



ESTUDO DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA Grb2 (W121A) MUTANTE E O FLAVONOIDE MORINA EM pH ALCALINO

JAQUELINE GOMES FRANCISCO

RESUMO

Inicialmente o presente estudo desenvolvido explora a interação da proteína Grb2(W121A) mutante e a Morina, um flavonoide com propriedades anticancerígenas, em pH alcalino em nos contextos relacionados ao câncer. O câncer é descrito como uma condição caracterizada por desregulações nas vias de sinalização celular, geralmente causadas por mutações em genes que controlam o ciclo celular. Destaca-se o papel do FGFR2 na regulação do metabolismo celular, expressão gênica e diferenciação celular, bem como a função da Grb2 como uma proteína adaptadora essencial na sinalização celular, especialmente na via MAPK. A Morina, por sua vez, é apresentada como um composto natural encontrado em plantas com propriedades anticancerígenas, capaz de inibir a proliferação celular e induzir a apoptose em várias linhagens de células cancerígenas. O presente estudo ainda sugere uma interação entre a Morina e a Grb2, com evidências de que a Morina pode competir pelo sítio de ligação hidrofóbico no domínio SH2 da Grb2. Além disso, são mencionados estudos que envolvem a mutação específica da Grb2 (Grb2(W121A)) para investigar o papel do triptofano 121 na interação com a Morina. Por fim, o texto ressalta a importância da Grb2 como um alvo terapêutico promissor para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer, com a Morina emergindo como um candidato promissor devido às suas propriedades anticancerígenas e interação potencial com a Grb2. Em síntese, o estudo desenvolvido oferece uma visão abrangente sobre a interação entre proteínas quinases, a Morina e o câncer, destacando a importância desses elementos na compreensão e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra o câncer.

Palavras-Chaves: Grb2, mutante 121, SH2

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma condição caracterizada por desregulações nas vias de sinalização que controlam a atividade proliferativa celular. Mutações nos genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular são responsáveis pelo desenvolvimento de certos tipos de câncer. Por exemplo, inibidores do ciclo celular desempenham um papel crucial na supressão da divisão celular quando as condições não são adequadas, e uma redução na sua atividade pode levar ao surgimento do câncer. Da mesma forma, um aumento na atividade dos reguladores positivos da divisão celular pode desencadear o desenvolvimento de câncer.[12].

Cânceres como o de próstata, ovário e doenças, como o de Hodgkin e a asma, estão associados às proteínas quinases, que são proteínas receptoras RTKs (*Receptor Tyrosine Kinase*), como, por exemplo, FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*). Esta, por sua vez, está relacionada à regulação do metabolismo celular, expressão gênica e diferenciação celular [12].

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas parceiras por

meio da transferência de um grupo fosfato do ATP. A dimerização dos receptores de FGF é essencial para a ativação desta proteína, o que resulta em um aumento na regulação de sua atividade quinase e subsequente autofosforilação de resíduos de tirosina em sua região C-terminal. Por esse motivo, o FGFR2 fornece sítios de ligação para o recrutamento de proteínas do citosol e a formação de complexos de sinalização primários, levando à ativação de vias de sinalização, como a da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) [12].

A proteína Grb2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*) é uma proteína adaptadora citosólica expressa exclusivamente em eucariotos, atuando em diversas vias de sinalização de proteínas quinases nas células [6]. As primeiras pesquisas relacionadas à proteína Grb2 basearam-se em seu importante papel na sinalização celular, especialmente em relação à via MAPK [6]. A proteína Grb2 modula essa via através de sua interação com RTKs e Sos (Pro-rich domain of the GTP-GDP exchange factor), sendo esta última responsável pela catalisação da substituição do GDP (Guanosina difosfato) ligado ao Ras (*Rat Sarcoma*) por GTP [5, 21-22]. Posteriormente, ocorre a formação de um complexo envolvendo GAP (*GTPase-activating protein*) e NF1 (*neurofibromin*), que se liga ao Ras-GTP, acelerando sua conversão para a forma monomérica de RasGEFs (*Ras-specific guanine nucleotide exchange*) [5]. A Grb2 possui uma estrutura composta por 217 aminoácidos e três domínios, sendo um domínio SH2 e dois domínios SH3, um N-terminal e outro C-terminal. São esses domínios que são responsáveis pelo reconhecimento de sequências específicas, permitindo as interações proteína-proteína e facilitando a sinalização celular [6].

O domínio SH2, assim como os outros domínios desse tipo, contém uma folha-beta central antiparalela entre duas alfas hélices [10]. Possui uma forma hemisférica, composta por cerca de 100 aminoácidos, responsável pelo reconhecimento de resíduos de fosfotirosinas [4]. Seu sítio de ligação é constituído por um bolsão de ligação com fosfotirosinas, na forma Y-x-N-x, conservado em todos os domínios SH2, e uma superfície de ligação formada pelos aminoácidos Q105, F107, H108, L120, W121, Y134 e L148, que reconhecem sequências de fosfotirosinas seguidas de 3 ou 4 aminoácidos, conferindo especificidade a cada domínio SH2 [10].

Pesquisas mostram que o flavonoide Morina (2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona) inibe a proliferação celular em diversos tipos de células carcinogênicas, inibindo o ciclo celular em tumores como o carcinoma oral e hepatócitos humanos [12]. A Morina induz a morte celular por apoptose em linhagens de células de câncer de pulmão do tipo não pequenas (H460), dependendo da concentração e do período de tempo, alterando a função mitocondrial [7]. Esse tipo de câncer está associado à atividade aberrante na via de sinalização estudada [8]. Além disso, é demonstrado que a Morina possui baixa toxicidade para o organismo, o que a torna um composto promissor para o desenvolvimento de fármacos [8]. No entanto, são necessários mais testes com o objetivo de elucidar as vias de indução de apoptose promovidas pela Morina nessa linhagem neoplásica [7].

Compreendendo que a Morina possui propriedades anti-tumorais e pode ser encontrada em espécies vegetais, torna-se uma molécula interessante para conduzir ensaios de interação com a proteína Grb2, a qual está relacionada à proliferação celular. De acordo com estudos sobre a interação da Grb2 com flavonoides [9], a Morina compete pelo sítio de ligação hidrofóbico localizado no domínio SH2. Essa característica hidrofóbica específica do domínio SH2 a torna importante para testes com moléculas farmacológicas.

Estudos prévios realizados [12,9] com moléculas como Morina, cumarina e rutina, juntamente com a proteína Grb2, sugerem que a interação ocorre próxima ao triptofano 121. Portanto, o objetivo de trabalhar com a Grb2(W121A), onde o triptofano 121 foi mutado para alanina, complementará o entendimento sobre a importância desse resíduo na interação da proteína com o flavonoide.

Considerando que a Grb2 está envolvida em eventos celulares básicos, como

crescimento celular, proliferação e metabolismo, muitos estudos evidenciaram sua ampla participação em vários tipos de câncer. Como resultado, a Grb2 tem sido um importante alvo para o estudo de moléculas com propriedades anticancerígenas, como a Morina [9].

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Expressão e Purificação

A proteína Grb2(W121A) será expressa utilizando o vetor pET28b em bactéria E.coli Gold (DE3). As colônias da proteína Grb2(W121A) serão cultivadas em meio líquido LB com a adição do antibiótico Canamicina (2 mM), sendo agitadas a 100 rpm a 37°C por 16 horas, aguardando-se que atinjam uma DO $\geq$ 0,6. Em seguida, será adicionado 0,2 mM de IPTG e induzido por 18 horas a 20°C com agitação de 100 rpm.

O meio será centrifugado a 4°C e 3583xg por 30 minutos. As células serão ressuspensas em tampão de lise contendo Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM) e β Me (1 mM), e serão lisadas por sonicação.

A amostra será centrifugada a 4°C e 34957xg por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, o produto será ressuspendido e filtrado por membrana de 0,45 micrometros e aplicado em uma resina de afinidade carregada com Cobalto, previamente equilibrada com Tampão A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM Imidazol e 1 mM β Me). A eluição da proteína Grb2 será realizada utilizando-se o Tampão B (Tampão A + Imidazol + 1 mM β Me), no qual a concentração de imidazol será aumentada gradativamente de 20 mM até 1 M, a fim de obter a maior pureza possível da proteína.

As amostras serão concentradas em 2 mL antes de serem injetadas na resina Superdex 75, previamente equilibrada com Tampão C (20 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, 1 mM β Me, pH 8,0) e eluída com o mesmo. O grau de pureza da proteína será verificado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15% [15].

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica usada para caracterizar a estabilidade de uma proteína diretamente em sua forma nativa. Esse processo é realizado através da alteração de calor associada a desnaturação térmica da proteína.

É necessário que se realize essa técnica para que haja conhecimento sobre a temperatura de melting da proteína de interesse onde será realizado outros experimentos que exigem dessa informação para que os dados coletados sejam sobre a proteína no seu estado funcional [14].

Esse experimento será utilizado para verificar a temperatura de melting da proteína na ausência e presença do ligante com uma pressão constante ajustada para 3Pa, onde se varia a quantidade de calor fornecido entre 10°C a 90°C com alternâncias entre resfriamento e aquecimento com a proteína em uma concentração de 1g/ml.

Espectroscopia de Fluorescência

A fluorescência é um experimento que permite observar a interação do ligante com a proteína de interesse. Um feixe de luz é emitido a partir de um estado excitado, no qual o elétron excitado não muda a direção do spin. Ao voltar ao estado fundamental, eles liberam o excesso de energia na forma de radiação. Essa radiação permite visualizar a interação do ligante com a Proteína através de um espectro.

Para realizar esse procedimento, será utilizado um espectrofluorímetro ISS PC1 (Champaign IL, USA) ligado a um banho térmico Nestlab RTE-221 (Thermo Electron Corporation, USA), onde metodologia presente é a mesma realizada em estudos de interação com a Grb2 [12]

Coloca-se uma amostra de 2mM de concentração de proteína em 2mL em uma cubeta quartzo de 1cm de caminho óptico onde será acrescentado também a Morina. Serão realizados essa técnica de interação para diferentes temperaturas em um comprimento de onda de 295 nm para excitação e de 305 a 500 nm na emissão, com as fendas de 1mm e 2mm. Essa técnica será realizada para 3 temperaturas, que serão definidas a partir dos dados obtidos por DSC; Os cálculos necessários para tratar os dados obtidos, serão os mesmos utilizados no estudo sobre interação com a Grb2 do artigo [9].

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os experimentos de DLS foram realizados para analisar o diâmetro hidrodinâmico da Grb2(W121A) na ausência e na presença do flavonoide morina. Para isso, utilizaremos uma amostra contendo 1.5 mg/mL de proteína que será previamente filtrada para evitar que partículas de poeira ou bolhas interfiram no experimento. A amostra será analisada a 20 °C, em uma cubeta de poliestireno com 1 cm de caminho óptico, no equipamento ZETASIZER NANO ZS90 (Malvern Panalytical). A concentração de flavonoide utilizada será definida a partir dos dados obtidos pela técnica de fluorescência. O cálculo do diâmetro é realizado automaticamente pelo equipamento a partir da velocidade das partículas em solução.

Dicroísmo Circular

O CD é um experimento utilizado para obter informações sobre as estruturas das proteínas. Uma vantagem dessa técnica é que pode-se obter informações de qualquer região espectral; é possível obter, porcentagem de hélices, folhas alfa e beta, ligação peptídica.

Baseado em estudos sobre interação da Grb2 com a Morina e Rutina [9] o CD mostra um comportamento positivo sobre a estrutura da proteína em pH alcalino quando interagido com os flavonoides, sendo de suma importância realizar a técnica com essa mesma interação da proteína Grb2 em pH alcalino com o flavonoide Morina e a mutação W121A, afim de complementar informações sobre a estrutura secundária e seu comportamento na ausência e presença do ligante.

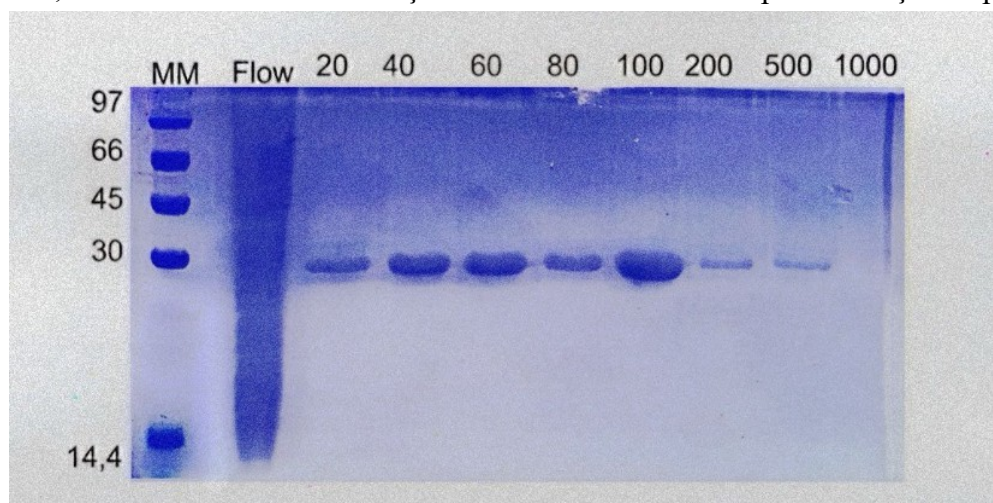
Para realizar o experimento utilizará do equipamento Jasco J-710, onde será colocado uma amostra da proteína de interesse com concentração de 10 uL. Será estabelecido comprimentos de onda 190 a 250 nm a uma temperatura de 20 °C com caminho óptico da cubeta de quartzo 0,1 cm, a uma velocidade de varredura 50 nm/min com resposta igual a 1 segundo e acumulações 10. A análise dos espectros será realizada pelo programa DichroWeb baseado no estudo sobre CD [1].

3 RESULTADOS

Expressão e purificação

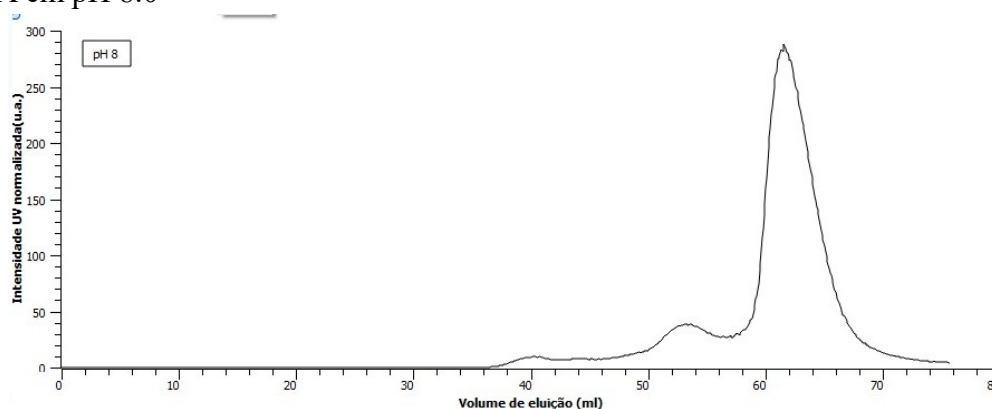
A proteína Grb2 W121A foi expressa seguindo protocolo descrito na metodologia. O processo de purificação foi realizado em duas etapas: afinidade por Cobalto e exclusão molecular automatizada. A purificação por afinidade ao Cobalto foi realizada com concentrações gradativas de Imidazol (20 - 1000 mM) e as amostras coletadas para aplicação em gel SDS-PAGE (Figura 1)

Figura 1 - Gel SDS-PAGE 15% da purificação de Grb2 W121A por afinidade ao Cobalto. MM - Marcador de massa molecular (kDa); Flow - proteínas que não apresentam afinidade por Cobalto; 20 - 1000 mM - concentrações de Imidazol utilizadas para a eluição da proteína.



Visto que as amostras já se encontravam puras, estas foram concentradas e aplicadas em coluna Superdex 75 apenas para troca de tampão nos pHs desejados. Mais uma vez, pode-se observar abaixo

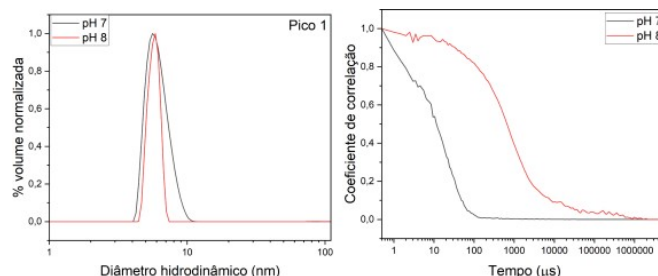
Figura 2 - Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína Grb2 W121A em pH 8.0



Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O perfil cromatográfico revelou que a proteína W121A demonstra uma alteração no volume de eluição entre os pHs 7.0 e 8.0, sugerindo uma variação em seu tamanho hidrodinâmico. Além disso, o deslocamento no volume de eluição do pico mais evidente, em comparação com as proteínas Grb2 WT e W60A, indica uma diferença no estado oligomérico entre elas. Foram conduzidos experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) nos dois picos da proteína W121A para avaliar a variação de tamanho entre os pHs analisados e a influência da mutação no triptofano 121 sobre o tamanho da proteína. A Figura 72 apresenta os gráficos percentuais de volume em relação ao tamanho em nanômetros e o coeficiente de correlação das amostras nos pHs 7.0 (representado em preto) e 8.0 (representado em vermelho) do primeiro pico de eluição da cromatografia por exclusão molecular.

Figura 3 - 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.



Para o primeiro pico, as duas amostras apresentam uma população superior a 99%. No entanto, há um deslocamento do pico para diâmetros hidrodinâmicos mais elevados em pH 8. Em pH 7.0, a proteína mostra uma maior flexibilidade, evidenciada pela largura do pico, com valores médios de 6,144 nm e desvio padrão de 1.113 nm, enquanto em pH 8.0, os valores médios são de 6,281 nm e desvio padrão de 0.286 nm. Essa diferença de diâmetro também é corroborada pelo gráfico do coeficiente de correlação, que mostra um maior decaimento da amostra em pH 7.0.

Dicroísmo Circular

Foram realizados experimentos de espectroscopia no infravermelho pH alcalino para investigar possíveis alterações estruturais causadas pela mutação do triptofano e para avaliar a preservação da estrutura secundária no estado monomérico da proteína. A análise da estrutura secundária foi feita através da deconvolução da banda Amida I ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$). A Figura 4 apresenta o espectro da região da Amida I para a proteína em pH 8.0, juntamente com as deconvoluções correspondentes às estruturas secundárias. As deconvoluções foram realizadas com o mínimo necessário para melhor representar o 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 representam duas regiões de folhas beta (~ 1630 e 1620).

Figura 4: mostra o espectro de infravermelho da região da amida I para a proteína Grb2 W121A em pH 8.0. O espectro experimental é representado em preto, enquanto o espectro calculado pela soma das deconvoluções é apresentado em verde escuro.

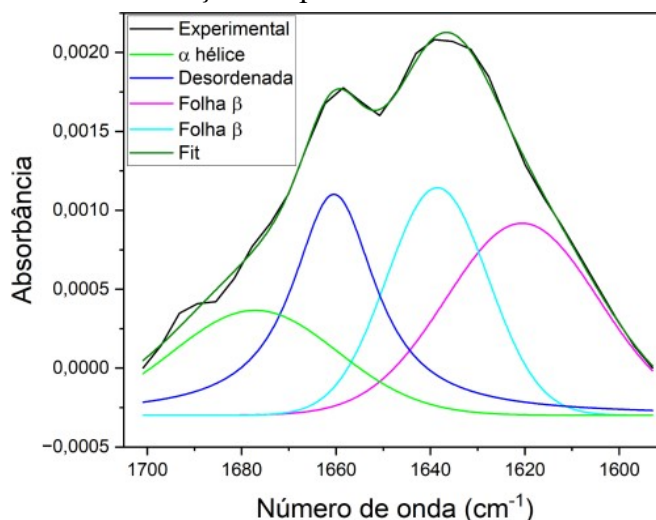


Tabela 1 – Composição da estrutura secundária da proteína Grb2 W121A em pH 8.0 com seus respectivos centros e porcentagens.

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

Assim como o observado para as proteínas anteriores, não foi possível observar uma influência de voltas beta no espectro em pH 8.0. No entanto, nota-se uma semelhança nos perfis associados às deconvoluções de estruturas desordenadas e folhas β, como pode ser observado na Tabela 1

4 CONCLUSÃO

Durante anos, o Triptofano 121 na proteína Grb2 foi considerado essencial para sua dimerização devido à sua estrutura desfavorável para um estado monomérico. No entanto, ao realizar uma mutação para alanina nessa posição, descobriu-se dois estados oligoméricos em solução através de cromatografia de exclusão molecular. O primeiro estado, similar aos dímeros conhecidos, e o segundo, sugerindo uma forma oligomérica menor que o dímero. A análise por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) confirmou essa observação, revelando uma diminuição no diâmetro hidrodinâmico para o segundo estado. Além disso, simulações de dinâmica molecular revelaram que o monômero com a mutação W121A é estável em diferentes pHs, destacando sua importância na estabilização do monômero e abrindo oportunidades para estudos de interação com outras proteínas e ligantes.

REFERÊNCIAS

Aldino Viegas, João o Manso, Franklin L. Nobrega, and Eurico J. Cabrita. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. Jornal of Chemical Education, Abril 2011.

Chardin, Pierre et al. The Grb2 adaptor. FEBS letters, v. 369, n. 1, p. 47-51, 1995

G. Bruylants!, J. Wouters? and C. Michaux. Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design. Current Medicinal Chemistry, 2005, 12.

(GIUBELLINO; BURKE, 2008a; LODISH et al., 2012; VOET; VOET, 2013)

KAWABATA, Kunihiro et al. Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. International journal of cancer, v. 83, n. 3, p. 381-386, 1999.

LOWENSTEIN, E. J. et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. Cell, v. 70, n. 3, p. 431- 442, 1992.

PEREIRA, W. L. et al. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de

oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. *Rev. bras. plantas med*, v. 17, n. 4, supl. 1, p. 798-806, 2015.

SAID, Rabih; TSIMBERIDOU, Apostolia Maria. Pharmacokinetic evaluation of vincristine for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 10, n. 3, p. 483-494, 2014.

Sanches, Karoline Thermodynamic profile and molecular modeling of the interaction between Grb2 dimer and flavonoids Rutin and Morin. *Journal of Molecular Structure*, 2021.

Sharon M.Kelly, Thomas J.Jess, Nicholas C. Price. How to study proteins by circular dichroism. *BIOCHIMICA ET.BIOPHYSICA ACTA/BBA*, July 2005.

Sanches, Karoline. Grb2 dimer interacts with Coumarin through SH2 domains: A combined experimental and molecular modeling study. *Heliyon*, 2019.

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

Tedesco, Jessica, Estudo biofísico-químico da proteína Growth Factor Receptor Bound Protein 2 (Grb2) em diferentes pHs e sua interação com a molécula 1,2-benzopirona., 2022.

Tedesco, Jessicam The influence of pH on the structure and stability of the Grb2 dimer reveals changes in the inter-domain and molecular interaction: Could it be a modulation mechanism?, *Biophysical Chemistry*, 2023.

(ANA M. TARI; GABRIEL LOPEZ-BERESTEIN, 2001, SÉBASTIEN MAIGNAN et al., 1995).