

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

Benyamin Alimohammadi¹, Faezeh Seyyed-Attaran¹, Milad Vali-shirin¹, Hossein Piri²

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, Fluorescence 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: hosseinpri@gmail.com & hpiri@qums.ac.ir

Tel: +98-283-3336001-6

Fax: +98-283-3324970-1

اثر فلاونوئید کوئرستین بر تغییرات ساختاری ناحیه کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b

بنیامین علیمحمدی^۱، فائزه سید عطاران^۱، میلاد ولی شیرین^۱، حسین پیری^۲

چکیده

زمینه و هدف: اثرات فلاونوئیدها تنها مربوط به خاصیت آنتی اکسیدانی 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 فلوروسانس یا فلوروسانس ذاتی برای بررسی ساختار سوم پروتئین تخلیص شده در شرایط مختلف استفاده گردید. به منظور ارزیابی پایداری کنفورماسیونی پروتئین تخلیص شده و با کمک غلظت‌های مختلفی از گوانیدین هیدروکلرید (GnHCl) در دامنه غلظتی صفر تا ۶ مولار و طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر، دناوراسیون شیمیایی پروتئین مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

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

نتیجه گیری: کوئرستین می‌تواند 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، فلوروسانس، فیبروبلاستی، کوئرستین، گیرنده عامل رشد.

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

دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۰۸

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

^۲ 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: ۰۲۸۳۳۳۳۴۹۷۰ پست الکترونیکی: hosseinpriy@gmail.com و hpiri@qums.ac.ir

مقدمه

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 به دست آمد. در مطالعه حاضر، اثر برهم کنش فلاونوئید کوئرسستین 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 متوقف کردن سلولی های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق

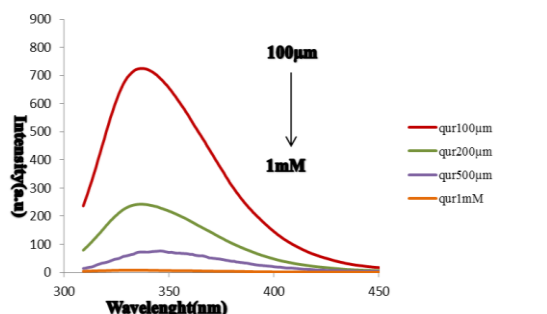
در این مطالعه تجربی، پروتئین FGFR2b از طریق بیان و تخلیص آن به دست آمد و کوئرسستین از شرکت Sigma (آمریکا)، تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع خالص بودند. غلظت پروتئین مورد نظر که در برگرفته ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود در طول موج ماکسیمم 280 nm با استفاده از ضریب جذب مولی برابر با $4160 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ و به وسیله 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 تخلیص شده در شرایط مختلف صورت گرفت. برای انجام این کار از دستگاه اسپکتروفلوریمتر واریان کری اکلپس مدل بیو ۷۰۰ (Cary-Eclipse, varian) ، Fluorescence Spectrophotometre) ساخت کشور استرالیا، که دارای کووت کوارتز (quartz cuvette) با قطر ۱۰ میلی متری بود، استفاده گردید. طول موج ۲۸۰ نانومتر به عنوان طول موج تحریکی و طول موج ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر به عنوان طول موج نشری پروتئین بود. از محلول بلانک برای از بین بردن اثر

در سال های اخیر توجه زیادی به نقش آنتی اکسیدان ها در پیشگیری و درمان سرطان شده است. آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که از سلول ها در برابر حملات رادیکال های آزاد محافظت می نمایند (۱). عدم تعادل بین آنتی اکسیدان ها و رادیکال های آزاد باعث پدیده ای به نام استرس اکسیداتیو می شود که منجر به آسیب سلولی خواهد شد. فلاونوئیدها علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی، دارای خاصیت ضدسرطانی می باشند که این عمل با تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و حذف کارسینوژن ها و رادیکال های آزاد از شروع سرطان جلوگیری می کند (۲). همچنین، بررسی مطالعات مختلف اهمیت این ترکیبات را در مهار پیشرفت سرطان نشان می دهد. مطالعات سلولی در محیط های آزمایشگاهی نشان می دهد که این ترکیبات روی مسیرهای سیگنالی سلولی نیز اثر گذار است. مراحل نظیر: رشد سلول، تکثیر سلولی و مرگ برنامه ریزی شده سلول می تواند تحت تأثیر فلاونوئیدها قرار گیرد. فلاونوئیدها از این طریق روی سرطان اثر پیشگیری کننده خود را نشان می دهند (۳،۴). با بررسی مطالعات مختلف، مکانیسم دقیق عملکرد ضدسرطانی فلاونوئیدها هنوز شناسایی نشده است. ترکیبات پلی فنولی می توانند 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 سلول های سالم و بدخیم دخیل هستند (۵،۶). برخی از گیرنده های سلول از جمله گیرنده تیروزین کینازی در اثر فعال شدن اتصال لیگاندهایی نظیر فاکتورهای رشد منجر به فسفریلاسیون و فعال شدن آنزیم های PI3-kinase و AKT به عنوان یک کیناز مرکزی در این مسیر می شوند (۷،۸). اختلال در تنظیم بیان ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGFR2b) یا موتاسیون این ژن در انواعی از سرطان های

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 Ni^{2+} -NTA صورت گرفته است (۱۱). در حضور فلاونوئید کوئرتستین 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 کوئرتستین و با افزایش تدریجی غلظت آن‌ها کاهش می‌یابد. همچنین با تیتراسیون کوئرتستین، 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 کوئرتستین می‌باشد.



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

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

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.

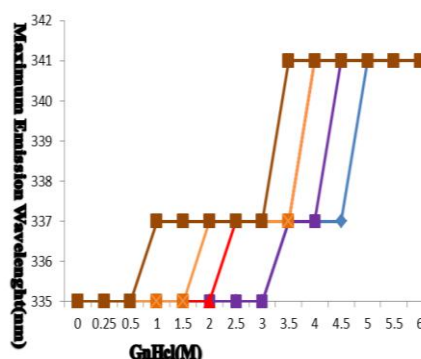
غلظت‌های مختلف فلاونوئید کوئرتستین برای بررسی اثر آن روی شدت فلوئورسانس پروتئین (با غلظت ثابت)، در محدوده غلظتی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار (یا ۱ میلی‌مولار) آماده‌گردید و اثر هر کدام از غلظت‌ها به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. سپس، بعد از طی شدن زمان تیمار ۲۰ دقیقه‌ای، طیف نشری گرفته شد. برای تعیین غلظت 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 کوئرتستین به‌طور جداگانه مانیتور شد. در پایان، جهت رسم نمودار در غلظت‌های مختلفی از دناتوره‌کننده از طول موج ماکسیمم هر نشر استفاده شد (۱۱).

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

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 کوئرسستین 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 کوئرسستین و نیز با افزایش تدریجی غلظت آن، شدت نشر فلئورسانس کاهش می‌یابد. با تیتراسیون کوئرسستین بر اثر دنا تورا سیون شیمیایی به کمک گوانیدین هیدروکلرید، تغییراتی در شیفت منحنی حداکثر طول موج نشری فلئورسانس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر مشاهده شد. با افزایش غلظت کوئرسستین، ساختار سوم پروتئین تغییر کرده و به سمت آنفولد شدن پیش می‌رود. با توجه به مطالعه‌ی Burd و Vargas، افزایش غلظت کوئرسستین باعث القای مرگ سلول می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت کوئرسستین پروتئین‌های سیگنالی به‌طور چشمگیری کاهش پیدا می‌کنند (۱۵). همانند نتایج مربوط به تأثیرات فلاونوئید گالیک اسید بر ساختار سوم پروتئین مورد مطالعه، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش غلظت کوئرسستین نیز باعث افزایش شدت نشر و در نتیجه مدفون شدن تریپتوفان انتهایی رشته پلی‌پپتیدی در ساختار پروتئین می‌گردد (۱۶). همانند مطالعه قبلی، مطالعه آنفولدینگ یا غیرطبیعی سازی شیمیایی فلئورسانس در حضور چندین غلظت کوئرسستین نیز صورت گرفت (۱۶). این مطالعه در حضور بالاترین غلظت اثرکننده کوئرسستین و در حضور تغییرات صعودی در غلظت گوانیدین هیدروکلرید به‌عنوان یکی از عوامل دنا توره‌کننده پروتئینی رایج، صورت گرفت (۱۷). نتایج به‌دست آمده نشان داد که غیرطبیعی شدن پروتئین مورد مطالعه در سه فاز صورت می‌گیرد که به‌دلیل

مشاهده گردید. نمودار ۲ کاهش طول موج در برابر افزایش غلظت کوئرسستین 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 دنا تورا سیون شیمیایی ساختار سوم ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نو ترکیب FGFR2b با استفاده از روش فلئورسانس ذاتی در حضور کوئرسستین و با غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلرید

بحث

با توجه به مطالعات قبلی، فلاونوئیدها از جمله آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که نقش مهمی در سرطان دارند؛ بنابراین کوئرسستین 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 فیروبلاستی 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 کوئرسستین و در مقایسه با حالت بدون

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.

وجود دو حالت ترانزیشنال ناشی از بازشدن دو زیر دومین در مراحل جداگانه و تحت تأثیر غلظت‌های مختلفی از عامل دنا توره‌کننده 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 برهم‌کنش بین پروتئین با کوئرستین در درمان سرطان

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.