018.
- [21] L. Nogova *et al.*, “Targeting *FGFR1* -amplified lung squamous cell carcinoma with the selective pan-FGFR inhibitor BGJ398.”, *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, n° 15\_suppl, p. 8034–8034, maio 2014.
- [22] S. E. Egan, B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland, e R. A. Weinberg, “Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation”, *Nature*, vol. 363, p. 45, maio 1993.

- [23] T. A. Ceska *et al.*, “FGFr2 kinase domain”, out. 2004.
- [24] T. A. Ceska *et al.*, “The FGFr2 tyrosine kinase domain”, ago. 2003.
- [25] A. Brown e T. L. Blundell, “Crystal structure of D2 domain from human FGFR2”, jun. 2008.
- [26] J. Sakon, F. Guo, R. Dakshinamurthy, K. M. Kathir, e S. K. K. Thallapuranam, “Crystal structure of the FGFR2 D2 domain”, ago. 2009.
- [27] P. M. Pollock *et al.*, “Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes”, *Oncogene*, vol. 26, nº 50, p. 7158–7162, nov. 2007.
- [28] X. Du, Y. Xie, C. J. Xian, e L. Chen, “Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration”, *J. Cell. Physiol.*, vol. 227, nº 12, p. 3731–3743, dez. 2012.
- [29] D. M. Ornitz, “FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease”, *Genes Dev.*, vol. 16, nº 12, p. 1446–1465, jun. 2002.
- [30] M. Tang e X. J. Huang, “Comment on ‘S267P Mutation in FGFR2: First Report in a Patient With Crouzon Syndrome’”, *J. Craniofac. Surg.*, vol. 26, nº 7, p. e677, out. 2015.
- [31] R. Ke, X. Yang, M. Ge, T. Cai, J. Lei, e X. Mu, “S267P Mutation in FGFR2: First Report in a Patient With Crouzon Syndrome”, *J. Craniofac. Surg.*, vol. 26, nº 2, p. 592–594, mar. 2015.
- [32] E. W. Jabs *et al.*, “Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2”, *Nat. Genet.*, vol. 8, nº 3, p. 275–279, nov. 1994.
- [33] Y. Tanimoto *et al.*, “A Soluble Form of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) with S252W Mutation Acts as an Efficient Inhibitor for the Enhanced Osteoblastic Differentiation Caused by FGFR2 Activation in Apert Syndrome”, *J. Biol. Chem.*, vol. 279, nº 44, p. 45926–45934, out. 2004.

- [34] J. Morita, M. Nakamura, Y. Kobayashi, C.-X. Deng, N. Funato, e K. Moriyama, “Soluble form of FGFR2 with S252W partially prevents craniosynostosis of the apert mouse model: Soluble FGFR2 Prevents Apert Syndrome”, *Dev. Dyn.*, vol. 243, n° 4, p. 560–567, abr. 2014.
- [35] S. Jay *et al.*, “The Fibroblast Growth Factor Receptor 2 p.Ala172Phe Mutation in Pfeiffer Syndrome-History Repeating Itself”, *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 161, n° 5, p. 1158–1163, maio 2013.
- [36] F. C. Kelleher, H. O’Sullivan, E. Smyth, R. McDermott, e A. Viterbo, “Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease”, *Carcinogenesis*, vol. 34, n° 10, p. 2198–2205, out. 2013.
- [37] A. Slavotinek *et al.*, “Novel FGFR2 deletion in a patient with Beare-Stevenson-like syndrome”, *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 149A, n° 8, p. 1814–1817, ago. 2009.
- [38] M. Katoh, “FGFR2 Abnormalities Underlie a Spectrum of Bone, Skin, and Cancer Pathologies”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 129, n° 8, p. 1861–1867, ago. 2009.
- [39] S. A. Byron *et al.*, “FGFR2 Point Mutations in 466 Endometrioid Endometrial Tumors: Relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 Mutations and Clinicopathological Features”, *PLoS ONE*, vol. 7, n° 2, p. e30801, fev. 2012.
- [40] C. Greenman *et al.*, “Patterns of somatic mutation in human cancer genomes”, *Nature*, vol. 446, n° 7132, p. 153–158, mar. 2007.
- [41] N. Reintjes, Y. Li, A. Becker, E. Rohmann, R. Schmutzler, e B. Wollnik, “Activating Somatic FGFR2 Mutations in Breast Cancer”, *PLoS ONE*, vol. 8, n° 3, p. e60264, mar. 2013.
- [42] A. Dutt *et al.*, “Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 25, p. 8713–8717, jun. 2008.
- [43] R. M. Hansen, A. Goriely, S. A. Wall, I. S. Roberts, e A. O. Wilkie, “Fibroblast growth factor receptor 2, gain-of-function mutations, and tumourigenesis: investigating a potential link”, *J. Pathol.*, vol. 207, n° 1, p. 27–31, set. 2005.
- [44] J. H. Jang, K. H. Shin, e J. G. Park, “Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers”, *Cancer Res.*, vol. 61, n° 9, p. 3541–3543, maio 2001.

- [45] R. McLendon *et al.*, “Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways”, *Nature*, vol. 455, n° 7216, p. 1061–1068, out. 2008.
- [46] F. Luo *et al.*, “Deformed Skull Morphology Is Caused by the Combined Effects of the Maldevelopment of Calvarias, Cranial Base and Brain in FGFR2-P253R Mice Mimicking Human Apert Syndrome”, *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 13, n° 1, p. 32–45, 2017.
- [47] J. Liang *et al.*, “Genetic variants in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) contribute to susceptibility of breast cancer in Chinese women”, *Carcinogenesis*, vol. 29, n° 12, p. 2341–2346, ago. 2008.
- [48] H. Davies *et al.*, “Somatic Mutations of the Protein Kinase Gene Family in Human Lung Cancer”, *Cancer Res.*, vol. 65, n° 17, p. 7591–7595, set. 2005.
- [49] The Cancer Genome Atlas Research Network, “Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers”, *Nature*, vol. 489, n° 7417, p. 519–525, set. 2012.
- [50] R. G. Liao *et al.*, “Inhibitor-Sensitive FGFR2 and FGFR3 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma”, *Cancer Res.*, vol. 73, n° 16, p. 5195–5205, ago. 2013.
- [51] J. H. Tchaicha *et al.*, “Kinase Domain Activation of FGFR2 Yields High-Grade Lung Adenocarcinoma Sensitive to a Pan-FGFR Inhibitor in a Mouse Model of NSCLC”, *Cancer Res.*, vol. 74, n° 17, p. 4676–4684, set. 2014.
- [52] M. G. Gartside *et al.*, “Loss-of-Function Fibroblast Growth Factor Receptor-2 Mutations in Melanoma”, *Mol. Cancer Res.*, vol. 7, n° 1, p. 41–54, jan. 2009.
- [53] B. Kwabi-Addo, F. Ropiquet, D. Giri, e M. Ittmann, “Alternative splicing of fibroblast growth factor receptors in human prostate cancer”, *The Prostate*, vol. 46, n° 2, p. 163–172, fev. 2001.
- [54] J. E. Ruhe *et al.*, “Genetic Alterations in the Tyrosine Kinase Transcriptome of Human Cancer Cell Lines”, *Cancer Res.*, vol. 67, n° 23, p. 11368–11376, dez. 2007.
- [55] D. C. Koboldt *et al.*, “Comprehensive molecular portraits of human breast tumours”, *Nature*, vol. 490, n° 7418, p. 61–70, set. 2012.

- [56] The Cancer Genome Atlas Network, "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer", *Nature*, vol. 487, p. 330, jul. 2012.
- [57] Z. Ahmed *et al.*, "Direct binding of Grb2 SH3 domain to FGFR2 regulates SHP2 function", *Cell. Signal.*, vol. 22, n° 1, p. 23–33, jan. 2010.
- [58] M. Mohammadi, I. Dikic, A. Sorokin, W. H. Burgess, M. Jaye, e J. Schlessinger, "Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction", *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, n° 3, p. 977–989, mar. 1996.
- [59] 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, n° 3, p. 611–620, maio 1993.
- [60] P. Shapiro, "Ras-MAP kinase signaling pathways and control of cell proliferation: relevance to cancer therapy", *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 39, n° 4–5, p. 285–330, set. 2002.
- [61] 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, fev. 2002.
- [62] H. Gram, R. Schmitz, J. F. Zuber, e G. Baumann, "Identification of phosphopeptide ligands for the Src-homology 2 (SH2) domain of Grb2 by phage display", *Eur. J. Biochem.*, vol. 246, n° 3, p. 633–637, jun. 1997.
- [63] N. Goudreau *et al.*, "NMR structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 1, n° 12, p. 898–907, dez. 1994.
- [64] S. Maignan, J. 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.
- [65] P. Chardin, D. Cussac, S. Maignan, e A. Ducruix, "The Grb2 adaptor", *FEBS Lett.*, vol. 369, n° 1, p. 47–51, ago. 1995.

- [66] C.-C. Lin *et al.*, “Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2”, *Cell*, vol. 149, n° 7, p. 1514–1524, jun. 2012.
- [67] G. Zhu, Y. Xia, L. K. Nicholson, e K. H. Sze, “Protein Dynamics Measurements by TROSY-Based NMR Experiments”, *J. Magn. Reson.*, vol. 143, n° 2, p. 423–426, abr. 2000.
- [68] Aramini, J., “NMR determined Rotational correlation time”. .
- [69] 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.
- [70] C. P. Brangwynne *et al.*, “Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation”, *Science*, vol. 324, n° 5935, p. 1729–1732, jun. 2009.
- [71] C. P. Brangwynne, T. J. Mitchison, e A. A. Hyman, “Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, n° 11, p. 4334–4339, mar. 2011.
- [72] A. A. Hyman, C. A. Weber, e F. Jülicher, “Liquid-Liquid Phase Separation in Biology”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, n° 1, p. 39–58, out. 2014.
- [73] A. Molliex *et al.*, “Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization”, *Cell*, vol. 163, n° 1, p. 123–133, set. 2015.
- [74] S. Wegmann *et al.*, “Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation”, *EMBO J.*, vol. 37, n° 7, p. e98049, abr. 2018.
- [75] H.-X. Zhou, V. Nguemaha, K. Mazarakos, e S. Qin, “Why Do Disordered and Structured Proteins Behave Differently in Phase Separation?”, *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, n° 7, p. 499–516, jul. 2018.
- [76] Y. Lin, S. L. Currie, e M. K. Rosen, “Intrinsically disordered sequences enable modulation of protein phase separation through distributed tyrosine motifs”, *J. Biol. Chem.*, vol. 292, n° 46, p. 19110–19120, nov. 2017.