Effect of Quercetin flavonoid on structural changes of recombinant human FGFR2b kinase domain

Benyamin Alimohammadi[1], Faezeh Seyyed-Attaran[1], Milad Vali-shirin[1], Hossein Piri[2]

Background and Aim: Antioxidants are compounds that protect cells from attacks of free radicals. Lack of balance between antioxidants and free radicals results in oxidative stress, which ultimately results in cell damage. The effects of flavonoids are not related solely to their antioxidant properties, but also to their effects on cellular signal pathways. The present study was conducted to evaluate the effect of Quercetin on the structure of the third region of FGFR2b kinase using fluorescence method.

Materials and Methods: Using SDS-PAGE, expression of the protein was determined and its constant concentration was used in the present study. Using different concentrations of Quercetin in the presence of a constant concentration of pure protein, the fluorescence spectrum and chemical denaturation were evaluated.

Results: In the last studies, SDS-PAGE analysis of the purified proteins had confirmed that no contamination and unwanted bacterial proteins were co-eluted with the protein. Studying the spectrum of various concentrations of Quercetin in the presence of constant concentration of proteins showed a decrease in the intensity of the release; and also, the chemical denaturation changed the third structure of the kinase domain.

Conclusion: The tertiary structural change of FGFR2b kinase domain represents a conformational change that may have a critical role in signal transduction cascade. Thus, this molecular transduction inconsistency can lead to cellular transduction complication; and as a result, inhibit the development and multiplication of cancerous cells.

Key Words: Fibroblast growth factor receptor, Kinase domain, Flouresence spectroscopy, Quercetin.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24 (2): 94-100

Received: July 19, 2016 ***Accepted: August 30, 2017***

[1] *Student Research committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.*
[2] ***Corresponding Author;*** *Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.*
Email: hosseinpiry@gmail.com & hpiri@qums.ac.ir *Tel: +98-283-3336001-6* *Fax: +98-283-3324970-1*

مقاله اصیل پژوهشی

اثر فلاونوئید کوئرستین بر تغییرات ساختاری ناحیه کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b

بنیامین علیمحمدی[1]، فائزه سید عطاران[1]، میلاد ولی شیرین[1]، حسین پیری[2]

چکیده

زمینه و هدف: اثرات فلاونوئیدها تنها مربوط به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نمی‌باشد؛ بلکه این ترکیبات روی مسیرهای سیگنالی سلولی نیز تأثیر می‌گذارند. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر فلاونوئید کوئرستین بر ساختار سوم ناحیه کینازی پروتئین FGFR2b در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

روش تحقیق: در این مطالعه از تکنیک اسپکتروسکوپی فلوئورسانس یا فلوئورسانس ذاتی برای بررسی ساختار سوم پروتئین تخلیص‌شده در شرایط مختلف استفاده گردید. به‌منظور ارزیابی پایداری کنفورماسیونی پروتئین تخلیص‌شده و با کمک غلظت‌های مختلفی از گوانیدین هیدروکلرید (GnHCl) در دامنه غلظتی صفر تا ۶ مولار و طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر، دناتوراسیون شیمیایی پروتئین مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی SDS-PAGE نشان داد که پروتئین به‌دست آمده خالص بوده و عاری از آلودگی پروتئین‌های باکتریایی بود. نتایج حاصل از آزمایشات اسپکتروسکوپی فلوئورسانس نشان داد که شدت نشر فلوئورسانس در حضور کوئرستین و با افزایش تدریجی غلظت آن‌ها کاهش می‌یابد. دناتوراسیون ساختمان پروتئین نشان داد که نشر فلوئورسانس در حضور کوئرستین و با افزایش تدریجی غلظت آن کاهش یافت که نتیجه‌ی آن، تغییر ساختار سوم ناحیه کینازی بر اثر دناتوراسیون شیمیایی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: کوئرستین می تواند موجب تغییر ساختار سوم دومین کینازی و در نتیجه ناپایدار شدن آن گردد. این ناپایداری در سطح مولکولی می‌تواند موجب اختلال در مسیر پیام‌رسانی سلول شده و در نتیجه مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی گردد.

واژه‌های کلیدی: اسپکتروسکوپی، دومین کینازی، فلوئورسانس، فیبروبلاستی، کوئرستین، گیرنده عامل رشد.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۶؛ ۲۴ (۲): ۹۴-۱۰۰.

دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۰۸

[1] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

[2] **نویسنده مسؤول؛** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

آدرس: قزوین- دانشگاه علوم پزشکی قزوین- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

تلفن: ۰۲۸۳۳۳۳۶۰۰۱ نمابر: ۰۲۸۳۳۳۲۴۹۷۰ پست الکترونیکی: hosseinpiry@gmail.com و hpiri@qums.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر توجه زیادی به نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری و درمان سرطان شده است.آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که از سلول‌ها در برابر حملات رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نمایند (۱). عدم تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد باعث پدیده‌ای به نام استرس اکسیداتیو می‌شود که منجر به آسیب سلولی خواهد شد. فلاونوئیدها علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، دارای خاصیت ضدسرطانی می‌باشند که این عمل با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و حذف کارسینوژن‌ها و رادیکال‌های آزاد از شروع سرطان جلوگیری می‌کند (۲). همچنین، بررسی مطالعات مختلف اهمیت این ترکیبات را در مهار پیشرفت سرطان نشان می‌دهد. مطالعات سلولی در محیط‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که این ترکیبات روی مسیرهای سیگنالی سلولی نیز اثر گذار است. مراحلی نظیر: رشد سلول، تکثیر سلولی و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول می‌تواند تحت تأثیر فلاونوئیدها قرار گیرد. فلاونوئیدها از این طریق روی سرطان اثر پیشگیری‌کننده خود را نشان می‌دهند (۳،۴). با بررسی مطالعات مختلف، مکانیسم دقیق عملکرد ضدسرطانی فلاونوئیدها هنوز شناسایی نشده است. ترکیبات پلی‌فنولی می‌توانند روی مسیرهای مختلف انتقال پیام از جمله مسیر Phosphoinositid3-kinase(PI3-kinase) و AKT(protein kinase B) تأثیر گذارند و در نتیجه فرآیندهای تکثیر و تمایز سلولی و متاستاز را متأثر کنند. مسیرهای سیگنالی سلولی در کنترل همزمان رشد و تکثیر سلولی در سلول‌های سالم و بدخیم دخیل هستند (۵،۶). برخی از گیرنده‌های سلول از جمله گیرنده‌ی تیروزین کینازی در اثر فعال‌شدن اتصال لیگاندهایی نظیر فاکتورهای رشد منجر به فسفریلاسیون و فعال‌شدن آنزیم‌های PI3-kinase و AKT به‌عنوان یک کیناز مرکزی در این مسیر می‌شوند (۷،۸). اختلال در تنظیم بیان ژن گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGFR2b) یا موتاسیون این ژن در انواعی از سرطان‌های انسانی از جمله سرطان ریه و سینه شناخته شده است (۹،۱۰). در این مطالعه، خلوص پروتئین FGFR2b باعث شد تا ساختار ناحیه کینازی مورد بررسی قرار گیرد و اطلاعاتی درباره برهم کنش ساختار ناحیه دومین کینازی پروتئین و لیگاند به‌دست آمد. در مطالعه حاضر، اثر برهم کنش فلاونوئید کوئرستین بر ناحیه کینازی FGFR2b انسانی جهت بررسی تأثیر آن بر ناحیه کینازی پروتئین و مسیرهای سیگنالی درون سلولی و مکانیسم و اثر احتمالی آن بر متوقف‌کردن سلولی‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی، پروتئین FGFR2b از طریق بیان و تخلیص آن به‌دست آمد و کوئرستین از شرکت Sigma (آمریکا)، تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع خالص بودند. غلظت پروتئین مورد نظر که در برگیرنده ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود در طول موج ماکسیمم ۲۸۰ نانومتر با استفاده از ضریب جذب مولی برابر با $M^{-1}cm^{-1}$ ۴۱۱۶۰ و به‌وسیله دستگاه نانودراپ مدل EPOCH از شرکت BioTek آمریکا، براساس توالی آمینواسیدی مربوط به پروتئین محاسبه گردید. قابل ذکر است که وزن مولکولی پروتئین مذکور ۳۸ کیلودالتون در نظر گرفته شد (۱۱).

استفاده از تکنیک اسپکتروسکوپی فلوئورسانس یا فلوئورسانس ذاتی برای بررسی ساختار سوم پروتئین تخلیص‌شده در شرایط مختلف صورت گرفت. برای انجام این کار از دستگاه اسپکتروفلوریمتر واریان کری اکلیپس مدل بیو Fluorescence ، Cary-Eclipse، varian) ۷۰۰ Spectrophotomete) ساخت کشور استرالیا، که دارای کووت کوارتز (quartz cuvette) با قطر ۱۰ میلی‌متری بود، استفاده گردید. طول موج ۲۸۰ نانومتر به‌عنوان طول موج تحریکی و طول موج ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر به‌عنوان طول موج نشری پروتئین بود. از محلول بلانک برای از بین بردن اثر

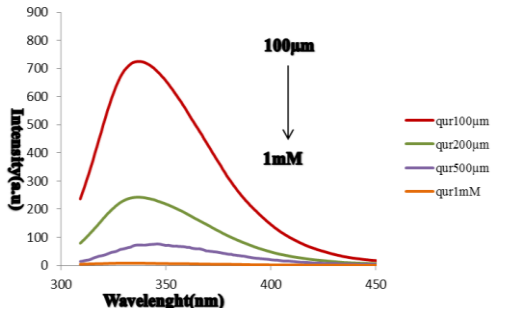
تداخل‌گری بافر حاوی پروتئین روی میزان نشر فلوئورسانس، استفاده شد (۱۱). حجم محلول داخل کووت ۴۰۰ میکرولیتر بود که ۲۰۰ میکرولیتر آن مربوط به نمونه پروتئینی و مابقی آن مربوط به بافر مورد استفاده بود. غلظت ثابت پروتئین مورد استفاده برای همه آزمایشات نیز ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

غلظت‌های مختلف فلاونوئید کوئرستین برای بررسی اثر آن روی شدت فلوئورسانس پروتئین (با غلظت ثابت)، در محدوده غلظتی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار (یا ۱ میلی‌مولار) آماده‌گردید و اثر هر کدام از غلظت‌ها به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. سپس، بعد از طی شدن زمان تیمار ۲۰ دقیقه‌ای، طیف نشری گرفته شد. برای تعیین غلظت مینیمم و ماکسیمم فلاونوئید مؤثر بر طیف نشری فلوئورسانس، آزمایش‌های ابتدایی صورت گرفت. در نهایت، مقایسه‌ای بین نتایج طیف نشری پروتئین مورد مطالعه در تیمار و عدم تیمار با فلاونوئید انجام شد. قابل ذکر است که همه آزمایشات به‌صورت دوبار تکرار صورت گرفت.

پس از بررسی ساختار سوم پروتئین به کمک فلوئورسانس ذاتی، مطالعه غیرطبیعی شدن ساختمان آن به کمک تکنیک اسپکتروسکوپی فلوئورسانس انجام شد. به‌منظور ارزیابی پایداری کنفورماسیونی پروتئین تخلیص‌شده، غلظت‌های مختلفی از گوانیدین هیدروکلرید (GnHCl) در دامنه غلظتی ۰ تا ۶ مولار تهیه شد. طول موج تحریکی روی ۲۸۰ نانومتر تنظیم گردید. با استفاده از بافر تریس–هیدروکلرید ۲۵ میلی‌مولار و نمک کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار در محیط با pH برابر ۷/۵، محلول‌های مختلف پروتئینی که غلظتی برابر با ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داشتند، آماده گردید. طیف نشری در حضور ۱۰۰ میکرومولار از کوئرستین به‌طور جداگانه مانیتور شد. در پایان، جهت رسم نمودار در غلظت‌های مختلفی از دناتوره‌کننده از طول موج ماکسیمم هر نشر استفاده شد (۱۱).

یافته‌ها

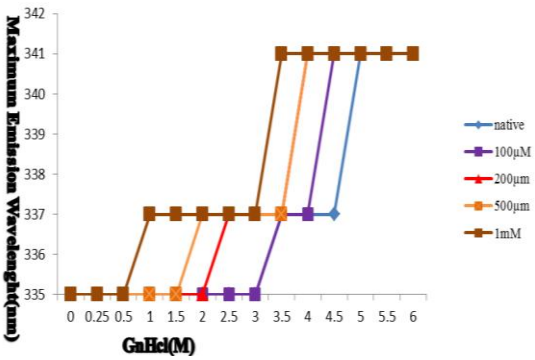
نتایج مربوط به انجام الکتروفورز به روش SDS-PAGE روی این پروتئین نشان داده است که القای مناسب پروتئین ناحیه کینازی FGFR2b رخ داده و خالص‌سازی مناسب آن به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی Ni2+- NTA صورت گرفته است (۱۱). در حضور فلاونوئید کوئرستین و به کمک تکنیک اسپکتروسکوپی فلوئورسانس، ویژگی ساختمان سوم ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایشات نشان داد که شدت نشر فلوئورسانس در حضور کوئرستین و با افزایش تدریجی غلظت آن‌ها کاهش می‌یابد. همچنین با تیتراسیون کوئرستین، تغییرات اندکی در میزان نشر فلوئورسانس در هنگام عدم استفاده از گوانیدین هیدروکلرید دیده شد. نمودار ۱ نشان‌دهنده کاهش میزان نشر در حضور افزایش غلظت کوئرستین می‌باشد.



نمودار ۱- فلوئورسانس ذاتی ساختار سوم ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در حضور غلظت‌های مختلف کوئرستین

با استفاده از روش فلوئورسانس ذاتی، وضعیت دناتوراسیون شیمیایی ساختار سوم ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در حضور کوئرستین و با غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلرید بررسی شد. نتایج به‌دست آمده کاهش شدت نشر فلوئورسانس را در حضور کوئرستین و با افزایش تدریجی غلظت آن‌ها نشان داد. با تیتراسیون کوئرستین تغییرات کمی در شیفت حداکثر طول موج نشری فلوئورسانس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر

مشاهده گردید. نمودار ۲ کاهش طول موج در برابر افزایش غلظت کوئرستین که یک مسیر آنفولدینگ سه مرحله‌ای با حضور غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلرید (غلظت‌های صفر تا ۶ مولار) است را نشان می‌دهد (نمودار ۲).



نمودار ۲- بررسی دناتوراسیون شیمیایی ساختار سوم ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b با استفاده از روش فلوئورسانس ذاتی در حضور کوئرستین و با غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلرید

بحث

با توجه به مطالعات قبلی، فلاونوئیدها از جمله آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که نقش مهمی در سرطان دارند؛ بنابراین کوئرستین که یکی از فلاونوئیدها است، به‌عنوان یک هدف درمانی جدید برای سرطان‌ها شناخته شده است (۱۰). اگرچه ترکیب‌های مؤثری برای مهار پروتئین کینازها شناسایی شده‌اند؛ اما مکانیسم مولکولی دقیق این مهارکننده‌ها در مهار فعالیت پروتئین کینازی به‌روشنی مشخص نیست (۱۱). پروتئین مورد نیاز برای انجام این پروژه به کمک تکنیک‌های زیست‌فناوری و از طریق ترانسفورماسیون ژن مربوطه در سوش BL21 باکتری اشریشیاکولی (*Escherichia coli*) حاصل گردید. مطالعات قبلی نشان داده است که گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای مربوط به انتقال علامت بیوشیمیایی مانند رشد و تمایز سلولی و بافتی ایفا می‌نماید. در این مطالعه، تغییرات روی ساختمان سوم دومین حاوی خاصیت کینازی، در تیمار با فلاونوئید کوئرستین و در مقایسه با حالت بدون حضور آن مقایسه و بررسی گردید. مطالعات نشان داده است که غلظت‌های مختلف از این ماده بر عملکرد این پروتئین تأثیر می‌گذارند (۱۲). در مطالعه حاضر از غلظت‌های مختلف کوئرستین با غلظت ثابت پروتئین استفاده شد تا تأثیر افزایش غلظت بر میزان سمیت تشخیص داده شود. برای بررسی ساختار سوم ناحیه کینازی مورد نظر با استفاده از روش اسپکتروسکوپی مذکور، نیاز به غلظت پروتئین در حد ۰/۲ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که در این مطالعه، غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین استفاده شد (۱۳). نتایج این مطالعه نشان داد که تحت تأثیر فلاونوئید کوئرستین و نیز با افزایش تدریجی غلظت آن، شدت نشر فلوئورسانس کاهش می‌یابد. با تیتراسیون کوئرستین بر اثر دناتوراسیون شیمیایی به کمک گوانیدین هیدروکلرید، تغییراتی در شیفت منحنی حداکثر طول موج نشری فلوئورسانس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر شاهده شد. با افزایش غلظت کوئرستین، ساختار سوم پروتئین تغییر کرده و به سمت آنفولد شدن پیش می‌رود. با توجه به مطالعه‌ی Burd و Vargas، افزایش غلظت کوئرستین باعث القای مرگ سلول می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت کوئرستین پروتئین‌های سیگنالی به‌طور چشمگیری کاهش پیدا می‌کنند (۱۵). همانند نتایج مربوط به تأثیرات فلاونوئید گالیک‌اسید بر ساختار سوم پروتئین مورد مطالعه، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش غلظت کوئرستین نیز باعث افزایش شدت نشر و در نتیجه مدفون‌شدن تریپتوفان انتهای رشته پلی‌پپتیدی در ساختار پروتئین می‌گردد (۱۶). همانند مطالعه قبلی، مطالعه آنفولدینگ یا غیرطبیعی‌سازی شیمیایی فلوئورسانس در حضور چندین غلظت کوئرستین نیز صورت گرفت (۱۶). این مطالعه در حضور بالاترین غلظت اثرکننده کوئرستین و در حضور تغییرات صعودی در غلظت گوانیدین هیدروکلرید به‌عنوان یکی از عوامل دناتوره‌کننده پروتئینی رایج، صورت گرفت (۱۷). نتایج به‌دست آمده نشان داد که غیرطبیعی شدن پروتئین مورد مطالعه در سه فاز صورت می‌گیرد که به‌دلیل

وجود دو حالت ترانزیشنال ناشی از بازشدن دو زیر دومین در مراحل جداگانه و تحت تأثیر غلظت‌های مختلفی از عامل دناتوره‌کننده در حضور غلظت‌های افزایشی فلاونوئید در محیط واکنشی می‌باشد. نتایج مذکور نشان می‌دهد، بین افزایش غلظت فلاونوئید و ناپایداری ساختار سوم پروتئین ارتباط مستقیم وجود دارد. براساس تحقیقات پیشین، یکی از اثرات فلاونوئیدها اثرگذاری بر سیستم انتقال علامت می‌باشد (۱۸). همچنین، کوئرستین می‌تواند با کاهش فعالیت پروتئین‌های مسیرهای سیگنالی منجر به کاهش دسترس‌پذیری زیستی و فعال‌شدن آپوپتوز گردد.

نتیجه‌گیری

با وجود یافته‌های حاصل از این مطالعه، مطالعات بیشتری با استفاده از تکنیک‌های دیگر جهت بررسی تأثیر ساختارهای دیگر برهم کنش بین پروتئین با کوئرستین در درمان سرطان نیاز می‌باشد (۱۹). همچنین برای تأیید و بررسی ساختار پروتئین و حد واسط‌های مسیر فولدینگ با استفاده از تکنیک‌های مختلف از جمله Far-UV-CD و FTIR، می‌توان تا خوردگی پروتئین را در ساختار دوم آن بررسی کرد و از آن در تهیه ترکیبات دارویی در درمان بسیاری از سرطان‌ها استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی میلاد ولی شیرین مصوب در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1394.432 می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و نیز از تمام کسانی که در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

1- Mathew A, Peters U, Chatterjee N, Kulldorff M, Sinha R. Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. Int J Cancer. 2004; 108(2): 287-92.

2- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 2000; 52(4): 673-751.

3- Pan MH, Ghai G, Ho CT. Food bioactives, apoptosis, and cancer. Mol Nutr Food Res. 2008; 52(1): 43-52.

4- Kale A, Gawande S, Kotwal S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. Phytother Res. 2008; 22(5): 567-77.

5- Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. Mol Nutr Food Res. 2008; 52(5): 507-26.

6- West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. Drug Resist Updat. 2002; 5(6): 234-48.

7- Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 2004; 9(6): 667-76.

8- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002; 2(7): 489-501.

9- Liu LZ, Fang J, Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. Mol Pharmacol. 2005; 68(3): 635-43.

10- Jain VK, Turner NC. Challenges and opportunities in the targeting of fibroblast growth factor receptors in breast cancer. Breast Cancer Res. 2012; 14(3): 208.

11- Moghadasi M, Ilghari D, Sirati-Sabet M, Amini A, Asghari H, Gheibi N. Structural characterization of recombinant human fibroblast growth factor receptor 2b kinase domain upon interaction with omega fatty acids. Chem Phys Lipids. 2017; 202: 21-7.

12- Feng S, Tang Q, Sun M, Chun JY, Evans CP, Gao AC. Interleukin-6 increases prostate cancer cells resistance to bicalutamide via TIF2. Mol Cancer Ther. 2009; 8(3): 665-71.

13- Bae JH, Lew ED, Yuzawa S, Tome´ F, Lax I, Schlessinger J. The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site. Cell. 2009; 138(3): 514-24.

14- Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di Bacco A, et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. Cancer Res. 2008; 68(7): 2340-8.

15- Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. Nutr Rev. 2010; 68(7): 418-28.

16- Seyyed-Attaran F, Ilghari D, Gheibi N, Sahmani M, Piri H. Expression and purification of the recombinant kinase domain of FGFR2b and study of its structural changes due to the interaction with gallic acid. J Isfahan Med Sch. 2016; 33(362): 2143-51.

17- Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. Curr Protein Pept Sci. 2000; 1(4): 349-84.

18- Gorinstein S, Goshev I, Moncheva S, Zemser M, Weisz M, Caspi A, et al. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. J Protein Chem. 2000; 19(8): 637-42.

19- Jana S, Chaudhuri TK, Deb JK. Effects of guanidine hydrochloride on the conformation and enzyme activity of streptomycin adenylyl transferase monitored by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. Biochemistry (Mosc). 2006; 71(11): 1230-7.