



CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA PROTEÍNA ADAPTADORA GRB2 COM A MUTAÇÃO W60A E SUA INTERAÇÃO COM O FLAVONOIDE MORINA EM PH NEUTRO

THAIS SAMPAIO DE ALMEIDA

RESUMO

INTRODUÇÃO: As células são submetidas a um constante e preciso controle de parâmetros de sobrevivência, crescimento, diferenciação e apoptose. No processo de proliferação celular podem ocorrer erros que ocasionam um descontrolado crescimento celular, que por sua vez, resulta no surgimento de tumores. Mudanças em vias que mapeiam as sinalizações, podem levar a um ambiente celular aberrante, assim temos a via Mitogen Activated Protein Kinases que é mediada por proteínas, como a adaptadora Growth Factor Receptor Bound – Protein 2. Essa proteína adaptadora é responsável por regular a via de sinalização citada anteriormente, de modo que isso ocorre através de um equilíbrio monômero-dímero, em que o monômero permite a transdução de sinal e o dímero inibe. Além disso, essa proteína é capaz de inibir a Fibroblast Growth Factor Receptor 2, que está relacionada com diversos tipos de cânceres, como o câncer de estômago, mama e pele. **OBJETIVOS:** A proteína Grb2 é um alvo promissor para o desenvolvimento de estudos a respeito de sua estrutura, de tal forma, que possa ser desenvolvido diferentes terapias antitumorais mais eficientes e com menos reações adversas. Estudos demonstraram que o triptofano 121, possui maior importância se comparado com os outros quatro triptofanos, assim o objetivo do estudo foi evidenciar se a mudança do triptofano 60 por uma alanina causaria alguma mudança na estrutura ou na dinâmica da proteína. **METODOLOGIA:** Trata-se de uma pesquisa experimental com experimentos de expressão e purificação de proteína, espectroscopia de fluorescência e Saturation Transfer Difference. **RESULTADOS:** Os experimentos indicaram interação entre proteína e o flavonoide morina, porém não foram interações significativas para um potencial alvo terapêutico. Como o domínio SH2 possui o triptofano 121 e o 60, a fim de dar continuidade ao estudo, realizamos experimento de espectroscopia de fluorescência sem a mutação e o ligante. **CONCLUSÃO:** Os resultados evidenciaram baixa interação proteína-ligante, o comportamento da proteína em diferentes temperaturas e a possível presença de estados enovelados e desenovelados.

Palavras-chave: Câncer; Sinalização; Grb2; Morina; Interação;

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo abrangente para mais de 100 tipos de doenças malignas, caracterizadas pelo crescimento desordenado de células agressivas e incontroláveis, formando tumores que podem espalhar-se pelo corpo. (INCA, 2022). De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o câncer é desenvolvido devido alterações no processo de sinalização celular, que podem ser provocadas por fatores genéticos ou agentes externos (OPAS, 2020). O câncer é um grande desafio de saúde global, sendo uma das principais causas de morte e que é um dos principais fatores de redução da expectativa de vida em muitos países ao redor do mundo. (SUNG *et al.*, 2021).

O câncer é causado por alterações genéticas e epigenéticas que levam à proliferação

excessiva das células. Essas mudanças interferem no controle de sobrevivência e migração celular, resultando em um ambiente propício para a formação de células cancerígenas. As vias de sinalização desempenham um papel crucial nesse processo, controlando o crescimento, divisão e morte celular. Quando essas vias são perturbadas, o câncer pode se desenvolver e progredir, criando um ambiente tumoral complexo (SEVER, BRUGGE, 2014). De acordo com Krauss, as células respondem a estímulos externos extracelulares que são de suma importância para a vida, no qual os receptores de membrana são os responsáveis pelo monitoramento de eventos do meio extracelular em relação a fatores como pH, luz, oxigênio, temperatura, pressão osmótica entre outros (KRAUSS, 2006, p.474).

Proteínas adaptadoras são responsáveis por construir associações em interações proteína-proteína devido o reconhecimento de resíduos de aminoácidos específicos, de modo a recrutar diferentes enzimas para a propagação da sinalização celular (LEITE *et al.*, 2012).

A proteína Grb2 é uma proteína adaptadora, envolvida na transdução/sinalização celular, que pode ser recrutada pelo receptor FGFR2 mesmo na ausência de estímulos de crescimento, devido ao nível de fosforilação não ser capaz de ativar a via de sinalização. Na forma dimérica a interação ocorre via domínio SH3c da Grb2 na região C-Terminal do receptor, formando um heterotetrâmero. Ao ocorrer a interação de fatores de crescimento na porção extracelular de FGFR2, a Grb2 é fosforilada, ocasionando um desvínculo da Grb2 através de repulsão eletrostática, ficando livre para interagir com outras proteínas e ativar indiretamente a via de sinalização MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (AHMED *et al.*, 2013).

Pelo domínio SH2, a Grb2 recruta a proteína Sos (Son of Sevenless) posicionando-a para a membrana celular, onde está a proteína Ras-GDP (Rat Sarcoma). A Sos ativa a Ras-GDP que se torna Ras-GTP, posteriormente recrutando a proteína Raf, tornando-a ativa e pronta para fosforilar e dar início a via de sinalização MAPK. Vale ressaltar que quando a MAPK está ativa e não se encontra regulada, ocorre a proliferação celular descontrolada, o que leva à proliferação de alguns tipos de cânceres como o de próstata, mama e má formação fetal (LIN *et al.*, 2012).

A morina (2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona) é um flavonoide conhecido por suas propriedades antimutagênicas e antitumorais, anti-inflamatórias, antidiabéticas, cardioprotetoras e, principalmente, antioxidante (KILANI-JAZIRI *et al.*, 2012). Ela é um indutor de morte celular por apoptose, sendo observado tal fato em linhagens de células de câncer de pulmão do tipo não pequenas (H460), sendo esse câncer associado à atividade aberrante da via de sinalização presente nesse estudo (TIMSAH *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo consistiu na investigação da interação entre a proteína de interesse e o ligante selecionado. A partir dos resultados obtidos o estudo foi aprofundado nos mecanismos de envelhecimento da proteína GRB2, cuja importância é destacada em processos celulares como o reparo de DNA, proliferação e diferenciação celular. Posteriormente, o objetivo central foi a compreensão da topologia dos domínios de GRB2.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Expressão e purificação W60A

A expressão foi realizada com o vetor Pet 28a (+) e bactéria E.coli BL21 (DE3). As colônias foram cultivadas em 100 ml de meio LB líquido com adição de 100 µL de Canamicina sob agitação de 100 rpm a 37 °C por 16 h. Para aumentar o volume de culturas bacterianas, foi adicionado 50 ml em erlenmeyers de 2L e completado o volume para 500 ml com meio Lb. O cultivo das colônias ocorreu até a produção atingir uma DO = 0,6. Posteriormente foi adicionado 0,2 mM de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) por 18 horas para indução da proteína, com coleta de alíquotas antes e após indução para análise em gel de poli-acrilamida 15%.

Após, a cultura foi centrifugada a 3583 xg por 30 minutos. O pellet foi então ressuspensionado em tampão de lise (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM de β -Mercaptoetanol (BME) e 2mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). Depois da incubação em tampão de lise, submetemos à lise celular através de sonicação pulsada em 15 ciclos de 30 segundos cada (2s ON e 1s OFF). Coletamos o extrato por meio de centrifugação a 34957 xg por 90 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em um filtro de seringa de 0,45 μ m.

Para purificar, foi utilizado o sistema de purificação manual Resina IMAC HiTrap HP carregada com cobalto. A coluna foi equilibrada com um tampão (10 mM de Imidazol, 50 mM de Tris, 100 mM de NaCl e 1 mM BME em pH 8,0) e a fração solúvel foi aplicada, seguida por lavagens com diferentes concentrações de Imidazol. A exclusão molecular foi feita no AKTA Purifier com tampão 20 mM de NaPi (Na₂HPO₄/NaH₂HPO₄) pH 7,0 contendo 50 mM de NaCl e 1 mM de BME. A pureza da amostra foi verificada em gel de poliacrilamida 15%.

2.2 Espectroscopia de Fluorescência para o W60A e o domínio SH2

A espectroscopia de fluorescência envolve a emissão de luz por um elétron excitado, que ao retornar ao seu estado fundamental libera o excesso de energia em forma de radiação. Através desse experimento verificamos se ocorria interação entre a proteína e a morina. Para isso, utilizamos um espectrofluorímetro, acoplado a um banho térmico, sendo empregada a metodologia utilizada em outros estudos base a respeito de Grb2 [SILVA, 2017].

O experimento foi realizado em uma cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico e 2mL de volume, com 2 μ M de proteína. A excitação do triptofano realizada em 295nm e os espectros de emissão coletados de 305 a 500nm.

2.3 Saturation Transfer Difference (STD-RMN)

Essa técnica foi realizada em um espectrômetro Bruker equipado com uma criosonda de ressonância tripla 5 mm, com o gradiente de campo pulsado ao longo do eixo Z. Para obtenção dos espectros, utilizamos amostras de 600 μ L contendo 15 μ M de Grb2^{W60A} em solução tampão (20 mM NaPi e 50 mM NaCl) ajustado de acordo com a amostra purificada 90% H₂O / 10% D₂O, a fim de obter a melhor condição de saturação. Após titulação da morina, procedemos um ajuste no filtro spin-lock para obtenção da supressão do sinal da proteína no espectro. Os dados obtidos foram tratados no software Bruker TopSpin versão 4.1.4.

2.4 Grb2 - Transformação do plasmídeo recombinante em células de Escherichia Coli Linhagem DH5 α

O plasmídeo recombinante, vetor pET-28a(+) foi utilizado para codificar a proteína GRB2 monomérica, adquirido da empresa FastBio e fabricado pela GenScript. A construção do vetor foi baseada na estrutura completa da proteína, com uma mutação Y160F para expressão na forma monomérica.

A transformação do plasmídeo recombinante nas células de E.coli DH5 α foi realizada para aumentar a quantidade do plasmídeo. O procedimento incluiu a incubação do plasmídeo nas células competentes, seguido por um choque térmico a 42 °C e um resfriamento em gelo. Posteriormente, o meio de cultura líquido LB foi adicionado e a mistura foi incubada a 37 °C por uma hora.

Após a centrifugação do meio de cultura, o pellet foi ressuspensionado em LB e adicionado a uma placa com meio sólido e canamicina. Posteriormente a incubação, colônias foram selecionadas e o plasmídeo purificado com o kit GenCatch™ Plasmid DNA Mini-Prep.

2.5 Grb2 - Transformação em células de Escherichia Coli Linhagem BL21(DE3)

Para iniciar o processo de expressão e purificação da proteína GRB2, realizou-se a transferência do DNA plasmidial para células quimicamente competentes da linhagem BL21

(DE3) de *E.coli*.

A incubação do plasmídeo com células competentes foi feita em gelo por 30 minutos, seguido por um choque térmico a 42 °C por 45 segundos e resfriamento. Adicionamos meio de cultura e incubamos a 37°C por uma hora.

Após a centrifugação, o pellet foi ressuscitado em meio de cultura LB líquido e adicionado a uma placa de Petri com meio de cultura LB sólido e Canamicina. Após 14 horas de incubação a 37 °C, duas colônias foram selecionadas para expressão da proteína GRB2.

2.6 Expressão e purificação Grb2

As colônias foram inoculadas em 50 ml de meio de cultura LB líquido, com antibiótico canamicina, e incubadas por 14 horas a 37°C com agitação. Em seguida, 30 ml da cultura foram transferidos para 200 ml de meio mínimo de cultura M9, começando com densidade óptica (DO600) de 0,2 e mantendo a cultura agitada a 100 rpm a 37°C até atingir DO600 \approx 0,8. Após centrifugação, o pellet foi ressuscitado em um litro de meio M9 e induzido com IPTG a 20°C, sendo incubado por 16 horas a 100 rpm.

As células foram centrifugadas a 3.500xg por 40 minutos a 4 °C. Após incubação com tampão Tris-HCl (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,5 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF), as células foram submetidas à lise celular por sonicação pulsada de dez ciclos. O extrato resultante foi centrifugado a 35.000xg por 90 minutos e por fim filtrado por uma membrana de 0,45 μ m.

Na etapa de purificação, empregou-se o sistema de purificação por afinidade manual com resina IMAC HiTrap[®] HP pré-carregada com cloreto de cobalto. A resina foi equilibrada com tampão Tris-HCl (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 5 mM imidazol). O sobrenadante filtrado (da etapa de expressão) foi aplicado à coluna, seguido por lavagens com tampão Tris-HCl, variando a concentração de imidazol entre 20 mM e 1 M (20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM e 1 M), com a eluição do domínio ocorrendo entre 40 mM e 200 mM.

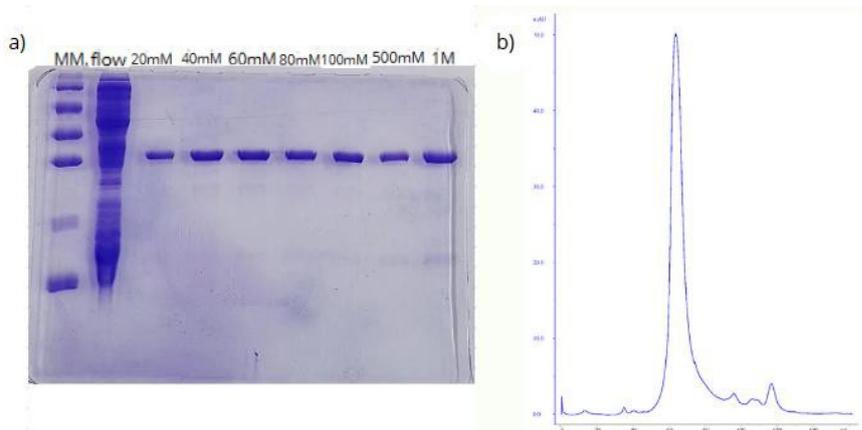
A amostra foi purificada por exclusão molecular com a coluna Superdex 75 (GE Life Science[®]), utilizando tampão fosfato (20 mM Fosfato de Sódio pH 7,0; 100 mM NaCl; 0,5 mM PMSF), resultando na remoção de contaminantes e mudança da solução tampão. A pureza foi confirmada por SDS-PAGE de 15%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação W60A

Após o procedimento de lise celular, a pureza da proteína foi verificada ao analisarmos o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). Em seguida, as amostras que apresentaram boa qualidade foram submetidas a gel-filtração para que fossem eliminados contaminantes e fosse realizada a troca de tampão.

Figura 1: Análise de pureza das amostras de Grb2 por a) Purificação por coluna de cobalto e aumento crescente de Imidazol e b) Gel filtração.



Fonte: autoria própria

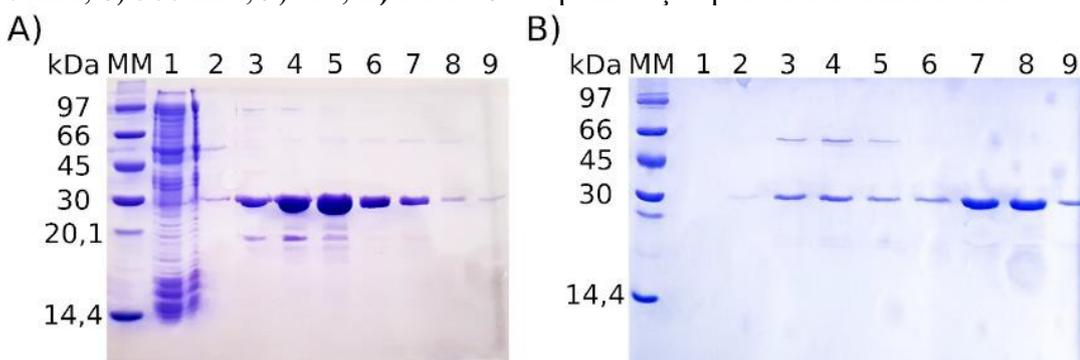
3.2 Espectroscopia de fluorescência W60A e STD

Ao testar o DMSO na proteína com mutação W60A, verificou-se que não era adequado para preparar a morina, pois afetava o espectro da proteína em sua forma enovelada. A morina foi então preparada em DMSO e diluída em etanol. Durante a espectroscopia de fluorescência, foi observado que a morina não proporcionou o sinal esperado para confirmar a interação, conforme corroborado pelo teste STD, que indicou que a morina não é um ligante com interação significativa para um alvo terapêutico no caso da mutação W60A.

3.3 Expressão e purificação da Grb2

O domínio SH2 também foi submetido a lise celular e observado o grau de pureza das amostras por gel SDS-PAGE 15%

Figura 2: Processo de Purificação da Proteína GRB2. A) diferentes concentrações de Imidazol, MM) Marcador Molecular; 1) flow; 2) 20 mM; 3) 40 mM; 4) 60 mM; 5) 80 mM; 6) 100 mM; 7) 200 mM; 8) 500 mM; 9) 1M, B) De 1 a 9 é a purificação por exclusão molecular.

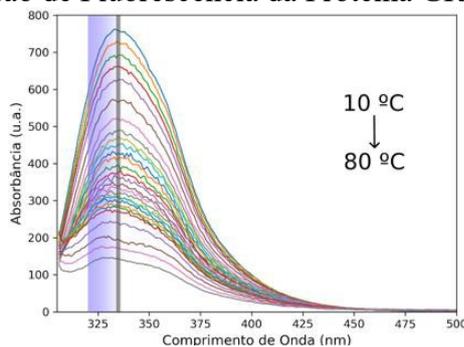


Fonte: autoria própria.

3.4 Espectroscopia de fluorescência da proteína Grb2

Foram realizados experimentos de espectroscopia de fluorescência para investigar o perfil termodinâmico da proteína GRB2. Os espectros registrados em diferentes temperaturas mostraram diminuição na intensidade e alargamento do pico de intensidade, indicando desnaturação em andamento.

Figura 3: Espectro de Emissão de Fluorescência da Proteína GRB2.

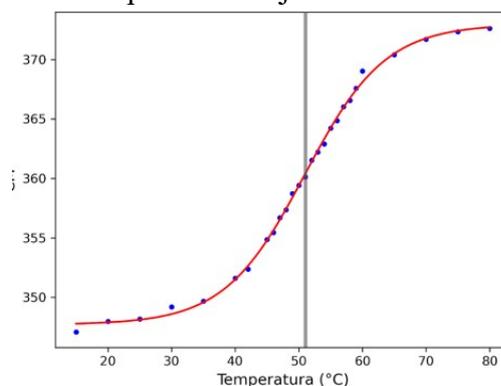


Fonte: autoria própria

O deslocamento do pico espectral para regiões de comprimento de onda menor, caracterizado como um *blueshift*, indica a exposição do triptofano ao solvente e sugere a desnaturação da proteína. Mudanças conformacionais relacionadas à exposição de resíduos hidrofóbicos durante a desnaturação térmica são observadas. A análise dos espectros permite investigar as mudanças conformacionais na proteína GRB2, porém não oferece informações precisas sobre estruturas intermediárias durante o processo de desnaturação. Para explorar essa possibilidade, é conduzido o cálculo do centro de massa espectral abaixo

$$CM = \frac{\sum_i \lambda_i F_i}{\sum_i F_i}$$

Figura 4: Determinação do Centro de Massa Espectral (CM). Efetuada por meio da análise dos dados obtidos na espectroscopia de fluorescência, em que os círculos azuis denotam os dados experimentais, e a curva vermelha representa o ajuste teórico.



Fonte: autoria própria.

Na Figura 4, os pontos azuis mostram os dados experimentais de fluorescência para diferentes temperaturas, enquanto a curva vermelha é o ajuste teórico. O ajuste revelou uma forma sigmoidal, indicando dois estados - enovelado e desenovelado.(RAHAMAN, *et al.*, 2013). Não foi possível identificar estados intermediários por meio desta técnica, contudo, a temperatura de melting foi determinada em cerca de 51°C, mostrando estabilidade da proteína.

4 CONCLUSÃO

Com base no estudo apresentado, podemos concluir que a pesquisa emerge uma visão abrangente a respeito das complexidades termodinâmicas e estruturais. Essa exploração através de espectroscopia de fluorescência e STD evidenciou que o flavonoide morina, apesar de possuir propriedades antimutagênicas e antitumorais, com a mutação W60A, não apresentou

resultados satisfatórios para o desenvolvimento de um novo fármaco.

O experimento de espectroscopia de fluorescência da Grb2 revelou, através da observação de alterações nos espectros e do deslocamento do pico espectral para regiões de comprimento de onda menores (*blueshift*), indícios inequívocos do processo de desnaturação da proteína GRB2. A análise desses dados permitiu a construção do perfil térmico da proteína, indicando a presença de estados enovelados e desnaturados e culminando em uma temperatura de *melting* de aproximadamente 51°C, ressaltando a considerável estabilidade da proteína.

REFERÊNCIAS

AHMED, Zamal et al. Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity. *Journal of Cell Biology*, v. 200, n. 4, p. 493-504, 2013.

Câncer - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. [citado 27 de março de 2024]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>.

Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries - Sung - 2021 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library [Internet]. [citado 27 de março de 2024]. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>.

Instituto Nacional de Câncer - INCA [Internet]. [citado 27 de março de 2024]. O que é câncer? Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer/o-que-e-cancer>.

KILANI-JAZIRI, Soumaya et al. Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis. *Drug and chemical toxicology*, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2012.

Krauss G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. John Wiley & Sons; 2014. 1388 p.

Leite C, Costa JVG, Callado RB, Torres JNL, Lima Júnior RCP, Ribeiro RA. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*. 2012;8(29):130–42.

Lin CC, Melo FA, Ghosh R, Suen KM, Stagg LJ, Kirkpatrick J, et al. Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2. *Cell*. 22 de junho de 2012;149(7):1514–24.

Sever R, Brugge JS. Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. abril de 2015;5(4):a006098.

Silva, Paulo Henrique da, Estudos da interação da proteína adaptadora Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) com os Flavonoides Morina e Rutina, 2017.

Timsah Z, Berrout J, Suraokar M, Behrens C, Song J, Lee JJ, Ivan C, Gagea M, Shires M, Hu X, Vallien C, Kingsley CV, Wistuba I, Ladbury JE. Expression pattern of FGFR2, Grb2 and Plectin acts as a novel prognostic marker of recurrence-free survival in lung adenocarcinoma. *Am J Cancer Res*. 2015 Sep 15;5(10):3135-48. PMID: 26693065; PMCID: PMC4656736.