



EMERSON RODRIGO MACHI GOMES

**“Caracterização bioquímica e celular da glutaminase isoforma
Kidney-type com seus parceiros de interação”**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

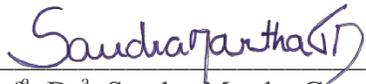
EMERSON RODRIGO MACHI GOMES

**“Caracterização bioquímica e celular da glutaminase isoforma
Kidney-type com seus parceiros de interação”**

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sandra Martha Gomes Dias

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO EMERSON RODRIGO MACHI GOMES E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. SANDRA MARTHA GOMES DIAS.


Prof^a. Dr^a. Sandra Martha Gomes Dias

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

G585c Gomes, Emerson Rodrigo Machi, 1977-
 Caracterização bioquímica e celular da glutaminase
 isoforma *Kidney-type* com seus parceiros de interação /
 Emerson Rodrigo Machi Gomes. -- Campinas, SP : [s.n.],
 2013.

 Orientador : Sandra Martha Gomes Dias.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Glutaminase. 2. Neoplasias. 3. PPAR gama. 4.
 Metabolismo tumoral. I. Dias, Sandra Martha Gomes. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Biochemical and cellular characterization of Kidney-type glutaminase with their interaction partners.

Palavras-chave em inglês:

Glutaminase

Neoplasms

PPAR gamma

Tumor metabolism

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Sandra Martha Gomes Dias [Orientador]

Ana Carolina Migliorini Figueira

Wilson Nadruz Junior

Data da defesa: 29-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

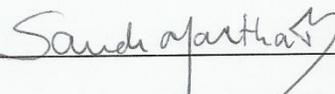
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

EMERSON RODRIGO MACHI GOMES

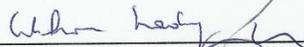
Orientadora **PROFA. DRA. SANDRA MARTHA GOMES DIAS**

MEMBROS:

1. **PROFA. DRA. SANDRA MARTHA GOMES DIAS**



2. **PROF. DR. WILSON NADRUZ JUNIOR**



3. **PROFA. DRA. ANA CAROLINA MIGLIORINI FIGUEIRA**



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 29 de maio de 2013

Sumário

1	Introdução	11
1.1	O efeito Warburg.....	11
1.2	O ciclo do ácido tricarbóxico	15
1.3	As diferentes glutaminases	18
1.4	Potenciais Parceiros de Interação da KGA	20
1.4.1	Aldolase A.....	20
1.4.2	BNIP-H	22
1.4.3	Receptores nucleares.....	23
1.4.3.1	PPAR γ	28
2	Objetivos.....	32
3	Objetivos Específicos	33
4	Material e Métodos.....	34
4.1	Estudos bioquímicos e biofísicos	34
4.1.1	Clonagem e manipulação de ácidos nucléicos	34
4.1.2	Testes de expressão em <i>E. coli</i>	37
4.1.3	Expressão e purificação de proteínas.....	38
4.1.3.1	KGA.....	38
4.1.3.2	Aldolase A, BNIP-H e PPAR γ	40
4.1.4	<i>Pull-down</i>	42
4.1.4.1	KGA:Aldolase A	42
4.1.4.2	KGA:PPAR γ	43
4.1.5	Anisotropia de Fluorescência	44
4.1.6	Ensaio de atividade enzimática	48
4.1.7	Análise da formação do complexo em coluna de filtração em gel analítica ..	49
4.1.8	<i>Crosslinking</i> e <i>docking</i> molecular	50
4.1.9	Eletroforese em Gel Nativo	52

4.2	Estudos celulares	52
4.2.1	Duplo híbrido da KGA.....	52
4.2.2	Cultura de células de mamíferos	58
4.2.3	Transfecção de células de mamíferos	58
4.2.4	Co-imunoprecipitação.....	59
4.2.5	<i>Western Blotting</i>	60
4.2.6	Co-localização por Imunofluorescência.....	61
4.2.7	<i>Immunogold labelling</i>	62
4.2.8	Ensaio de transativação celular	64
4.2.9	qPCR.....	64
5	Resultados.....	66
5.1	Estudo da interação KGA:Aldolase A.....	66
5.1.1	Teste de expressão da Aldolase A	66
5.1.2	Purificação.....	66
5.1.3	<i>Pull-down</i>	68
5.1.4	Co-imunoprecipitação.....	69
5.2	BNIP-H : KGA.....	70
5.2.1	Teste de expressão da BNIP-H.....	70
5.2.2	Co-imunoprecipitação.....	74
5.2.3	Co-localização por imunofluorescência.....	75
5.3	KGA : PPAR γ	76
5.3.1	Prospecção de parceiros de interação pela técnica de duplo híbrido em levedura 76	
5.3.2	Identificação do domínio de interação.....	78
5.3.3	Purificação.....	79
5.3.4	<i>Pull-Down</i>	80
5.3.5	Análise por Cromatografia de Exclusão Molecular.....	81
5.3.6	Anisotropia de Fluorescência	82
5.3.7	Eletroforese em Gel Nativo	83
5.3.8	<i>Crosslinking</i>	84
5.3.9	Localização por imunofluorescência	87

5.3.10	<i>Immunogold labelling</i>	88
5.3.11	Ensaio de Atividade Enzimática.....	89
5.3.12	Ensaio de transativação celular	90
5.3.13	qPCR.....	91
6	Discussão	92
7	Perspectivas	96
8	Conclusões	98
9	Referências.....	99

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe cujo exemplo de pessoa batalhadora sempre me inspirou em minhas conquistas.

Ao meu pai, pelo apoio que também contribui para minhas conquistas.

À minha namorada Jully, minha companheira e cúmplice, pela paciência e carinho nesses anos.

À minha orientadora Sandra, pela oportunidade e pelos ensinamentos que elevaram grandemente os meus conhecimentos científicos.

Ao André, pela oportunidade inicial, ajuda e por quem tenho grande respeito e admiração.

Ao Marcel e a Carol, pela amizade e ajuda que foram ímpares no desenvolvimento deste projeto.

Aos grupos LEC, MAS, LPP, LBE, à Carollzinha, Douglas, Silvio Consonni, Rodrigo Honorato pela colaboração.

A todos os amigos do laboratório pela amizade, os momentos de descontração, ajuda e conselhos que sempre serão lembrados.

À Fapesp pelo apoio financeiro.

Ao LNBio pelos *facilities*.

Resumo

Células tumorais apresentam uma autonomia metabólica aumentada em comparação a células não-transformadas, incorporando nutrientes e metabolizando-os através de vias que suportam o seu crescimento e proliferação. O foco deste trabalho foi a enzima glutaminase, a qual processa glutamina em glutamato para posterior produção de alfa-cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase, reabastecendo o ciclo do TCA e suportando seu funcionamento e geração de metabólitos essenciais para a síntese de macromoléculas. O gene GLS1 codifica para as isoformas glutaminase *kidney-type* (KGA) e glutaminase C (GAC). Estas proteínas apresentam outros domínios além do catalítico, e, no caso da KGA, repetições do tipo *ankirin*, sabidamente envolvidas em contatos proteínas-proteínas. Os objetivos deste projeto foram de encontrar parceiros de interação para a glutaminase *kidney-type* (KGA) e avaliar o impacto desta interação para o metabolismo tumoral. Um candidato inicialmente avaliado, a Aldolase A, não foi confirmado como parceiro de interação. Outro candidato, a BNIP-H, apesar de ter sido mostrado interagir com a KGA em células nervosas, não mostrou indícios de interação com a KGA em linhagem de células de câncer de mama. Por fim, estudos de duplo-híbrido em levedura revelaram o receptor nuclear PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) como forte candidato a parceiro de interação. Realizou-se um mapeamento dos domínios responsáveis pela interação entre estas duas proteínas, também por duplo híbrido, tendo sido identificado o domínio LBD da proteína PPAR γ como envolvido na interação. Mesmo estudos realizados com fragmento da KGA, apesar de incompletos, mostraram que a interação não ocorre pelo domínio carboxi-terminal da enzima. Ensaio de anisotropia de fluorescência com as proteínas KGA e PPAR γ purificadas indicaram que a interação é favorecida pela presença do produto da reação glutaminolítica, glutamato, e apresenta um Kd de $4,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Microscopia confocal de imunofluorescência mostrou que ambas as proteínas se co-localizam no citoplasma, mas não no núcleo. Mais, verificou-se que em células HEK 293T a presença de KGA diminui a capacidade de transativação de PPAR γ induzida pelo ativador rosiglitazona, enquanto que celular PC3 com superexpressão de KGA apresentam níveis diminuídos de expressão da proteína ACADL, alvo do PPAR γ . Da mesma maneira, ensaios *in vitro* de atividade da KGA mostraram que a presença de PPAR γ inibe a atividade da glutaminase. Nossos resultados mostram a interação *in vitro* entre as proteínas KGA-PPAR γ e a potencial influência funcional que uma proteína exerce sobre a outra. Dado a participação de ambas as proteínas no processo tumoral, especula-se que esta interação possa ter impacto no desenvolvimento do câncer.

Abstract

Tumor cells have an increased metabolic autonomy compared to non-transformed cells, metabolizing nutrients and incorporating them through pathways that support cell growth and proliferation. The focus of this study was the glutaminase enzyme, which processes glutamine to glutamate for subsequent production of alpha-ketoglutarate, by the glutamate dehydrogenase enzyme, replenishing TCA cycle and bearing its function and the generation of metabolites essential for the synthesis of macromolecules. The gene GLS1 codes for the isoforms kidney-type glutaminase (KGA) and glutaminase C (GAC). These proteins exhibit other domains besides the catalytic, and in the case of KGA, ankirin repeats, known to be involved in protein-protein contacts. The goal of this project was to investigate potential interacting partners of KGA and contextualize the interaction within the metabolic demands of tumor cells. A candidate initially evaluated, the Aldolase A, was not confirmed as a partner of interaction. Another candidate, the BNIP-H, despite having been shown to interact with the KGA in nervous cells, showed no evidence of interaction with KGA in one tested breast cancer cell lines. Finally, yeast two-hybrid studies revealed the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) as a strong interaction partner candidate. We mapped the domains responsible for the interaction between these two proteins, also by two-hybrid and identified the LBD domain of PPAR γ as involved in the interaction. The same studies with KGA fragments, although incomplete, showed that the interaction did not involve the carboxy-terminal domain of the enzyme. KGA and PPAR γ proteins were expressed in *E. coli*, purified and their interaction was analyzed by pull-down, fluorescence anisotropy, electrophoresis under native conditions, gel filtration chromatography and crosslinking. The assays indicated that the interaction is favored by the presence of the reaction product glutamate and has a K_d of $4,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ and disfavored by phosphate. Immunogold labeling followed by transmission electron microscopy of SKBR3 cells revealed a curious nuclear staining pattern probably heterochromatic of KGA. Immunofluorescence confocal microscopy showed that both proteins co-localize in the cytoplasm but not in the nucleus. Moreover, it was found that in HEK 293T cells, the presence of KGA decreases PPAR γ ability of inducing transactivation of a reporter gene, while PC3 cell overexpressing KGA have low levels of protein expression ACADL target this receptor. Likewise, activity *in vitro* assays in the presence of KGA showed that PPAR γ receptor inhibits the glutaminase activity. Our results demonstrate the *in vitro* interaction between proteins KGA-PPAR γ and the potential functional influence that these proteins exerts on each other. Given the involvement of both proteins in the tumor growth, it is speculated that this interaction may have impact on the development of cancer.

1 Introdução

1.1 O efeito Warburg

A proliferação celular em mamíferos é essencial para diversos processos do organismo tais como a embriogênese, o crescimento e a correta função de vários tecidos adultos. O processo está sob o fino controle de vias de sinalização acionadas por fatores de crescimento, mesmo quando na presença abundante de nutrientes. No caso de tumores, essas mesmas vias se tornam constitutivamente acionadas devido a mutações em oncogenes e/ou supressores de tumores, o que leva, entre outros, ao aumento robusto na captação dos nutrientes e proliferação desregulada ¹⁻³. Os nutrientes captados são direcionados para vias metabólicas que visam a produção dos intermediários biossintéticos, como aminoácidos, lipídeos e ácidos nucleicos, posteriormente usados na síntese de macromoléculas requeridas para o crescimento e divisão celular. Desta maneira, sinais que estimulam a proliferação celular precisam também participar na reorganização da atividade metabólica que permitirá o início da proliferação de células até então quiescentes. O completo conhecimento dos mecanismos de regulação destes diferentes fluxos metabólicos é de suma importância para o entendimento do processo de multiplicação celular e consequente processo tumoral ⁴.

Na última década, o estudo de diversos tipos de células proliferativas tem permitido o desenho de um cenário completo do metabolismo de células em constante divisão. Este metabolismo difere de células quiescentes pela alta taxa de glicólise, mesmo na presença de oxigênio, produção de lactato e a biossíntese de lipídeos e outras macromoléculas ⁴. A observação deste fenômeno foi originalmente feita pelo fisiologista alemão Otto Warburg em meados da década de 1920 ⁵⁻⁷ e rendeu à Warburg o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina

em 1931. A observação de Warburg é hoje bastante aceita pela comunidade científica, já tendo sido demonstrada em diversos tipos de câncer. Além disto, o “efeito Warburg”, ou glicólise aeróbica, como ficou conhecido, está associado ao aumento concomitante na captação de glicose e é explorado clinicamente na detecção de tumores pela técnica do FDG-PET (*Fluor_{deoxyglucose} Positron Emission Tomography*) (Figura 1) ⁸⁻¹⁰. A captação aumentada de glicose detectada pela técnica FDG-PET se correlaciona com um prognóstico ruim e alto potencial metabólico em vários tipos de tumor ⁴.

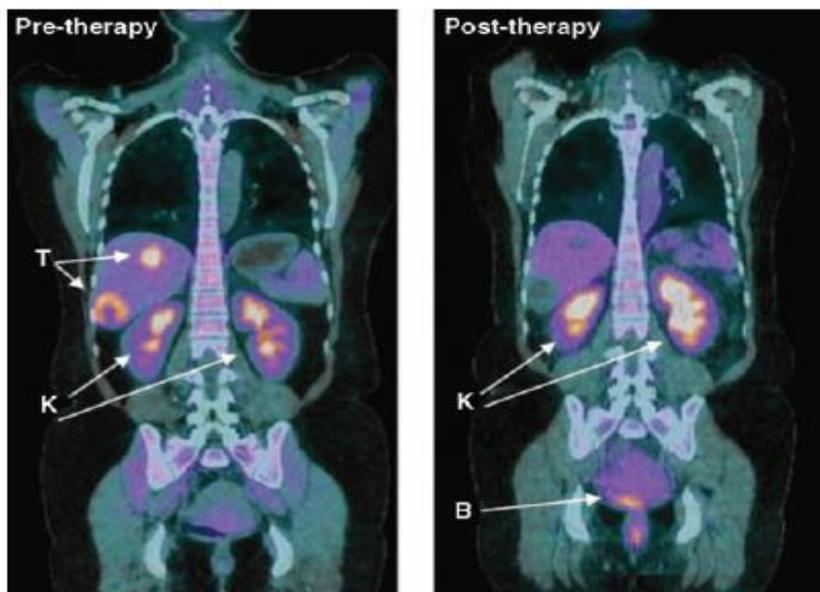


Figura 1: Tomografias de emissão de pósitron usando glicose marcada com flúor 18 (FDG-PET). As figuras mostram diminuição de tumores, visualizados como regiões de alta captação de glicose marcada, após terapia anticâncer. O tumor (T) é facilmente visualizado por FDG-PET antes da terapia (à esquerda). Após 4 semanas de tratamento (direita), o tumor regride e praticamente não se

detecta mais a captação da glicose. Excesso de FDG que é excretado na urina e, portanto, os rins (K) e bexiga (B) também emitem sinal ¹¹.

Na presença de oxigênio, células não transformadas metabolizam glicose produzindo dióxido de carbono pela oxidação do piruvato, gerado pela via glicolítica, na mitocôndria através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Esta reação produz NAD^+ reduzido (NADH) que abastece a fosforilação oxidativa maximizando a produção energética em 36 moléculas de

ATP por molécula de glicose, com uma produção mínima de lactato. Sob condições anaeróbicas células não transformadas produzem maior quantidade de lactato. Em contraste, a maioria das células cancerosas produzem grandes quantidades de lactato, independentemente da disponibilidade de oxigênio com um rendimento máximo de apenas 4 moléculas de ATP por molécula de glicose e, por isso, o seu metabolismo é muitas vezes referido como "glicólise aeróbica" (Figura 2)¹¹.

A via da glicólise aeróbica é somente 5% eficiente em termos da produção de ATP quando comparada com a fosforilação oxidativa, o que poderia indicar um contrassenso às necessidades energéticas de tecidos tumorais. Entretanto, com uma taxa glicolítica alta o suficiente, como acontece no processo canceroso, a porcentagem final de ATP produzida pela glicólise pode exceder à produzida pela via oxidativa. Além disso, a provável ineficiência na produção de ATP seria um problema somente no caso de escassez de suprimentos, como a glicose, o que não é o caso das células proliferativas de mamíferos que estão expostas a um contínuo suprimento de glicose e outros nutrientes disponíveis na corrente sanguínea. Além do mais, em contraste com a respiração mitocondrial, a geração de energia pela glicólise é independente da presença de oxigênio no ambiente celular, conferindo assim aos tumores a capacidade de sobrevivência e a possibilidade de migração para áreas hipóxicas, um fator crucial pra o crescimento do mesmo. Entretanto, a observação de que células derivadas de tumores hipóxicos cultivadas em condições de normóxia ainda mantém o fenótipo glicolítico indica que a força dirigente do aumento da glicólise não é uma simples adaptação às condições de falta de oxigênio e que, ao contrário, mecanismos genéticos estabilizados podem promover a ativação glicolítica dentro dos tumores¹⁰.

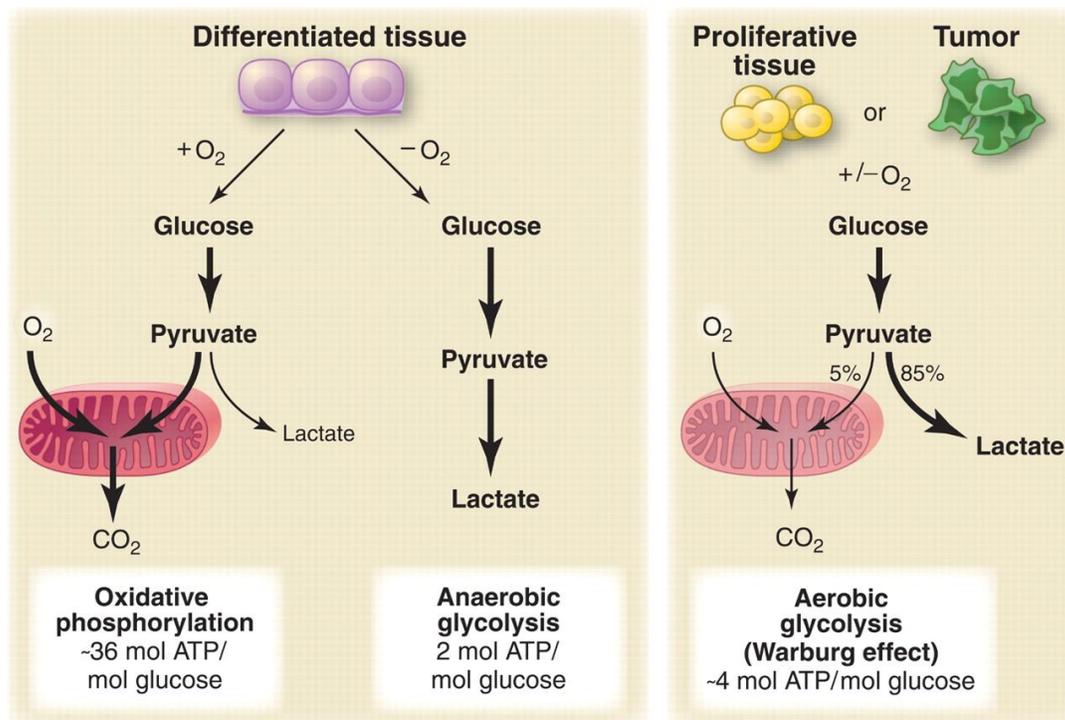


Figura 2: Representação esquemática das diferenças entre a fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica, e glicólise aeróbica (efeito Warburg). Na presença de oxigênio, tecidos não proliferativos metabolizam a glicose, através da glicólise, para piruvato e, em seguida, oxidam completamente a maior parte do piruvato produzindo CO₂ na mitocôndria, durante o processo de fosforilação oxidativa. O oxigênio é necessário como o último receptor de elétrons para oxidar completamente a glicose, tornando-se essencial para este processo. Quando o oxigênio é limitante, as células podem redirecionar o piruvato gerado pela glicólise para fora da fosforilação oxidativa mitocondrial através da geração de lactato (glicólise anaeróbica). Esta geração de lactato durante a glicólise anaeróbica permite a glicólise continuar (pela oxidação de NADH a NAD⁺), mas resulta na produção mínima de ATP quando comparada com a fosforilação oxidativa. Warburg observou que as células cancerosas tendem a converter mais glicose em lactato independentemente da presença de oxigênio (glicólise aeróbica). Esta propriedade é compartilhada por tecidos normais proliferativos. A mitocôndria permanece funcional e parte da fosforilação oxidativa continua tanto nas células cancerosas quanto nas células normais proliferativas. No entanto, a glicólise aeróbica é menos eficiente do que a fosforilação oxidativa para a geração de ATP. Em células proliferativas, cerca de 10% da glicose é desviada para vias biossintéticas *upstream* da produção de piruvato¹¹.

Outro aspecto importante do processo de adaptação metabólica tumoral que decorre da intensificação das vias glicolíticas é que o mesmo, além de atender as necessidades bioenergéticas das células, também coopera com a necessidade da produção de intermediários

usados na síntese das macromoléculas, essencial para duplicação da biomassa celular. Neste sentido, a via da glicólise, através dos braços oxidativos e não oxidativos de produção de ribose 5-fosfato, é fonte essencial de blocos moleculares para a síntese de nucleotídeos ¹⁰.

1.2 O ciclo do ácido tricarboxílico

Para sintetizar lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, as células usam precursores do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 3). Desta maneira, o papel chave do ciclo TCA nas células em proliferação é o de agir como uma fonte de metabólitos para a biossíntese. Isto representa uma diferença importante em relação ao metabolismo não proliferativo de tecidos oxidativos, como o cardíaco por exemplo, onde a visão tradicional do ciclo TCA é o de servir para extração máxima de ATP a partir de substratos oxidáveis. Durante a proliferação celular, muito do carbono que entra o ciclo TCA é usado em vias biossintéticas que consomem, ao contrário de produzir ATP. O resultado é o contínuo efluxo de intermediários metabólicos (cataplerose) ^{4,9,12}.

A síntese de lipídeos (ácidos graxos, colesterol, e isoprenóides) é o perfeito exemplo de cataplerose que ocorre nas células proliferativas. A glicose metabolizada que entra no ciclo TCA dentro da mitocôndria na forma de piruvato é convertida a acetil-CoA, e então em citrato. Os níveis diminuídos de super-óxido dismutases encontrado em alguns tumores levam ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), resultando na inibição da metalo-proteína aconitase, que é parte do ciclo do ácido cítrico e converte citrato em isocitrato. O citrato acumulado é exportado da mitocôndria para o citoplasma onde é convertido à oxaloacetato (OAA) e o precursor lipogênico, acetil-CoA, alimentando a síntese de lipídeos. Outros intermediários do ciclo do TCA também são usados para a biossíntese de

diferentes macromoléculas, como o OAA e α -cetoglutarato, os quais suplementam o *pool* de aminoácidos não essenciais que serão usados para a síntese de proteínas e nucleotídeos (Figura 3). Estes fenômenos corroboram com o truncamento do ciclo TCA, o que compromete a produção de NADP reduzido e intermediários metabólicos.

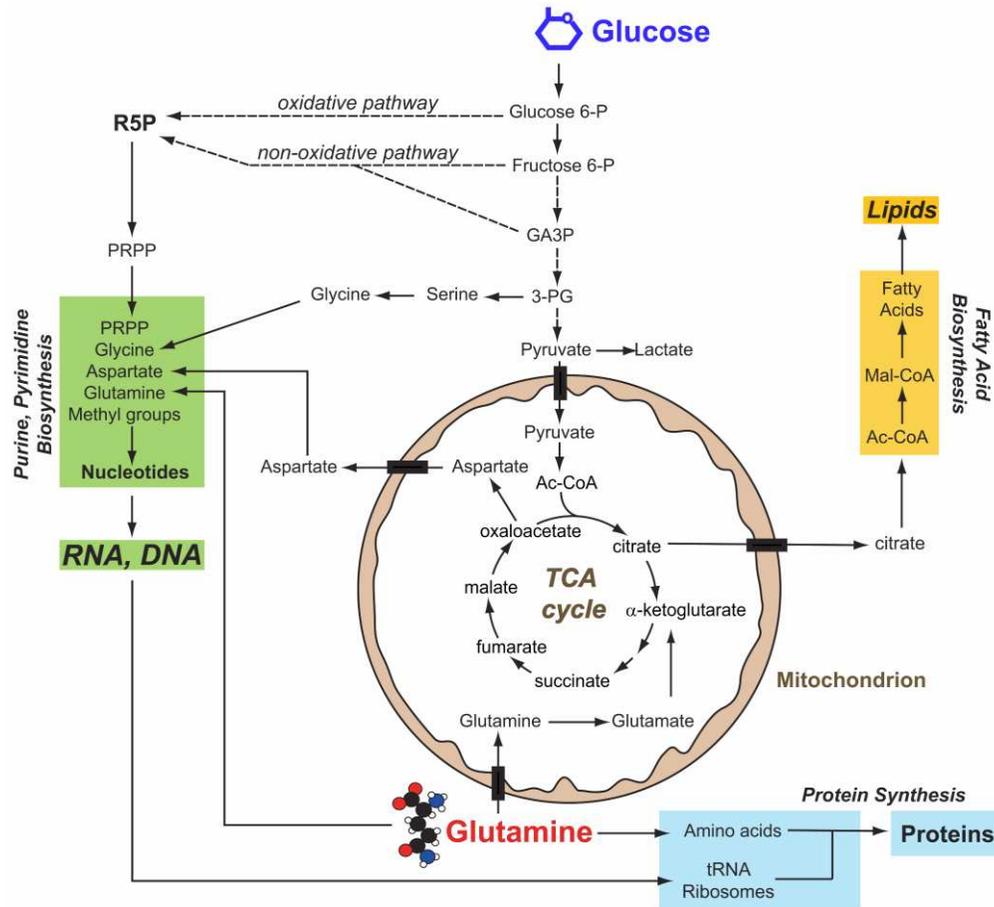


Figura 3: Células tumorais obtêm os precursores biossintéticos a partir do metabolismo da glicose e glutamina. A glicose e a glutamina, os quais são os dois nutrientes mais abundantes no meio extracelular, fornecem carbono para a síntese de ácidos nucleícos, lipídeos e proteínas. A biossíntese de purina e pirimidina utiliza ribose 5-fosfato (R5P) produzida pelos braços oxidativos e não-oxidativos da via ribose fosfato, e aminoácidos derivados da glicose e glutamina. A síntese de ácidos graxos, necessária para a produção de lipídeos requer acetil-CoA (Ac-CoA) gerado a partir do citrato exportado da mitocôndria. A síntese de proteínas requer aminoácidos, tRNAs e ribossomos, sendo que ambas glicose e glutamina são usados para gerar estas moléculas. Glutamina também doa nitrogênio para nucleotídeos e para a síntese de aminoácidos. P, fosfato; GA3P, gliceraldeído3-fosfato; 3-PG, 3-fosfoglicerato; PRPP, fosforibosilpirofosfato; Mal-CoA, malonil-CoA¹⁰.

A cataplerose do ciclo do TCA precisa ser compensada por algum mecanismo anaplerótico de maneira a manter o ciclo do TCA funcional. Uma fonte importante de anaplerose é o metabolismo de aminoácidos, particularmente o da glutamina, o aminoácido mais abundante em mamíferos. A glutamina em tecidos normais serve como carregador não-tóxico de nitrogênio, além de ser precursor na síntese de outras moléculas importantes como glutatona, ácido fólico e neurotransmissores como glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) ¹³⁻¹⁵.

As células podem oxidar a glutamina parcialmente de uma maneira análoga à oxidação parcial da glicose através da glicólise aeróbica. Esta via, conhecida como glutaminólise, a qual é indiferente aos níveis de ROS encontrados em tumores, usa diversos passos do ciclo TCA e torna a glutamina uma fonte energética para as células proliferativas ^{4,10,12}. O primeiro passo da glutaminólise é orquestrado pela glutaminase que catalisa a deaminação hidrolítica da glutamina em glutamato. Além da formação de glutamato há também a formação de aspartato, os quais, junto com a glutamina por si, são precursores de ácido nucléico e serina. Também dentro da via da glutaminólise, o alfa-cetoglutarato, produzido a partir do glutamato, é convertido em succinato, o qual é metabolizado a fumarato e então malato. A conversão do malato tanto em oxaloacetato quanto em piruvato (no citoplasma) é importante fonte de NADPH e evidências sugerem que essa etapa pode ser a maior fonte de NADPH em células cancerosas. Oxaloacetato, combinado com acetil-CoA, gera citrato e alimenta a produção de lipídeos. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear na presença de substratos marcados com C^{13} tem revelado o uso da glutamina como o principal precursor anaplerótico em células de glioma proliferativas ¹⁶. Além disto, estudos recentes mostram que a inibição da enzima glutaminase por um inibidor sintético, assim como

seu *knock-down* por siRNA, desacelera o crescimento tumoral sem, entretanto, afetar células normais ¹⁷.

Tomados em conjunto, estas observações sugerem que o metabolismo da glutamina permite às células proliferativas manterem um fluxo anaplerótico compatível com o uso dos intermediários metabólicos do ciclo TCA como precursores biossintéticos. A Figura 3 apresenta um quadro geral que resume como o metabolismo de células proliferativas é adaptado para a biossíntese.

1.3 As diferentes glutaminases

Mamíferos contêm dois genes distintos, mas estruturalmente relacionados, que codificam para a glutaminase. Estes genes provavelmente se formaram por duplicação seguida de evolução divergente ^{18,19} e codificam para pelo menos três diferentes isoformas de glutaminases. O gene GLS1, constituído de 19 éxons e presente no cromossomo 2, codifica para duas isoformas produzidas por *splicing* alternativo, denominadas KGA (*Kidney-type glutaminase*) e GAC (*Glutaminase C*). A KGA apresenta os éxons 1-14/16-19 e é expressa de maneira constitutiva na maioria dos tecidos, com exceção do fígado ^{20,21}. A GAC é codificada pelos éxons 1-15, sendo comumente encontrada em coração, pâncreas, rim e pulmão ²¹. KGA e GAC compartilham completa identidade sequencial desde o N-terminal até o fim do domínio glutaminase, e, devido à ocorrência de *splicing* após a sequência codante para estas regiões, o C-terminal das duas é somente 4% idêntico (Figura 4).

O gene GLS2, presente no cromossomo 12, consiste em 18 éxons e codifica para a enzima LGA, ou *Liver-type Glutaminase*. Originalmente identificada no fígado, LGA também é encontrada em tecidos cerebrais e no pâncreas ²².

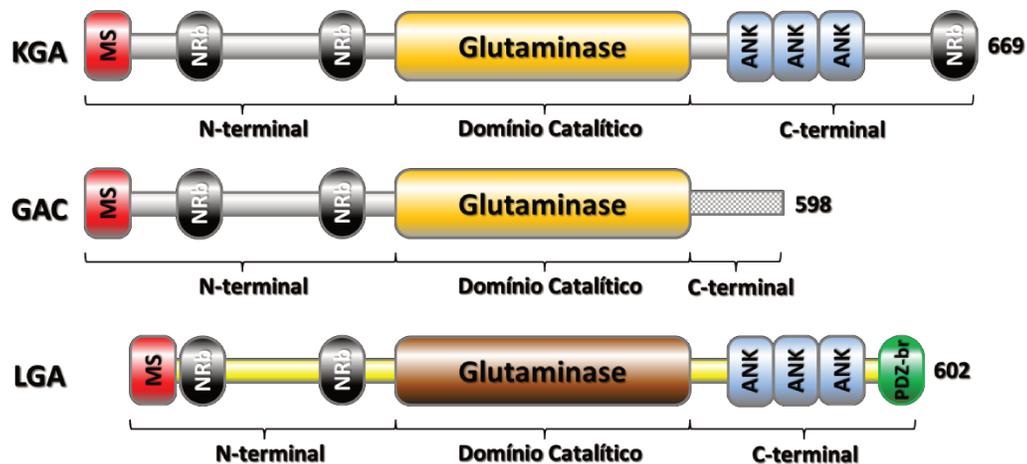


Figura 4: Representação das isoenzimas LGA e KGA e de sua isoforma, GAC. Em laranja e marrom encontram-se os domínios catalíticos. Em vermelho está representada a região traduzida pelo éxon 1 que é processada após a entrada da enzima na mitocôndria. Em azul, os domínios do tipo *ankyrin repeat* detectados por alinhamento de estrutura secundária (dados não mostrados). **PDZ-br** (*PDZ-binding-region*), em verde, denota o domínio de interação com proteínas com regiões PDZ. **NRb**, em preto, são regiões com o peptídeo conservado LXXLL (L = leucina; X = aminoácido qualquer), normalmente encontrado em proteínas co-ativadoras de receptores nucleares. Os números 669, 598 e 602 indicam a quantidade de resíduos da KGA, GAC e LGA, respectivamente. **MS**, *mitochondrial signaling sequence*, **ANK**, *ankyrin repeat*.

Apesar de serem genes distintos, as principais diferenças entre as sequências de nucleotídeos que codificam para as isoenzimas KGA e LGA encontram-se somente no éxon inicial e nos que procedem ao sítio catalítico (16 ao 19 em KGA e 16 ao 18 em LGA). O éxon 1 compartilha 62.5% de identidade entre os dois genes e codifica para 129 resíduos em KGA, enquanto que somente 61 resíduos para LGA. A sequência codificada contém os sinais envolvidos para o direcionamento das proteínas para a mitocôndria. A porção C-terminal, logo após o sítio catalítico, apresenta 62% de identidade entre as isoenzimas KGA e LGA. Uma porção desta região na proteína humana da LGA foi recentemente envolvida no reconhecimento de proteínas com domínio PDZ (PSD95/Dlg/ZO1), comumente encontradas no cérebro (Figura 4) ²³. Uma proteína em específico, a GIP-1 (*Gutaminase interacting*

protein 1), funciona como *scaffold* da LGA e foi proposta ser responsável por direcioná-la para múltiplas localizações subcelulares tais como a membrana, núcleo e mitocôndria ²⁴.

Análises de bioinformática detectaram domínios do tipo *ankirin* (ANK) no C-terminal das sequências da KGA e LGA. Os domínios do tipo ANK possuem tipicamente 33 resíduos formando um *motif* em forma de L, que contém duas hélices α antiparalelas conectadas por um *loop* curto. Estes domínios mediam contatos interprotéicos em várias famílias de proteínas tais como as de membrana e citoesqueleto, reguladores transcricionais, toxinas e inibidores de CDK (*cyclin-dependent kinase*) ²⁵, levantando a possibilidade destas duas isoenzimas estarem envolvidas em contatos proteína-proteína. Outra observação interessante é de que as três proteínas possuem pelo menos duas sequências consenso do tipo LXXLL, também chamada de NRbox (*Nuclear Receptor box*) (Figura 4), o que levanta a hipótese de que estes segmentos possam estar envolvidos na associação das glutaminases com receptores nucleares, uma vez que a isoenzima LGA, assim como a KGA, já foram detectadas no núcleo ²⁶ e possuem sua expressão aumentada por glucocorticóides (hormônio que ativa o receptor de glucocorticóide – GR – *glucocorticoid receptor*) ^{27,28}. Estudos recentes do laboratório mostraram, por *western blot* de frações subcelulares, que a KGA está presente também no citoplasma ²⁹.

1.4 Potenciais Parceiros de Interação da KGA

1.4.1 Aldolase A

Na busca por parceiros de interação da KGA, ensaios de *pull-down* foram feitos em nosso laboratório, durante a iniciação científica do candidato a este título, usando-se a

proteína recombinante como isca. Após análise por espectrometria de massas o resultado indicou a enzima Aldolase A como provável candidato (Figura 5).

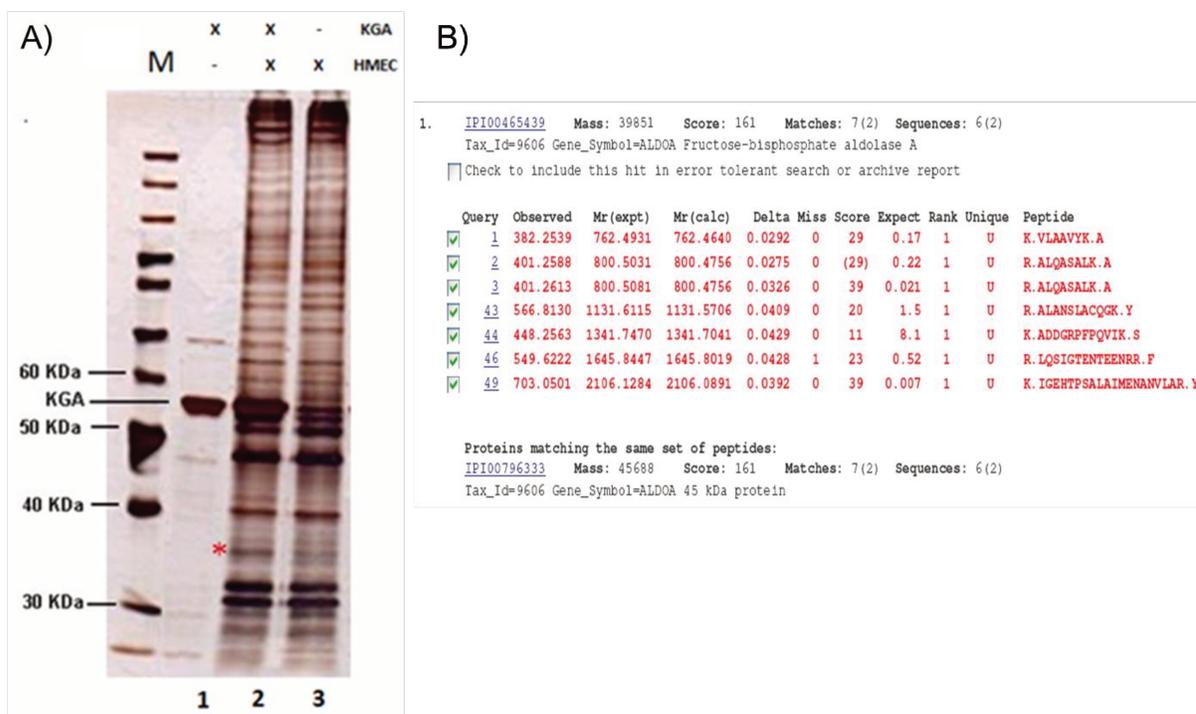


Figura 5: A) SDS-PAGE corado com nitrato de prata do ensaio de *pull-down* realizado com a KGA purificada, imobilizada em resina de afinidade a metais como isca e incubada contra extratos celulares totais de células humanas de epitélio mamário. Canaleta 1, *input* de proteína recombinante, 2, KGA incubada com resina e lisado, 3, lisado incubado com resina (controle negativo). Banda protéica diferencial é indicada por asterisco. B) Resultado da espectrometria de massas que identificou, após tripsinização das proteínas contidas no fragmento de acrilamida e análise dos peptídeos gerados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, a proteína Aldolase A. O *score* do resultado foi de 161, maior que o considerado significativo para a técnica, que foi de 33. M, marcador de peso molecular.

A Aldolase A é a enzima do quarto passo da via glicolítica, altamente expressa em células musculares, que converte frutose 1-6-bifosfato em dihidroxicetona fosfato e gliceraldeído 3-fostato. Embora a função enzimática da Aldolase no metabolismo de carboidratos esteja bem definida, vários papéis não catalíticos já foram descritos e sua interação com várias proteínas não relacionadas com as enzimas glicolíticas, incluindo actina F, α -tubulina, cadeia leve da dineína 8, o fator de promoção de nucleação de actina WASP, a

proteína de triagem endocitótica nexina-9, e a fosfolipase D, sugerem que a Aldolase possui importante função como *scaffold*, na coordenação do tráfico de membrana e na dinâmica do citoesqueleto na periferia da célula^{30,31}.

Além da isoforma A, codificada pelo gene ALDOA, outras duas isoformas são conhecidas para a Aldolase, B e C, codificadas pelo gene ALDOB e ALDOC respectivamente. A isoforma B é expressa predominantemente em fígado e rim e a isoforma C em tecidos nervosos. A superexpressão de Aldolase tem sido encontrada em vários tipos de tumores, incluindo câncer cervical, endometrial, renal, pulmonar e de próstata, servindo assim como biomarcador em exames laboratoriais, cujo diagnóstico positivo de superexpressão é vinculado ao quadro maligno de câncer^{32,33}. Desta maneira, a Aldolase A se tornou um interessante alvo de estudo como provável parceiro de interação da KGA.

1.4.2 BNIP-H

Recentemente, um estudo revelou que a proteína BNIP-H ou Caytaxin, altamente expressa em tecidos neuronais, e cujas mutações no gene que a codifica (*ATCAY*) leva à distúrbios como ataxia, distonia e retardo mental, é um parceiro de interação da isoforma KGA. O resultado desta parceria é o controle do tráfico da KGA em células nervosas, relocando-a da mitocôndria para os neuritos, além da inibição da atividade de glutaminase e redução dos níveis do neurotransmissor glutamato. Assim, a perda da função glutaminolítica e consequente desregulação dos níveis de glutamato nas fendas pós-sinápticas podem propiciar a ataxia, distonia ou outras desordens neurológicas. A interação foi caracterizada como ocorrendo via parte do domínio catalítico da KGA e do domínio BCH da BNIP-H, mas

as bases estruturais da mesma e os mecanismos de inibição enzimática não foram determinados^{34,35}.

Outras funções para a BNIP-H ainda não foram descritas na literatura, contudo, a proteína possui outras duas isoformas, a BNIP-2 e a BNIP-S α . A BNIP-2 foi originalmente descrita como parceiro de interação da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e também foi relacionada com a dinâmica celular no alongamento de saliências na membrana. A outra isoforma BNIP-S α está envolvida na indução do arredondamento da célula e no processo de apoptose através de sua interação com as GTPases p50RhoGap e RhoA. Ambas isoformas possuem o domínio BCH descrito como intermediador de interações proteína-proteína e alvo de pequenas GTPases como a CDC42³⁵, cuja atuação também está descrita no aumento da atividade de glutaminase em câncer¹⁷, tornando a BNIP-H um interessante alvo de estudo na interação com a KGA no contexto tumoral.

1.4.3 Receptores nucleares

Além da identificação das proteínas Aldolase A e da BNIP-H como prováveis parceiros de interação da KGA, o ensaio de duplo híbrido em levedura realizado pelo pós-doutorando Dr. Marcel Nakahira em nosso laboratório identificou, dentre outras proteínas, a proteína *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) como potencial parceiro de interação da KGA.

A maioria dos organismos comunicam-se através de sinais intercelulares, por meio de secreções de centenas de tipos de moléculas sinalizadoras como proteínas, pequenos peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, retinóides, derivados de ácidos graxos, além de gases como óxido nítrico, monóxido de carbono, oxigênio dentre muitas outras moléculas.

As células alvos respondem independentemente da natureza das moléculas sinalizadoras, por meio de proteínas específicas denominadas receptores. Os receptores podem ser proteínas transmembranas localizadas na superfície da célula alvo ou localizados internamente a mesma.

Os receptores nucleares constituem uma superfamília de proteínas filogeneticamente relacionadas com 21 genes no genoma completo de *Drosophila melanogaster*, 48 em seres humanos [e um adicional FXRb, em rato] e, de forma inesperada, mais de 270 genes no verme nematóide *Caenorhabditis elegans*³⁶. A maioria dos receptores que se localizam e agem no núcleo das células são membros da superfamília de receptores nucleares (NRs), formadas pelos receptores para os hormônios lipofílicos (esteróides, retinóides, vitamina D₃ e tireoideanos), de metabólitos endógenos (ácidos biliares e oxisterol), xenobióticos (que medeiam a transcrição de uma variedade de enzimas desintoxicantes que são membros da família de supergenes das moléculas do citocromo P450 (CYP) em processos de desintoxicação), assim como de receptores órfãos para os quais os ligantes naturais não foram identificados³⁶⁻³⁸.

Os receptores nucleares são geralmente proteínas de 50 a 100 kDa responsáveis pela regulação da transcrição de genes alvo, podendo atuar na forma homo ou heterodímero. Estes receptores medeiam os efeitos pleiotrópicos dos hormônios lipofílicos através da ativação dependente de ligante, repressão independente do ligante e transrepressão dos genes alvos. Desse modo, estão envolvidos em variados processos fisiológicos como regulação do desenvolvimento, divisão, diferenciação celular, metabolismo e homeostase³⁹⁻⁴³.

Os membros da superfamília dos receptores nucleares apresentam estruturas semelhantes com três domínios principais (Figura 6 A). O primeiro domínio é o N-terminal,

que contém a função de ativação transcricional 1 (AF-1), responsável pela ativação da transcrição na ausência do hormônio ³². O segundo domínio, altamente conservado, é conhecido como domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain* - DBD). Este domínio possui cerca de 80 aminoácidos e contém *motifs* curtos (*P-box*), responsáveis pela ligação em regiões regulatórias específicas dos genes contendo o motivo AGGTCA. O DBD também está envolvido na dimerização de receptores nucleares e possui domínios do tipo “*zinc fingers*”, arranjos protéicos constituídos de uma α -hélice e uma folha β -pregueada, mantidas unidas por um íon de zinco na região central. Este arranjo confere maior estabilidade de dobramento, permitindo associações firmes quando da ligação aos elementos responsivos na região regulatória de genes alvo. O terceiro domínio é o domínio de ligação do ligante (*Ligand binding domain* - LBD), o qual contém cerca de 250 aminoácidos e é responsável pela ligação do receptor ao hormônio ²⁷⁻³⁰. Além disto, o LBD carrega a função de ativação dependente de ligante (AF-2), que pode regular a transcrição de genes alvo e também promover a dimerização desses receptores e consequente interação com as proteínas co-reguladoras (co-ativadores e co-repressores). Entre os domínios DBD e LBD encontra-se uma curta sequência conhecida por *hinge* ou dobradiça, que participa na interação dos NRs com os co-repressores, permitindo o movimento relativo entre os dois módulos que leva ao encaixe no DNA ^{36,44-48}.

Os receptores nucleares interagem com proteínas co-reguladoras para ativar ou suprimir a transcrição de genes. Tanto os receptores na sua forma *apo* (não ligado ao ligante) como na forma *holo* (em complexo com o ligante), dentro do núcleo celular, fazem parte de um grande complexo protéico que modifica a estrutura da cromatina e influencia os promotores dos genes na sua vizinhança ⁴³. A repressão na transcrição de genes é característico de receptores nucleares em sua forma *apo*, que recruta o complexo co-repressor

com atividade histona deacetilase (HDAC). A ligação destes receptores com seus agonistas promovem mudanças conformacionais, localizadas principalmente na região C-terminal, que induzem a dissociação dos co-repressores e o recrutamento de co-ativadores. Desta maneira, após a ligação do receptor com o ligante (forma *holo*) o complexo HDAC é dissociado e o primeiro complexo ativador com atividade histona acetiltransferase (HAT) é recrutado. A interação do co-ativador se dá via interações com um motivo hidrofóbico conservado (NR *box*, motivo LXXLL) do LBD, resultando na descondensação da cromatina, a qual acredita-se ser necessária mas não suficiente para ativação da transcrição de genes alvo. Em seguida, o complexo HAT se dissocia, um segundo complexo co-ativador é agregado (TRAP/DRIP/ARC) promovendo contato com a maquinaria basal de transcrição e resultando na ativação da transcrição dos genes alvo ^{36,47,52-54}.

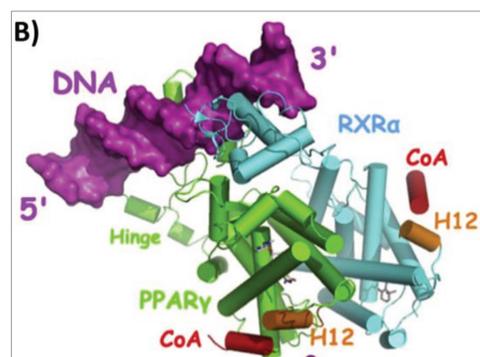
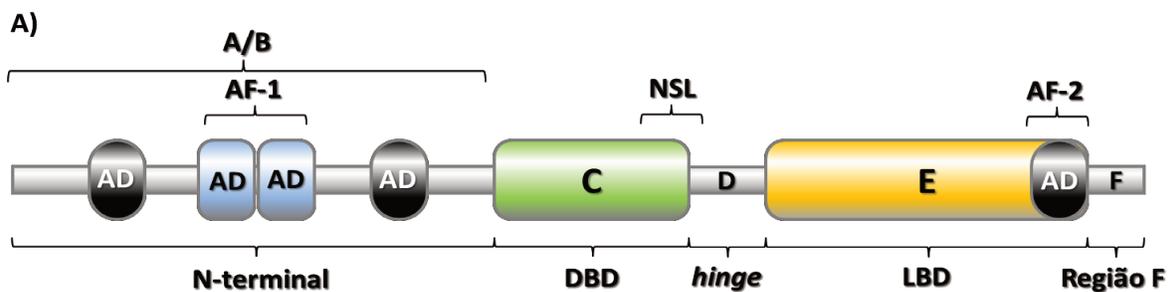


Figura 6: A) Representação esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. C (em verde) e E (em amarelo) representam os domínios estruturalmente conservados, DBD e LBD, respectivamente, enquanto que as barras cinza ilustram as regiões divergentes A/B, D e F. A região F está ausente em alguns receptores. Duas funções de ativação da transcrição (AFs) tem sido descritas entre os vários receptores nucleares, uma região AF-1 constitutivamente ativa (se retirada do contexto do receptor) e presente na região A/B, e outra região AF-2 induzida por ligante e encontrada na região E (hélice 12). Dentro destas funções de ativação, tem-se definido na região amino-terminal dos receptores, por exemplo, de estrogênio (ER, *Estrogen Receptor*) e progesterona (PR, *Progesterone Receptor*), domínios autônomos de transativação (ADs dentro dos círculos pretos, identificados em PR; dentro dos boxes

azuis, identificados em ER). Outro domínio de ativação autônomo foi identificado na porção C-terminal do domínio de ligação do ligante (LBD) dos receptores nucleares. **NSL**, sinal de localização nuclear^{37,49}. **B)** Estrutura cristalográfica do heterodímero PPAR γ -RXR α ligado a um fragmento de DNA em sua forma *holo*. A figura mostra a interação entre os receptores o peptídeo co-ativador (CoA), à hélice 12 (H12). Em roxo o fragmento de DNA, em verde o PPAR γ , em azul o RXR α , em vermelho os peptídeos co-ativadores (CoA) e em laranja as hélices 12 (H12)^{50,51}.

Vários estudos demonstraram que o motivo LXXLL está envolvido na interação dos co-ativadores com os NRs^{36,48}. Experimentos de mutagênese sítio-dirigida e estudos cristalográficos revelaram que peptídeos co-ativadores que contém o motivo LXXLL, se ligam à uma região do LBD formada pelo empacotamento da hélice H12 contra as H1-H2 e H3, processo que resulta da interação do receptor com seu ligante agonista (Figura 6 B)^{49,55-57}.

Além dos co-ativadores clássicos, algumas proteínas têm emergido como capazes de interagir e alterar a atividade de transativação de receptores nucleares. Um variante por *splicing* alternativo da tioredoxina redutase, que contém o motivo LXXLL, foi implicado na interação direta com o receptor de estrógeno (ER). Estudos transcricionais demonstraram que esta proteína afeta a ativação gênica dependente de estrógeno, dado que compete com o co-ativador pela interação com o receptor deste hormônio, colocando esta isoforma da tioredoxina como um importante modulador da sinalização por estrógeno⁵⁸. A proteína supressora de tumor BTG2 também apresenta sequências do tipo LXXLL, e recentemente foi mostrada contactar diretamente o receptor de andrógeno (AR), em uma interação que é fortalecida pelo hormônio andrógeno⁵⁹. A expressão ectópica de BTG2 causou uma inibição significativa da atividade transcricional mediada por AR, além de ter promovido uma diminuição na proliferação de células de câncer de próstata⁵⁹.

Outro caso interessante, desta vez envolvendo a translocação do receptor órfão Nurr77 para a mitocôndria, coloca o mesmo como chave no processo apoptótico ⁶⁰. Nurr77 converte Bcl-2 em pró-apoptótica através da interação com um *loop* da mesma que se traduz em mudanças alostéricas com concomitante exposição do domínio SH3 e sequestro da proteína anti-apoptótica Bcl-X_L ⁶¹.

1.4.3.1 PPAR γ

PPAR γ é um fator de transcrição ativado por ligantes, bem como seus outros dois isotipos existentes PPAR α e β/δ , que pertencem à família de receptores nucleares. Desde sua descoberta, há mais de 20 anos, numerosos estudos revelaram a importância dos isotipos de PPAR em importantes funções biológicas como inflamação, sobrevivência celular e diferenciação ^{62,63}. PPARs são ativados por ligantes endógenos derivados do metabolismo de ácidos graxos e outros componentes da dieta, consistente com o fato de PPARs regularem a expressão de muitos genes envolvidos no metabolismo da glicose e lipídeos. PPARs atuam como heterodímeros com o seu parceiro obrigatório, o receptor de retinóide X (RXR). O dímero PPAR-RXR recruta complexos cofatores, ambos co-ativadores ou co-repressores, que modulam a atividade transcricional de genes alvo específicos através da interação com o *peroxisome-proliferator response element* (PPRE), de sequência consenso 5'-AGGTCA N AGGTCA-3', encontrada na região promotora dos genes alvo ⁶².

Como citado acima, o PPAR γ possui outros dois isotipos (PPAR α e PPAR β/δ) os quais são codificados por genes distintos. Além disso, o PPAR γ apresenta duas variantes (PPAR γ_1 e PPAR γ_2) as quais distinguem-se pelos 30 aminoácidos adicionais presentes no N-terminal da variante 2 (Figura 7) ⁶⁴.

Os isotipos do PPAR podem ser expressas em partes distintas do organismo. O PPAR α é expresso em fígado, rim, intestino, coração, músculo esquelético, tecido adiposo marrom, glândula adrenal e pâncreas. PPAR β/δ é expresso amplamente em todos os tecidos testados até hoje, enquanto que o PPAR γ , cuja expressão parece ser mais restrita, é altamente expresso em tecido adiposo, branco e marrom, e em menor nível no epitélio intestinal, retina, musculatura esquelética e órgãos linfóides⁶².



Figura 7: Esquema dos isotipos humanos de PPAR β/δ , PPAR α e PPAR γ . As isoformas são representadas linearmente demonstrando os domínios conservados DNA *binding domain* (DBD) e *ligand binding domain* (LBD). Os números

mostrados acima de cada receptor representam os aminoácidos em cada posição e a porcentagem de identidade, comparada com o primeiro isotipo apresentado (PPAR β/δ), é indicada dentro de cada caixa. PPAR γ_1 e PPAR γ_2 se distinguem por 30 aminoácidos extras no N-terminal do PPAR γ_2 ⁶⁴.

O PPAR α atua com peça central na manutenção da homeostase de lipídeos, cujo primeiro passo é aumentar a capacidade celular em mobilizar e catabolizar ácidos graxos, principalmente no fígado, durante escassez de nutrientes. Nesta situação, a oxidação de ácidos graxos é essencial para obtenção de energia. O PPAR β/δ também regula a homeostase de lipídeos e glicose e a ativação do PPAR β/δ por ligantes específicos aumenta os níveis de colesterol HDL em ratos, primatas e humanos. Já o PPAR γ , proteína crucial para o desenvolvimento placentário e coronário, também é essencial para a adipogênese e armazenagem de lipídeos. O tecido adiposo branco é o primeiro alvo do agonista do PPAR γ ,

tiazolidinedionas, o qual diminui os níveis séricos de lipídeos através da adipogênese e armazenagem dos mesmos, bem como o aumento na sensibilização de insulina ⁶³.

O envolvimento do PPAR γ no desenvolvimento de tumores em diversos tecidos ainda é discutido. A ativação do PPAR γ mostrou efeitos anti-tumorigênico em células de câncer de colo, mama, próstata e pulmão. A ativação do PPAR γ por agonistas podem promover a diferenciação, inibir o crescimento celular e aumentar a apoptose em linhagens de células de câncer humano e em modelos animais de câncer, inibindo a tumorigênese ⁶³. A ativação do PPAR γ em linhagens de células de câncer é associada a diversos processos como a indução da parada do ciclo celular, aumento na expressão de mRNA e proteínas necessárias para a diferenciação, incluindo queratina, antígeno carcinoembrionário, E-caderinas, fosfatase alcalina, *development-regulated GTP-binding protein 1* (DRG1), bem como mudanças na morfologia celular ⁶³. Além disso, a expressão dos genes p16, p21 e p27, bem como o gene supressor tumoral PTEN, é *upregulated* pelo PPAR γ , enquanto que os genes para beta-catenina, a COX-2, VEGF, Bcl-2 e NF- κ B são *dowregulated*. Finalmente, PPAR γ reduz a transição epitelial mesenquimal (EMT), um processo que permite as células cancerosas adquirirem capacidade invasiva, um pré-requisito para a formação de metástases. Consistente com as evidências *in vitro*, modelos experimentais em camundongos demonstraram que a ativação do PPAR γ por agonistas reduziram o crescimento de tumores originados a partir de células humanas injetadas subcutaneamente ⁶⁵.

Controversamente, outros estudos demonstram que a ativação do PPAR γ tem consequências pró-carcinogênicas. Ensaios realizados em camundongos com uma mutação no gene supressor tumoral (*adenomatous polyposis coli* – Apc), associado à formação de tumores

no trato intestinal, tiveram um aumento de cinco vezes na carcinogênese ao receberem doses do ativador do PPAR γ rosiglitazona^{62,66}. Assim, as mudanças em células tumorais causadas pela ativação do PPAR γ , tem colocado esse receptor nuclear como alvo no tratamento e na prevenção de câncer.

2 Objetivos

Células proliferativas são ávidas consumidoras de glutamina, um nutriente que além de ser um dos mais versáteis dentro do contexto do metabolismo energético e biossintético, tem sido também descrito como mediador de vias de sinalização em mamíferos ligadas a processos de tradução protéica^{15,67}. Esta pleiotropia de ações dentro da célula provavelmente está diretamente ligada à existência de pelo menos três isoenzimas/isoformas de glutaminases conhecidas, a LGA, KGA e GAC. No entanto, até o momento, funções que vão além da sua capacidade de metabolizar glutamina em glutamato, não foram ainda descritas para estas enzimas.

O entendimento mais detalhado da atividade e regulação da enzima glutaminase e de sua relação com o processo maligno tem o potencial de desvendar importantes alvos de interferência e tratamento do câncer, especialmente em células transformadas onde o reabastecimento do ciclo TCA é fundamental para sua viabilidade. A isoforma KGA é menos representada em câncer em comparação com a isoforma GAC, além de, diferentemente da GAC, ter sido detectada nos compartimentos nucleares e citoplasmáticos. Estas informações levantam a hipótese de que, enquanto que a GAC seria a enzima glutaminolítica mitocondrial responsável pela sustentação do fenótipo proliferativo tumoral, a KGA possa ter funções diversas na célula. O entendimento das funções extra-enzimáticas da KGA ajudará a compor o cenário da importância desta enzima para o processo de crescimento celular assim como processos celulares ainda de desconhecida relação com a mesma.

O objetivo deste projeto foi o de encontrar parceiros de interação da proteína KGA e estudar o impacto desta parceria para o metabolismo tumoral utilizando-se de ferramentas bioquímicas e de biologia celular.

3 Objetivos Específicos

- Confirmar a Aldolase A, BNIP-H e PPAR γ como parceiros de interação da KGA por métodos bioquímicos, biofísicos e biologia celular.
- Estudar as condições necessárias para interação e o impacto da mesma para o metabolismo tumoral.

4 Material e Métodos

4.1 Estudos bioquímicos e biofísicos

4.1.1 Clonagem e manipulação de ácidos nucleicos

4.1.1.1 KGA

Para expressão heteróloga da KGA utilizamos vetor pET-15b (Novagen) clonado com o cDNA (Δ 1-127) da glutaminase de rato o qual já encontrava-se disponível em nosso laboratório. O vetor pcDNA 3.1-V5 (Invitrogen), para transfecção em células de mamífero, com o inserto da KGA humana *full length* foi gentilmente cedido pelo laboratório do Dr. Richard Cerione da universidade de Cornell nos EUA. Uma descrição dos clones usados é detalhada na tabela 1.

Nome	Organismo	Vetor	Construção
rKGA	rato	pET15b	Δ 1-127
hKGA	humano	pcDNA 3.1-V5	<i>full length</i>

Tabela 1: Lista dos clones de KGA usados na expressão heteróloga e transfecção em células de mamíferos.

4.1.1.2 Parceiros de interação

Os insertos da Aldolase A *full length* ou da BNIP-H *full length* foram amplificados a partir de bibliotecas de cDNA empregando-se a reação de PCR com *primers* específicos contendo sítios de cortes inseridos nas extremidades. As bibliotecas foram preparadas a partir de RNA total extraído de cultura de células SKBR3 utilizando-se kit Rneasy (Qiagen) e sintetizadas com *primers* de hexâmeros randômicos utilizando-se kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Os insertos foram digeridos através das enzimas de restrição BamHI e XhoI e inseridos nos vetores petSUMO e pcDNA 3.1 – FLAG (ambos da

Invitrogen) e pGEX4T1 usando técnicas básicas de biologia molecular. Os vetores contendo os insertos para ambas as proteínas foram introduzidos em cepa de *E. coli* do tipo TOP-10, para propagação, através da técnica de transformação de bactérias competentes por meio de choque térmico. Os vetores pET-28a(+) (Novagen) com o inserto PPAR γ (Δ 1-100), contendo os domínios DBD e LBD, o mesmo vetor contendo somente o domínio LBD (Δ 1-251) e os vetores pCMW e pcDNA-Flag contendo o inserto do PPAR γ *full length* foram gentilmente fornecido pela Dra. Ana C. M. Figueira (LNBio). A Tabela 2 apresenta uma descrição dos clones e *primers* utilizados para clonagens.

Nome	Organismo	Vetor	Construção	Primers
Aldolase A - <i>fow</i>	humano	pETSUMO	<i>full length</i>	5'-TCT ACG TGG ATC CAT GCC CTA CCA AT-3'
Aldolase A - <i>rev</i>	humano	pETSUMO	<i>full length</i>	5'-TAG TCG TAC TCG AGT TTA TAG GCG TG-3'
Aldolase A - <i>fow</i>	humano	pcDNA 3.1-FLAG	<i>full length</i>	5'-TCT ACG TGG ATC CAT GCC CTA CCA AT-3'
Aldolase A - <i>rev</i>	humano	pcDNA 3.1-FLAG	<i>full length</i>	5'-TAG TCG TAC TCG AGT TAA TAG GCG TG-3'
BNIP-H - <i>fow</i>	humano	pETSUMO	<i>full length</i>	5'-TTG GTG GAT CCA TGG GGA CCA CCG A-3'
BNIP-H - <i>rev</i>	humano	pETSUMO	<i>full length</i>	5'- CCA GAC TCG AGT TAG GAC ATG CTT GT-3'
BNIP-H - <i>fow</i>	humano	pGEX4T1	<i>full length</i>	5'-TTG GTG GAT CCA TGG GGA CCA CCG A-3'
BNIP-H - <i>rev</i>	humano	pGEX4T1	<i>full length</i>	5'-GCC GCA AGC TTT TAG GAC ATG CTT GT-3'
BNIP-H - <i>fow</i>	humano	pcDNA 3.1-FLAG	<i>full length</i>	5'-TTG GTG GAT CCA TGG GGA CCA CCG A-3'
BNIP-H - <i>rev</i>	humano	pcDNA 3.1-FLAG	<i>full length</i>	5'- CCA GAC TCG AGT TAG GAC ATG CTT GT-3'
PPAR γ	humano	pET28a(+)	Δ 1-100
PPAR γ -LBD	humano	pET28a(+)	Δ 1-251
PPAR γ	humano	pcDNA 3.1-FLAG	<i>full length</i>
PPAR γ	humano	pCMW	<i>full length</i>

Tabela 2: Lista de clones das proteínas utilizadas nos estudos de interação com a KGA, bem como os *primers* desenhados para obtenção dos mesmos. Os clones cujos *primers* não são apresentados foram doados conforme apresentado no texto acima.

4.1.1.3 Clones utilizados nos ensaios de duplo híbrido

Para estudos de duplo-híbrido em levedura, os cDNAs das proteínas KGA e PPAR γ foram amplificados por PCR com primers específicos (Tabela 3) e clonados nos vetores apropriados (pBTM116KQ e pACT2, Clontech). Um esquema das construções planejadas é exibido na Figura 8.

4.1.2 Testes de expressão em *E. coli*

Bactérias do tipo Rosetta II (Novagen) ou BL21 (DE3 - Novagen) foram transformadas com o vetor petSUMO contendo cDNA da Aldolase A ou BNIP-H, através da técnica de choque térmico. Inoculamos uma colônia em 2 ml de LB (*Lysogene Broth*) contendo 50 µg/mL de canamicina (BL21 (DE3) e Rosetta II) e 50 µg/mL cloranfenicol (Rosetta II). A cultura foi incubada em *shaker* permanecendo por 3 h, 37°C a 200 rpm. Uma fração não induzida de 350 µL foi colhida e o restante da cultura induzida com 0,2 ou 1 mM de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*). Novas frações de 300 µL foram então colhidas em intervalos de 2, 4, 6 e 16 horas de indução. Todas as frações foram centrifugadas por 2 minutos a 5.200 x g e 4°C, as células separadas do sobrenadante, ressuspensas com 50 µL de solução de corrida SDS-PAGE (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 30% glicerol, 0,2% azul de bromofenol e 300 mM DTT), fervidas por 5 minutos a 95°C e submetidas a análise por SDS-PAGE seguida de coloração com *Coomassie brilliant blue*.

Cultura de *E. coli* da cepa tipo Rosetta II foi transformada com o vetor pGEX4T1 (GE) contendo cDNA da BNIP-H, através da técnica de choque térmico. Uma colônia foi inoculada em 2 ml de LB (*Lysogene Broth*) contendo 50 µg/mL de canamicina e ou 50 µg/mL cloranfenicol. A cultura foi incubada em *shaker* permanecendo por 3 h a 37°C e 200 rpm. Uma fração não induzida de 350 µL foi coletada e o restante da cultura dividida em 3 alíquotas, as quais foram mantidas à 18°C, 25°C e 37°C e induzidas com 1 mM de IPTG. Novas frações de 300 µL foram então colhidas após 3 e 16 horas de indução. Todas as frações foram centrifugadas por 2 minutos a 5.200 x g e 4°C, as células separadas do sobrenadante, ressuspensas com 50 µL de solução de corrida SDS-PAGE, fervidas por 5 minutos a 95°C e submetidas a análise por SDS-PAGE seguida de coloração com *Coomassie brilliant blue*.

4.1.3 Expressão e purificação de proteínas

4.1.3.1 KGA

O vetor pET28a(+) contendo o cDNA da KGA foi utilizado para transformar bactéria *E. coli* do tipo Rosetta II através da técnica de choque térmico. O produto da transformação foi plaqueado em placa de petri com meio LB contendo os antibióticos cloranfenicol e canamicina (50 µg/mL para ambos). Uma colônia foi retirada para produção do pré-inóculo (50 mL de meio LB com 50 µg/mL de cloranfenicol e canamicina), o qual foi incubado em *shaker* à 37°C, 200 rpm, por 16 horas. Um litro de meio LB foi inoculado com 10 mL de pré-inóculo. A cultura foi incubada em *shaker* à 37°C, 200 rpm por 5 horas até atingir a Abs₅₉₀ entre 0,4 e 0,6 (fase *log* do crescimento bacteriano). Após alcançar a densidade ótica ideal, adicionou-se ao meio de cultura 500 µM IPTG para indução da expressão por 16 horas a 25°C. As células foram coletadas por centrifugação (20 minutos, a 6.000 x g) e ressuspendidas em 20 mL de solução de lise contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 500 mM NaCl, 2 mM de β-mercaptoetanol, DNase (10 µg/mL), 1 mM PMSF (*Phenylmethanesulfonylfluoride*), 120 mg de lisozima e 10% de glicerol, e incubadas em gelo por 1 hora. Em seguida, o lisado foi sonicado 3 vezes por 15 segundos com intervalos de 20 segundos (amplitude de 40%) com sonicador SONICS VCX 500. O lisado foi então clarificado por centrifugação (19.400 x g, 4°C, por 40 minutos) e o sobrenadante usado para purificação.

A purificação da proteína foi feita a 4°C por cromatografia de afinidade usando coluna contendo 1,5 ml de resina de cobalto Talon (Clontech) por litro de meio de cultura. Após lavar e equilibrar a resina com solução Afinidade A (50 mM Tris-HCl ph 8,5, 500 mM NaCl, e 2 mM β-mercaptoetanol) o lisado foi aplicado na coluna e a proteína imobilizada na resina,

em função da afinidade entre o metal imobilizado na resina e a cauda de histidina co-expressa com a mesma. A resina foi então lavada com 50 mL de solução Afinidade A e em seguida eluída com 4 mL de solução Afinidade A acrescida de 500 mM de imidazol em frações de 1 mL.

As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE 10% e coradas com *Coomassie brilliant blue*. Após análise do gel, juntou-se as frações correspondentes a proteína para a execução de um segundo processo de purificação em coluna de troca aniônica do tipo Mono Q 5/50 GL (GE). A coluna foi acoplada ao aparelho AKTA-FPLC (GE) e equilibrada com solução A-KGA (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM NaCl, 0,3 mM DTT). A amostra foi aplicada na coluna e a eluição feita com solução B-KGA (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 M NaCl, 0,3 mM TCEP), seguindo um gradiente linear de solução B-KGA de 0 a 100 % em 40 minutos em um fluxo de 1 mL/min, coletando frações de 0,5 mL. As frações referentes ao maior pico no cromatograma foram então analisadas por SDS-PAGE 10% e aquelas com maior concentração de proteína e pureza foram coletadas.

Para aumentar a pureza da amostra, utilizou-se uma coluna de filtração em gel Superdex 200 HR 10/30 (GE), a qual foi equilibrada com solução Gel Filtração (30 mM Tris-HCl pH 8,5, 500 mM NaCl e 0,5 mM TCEP). Aplicou-se 500 µL de amostra na coluna e seguiu-se com eluição isocrática a 0,5 mL/min coletando-se frações de 0,5 mL. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE 10% e coradas com *Coomassie brilliant blue* e concentradas com Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit 30.000 NMWL.

A quantificação foi realizada utilizando-se o NanoDrop (Thermo Scientific), a 280 nm, utilizando-se cálculo teórico de coeficiente de extinção feito pelo programa ProtParam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>).

4.1.3.2 Aldolase A, BNIP-H e PPAR γ

A expressão da Aldolase A e preparação do lisado celular foram realizadas da mesma maneira como descrito para a KGA no item 4.1.3.1. O extrato protéico obtido na expressão foi submetido à cromatografia de afinidade (realizada a 4°C) usando coluna contendo 1,5 ml de resina de cobalto Talon (Clontech)/litro de cultura a 4°C, previamente lavada e equilibrada com solução de ressuspensão (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 mM PMSF e 2 mM β -mercaptoetanol). Passado o lisado na coluna, lavou-se a resina com solução Afinidade B (50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 2 mM β -mercaptoetanol) e eluiu-se com 4 mL da mesma solução acrescida de 500 mM imidazol em frações de 1 mL. A quantificação foi realizada utilizando-se o NanoDrop (Thermo Scientific), a 280 nm, utilizando-se cálculo teórico de coeficiente de extinção feito pelo programa ProtParam. A análise das frações foi feita por SDS-PAGE 10 % corado com *Coomassie brilliant blue* e concentradas com Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit 30.000 NMWL.

A proteína purificada foi submetida à remoção da cauda sumo-His usando-se a enzima ULP-1 (sumo protease), incubada por 16 h à 4°C. Posteriormente, a mistura foi aplicada em coluna contendo 1,5 mL de resina de cobalto Talon, sendo o *flow through* coletado. A proteína Aldolase A sem a fusão com sumo-His foi então utilizada para os ensaios de *pull-down*.

O processo de expressão e lise bacteriana da GST-BNIP-H seguiu o mesmo protocolo descrito acima para KGA (e Aldolase A). Para a purificação desta construção utilizou-se a resina *Glutathione Sepharose* (GE). A mesma foi equilibrada com solução Afinidade B, incubando-se o lisado celular em seguida com a resina por 1 hora (4°C). A resina foi lavada com a solução Afinidade B, seguido de eluição com a solução Afinidade B acrescida 5 mM de

glutathiona reduzida. A quantificação foi realizada utilizando-se o NanoDrop (Thermo Scientific), a 280 nm, utilizando-se cálculo teórico de coeficiente de extinção feito pelo programa ProtParam. A análise das frações foi realizada por SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie brilliant blue* e concentradas com Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit 30.000 NMWL.

A expressão da construção PPAR γ DBD-LBD (Δ 1-100) clonado no vetor pET28a(+), foi realizada a 22°C, por 16 horas, tendo havido a adição de 10 μ M de sulfato de zinco ao meio de cultura. Após sedimentação das células, adicionou-se a solução de Afinidade C (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl e 2 mM β -mercaptoetanol), seguido da adição de 120 mg de lisozima e 60 mg de DOC (*sodium deoxycholate monohydrate*) por litro de cultura. O lisado celular foi então clarificado por centrifugação (19.400 x g por 1 hora a 4°C) e o sobrenadante incubado por 1 hora (4°C) com 1 mL de resina de cobalto Talon (Clontech), por litro de cultura, previamente lavado e equilibrado com solução Afinidade C. O lisado celular, juntamente com a resina, foram então acondicionados à coluna cromatográfica seguido de lavagens com solução Afinidade C (10 vezes o volume de resina), solução Afinidade C com 5 mM imidazol (5 vezes o volume de resina) e eluição com solução Afinidade C contendo 350 mM de imidazol (5 vezes o volume de resina). Em uma fração do eluato foram adicionadas 30 unidades de trombina de plasma bovino (Sigma) por litro de cultura, seguido de incubação por 16 horas a 4°C para clivagem da fusão de cauda de histidinas.

O eluato foi submetido à um segundo processo de purificação em coluna troca aniônica (Mono S 5/50 GL). A coluna foi acoplada ao aparelho AKTA-FPLC e equilibrada com Solução A-PPAR γ (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 2 mM DTT). A amostra foi aplicada na coluna e a eluição feita com Solução B-PPAR γ (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M

NaCl, 0,5 mM TCEP), seguindo um gradiente linear de solução B-KGA de 0 a 100 % em 40 minutos em fluxo de 1 mL/min, coletando frações de 1 mL. As frações referentes ao maior pico no cromatograma foram então analisadas por SDS-PAGE 10% e aquelas com maior concentração de proteína e pureza foram coletadas.

Para aumentar a pureza da amostra, utilizou-se o mesmo processo de purificação em coluna de filtração em gel descrito acima na purificação da KGA no item 4.1.3.1, neste caso utilizou-se uma coluna Superdex 75 HR 10/30 (GE). A quantificação foi realizada utilizando-se o NanoDrop (Thermo Scientific), a 280 nm, utilizando-se cálculo teórico de coeficiente de extinção feito pelo programa ProtParam. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE 10% e coradas com *Coomassie brilliant blue*, e concentradas com Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit 30.000 NMWL.

A proteína purificada contendo a construção do PPAR γ LBD (Δ 1-251) foi gentilmente cedida pelo laboratório da Dra. Ana C. M. Figueira.

4.1.4 *Pull-down*

4.1.4.1 KGA:Aldolase A

Para os ensaios de *pull-down* foram usadas a solução PDA (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,3 mM TCEP) contendo 5 mM imidazol e PBS 1X (Invitrogen) contendo 0,3 mM TCEP e 5 mM imidazol. Além dos componentes destas soluções testou-se também a influência que 1 mM de glutamato poderia ter na interação entre as proteínas. Trinta microlitros de resina Talon foram utilizados para cada ensaio, previamente lavadas e equilibradas com a solução PDA ou PBS 1X (com ou sem glutamato). Cerca de 430 nM de

His-KGA e um excesso molar de 28x de Aldolase A, a qual teve a fusão sumo-His removida, foram incubados com a resina de cobalto Talon. Como controle negativo, a resina foi incubada somente com a Aldolase A sem a fusão sumo-His. As misturas foram igualmente completadas para o volume de 300 μ l de solução PDA ou PBS 1X e incubadas sob agitação a 4°C por 16 h, tendo sido posteriormente centrifugadas a 500 x g, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a resina lavada 2 vezes com 1 ml de solução PDA ou PBS 1X. A resina foi ressuspendida em 30 μ l de tampão de solução de corrida SDS-PAGE e fervida por 5 minutos a 95°C. As amostras foram centrifugadas a 500 x g por 1 minuto e 20 μ L de cada uma coletadas e analisadas por SDS-PAGE 10%.

4.1.4.2 KGA:PPAR γ

Para os ensaios de *pull-down* utilizou-se duas soluções: solução PDA contendo 15 mM imidazol e solução PBS 1X contendo 0,5 mM TCEP e 15 mM imidazol, acrescidos ou não de 1 mM de glutamato. Trinta microlitros de resina Talon foram utilizados para cada ensaio, a qual foi previamente lavada e equilibrada com a solução PDA ou PBS 1X com ou sem a adição de 1 mM glutamato e 1,3 μ M de rosiglitazona. Trezentos nanomolar de His-PPAR γ e um excesso molar de 10x de KGA, a qual teve a fusão de cauda His removida, foram incubados com a resina de cobalto Talon. Como controle negativo, a resina foi incubada somente com KGA sem a fusão His. As misturas foram igualmente completadas para o volume de 500 μ L de solução PDA ou PBS 1X e incubadas sob agitação a 4°C por 16 horas, tendo sido posteriormente centrifugadas a 500 x g, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a resina lavada 3 vezes com 1 mL de solução PDA ou PBS 1X. A resina foi ressuspendida em 30 μ L de solução de corrida SDS-PAGE e fervida por 10 minutos a 95°C.

As amostras foram centrifugadas a 500 x g por 1 minuto e 20 μ L de cada uma foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 10%.

Seguiu-se o mesmo protocolo acima para o ensaio de *pull-down* entre a KGA e o domínio LBD do PPAR γ com as seguintes alterações: Incubou-se 4,4 μ M de KGA com 1,1 μ M de His-PPAR γ (LBD) em soluções PDA ou PBS 1X acrescidas de 10 mM de imidazol com ou sem a presença de 1,3 μ M de rosiglitazona e/ou 1 mM de glutamato.

4.1.5 Anisotropia de Fluorescência

Nesta técnica, a luz incidida sobre a amostra é uma luz polarizada, e somente os fluoróforos orientados nessa mesma direção absorvem energia, tornam-se excitados e subsequentemente emitindo luz. A luz emitida é detectada pelo equipamento tanto no sentido paralelo ao de excitação (“vertical”) quanto no sentido ortogonal a ele (“horizontal”) (Figura 9).

Moléculas pequenas (neste experimento, caracterizadas pela glutaminase em estado dimérico), devido a sua rotação mais acelerada, emitem luz tanto no sentido vertical quanto horizontal, ocasionando a despolarização da luz emitida. O inverso ocorre para as moléculas em solução no estado ligado (caracterizado pela interação com PPAR γ), pois o movimento browniano será mais lento devido ao aumento do tamanho da molécula. Consequentemente, a emissão da luz pelo fluoróforo presente nessas moléculas será mais frequente no mesmo plano da energia de excitação (“vertical”), e assim a luz emitida continuará polarizada.

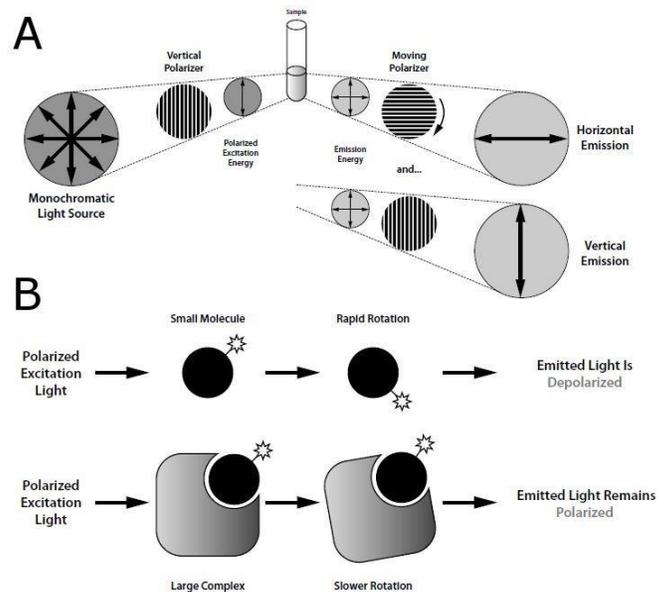


Figura 9: Experimento de anisotropia de fluorescência. **A)** Apresenta-se o arranjo experimental do equipamento, onde uma luz monocromática passa por um polarizador, sendo orientada em um único sentido para então ser incidida sobre a amostra. O detector irá medir a luz emitida pela molécula tanto no sentido paralelo ao de excitação quanto no ortogonal a ele. **B)** Nota-se que quanto maior for a molécula, mais lenta será sua rotação, e consequentemente, a luz emitida pelo fluoróforo continuará em maior parte no plano paralelo ao de excitação, caracterizando a emissão de luz polarizada. Para moléculas menores cuja rotação é mais acelerada, a luz que excita o fluoróforo é emitida em várias direções, sendo detectada pelo equipamento tanto no sentido paralelo ao de excitação quanto no ortogonal, caracterizando a despolarização da luz ⁶⁹.

O aumento na concentração da proteína, cuja interação é esperada, pode deslocar o equilíbrio da KGA de dímero para o de hetero-oligômeros maiores ²⁹. Desta maneira, foi feita a adição de PPAR γ não marcado em concentrações crescentes na faixa que garante a obtenção de uma curva sigmoidal de anisotropia. Tanto a anisotropia quanto a polarização são medidas de intensidade horizontal ou vertical da luz, contudo, a anisotropia é obtida a partir do tratamento matemático dos valores de polarização. Seus valores estão relacionados, e, portanto, se maior é a polarização, maior será também a anisotropia. O cálculo da anisotropia foi feito pelo *software* do próprio equipamento (Envision PerkinElmer) pela seguinte equação:

$$r = \frac{(I_{vv} - I_{vh})}{I_{vv} + 2GI_{vh}}, \text{ onde } G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}},$$

onde r = anisotropia; I_{vv} = intensidade de emissão quando o polarizador da excitação e da emissão estão orientados verticalmente; I_{vh} = intensidade de emissão quando o polarizador da excitação se encontra na posição vertical e o polarizador da emissão se encontra orientado horizontalmente; I_{hh} = intensidade de emissão quando o polarizador da excitação e da emissão estão orientados horizontalmente; I_{hv} = intensidade de emissão quando o polarizador da excitação se encontra na posição horizontal e o polarizador da emissão se encontra orientado verticalmente.

Os valores de K_d foram estimados utilizando-se os valores de anisotropia obtidos, sendo ajustados por regressão não-linear de mínimos quadrados empregando-se o software Origin (OriginLab), utilizando-se a seguinte equação:

$$y = ai + (af - ai) \left(\frac{\left(\frac{x^n}{k^n}\right)}{1 + \left(\frac{x^n}{k^n}\right)} \right)$$

Onde y é o valor de anisotropia medido, ai é a anisotropia inicial, af é a anisotropia final, k é a constante de dissociação (K_d), n é o índice de Hill e x é a quantidade de proteína não marcada adicionada ($PPAR\gamma$).

Para a realização do ensaio de anisotropia de fluorescência houve a necessidade de fazer a marcação da proteína KGA com o fluoróforo FITC (*Fluorescein isothiocyanate*, Thermo Scientific). Dessa forma, a proteína KGA, no terceiro passo cromatográfico, foi purificada utilizando-se solução 30 mM Hepes pH 8,0 contendo 150 mM NaCl e 0,5 mM TCEP. A troca do tampão Tris por Hepes ocorreu devido ao fato do tampão Tris apresentar o grupo funcional amina, capaz de reagir com FITC. Em seguida, foi realizada a marcação da

proteína KGA com FITC, seguindo especificações do fabricante. De modo resumido, 16 mM de proteína foi diluída em 0,5 mL de solução tamponante para conjugação com 50 mM Borato de sódio pH 8,5 e adicionada de excesso molar entre 15 e 20 vezes de FITC, conforme protocolo do fabricante. A mistura foi homogeneizada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente na ausência de luz. Em seguida, a amostra foi purificada em uma coluna HiTrap Dessalting (GE) acoplada a AKTA FPLC com fluxo de 5 mL/min, para se retirar o excesso de FITC não incorporado. A proteína KGA marcada foi quantificada medindo-se a absorbância em 280 e 494 nm. Para se calcular a concentração de KGA após marcação empregou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de proteína (M)} = \frac{A_{280} - (A_{495} \times \text{fator de correção})}{\epsilon_{\text{proteína}}} \times \text{fator de correção},$$

onde: ϵ proteína = coeficiente de extinção molar da proteína e fator de correção = A_{280}/A_{494} = 0.3 (a sonda contribui com absorbância a 280 nm).

Para cálculo do grau de marcação, empregou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Moles FITC/proteína} = \frac{A_{494} \text{ da proteína marcada}}{\epsilon_{\text{FITC}} \times \text{concentração da proteína (M)}} \times \text{fator de diluição},$$

onde ϵ FITC = 70.000.

O ensaio de anisotropia de fluorescência foi realizado mantendo-se a concentração de KGA fixa (5 nM) e variando-se a concentração de PPAR γ DBD-LBD. Realizou-se diluição seriada de PPAR γ cuja concentração estoque inicial de 200 μ M passou por 11 diluições 1:1 em solução Tris-HCl 30 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e TCEP 0,5 mM. Em poços de placa de 384 poços OptiPlate-384 Black (PerkinElmer) adicionou-se 5 nM de KGA-FITC, 12,5 μ L de PPAR γ diluída (0 a 50 μ M) e Tris-HCl 30 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e TCEP 0,5 mM q.s.p

50 μ L. Após, a mistura foi incubada por 24 horas a temperatura ambiente protegida da luz e contra evaporação. As medidas foram realizadas no equipamento Envision (PerkinElmer), com excitação no comprimento de onda de 480 nm e coleta no comprimento de onda de 535 nm utilizando-se 2 filtros de polarização ortogonais. Os dados coletados foram analisados no *software* OriginLab e o erro associado aos valores de K_d são decorrentes da incerteza do ajuste da curva. O ensaio foi realizado em triplicata ($n=1$).

4.1.6 Ensaio de atividade enzimática

O ensaio de atividade da enzima KGA foi realizado de acordo com protocolo já estabelecido no laboratório. Nesse ensaio, os parâmetros cinéticos são obtidos de forma indireta, ou seja, o produto da reação catalisada pela glutaminase é o substrato de outra enzima, glutamato desidrogenase (GDH), que converte glutamato em α -cetoglutarato. Neste processo, o NAD^+ é reduzido a NADH, este sendo identificado pela absorvância em 340 nm (Figura 10).

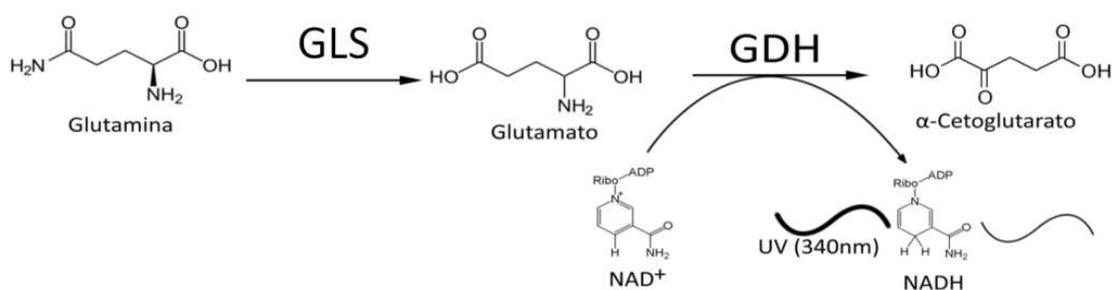


Figura 10: Esquema de ensaio cinética da atividade de glutaminase. **GLS:** Glutaminase. **GDH:** Glutamato desidrogenase.

Para realizar o ensaio cinético, 5 nM da enzima KGA foi incubada com 10 μ M da proteína PPAR γ por 24 horas a 4°C. A mistura foi acrescida de solução Tris-Acetato 50 mM pH 8,6, EDTA 0,2 mM, 30 mM NAD^+ (Sigma Aldrich), 3 unidades de GDH bovina (Sigma

Aldrich), 20 mM K₂HPO₄, na presença ou não de 100 μM do ativador de PPARγ rosiglitasona, em volume final de 80 μL. Após o tempo de incubação, a amostra foi colocada em uma placa de 96 poços (Greiner) contendo 120 μL de solução de glutamina (concentrações crescentes: 1,8 mM, 3,7 mM, 7,5 mM, 15 mM, 30 mM e 60 mM). O experimento foi realizado em triplicata, a medida realizada em um leitor de placas PerkinElmer Enspire 2300 MultiLabel Reader, no comprimento de onda de 340 nm. Os dados foram tratados no programa GraphPad Prism v5.0 para cálculo dos valores de K_d e K_{cat}. A média dos valores obtidos de 3 experimentos foram aplicados na fórmula $s = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n-1}$ para cálculo do desvio padrão, onde s é o desvio padrão, x_i os valores observados, \bar{x} a média dos valores observados e n o número de amostras analisadas, os quais foram posteriormente plotados em gráfico de barras no *software* Excel (Microsoft).

4.1.7 Análise da formação do complexo em coluna de filtração em gel analítica

Para análise da interação entre as proteínas KGA e PPARγ realizou-se cromatografia em coluna de filtração em gel analítica Superdex 200 HR 10/30 (GE) acoplada ao cromatógrafo AKTA FPLC (GE). Cento e cinquenta pmoles de KGA ou 450 pmoles de PPARγ foram aplicados em coluna equilibrada com 30 mM de Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM TCEP e 1 mM glutamato (condição usada para KGA) ou 1,5 mM rosiglitasona (condição usada para o PPARγ). Por fim, KGA foi pré-inubada por 16 horas, a 4°C, com PPARγ, na presença de glutamato e rosiglitasona, sendo esta mistura aplicada na filtração em gel equilibrada com solução 30 mM de Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM TCEP ou PBS 1X acrescido de 0,5 mM TCEP.

4.1.8 *Crosslinking e docking molecular*

Crosslinking é um processo utilizado para unir quimicamente duas ou mais moléculas covalentemente. Os agentes de *crosslinking* contêm extremidades reativas para grupos funcionais específicos (aminas primárias e sulfidrilas, por exemplo) presentes em proteínas ou outras moléculas. Para avaliar a interação entre as proteínas KGA e PPAR γ utilizamos o agente de *crosslinking* *Disuccinimidyl suberate* (DSS), que possui ésteres amino-reativos em suas extremidades que são usados para conjugar proteínas, formando um braço de 11,4 Å⁷⁰.

Após processo de purificação por cromatografia utilizando-se solução E (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl e 2 mM DTT), incubou-se 7,5 μ M de KGA com 9 μ M de PPAR γ , bem como as proteínas separadas como controle, a 4°C por 16 horas acrescidas ou não de 50 mM K₂HPO₄. Adicionou-se então 2,5 mM de DSS incubando por 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi parada com a adição de 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, acrescidas de solução de corrida SDS-PAGE q.s.p. 20 μ L e fervidas por 10 minutos a 95° C. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 10% corado com *comassie brilhante blue*, bem como *western blotting* conforme item 4.2.5, e as bandas identificadas, em comparação com as proteínas KGA e PPAR γ incubadas individualmente com DSS, foram excisadas e submetidas à análise por espectrometria de massas.

As bandas foram recortadas do gel, digeridas com a enzima tripsina e os peptídeos resultantes foram analisados em espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) acoplado ao sistema de cromatografia líquida EASY-nLC (Proxeon) por uma interface de nanoelectrospray. Os peptídeos foram separados por um gradiente de 2-90% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico em uma coluna analítica PicoFrit (20 cm x

ID75 μM , 5 μm de tamanho de partícula, New Objective) em um fluxo de 300 nL/min durante 65 min. A voltagem do nanoelectrospray foi ajustada para 2,2 kV e a temperatura da fonte em 275°C. Foi utilizada a análise dependente dos dados e fragmentação do tipo HCD (High Energy C-trap Dissociation). A resolução do equipamento foi de $r= 60.000$ e os 5 picos mais intensos foram fragmentados por HCD com energia de colisão normalizada de 40% e resolução de $r= 7500$. Para a realização de MS/MS, os íons deveriam ter pelo menos 80.000 contagens, com exclusão dinâmica de 60 s. A lista de picos (mgf) foi gerada pelo programa Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific). Os dados gerados foram analisados no programa MassMatrix (www.massmatrix.net) contra um banco de dados das sequências de KGA e do PPAR γ . Os parâmetros para análise de *crosslinking* foram carbamidometilação (+57,021460 Da) como modificação fixa, oxidação da metionina (+15,99491 Da) como modificação variável, ligações químicas cruzadas com DSS (138,06808 Da) e quatro clivagens perdidas da tripsina e tolerância de 10 ppm para o íon precursor e 0,02 Da para os íons fragmentos. Potenciais peptídeos com *crosslinking* foram validados manualmente. Os dados foram coletados e analisados pelo laboratório de espectrometria de massas (MAS) do LNBio.

As coordenadas atômicas do PPAR γ foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB, ID-3DZY). A estrutura da KGA utilizada foi a 3SS3. O modelo não possui o C-terminal e de fato corresponde às regiões em comum entre KGA e GAC, portanto, foi denominado GLS1. Um algoritmo de *Docking* personalizado foi desenvolvido através do *software* Rosetta⁷¹, utilizando informações do *crosslinking* como restrições do espaço de busca. Os modelos de baixa energia foram validados por meio de um protocolo de ligação DSS automatizado

gerando um modelo teórico final da interface de interação. O *docking* foi realizado por Rodrigo Honorato do LNBio.

4.1.9 Eletroforese em Gel Nativo

A formação do complexo KGA-PPAR γ foi analisada por eletroforese em gel de agarose em condições nativas. Para tanto, 100 pmoles de KGA foi incubada com PPAR γ em concentrações molares crescentes (300, 500 e 700 pmoles), em solução contendo 30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM de TCEP e 1 mM de glutamato em q.s.p. 15 μ L, por 24 horas, a 4°C. O mesmo ensaio foi realizado fixando a concentração de PPAR γ em 100 pmoles e adicionando concentrações crescentes (300, 500 e 700 pmoles) de KGA. Após o tempo de incubação, adicionou-se solução de amostra eletroforese nativa (4X solução Bis-Tris (Invitrogen), 40% glicerol, 0,1% azul de bromofenol) e aplicou-se as mesmas em gel de agarose 1,5% elaborado em solução Bis-Tris 1X pH 7,5 (Invitrogen). O gel foi submetido a uma tensão de 6 V/cm por 10 minutos e 3 V/cm por 100 minutos, a 4°C e subsequentemente corado com *Coomassie brilhante blue*.

4.2 Estudos celulares

4.2.1 Duplo híbrido da KGA

O ensaio de duplo híbrido em levedura (*Yeast 2-hybrid system*) é uma metodologia que foi desenvolvida para identificar genes que codificam proteínas que estão associadas a uma proteína alvo dentro de um contexto celular. O duplo híbrido é o método muito sensível e de maior sucesso para identificar as interações proteicas, mas pode, além disso, ser também usado para definir domínios ou resíduos de aminoácidos que são envolvidos, ou são essenciais

para a interação. A base para o duplo híbrido está na estrutura de um fator de transcrição particular (GAL4 e LexA) que tem dois domínios fisicamente separados: o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ativação da transcrição. O domínio da ligação ao DNA se liga a uma sequência promotora específica, que se situa no início de um gene repórter, e o domínio de ativação atrai os componentes críticos do complexo de iniciação de transcrição. No duplo híbrido, a proteína de interesse é fusionada ao domínio de ligação de DNA, enquanto uma biblioteca de cDNAs – codificando as proteínas com potencial de interação a serem identificadas – é fundido ao domínio de ativação de transcrição. Se ocorrer uma interação entre a proteína de interesse e uma proteína de interação da biblioteca, um fator de transcrição funcional completo é reconstituído e o "gene repórter", que está sob seu controle, será ativado para expressar, no nosso caso, a enzima β -galactosidase. Nos clones onde ocorreu esta interação há a formação de um corante azul através da reação enzimática da β -galactosidase (Figura 11).

O cDNA completo da isoforma hKGA foi inserido em um sítio múltiplo de clonagem do vetor pBTM116KQ, o qual contém o domínio de ligação ao DNA chamado LexA. Tal construção permitiu a produção da proteína de fusão "LexA-glutaminase" (vetor de "isca") nas células de levedura. O vetor contém o gene *TRP1* como marcador e por isto a linhagem de levedura utilizada ("L40", genótipo: *trp1*, *his3*, *leu2-3*, *ura3*, *ade2*) cresce em um meio deficiente em triptofano somente quando for transformada com este vetor.

O ensaio de duplo híbrido foi iniciado inoculando-se a levedura, cepa L40, em 50 mL meio de cultura YPD (1% m/v de extrato de levedura, 2% m/v de peptona e 2% m/v glicose seguido de crescimento por 24 horas, a 30°C, sob agitação a 200 rpm. Posteriormente, centrifugou-se 1 mL de meio de cultura 6000 x g por 3 minutos para cada transformação.

Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 200 μ L de solução de transformação 15,5 mM PEG3350, 206,2 mM acetato de lítio, 10,3 mM TE Tris-HCl pH 8,0, 10,3 M EDTA e 10,3 mM DTT.

Adicionou-se 5 μ L de ssDNA (10 mg/mL, Invitrogen), 100 ng de DNA individualmente (pBTM116KQ.hKGA, pBTM116KQ.Fez, pBTM116KQ.vazio, pACT2.vazio) e homogeneizou-se. Incubou-se por 40 minutos, a 45°C e plaqueou-se a amostra em placa com meio de cultura seletivo SD^{-W} (0,14% m/v de *yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate*, 0,5% m/v de sulfato de amônio, 2% m/v de glicose, 0,001% m/v de adenina, 0,002% m/v de histidina, 0,01% m/v de leucina (transformação com vetor pBTM116KQ) e SD^{-L} (0,14% de *yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate*, 0,50% de sulfato de amônio, 2% de glicose, 0,001% de adenina, 0,002% de histidina, 0,01% de triptofano (massa/volume) em água desmineralizada) (transformação com vetor pACT2). Além disso, utilizou-se o vetor pBTM116KQ clonado como proteína Fez (*fasciculation and elongation protein zeta*) como controle positivo devido a sua capacidade de autoativar o gene repórter⁷²; o vetor clonado foi gentilmente cedido pelo Dr. Jörg Kobarg do LNBio. Após o crescimento, repicou-se as células em novo meio de cultura para crescimento da colônia isoladamente.

Para que o ensaio prosseguisse, a proteína KGA sozinha não poderia autoativar o gene repórter, isso devendo ocorrer somente quando há interação entre a proteína KGA e proteína presa. Portanto o passo seguinte foi a realização do teste de autoativação do gene repórter. Nesse teste, as colônias foram transferidas para um papel filtro, deixadas em nitrogênio líquido por 3 minutos e incubadas com 3 mL de solução reveladora Z-buffer (87 mM Na₂HPO₄, 47 mM NaH₂PO₄, 19 mM KCl, 1,38 mM MgSO₄), 2,5 mM X-gal, 120 mM β -

mercaptoetanol a 37°C, por 3 horas. Após o tempo de incubação, as colônias contendo o vetor pBTM116KQ.hKGA desenvolveram coloração rosa, mostrando a não autoativação do gene repórter, enquanto que no caso do controle positivo (pBTM116KQ.Fez), a colônia desenvolveu coloração azul.

Seguindo o teste da autoativação, foi realizado o duplo híbrido empregando-se uma "biblioteca de cDNA" comercial de células HeLa, preparada em vetor pACT2, o qual contém o domínio de ativação. Este vetor contém outro marcador de seleção (*LEU2*). O vetor de fusão ("glutaminase - domínio de ligação ao DNA") e os vetores com a biblioteca ("domínio de ativação - proteína presa", chamado de vetor "presa") foram utilizados para a transformação de células de levedura (transformações sucessivas). Todos os transformantes individuais de levedura conterão o vetor "isca" e um vetor diferente da biblioteca (vetor de "presa"). A "caçada de interação" (*interaction hunt*) foi realizada em meio mínimo, o qual permite o crescimento de células somente quando a interação entre a "isca" e a "presa" ocorre (Figura 11). Um terceiro marcador *HIS3* (*imidazoleglycerol-phosphate dehydratase*) foi também empregado. As células de levedura com o fator de transcrição reconstituído induz a síntese de uma enzima que permitiu que as células crescessem em um meio mínimo sem histidina.

Portanto, a transformação da levedura foi feita com o vetor pBTM116KQ.hKGA e biblioteca de cDNA de HeLa em vetor pACT2.isca. A partir da placa de meio de cultura SD^{-W}, foi repicada uma colônia colocando-a em 150 mL de meio de cultura SD^{-W} líquido e incubado a 30°C, a 200 rpm por aproximadamente 16 horas. A amostra foi centrifugada por 5 minutos, a 1.300 x g, a 21°C e o *pellet* ressuspenso em 1 litro de meio de cultura YPD líquido e incubado a 30°C, a 200 rpm com a absorbância monitorada até o valor entre A₆₀₀ 0,4 - 0,6. O meio de cultura foi centrifugado por 10 minutos, a 21°C, a 1.300 x g e o *pellet*

lavado com 400 mL de TE (concentração descrita anteriormente) e novamente centrifugado. O *pellet* foi ressuspendido com 8 ml de TE e acetato de lítio. Foram adicionados 100 µL de ssDNA, 150 µg de maxiprep de biblioteca de cDNA de HeLa (Realizada com QIAGEN *Plasmid Maxi Kit*) e 60 mL de PEG/acetato de lítio agitando vigorosamente (vórtex). A mostra foi incubada por 30 minutos, a 30°C, a 200 rpm. Após a incubação, foi realizado o choque térmico (15 – 20 minutos, a 42°C e 3 minutos no gelo) e então centrifugado por 5 minutos, a 1.300 x g, a 21°C. O *pellet* foi ressuspendido com 8 mL de TE e plaqueado em meio SD^{-WLH} contendo 5 mM de 3-AT (*3-amino-1,2,4-triazole*). As placas foram incubadas a 30° C e monitoradas após o terceiro dia, quando começaram a crescer as colônias.

Após o crescimento em meio de cultura seletivo SD^{-WLK} contendo 5 mM 3-AT (inibidor da enzima His3, utilizado em doses baixas para aumentar a estringência do ensaio), as colônias foram repicadas em novo meio de cultura e então submetidas ao teste da β-galactosidase. Este teste, realizado em papel filtro, consiste na verificação da interação “isca-presa” (reconstituição do fator de transcrição) por meio da expressão da enzima β-galactosidase. Esta enzima cliva o substrato X-gal, cujo produto confere coloração azul as colônias, indicando interação positiva. Após esta confirmação, os DNAs plasmidiais, referentes à “presa” de cada clone, foram extraídos da levedura, propagados em bactéria competente DHR5α e sequenciados para identificação dos insertos correspondentes a cada proteína-“presa”.

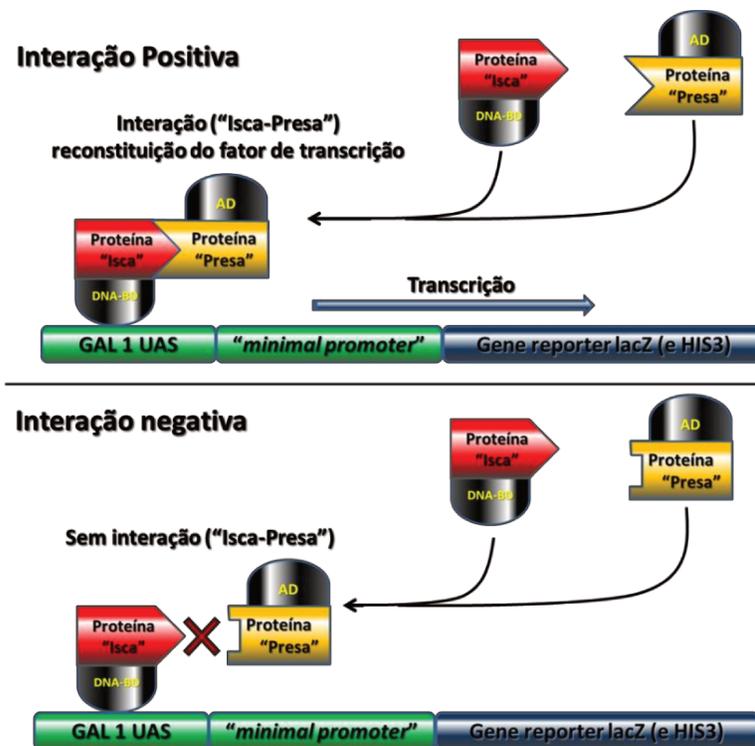


Figura 11: Desenho esquemático do sistema de duplo híbrido baseado no GAL4. A proteína “isca” está fusionada ao domínio de ligação ao DNA (DNA-BD) da proteína GAL4 de levedura (1-147 aa) que se liga ao GAL1 UAS *upstream* do gene repórter. A proteína “presa” está fusionada ao domínio de ativação (AD) da proteína GAL4 (768-881 aa) e tem função de ativação da transcrição. Os genes repórteres *lacZ* e *HIS3* são construções separadas integrados no genoma da levedura. Quando ocorre a interação entre as proteínas isca-BD e presa-AD, os dois domínios estarão fisicamente próximos, reconstituindo o fator de transcrição. Desse modo os genes repórteres são transcritos indicando que houve a interação isca-presa (acima). Quando a interação não ocorre, não existe reconstituição do fator de transcrição e, conseqüentemente, os genes repórteres não são transcritos (abaixo).

Com esta metodologia, o pós-doutorando do nosso grupo Marcel Nakahira, em colaboração com este projeto, encontrou diversos potenciais parceiros de interação da KGA, entre eles, o receptor nuclear PPAR γ . O sequenciamento do vetor pACT contendo o receptor revelou o fragmento em sua forma completa (dados não mostrados).

Para a confirmação da interação entre KGA e PPAR γ e definição das regiões envolvidas (Tabela 3) também foi utilizado o mesmo sistema em levedura. O protocolo

utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, bem como os protocolos de transformação e do teste da β -galactosidase.

4.2.2 Cultura de células de mamíferos

Linhagens de câncer de próstata humano (PC3) e câncer de mama (SKBR3) foram cultivadas em meio RPMI (Cultilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB, Cultilab) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células embrionárias de rim HEK293 foram cultivadas em meio DMEM (Cultilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal.

4.2.3 Transfecção de células de mamíferos

Células das linhagens de câncer de mama SKBR3 foram crescidas até uma confluência de 80% em meio de cultura RPMI suplementado com 10% SFB, à 37°C e 5% CO₂. As células (22 x 10⁵ células por placa) foram semeadas no dia anterior ao experimento, em placas de cultura celular de 100 mm de diâmetro. A transfecção foi realizada por meio da técnica de lipofecção (transfecção por lipossomos) com a utilização do X-Treme Gene 9 DNA *Transfection Reagent* (Roche), conforme as instruções do fabricante. Quinze microlitros do reagente foram diluídos em 500 μ L de meio Opti-MEM (Gibco) acrescidos de 5 μ g de DNA. A mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e adicionada sobre as células. Subsequentemente, as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 24h. O meio foi removido, as células lavadas com PBS e raspadas das placas após adição de 200 μ L de solução de lise (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X) acrescido de inibidores de fosfatase (50 mM β -glicerolfosfato, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM Na-

pirofosfato) e proteases (1 µg/mL aprotinina, 1 µM pepstatina, 1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptina) e anti-oxidante (2 mM DTT). Os lisados celulares totais foram congelados com N₂ líquido, descongelados em gelo e centrifugados a 10.600 x g por 10 minutos a 4°C. A quantificação foi feita pelo método de Bradford seguindo especificação do fabricante (BioRad) e tendo BSA como proteína padrão. O resultado foi analisado por *western blotting*.

Clones estáveis de PC3 com a expressão de KGA-V5 foram obtidos após 48 horas de transfecção com pcDNA3.1 KGA-V5, onde as células foram submetidas à seleção de colônias resistentes ao antibiótico neomicina (InvivoGen), utilizando-se 400µg/mL, durante 7 dias. A concentração de 400 µg/mL foi estabelecida a partir de uma curva de dose/reposta feita com concentrações que variaram de 100 µg/mL a 1 mg/mL de neomicina durante 7 dias. A concentração de 400 µg/mL foi capaz de causar a morte de 100% das células ao final de 7 dias. Estes clones foram obtidos pela aluna de mestrado Caroline Ascensão.

A confirmação da expressão ectópica foi realizada por SDS-PAGE e *Western blot*. Os anticorpos anti-KGA (Abnova), anti-Flag (Sigma), anti-V5 (Invitrogen), anti-BNIP-H (Abnova) e anti-PPAR γ (Cell Signaling) foram usados para a detecção da KGA, BNIP-H e PPAR γ .

4.2.4 Co-imunoprecipitação

Aproximadamente 500 µg de lisado obtido após a transfecção foram incubados com 6 µg do anticorpo anti-V5 ou anti-Flag em solução PDA com ou sem a adição de 1 mM de glutamato, em quantidade suficiente para 300 µL. A mistura foi incubada a 4°C sob agitação por 16 horas. Como controle negativo utilizou-se imunoglobulina G genérica (Invitrogen). Um volume de 10 µL de resina *Dynabeads Protein G* (Invitrogen) foram adicionados à

mistura (anticorpo/lisado) e incubados em temperatura ambiente por 4 horas sob agitação. A resina foi precipitada usando o Magna-Sep (*Magnect Particle Separator* - Invitrogen) e o sobrenadante separado para análise. Após lavagem com 500 μ L de solução PDA por três vezes, a resina foi ressuspensa em 30 μ L de solução de corrida SDS-PAGE, fervida por 15 minutos a 95°C e analisada por *western blotting* conforme item 4.2.5. Em uma variação deste protocolo, testou-se também a incubação dos anticorpos com a resina por 1 hora, em temperatura ambiente, seguido de adição do lisado celular e incubação por 16 horas, a 4°C.

4.2.5 Western Blotting

Após eletroforese das amostras por SDS-PAGE 10% de poliacrilamida, as bandas foram transferidas para membranas de PVDF (BioRad) empregando-se transferência em sistema semi-seco (BioRad) com solução 50 mM Tris-HCl, 38 mM glicina, 1 mM SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) e 20% metanol a 80 mA por 1 hora, empregando-se o equipamento Trans-Blot SD *Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad). Após essa etapa, a membrana foi bloqueada com 7% de albumina bovina (BSA) diluída em TBS (80 mM Tris-HCl, 16 mM Tris-base, 150 mM NaCl e 4 mM EDTA) com 0,1 % Tween 20 por 1 hora (TBS/T). Para a detecção das proteínas de interesse, a membrana foi incubada com os anticorpos primários anti-FLAG (Sigma) na proporção 1:5000, anti-V5 (Invitrogen) 1:5000, anti-KGA (Santa Cruz) 1:1000, anti-BNIP-H (Abnova) 1:1000 e anti-PPAR γ (Cell Signaling) 1:1000, todos diluídos em TBS/0,1% Tween 20, por 16 horas a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 x com TBS/T por 5 minutos cada, seguida de incubação com anticorpo secundário (GE – anti-*mouse* ou anti-*rabbit* diluídos 1:5000 em TBS/0,1% Tween 20), por 1 hora, à temperatura ambiente. A presença da banda protéica foi detectada adicionando-se reagente Luminol (*ECL*

Detection Reagent – Pierce) à membrana seguido do contato da mesma com filme autoradiográfico (BioMax *light film* – Kodak) pelo tempo julgado necessário.

4.2.6 Co-localização por Imunofluorescência

Cerca de 5×10^3 células das linhagens SKBR3 e PC-3 foram semeadas em placa de 384 poços (Opti-Plate – PerkinElmer) em meio RPMI (Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em estufa a 37° com 5% de CO₂. Após 48 horas, as células foram fixadas e permeabilizadas com solução de 3,7 % formaldeído, 0,2 % Triton X-100 em PBS 1 X, bloqueadas com solução de 3 % BSA, 0,8 % Triton X-100 em PBS 1 X e incubadas com os anticorpos primários anti-KGA (Abnova) e anti-PPAR γ (Cell Signaling) (diluição 1:200 em solução 3% BSA, 0,8 % Triton X-100 em PBS 1 X) por 16 horas à 4 °C. As células foram submetidas à lavagem com PBS 1 X acrescido de 0,05% Tween 20 (Sigma) por três vezes, seguido de incubação das células com anticorpo secundário anti-*mouse* Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (diluição 1:100) e anti-rabbit Alexa Fluor 633 na diluição 1:200 por 2 horas à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas duas vezes com PBS 1 X acrescido de 0,05% Tween 20. Para a detecção do núcleo, empregou-se DAPI (Sigma), o qual foi incubado na concentração de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em solução de PBS 1 X por 5 minutos. Após as incubações, as células foram analisadas em microscópio confocal (Operetta – Perkin Elmer). As imagens foram processadas utilizando-se o *software* Volocity (Perkin Elmer). A preparação das células foi realizada em colaboração com a aluna de doutorado Ms. Carolina de Guzzi Cassago.

O mesmo protocolo foi aplicado para o ensaio de imunolocalização da KGA-V5 e FLAG-BNIP-H transfectadas em células SKBR3 separadamente. Entretanto, foram utilizados

neste ensaio os anticorpos primários anti-V5 (Invitrogen) e anti-FLAG (Sigma) na diluição 1:20.000. Para os anticorpos secundários utilizou-se o anti-*mouse* Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (diluição 1:200). Para a marcação mitocondrial e nuclear, incubou-se 500 nM de MitoTracker CMXRos (Invitrogen) e 2 µg/mL de *Hoescht33342* (Sigma) respectivamente, diluídos em meio RPMI sem a adição de SFB q.s.p 50 µL, por 45 minutos a 37°C.

4.2.7 Immunogold labelling

Os procedimentos descritos a baixo foram realizados pelo Silvio Roberto Consonni do LNBio/CNPEN. As células SKBR3 foram cultivadas, tripsinizadas e sedimentadas por centrifugação pela pós-doutoranda Dra. Kaliandra de Almeida Gonçalves e em seguida foram fixadas com paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,1% dissolvidos em solução IL (100 mM cacodilato de sódio pH 7,4 e 200 mM sacarose). As células foram lavadas 3 vezes com solução IL por 10 minutos a 4°C. O processo de lavagem foi repetido com solução IF contendo 200 mM glicina e 200 mM sacarose durante 1 hora a 4°C. Submeteu-se as células ao processo de desidratação para embebição com resina em metanol nas concentrações 30%, 50%, 70% a 4°C, 80% e 100% a -20°C, todas por 20 minutos. Para embebição, as células foram incubadas com metanol acrescido de resina LR White na diluição (1:1) durante 8 horas, seguido de nova incubação na mesma solução na diluição (1:2), também por 8 horas. Para a polimerização utilizou-se sistema com 2 lâmpadas UV de 15W posicionando a amostra a uma distância de 15 centímetros das lâmpadas na temperatura de -20°C por 69 horas e a temperatura ambiente por 3 horas. Após a embebição, as células foram submetidas à microtomia utilizando *grid* de níquel cobertos com formvar e navalha de diamante para

secções de 70-80 nm de espessura. Após 24 horas de secagem, submeteu-se a amostra à imunocitoquímica.

Para a imunocitoquímica, utilizou-se o tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 em todas as lavagens. As soluções tampões foram filtradas com filtro Millipore 0,22 µm. As amostras foram lavadas em água ultra-pura durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida realizou-se pré-incubação com tampão 50 mM Tris-HCl e 200 mM de glicina em pH 7,4 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Lavou-se novamente por 2 vezes com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 durante 5 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi então incubada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 1% BSA e 0,05% Tween 20 por 30 minutos em temperatura ambiente. Incubou-se a amostra com o anticorpo primário anti-KGA mouse (Abnova) na diluição 1:200 previamente diluídos em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, por 16 horas a 4°C em câmara úmida. Novamente procedeu-se lavagem da amostra por 3 vezes com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,5% BSA por 5 minutos a temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-mouse conjugado com a partícula de ouro (10 nm) foi diluído em 1:40 em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 1% BSA, seguido de incubação por 1 hora em temperatura ambiente. A amostra foi lavada por 3 vezes em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,5% BSA durante 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de nova lavagem com água ultra-pura nas mesmas condições. Para contraste, foi adicionado 1% acetato de uranila em álcool etílico 50% durante 2 minutos, seguido de secagem do material por 10 minutos. Adicionou-se então citrato de chumbo/Reynolds (1,33 g de nitrato de chumbo, 1,76 g de citrato de sódio) com água ultra-pura q.s.p 50 mL durante segundos. Após lavagem, o material secou durante 30 minutos antes de ser coberto com carbono e ser observado ao microscópio. Para a coleta das imagens empregou-se o microscópio eletrônico

de transmissão LEO 906 do Laboratório de Microscopia Eletrônica/IB (Unicamp, Campinas-SP).

4.2.8 Ensaio de transativação celular

Cerca de 7×10^4 células de rim embrionário HEK 293T foram semeadas em placa de 24 poços. Quatrocentos nanogramas de pCMV-PPAR γ adicionado ou não de 400 ng de pCDNA3.1KGA-V5 foram transfectados utilizando-se lipofetamina 2000 (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Juntamente com os plasmídeos adicionou-se também vetor repórter pGL contendo o elemento responsivo a PPAR γ (DR-1, AGGTCA N AGGTCA) e cDNA para expressão da luciferase de vagalume, assim como plasmídeo pRL com expressão constitutiva da luciferase de Renilla (para normalização da eficiência de transfecção). Para avaliação da atividade de luciferase empregou-se o kit Dual Luciferase *Reporter Assay* (Promega). Assim, as atividades das luciferases do vagalume e da *Renilla* foram sequencialmente avaliadas a partir de um único experimento. A atividade da luciferase de vagalume foi medida pela adição do *Luciferase Assay Reagent II*. Após a medição deste sinal, a reação foi parada e a atividade da luciferase *Renilla* foi medida pela adição do reagente *Stop&Glow*. Os dados obtidos foram plotados em gráfico de barras no *software* Excel e o desvio padrão calculado conforme descrito no item 4.1.6. O ensaio foi realizado em triplicata (n=1). Este ensaio foi feito pela aluna de doutorado Jéssica Lois, do grupo da Dra. Ana C. M. Figueira do LNBio.

4.2.9 qPCR

Interessados no impacto da interação KGA:PPAR γ sobre os genes que são regulados pelo PPAR γ , realizamos ensaios de *quantitative - polymerase chain reaction* (qPCR) para

avaliar a superexpressão dos genes ACADL e CPT1A (alvos do PPAR γ). Linhagens de células de câncer de próstata, PC3, com expressão constitutiva da KGA em fusão com V5, conforme item 4.2.3, foram utilizadas para extração de RNA total, utilizando *kit* Qiagen RNeasy Mini, seguindo protocolo do fabricante, bem como a síntese de biblioteca de cDNA, a partir do RNA obtido, utilizando-se o *kit* Super-Script III – First strand (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. *Primers* específicos para os genes da KGA, PPAR γ , ACADL e CPT1A foram desenhados (Tabela 4) e utilizados, juntamente com o *kit* Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), no ensaio de q-PCR (Conforme protocolo do fabricante). Um *mix* contendo SYBR Green 1X, 0,3 μ M de *mix* de *primers forward* e *reverso* e cDNA sintetizado equivalente a 37,5 ng de RNA em água ultrapura q.s.p 20 μ L, foi acondicionado em placa de 96 poços (MicroAmp® 96-Well Plates – Invitrogen) e analisados no termociclador ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), cujo programa seguiu as temperaturas de 95°C - 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C - 15 segundos e 60°C - 60 segundos. A análise dos dados foi realizada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ⁷³. Os valores obtidos foram plotados em gráfico de barras no *software* Excel e o desvio padrão calculado conforme descrito no item 4.1.6. O ensaio foi realizado em triplicata (n=1). O ensaio foi realizado em colaboração com o aluno de mestrado Douglas Adamoski.

Nome	Sequência
qPCR_KGA_Fow	5'- TGG TGA TCA AAG GGT AAA GTC -3'
qPCR_KGA_Rev	5'- TGC TGT TCT AGA ATC ATA GTC C -3'
qPCR_CPT1A_F	5'- GACTCTGGAAACGGCCAAC -3'
qPCR_CPT1A_R	5'- GCCGTGCTCAGTGAACAT -3'
qPCR_ACADL_F	5'- TTTGGGAGGACACCACAGG -3'
qPCR_ACADL_R	5'- GACTCTGCGGCTACTCGG -3'
qPCR_PPARg_F	5'- ATGTCTCATAATGCCATCAGGTT -3'
qPCR_PPARg_R	5'- CTTTGGTCAGCGGGAAGG -3'

Tabela 4: Lista dos *primers* desenhados para o ensaio de q-PCR dos genes KGA, PPAR γ , CPT1A e ACADL.

5 Resultados

5.1 Estudo da interação KGA:Aldolase A

5.1.1 Teste de expressão da Aldolase A

A Aldolase A clonada em petSUMO foi usada para a transformação de *E. coli*, cepa Rosetta II, e a expressão induzida por IPTG. A comparação entre as bandas das amostra não induzida e induzida revelaram a superexpressão de uma proteína com peso molecular de aproximadamente entre 50 e 60 kDa (Figura 12), coerente com a massa calculada para a Aldolase A em fusão com a Sumo (massa teórica de 51 kDa, calculada pelo programa ProtParam, <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>). A análise também revelou que a expressão da proteína foi maior entre os tempos de indução de 6 e 18 horas à 37 °C.

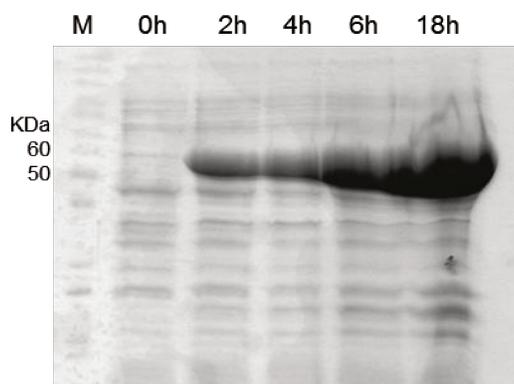


Figura 12: SDS-PAGE corado com *Coomassie brilliant blue* do teste de expressão da Aldolase A clonada em vetor petSUMO e transformado em bactérias do tipo Rosetta II. Verificou-se a superexpressão de uma proteína compatível com a fusão SUMO-Aldolase A quando comparado com a fração não induzida. **0 h**, fração não induzida; **2 h**, **4 h**, **6 h** e **18 h**, duas, quatro, seis e dezoito horas, respectivamente, de indução com 1 mM de IPTG. M, Marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas).

5.1.2 Purificação

A purificação da KGA envolveu as técnicas de cromatografia por afinidade a metais, troca iônica e filtração em gel. O resultado obtido foi a proteína com auto grau de pureza (Figura 13).

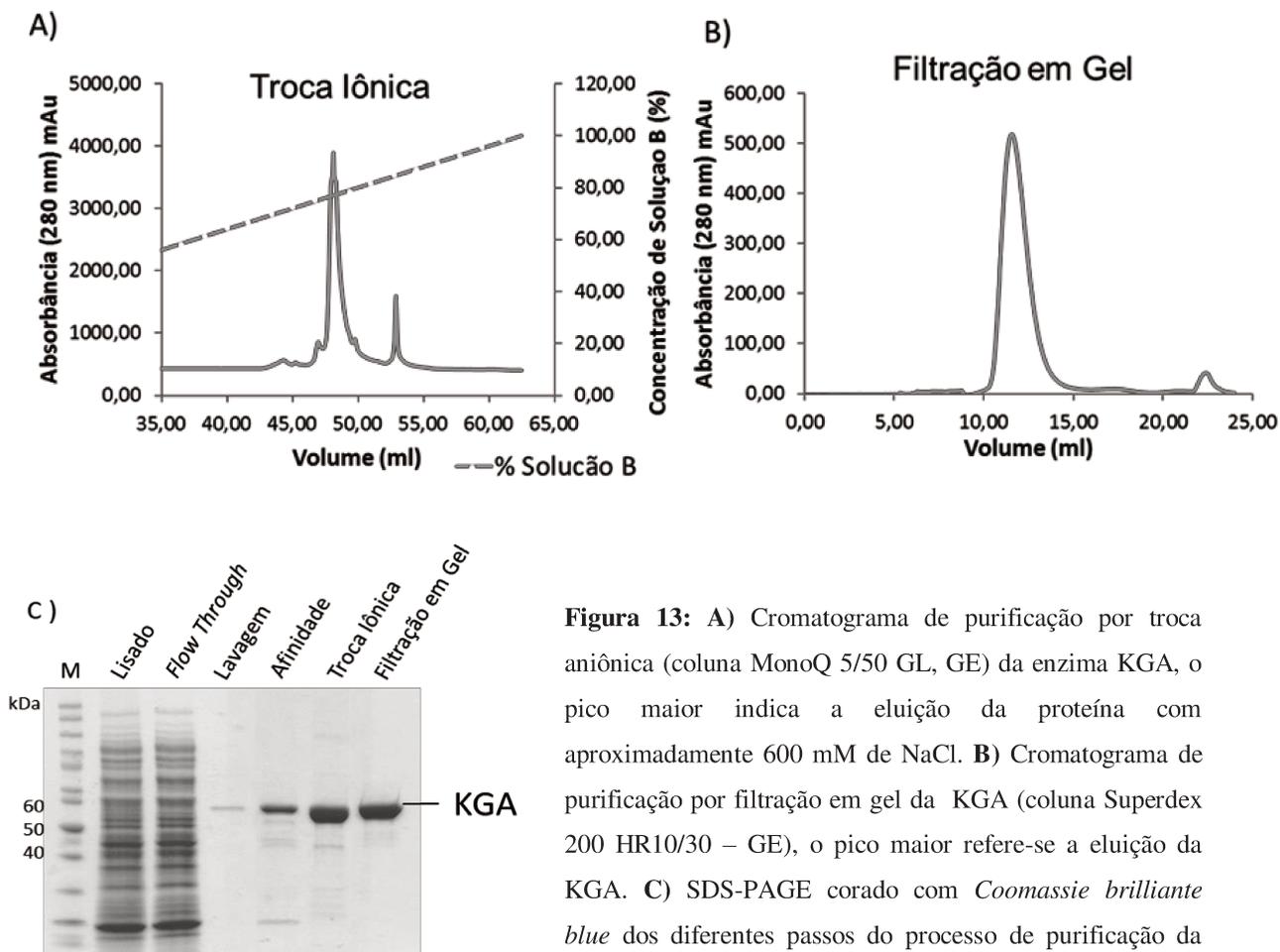


Figura 13: A) Cromatograma de purificação por troca aniônica (coluna MonoQ 5/50 GL, GE) da enzima KGA, o pico maior indica a eluição da proteína com aproximadamente 600 mM de NaCl. B) Cromatograma de purificação por filtração em gel da KGA (coluna Superdex 200 HR10/30 – GE), o pico maior refere-se a eluição da KGA. C) SDS-PAGE corado com *Coomassie brillante blue* dos diferentes passos do processo de purificação da

enzima KGA usando as técnicas de cromatografia por afinidade a metais, troca iônica e filtração em gel. **Lisado:** Lisado celular de bactérias transformadas com pet28a-KGA e induzidas por 16 horas com 1 mM de IPTG à 18 °C. **Flow Through:** Fração do lisado celular, usado na cromatografia por afinidade, que não interagiu com a resina após a passagem pela mesma. **Lavagem:** Lavagem da resina com solução Afinidade A contendo 5 mM de Imidazol. **Afinidade:** eluição da coluna de afinidade. **Troca Iônica:** União das frações referentes ao pico maior na eluição da troca iônica. **Filtração em gel:** União das frações referentes ao pico maior da filtração em gel. **M,** Marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas).

A Figura 14 exibe os resultados do processo de purificação por cromatografia de afinidade a metais da Aldolase A, mostrando as frações referentes ao lisado celular aplicado na coluna, *flow through*, lavagem e eluato. Pode-se avaliar pelo gel que com somente um passo de purificação foi possível obter alto grau de pureza da proteína.

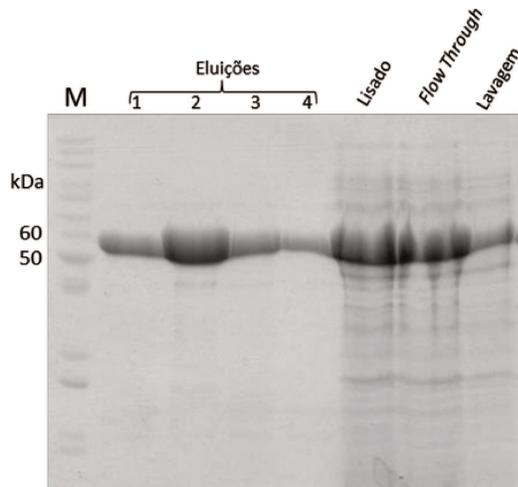


Figura 14: Análise da cromatografia de afinidade em SDS-PAGE corado com *Coomassie brilliant blue* da proteína Aldolase A. **1, 2, 3 e 4:** Eluições consecutivas feitas com 500 mM de imidazol; **Lisado:** Lisado celular de bactérias transformadas com petSUMO-Aldolase A e induzidas por 16 horas com 1 mM de IPTG. **Flow Through:** Fração do lisado celular que não interagiu com a resina após a passagem pela mesma. **Lavagem:** Lavagem da resina com solução Afinidade B contendo 5 mM de imidazol. **M:** Marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas).

5.1.3 Pull-down

Os ensaios de *pull-down* com as proteínas expressas em sistema heterólogo e purificadas não confirmaram o que havia sido identificado no ensaio de *pull-down*, previamente realizado, empregando-se lisado de células HMEC, conforme explicado na figura 5. Conforme pode ser verificado na Figura 15, KGA-His e Aldolase A não foram capazes de interagir dentro das condições de *pull-down* empregadas, dado que a intensidade de banda de Aldolase A detectada na presença da KGA-His não foi maior do que a detectada na ausência da mesma.

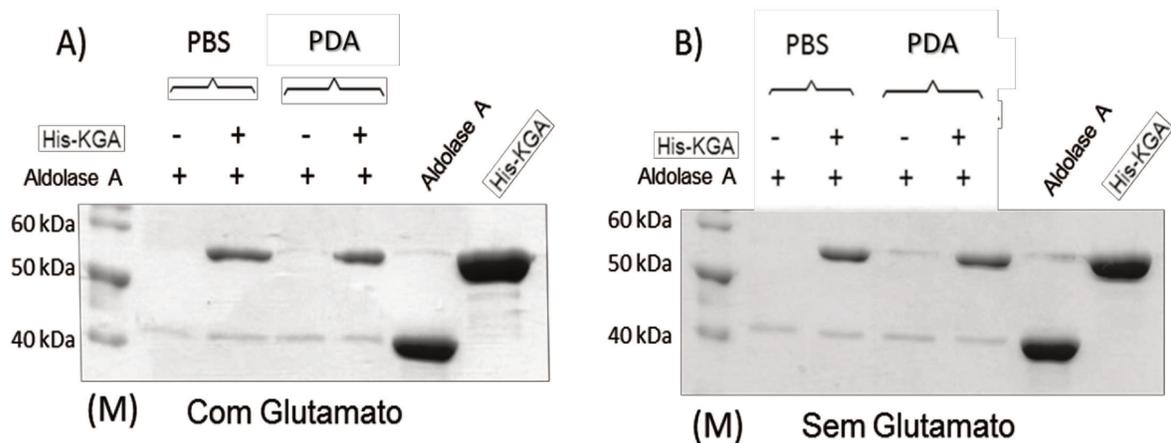


Figura 15: Análise por SDS-PAGE e coloração com *Coomassie brilliant blue* dos ensaios de *pull-down* entre as proteínas KGA-His (130 pmoles) e Aldolase A (excesso molar de 28 X) expressas em sistema heterólogo e purificadas. Ensaios realizados com as soluções PDA ou PBS 1X acrescidas de 5 mM de imidazol e acrescidas (A) ou não (B) de 1 mM glutamato. M: Marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas).

5.1.4 Co-imunoprecipitação

Na hipótese de que a não interação entre a KGA e Aldolase A pudesse ser devido a eventuais falta de modificações pós-traducionais que não podem ser obtidas do sistema de expressão usado (*E. coli*), resolvemos transfectar os genes das mesmas em células de mamífero e realizar ensaios de co-imunoprecipitação. Entretanto, os resultados obtidos nos ensaios de co-imunoprecipitação corroboraram com os obtidos por *pull-down* mostrados no item 4.1.3, e mostraram mais uma vez a não interação entre as proteínas Aldolase A e KGA, pelo menos nas condições empregadas (Figura 16).

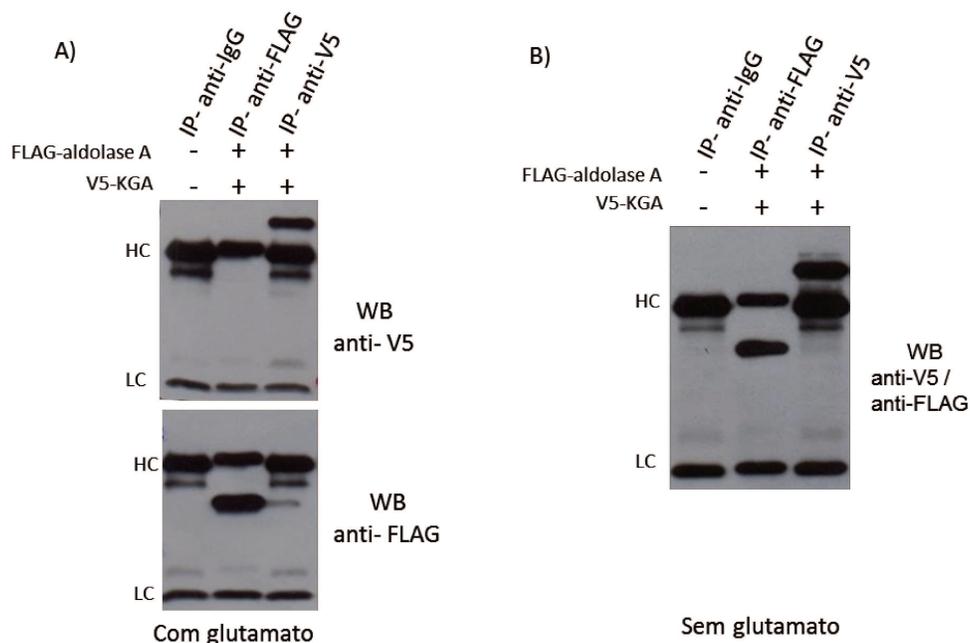


Figura 16: *Western blotting* dos ensaios de co-imunoprecipitação entre as proteínas V5-KGA e FLAG-Aldolase A expressas ectopicamente em células de mamífero SKBR3. Ensaio realizado com solução PDA acrescida de 1 mM de glutamato (A) ou sem glutamato (B). Como controle negativo o lisado celular total de SKBR3 foi incubado com anticorpo anti-IgG em resina contendo proteína G. HC e LC referem-se às cadeia pesadas (*Heavy chain*) e leve (*Light chain*) da imunoglobulina, respectivamente.

5.2 BNIP-H : KGA

5.2.1 Teste de expressão da BNIP-H

Vários testes de expressão em sistema heterólogo foram feitos buscando-se encontrar condições ótimas de expressão da BNIP-H-sumo, não tendo sido, entretanto, possível encontrar uma condição que evidenciasse a superexpressão da mesma (Figura 17).

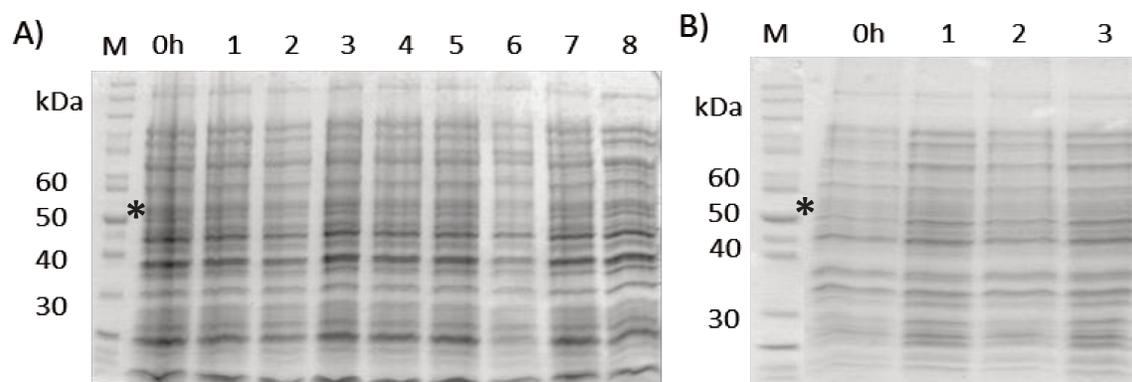


Figura 17: SDS-PAGE, corado com *Coomassie brilliant blue*, das amostras dos testes de expressão da proteína BNIP-H clonada em vetor petSUMO e usada para transformação de bactérias Rosetta II (A) e BL21 (DE3) (B). A expressão foi induzida com 1 mM de IPTG por 3 h a 37 °C. 0h refere-se a fração não induzida. Frações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 referem-se às colônias testadas. B) Expressão em bactéria BL21 (DE3) com 1 mM de IPTG por 3 h a 37°C. 0h corresponde à fração não induzida, 1, 2, 3, são as colônias testadas. M: Marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas). O asterisco indica a altura esperada da proteína no gel.

Como nova tentativa de encontrar condições para a expressão da BNIP-H, o seu cDNA foi clonado em vetor pGEX4T1 (GE). Cepas de bactérias do tipo Rosetta II foram transformadas com o vetor pGEX ligado à BNIP-H e um novo teste de expressão foi realizado seguindo o protocolo descrito no item 4.1.2. Os resultados indicam uma banda diferencial em relação à fração não induzida com peso molecular próximo ao esperado, indicando possível expressão da proteína (Figura 18).

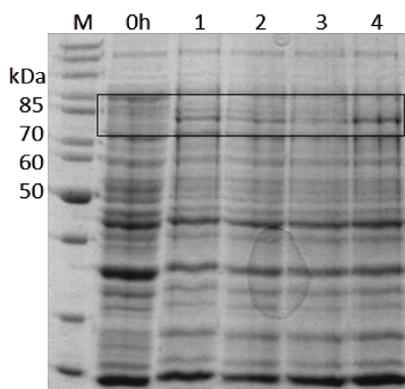


Figura 18: SDS-PAGE corado com *Coomassie brilliant blue* do teste de expressão da BNIP-H em vetor pGEX4T1 transformado em bactéria Rosetta II. A indução foi feita com 1 mM de IPTG por 3 h a 37°C. **0 h** refere-se a fração não induzida. Frações **1, 2, 3, 4**, referem-se às colônias usadas no teste de expressão. **M:** Marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas). Dentro do retângulo banda diferencialmente expressa.

Intrigados pela não expressão (ou baixa expressão) da BNIP-H em *E. coli*, sequenciamos o vetor clonado. O sequenciamento revelou que existia uma mutação no resíduo 9 que gerou a troca do aminoácido triptofano para arginina. A mutação foi revertida utilizando-se o *kit* QuikChange II XL (Agilent) seguindo protocolo do fabricante. Após ensaio para reversão da mutação realizamos novo sequenciamento e os resultados apontam que a reversão do gene clonado em petSUMO foi bem sucedida (Figura 19).

Após reversão da mutação, realizamos novo teste de expressão conforme o item 4.1.2. Novamente, não foi possível detectar uma banda de superexpressão e peso molecular compatível com o esperado para a BNIP-H em fusão com a sumo-His (Figura 20).

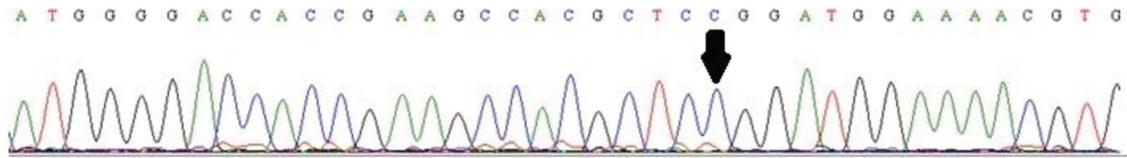
A) Sequenciamento

```

atggggaccaccgaagccacgctccggatggaaaacgtg
M G T T E A T L R M E N V
Molde
atggggaccaccgaagccacgctctggatggaaaacgtg
M G T T E A T L W M E N V

```

B)



C)

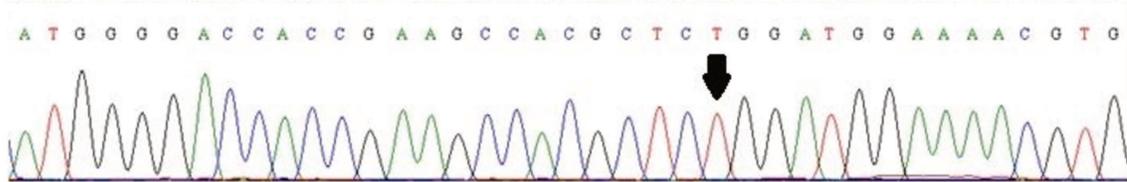


Figura 19: A) Análise da sequência obtida no sequenciamento comparada com o cDNA obtido do banco de dados (molde). Em amarelo destaca-se o códon mutado e em vermelho o códon sem a mutação. B) Eletroferograma do cDNA da BNIP-H mutado. C) Eletroferograma do cDNA BNIP-H após reversão da mutação. As setas pretas indicam os nucleotídeos envolvidos na mutação.

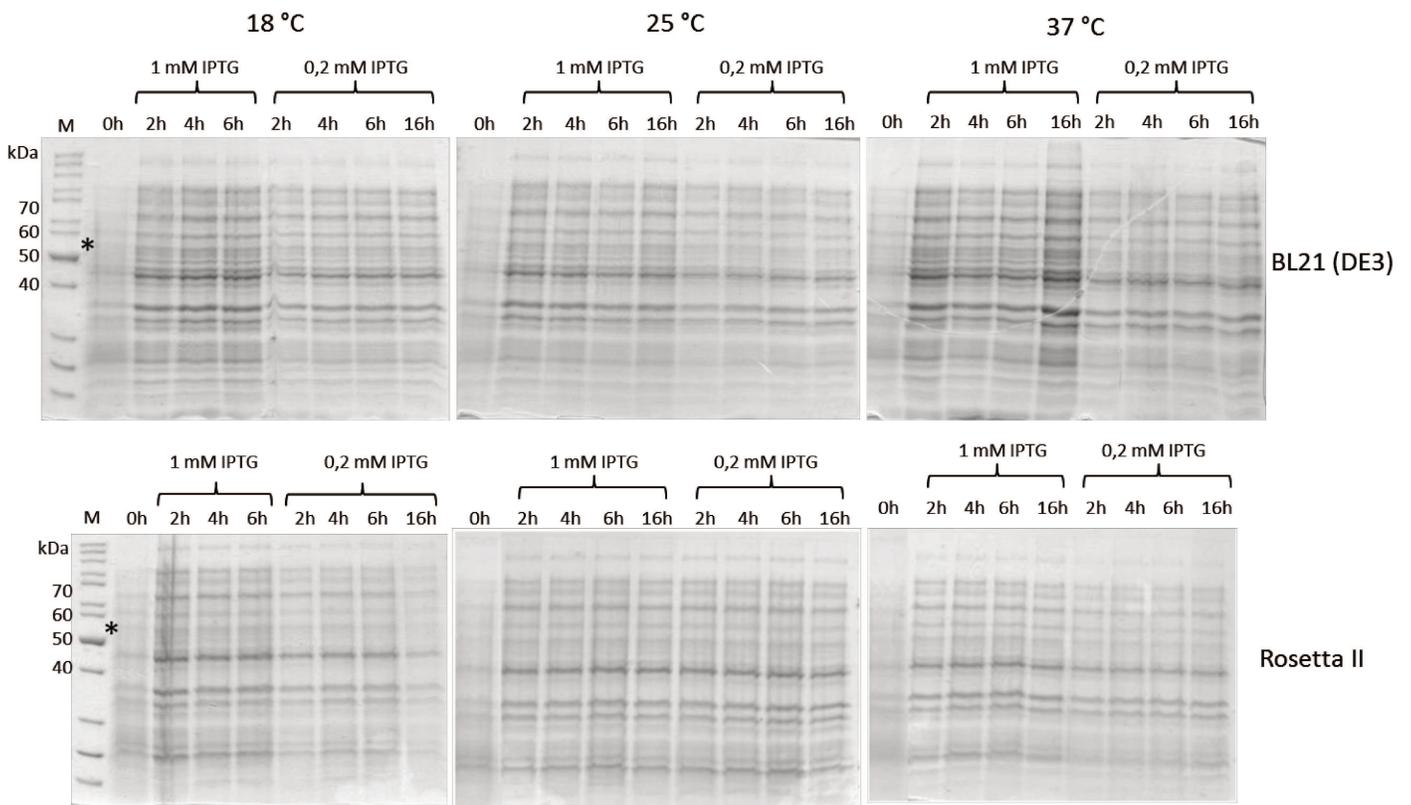


Figura 20: Análise por SDS-PAGE corado com *Coomassie brilhante blue* dos testes de expressão da BNIP-H clonada em vetor petSUMO e transformado em cepas de bactérias do tipo Rosetta II e BL21. Os testes ocorreram nas temperaturas de 18°C, 25°C e 37°C tendo a indução protéica sido feita com 0,2 e 1 mM de IPTG. **0h, 2 h, 4 h, 6 h, e 16 h** correspondem aos tempos de indução. O asterisco indica o tamanho esperado para a BNIP-H com sumo-His. **M:** Marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas).

A análise por sequenciamento da clonagem do gene da BNIP-H no vetor pGEX4T1, revelou que o gene também possuía a mutação encontrada no clone para expressão da BNIP-H com fusão Sumo-His. Empregamos o mesmo protocolo citado acima para reversão da mutação no gene BNIP-H em pGEX4T1. Após a reversão da mutação, fizemos novo teste de expressão, conforme item 4.1.2. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie brilhante blue* (Figura 21 A) ou *western blotting* (Figura 21 B), conforme item 4.2.5. Ambos os resultados indicam bandas diferenciais em relação à amostra não induzida correspondente, ao tamanho esperado para a BNIP-H em fusão com GST.

Empregou-se as mesmas condições do teste de expressão da GST-BNIP-H para a produção heteróloga em larga escala, seguido de cromatografia de afinidade. Contudo, os resultados obtidos na análise por SDS-PAGE (Figura 20), corado com *coomassie brilhante blue*, não indicaram obtenção da proteína em quantidade significativa para outros ensaios.

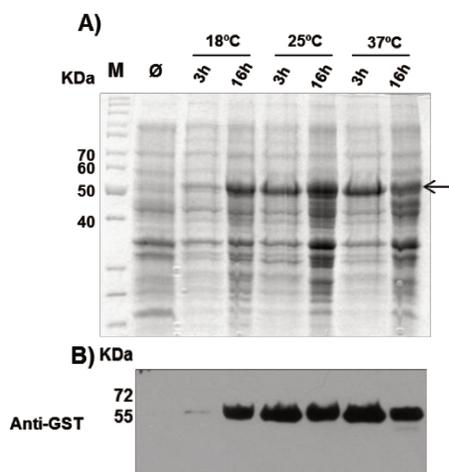


Figura 21:A) Análise por SDS-PAGE dos testes de expressão da BNIP-H clonada em vetor pGEX4T1 e transformado em cepas de bactérias do tipo Rosetta II. Os testes ocorreram nas temperaturas de 18°C, 25°C e 37°C tendo a indução protéica sido feita com 1 mM de IPTG. 3h e 16h correspondem aos tempos de indução. A seta indica banda diferencial em relação a fração não induzida. **M:** Marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas). **B)** Análise por *western blotting* do teste de expressão descrito acima.

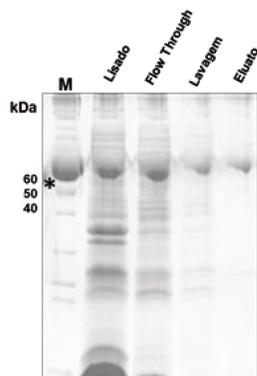


Figura 22: SDS-PAGE corado com *coomassie brillante blue* do processo de purificação da GST-BNIP-H usando a técnica de cromatografia por afinidade. **Lisado:** Lisado celular de bactérias transformadas com pGEX4T1-BNIP-H e induzidas por 16 horas com 1 mM de IPTG à 37°C. **Flow Through:** Fração do lisado celular, que não interagiu com a resina após a passagem pela mesma. **Lavagem:** Lavagem da resina com solução Afinidade C. **Eluato:** Fração eluída da coluna com solução contendo 5 mM de glutatona. Asterisco indica posição no gel onde proteína em fusão deveria ser encontrada. A banda acima maior é provavelmente fruto de resíduo presente nas placas de vidro usadas na eletroforese, dado que é também encontrada no marcador.

5.2.2 Co-imunoprecipitação

A análise de lisados totais das linhagens de células disponíveis em nosso laboratório, indicaram a ausência ou a presença de BNIP-H endógena em baixos níveis (Figura 23). Desta maneira adotamos a expressão ectópica de BNIP-H em linhagens de células de câncer de mamífero para os estudos de interação com a KGA.

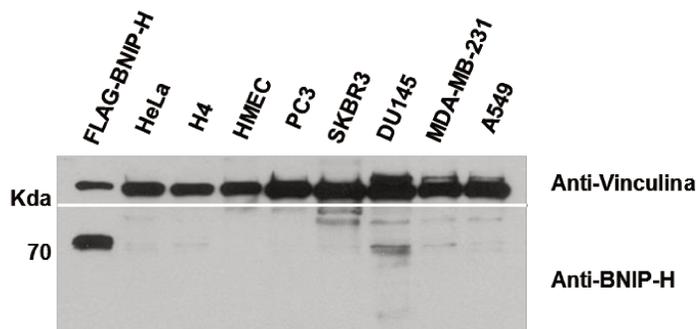


Figura 23: Análise por *western blotting* dos lisados de linhagens de células normais (HMEC), câncer de mama (SKBR3 e MDA-MB-231), câncer de pulmão (A549), câncer de próstata (DU149 e PC3), câncer cervical (HeLa) e câncer de cérebro (H4) contra anticorpo específico para BNIP-H. FLAG-BNIP-H refere-se a proteína expressa ectopicamente em SKBR3 e utilizada como controle positivo na análise.

Para avaliar a interação entre a KGA e a BNIP-H expressa ectopicamente em células de mamíferos, realizamos ensaios de co-imunoprecipitação das mesmas. O resultado obtido com a imunoprecipitação da FLAG-BNIP-H não revelou a interação entre as proteínas, pelo menos nas condições empregadas (Figura 24).

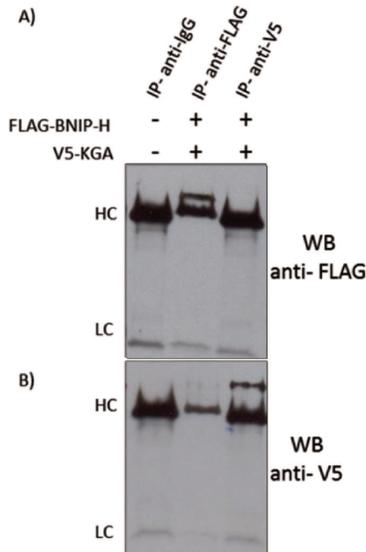


Figura 24: *Western Blotting* do ensaio de co-imunoprecipitação feito com o lisado de SKBR3 transfectado com FLAG-BNIP-H e V5-KGA e incubado com anticorpo anti-Flag (A) ou antiV5 (B) em solução PDA. Como controle negativo usamos IgG incubado com lisado celular total não transfectado. HC e LC referem-se às cadeia pesadas (*Heavy chain*) e leve (*Light chain*) da imunoglobulina, respectivamente.

5.2.3 Co-localização por imunofluorescência

As imagens obtidas no ensaio de localização por imunofluorescência da KGA-V5 e FLAG-BNIP-H indicam um padrão de localização distinto entre as proteínas. KGA-V5 é encontrada difusa pelo citoplasma da célula, co-localizada com a mitocôndria, enquanto que FLAG-BNIP-H encontra-se na periferia do citoplasma da célula, bem próximo à membrana (Figura 25). Experimento adequado para inferência de co-localização entre KGA e BNIP-H não foi realizado.

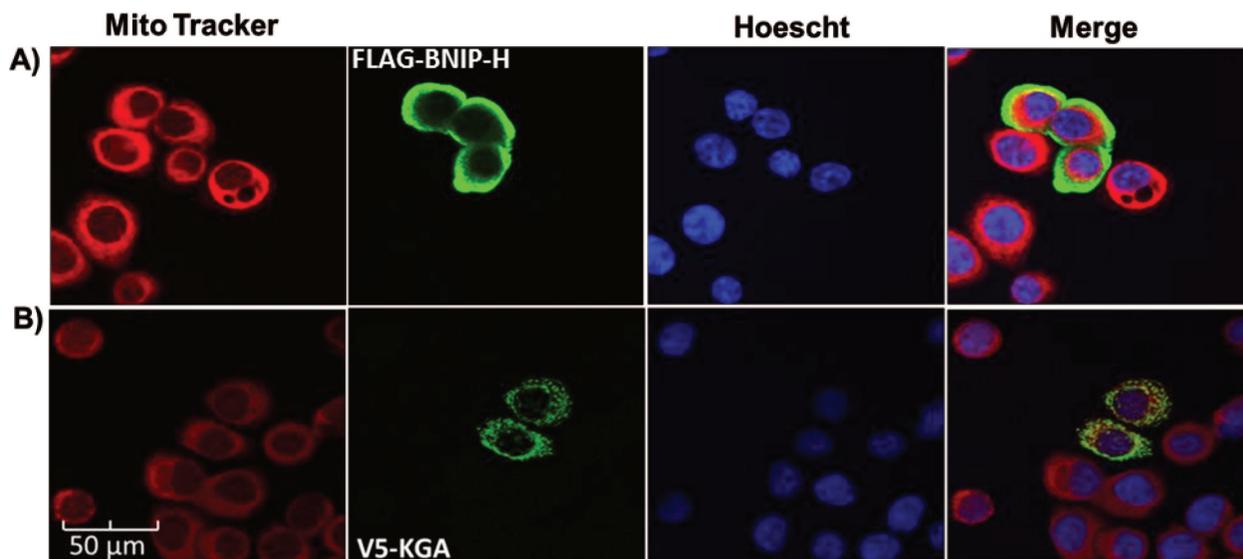


Figura 25: Imagens de microscopia confocal do ensaio de imunolocalização envolvendo as proteínas KGA-V5 e FLAG-BNIP-H em linhagens de células de câncer de mama SKBR3. **A)** Imagens das células transfectadas com FLAG-BNIP-H. **B)** Imagens das células transfectadas com KGA-V5. Em vermelho, a localização mitocondrial nas células (conforme detectado por MitoTracker CMXRos, Invitrogen), em verde a localização da KGA-V5 ou FLAG-BNIP-H (detectados por primário anti-Flag ou anti-V5 e secundário Alexa 488, Invitrogen). Os núcleos das células foram corados por *Hoescht* 33342(em azul).

5.3 KGA : PPAR γ

5.3.1 Prospecção de parceiros de interação pela técnica de duplo híbrido em levedura

Realizou-se o ensaio de duplo híbrido em levedura para determinação dos parceiros de interação da isoforma KGA. Os resultados mostraram a identificação de várias proteínas candidatas a interação, sendo uma delas extremamente interessante do ponto de vista do metabolismo celular: o receptor nuclear PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) (Figura 26 A). Posteriormente foi realizada a confirmação da interação KGA-PPAR γ em levedura e o resultado confirmou a interação entre elas (Figura 26 B). Para avaliar qualitativamente a afinidade de interação entre KGA-PPAR γ realizou-se um ensaio onde a enzima HIS3, sob o mesmo controle transcricional da β -galactosidase, foi inibida com doses crescentes de 3-AT. Quanto maior a afinidade de interação isca-presa, maior a quantidade de enzima produzida e maior dose de 3-AT necessária para a inibição da mesma (Figura 26 C). Como as leveduras são incubadas em meio de cultura desprovida de histidina, a atividade desta enzima (a qual está na via de síntese deste aminoácido) se torna importante para o crescimento das células. Os resultados indicam que, em termos relativos, a interação

KGA:PPAR γ apresenta alta afinidade quando comparada com seu controle (pBTM116KQvazio + pACT2.PPAR γ).

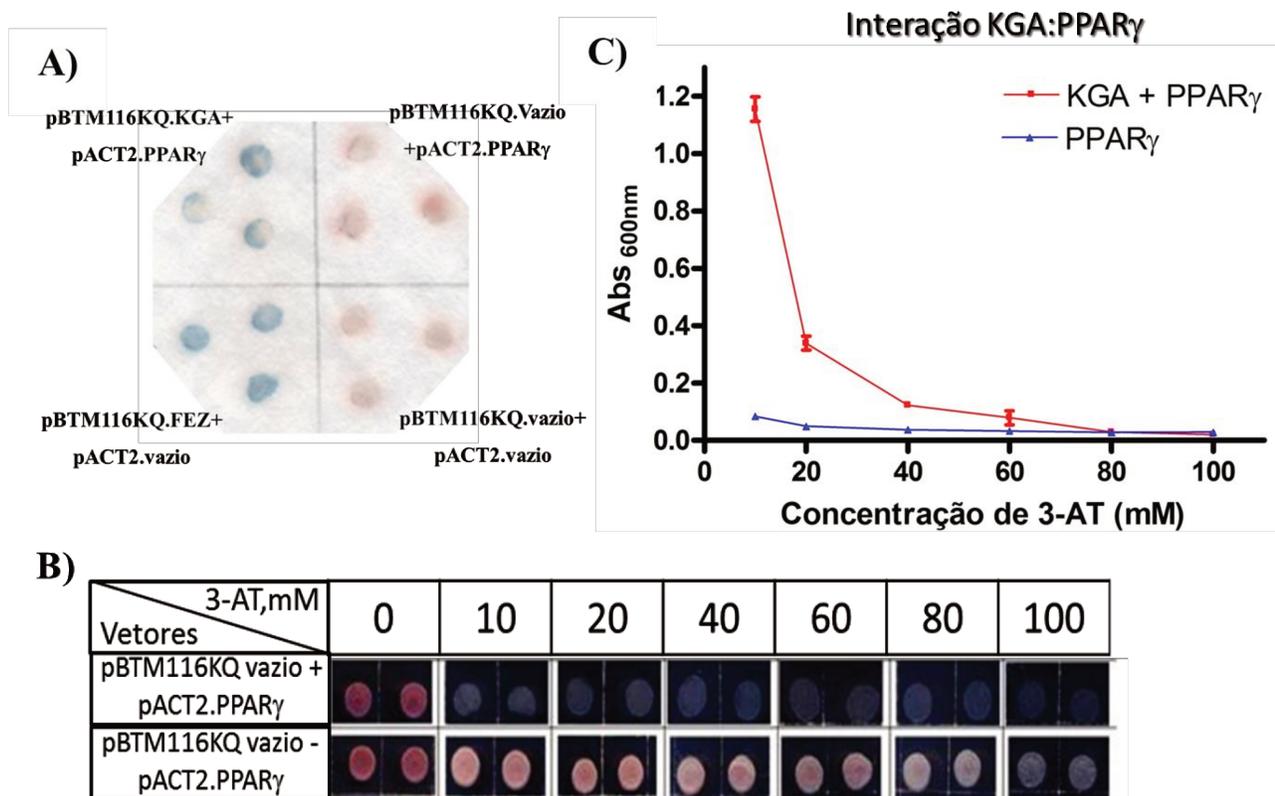


Figura 26: A) Confirmação par-a-par da interação KGA-PPAR γ em ensaio de colônia. Após a transformação de levedura com vetor pBTM116KQ.hKGA e pACT2-PPAR γ , as mesmas foram plaqueadas em meio de cultura SD^{-WLH}. Após o crescimento, as leveduras foram repicadas em meio de cultura SD^{-WL}, transferidas para papel filtro e ensaiadas para a atividade de β -galactosidase. Identificou-se as interações isca-presa por um ensaio de complementariedade onde reconstitui-se o elemento trans-ativador que leva a expressão de β -galactosidase. A ação desta enzima sobre o substrato X-gal gera um produto azulado (colônias rosas representam clones negativos). A colônia circulado em vermelho corresponde ao clone identificado do PPAR γ . FEZ1 é controle positivo do ensaio de β -galactosidase. Análise qualitativa da afinidade de interação entre KGA-PPAR γ por ensaio de inibição da atividade da enzima HIS3 pelo composto 3-AT (e conseguinte inibição de crescimento da levedura) feitos em meio sólido (B) e meio líquido (C) avaliado por absorbância a 600 nm.

5.3.2 Identificação do domínio de interação

Outro ensaio de duplo híbrido foi realizado para a identificação dos domínios das proteínas KGA e PPAR γ responsáveis pela interação. Foi identificado que a interação envolve o domínio LBD da proteína PPAR γ (Figura 27 A e B), enquanto que os outros 2 domínios efetivamente não mostraram interação (Figura 27 C). Essa informação é plausível, considerando o fato de ser o LBD um dos domínios onde podem ocorrer as interações com outras proteínas e consequente formação de homo/heterodímeros entre receptores ou co-ativadores^{37,52}. Por outro lado, os resultados obtidos até o momento sobre a interação entre os domínios da KGA com a proteína PPAR γ mostram que isso não ocorre pelo domínio carboxi-terminal (Figura 27 D), indicando que essa interação possa ocorrer, ou pelo domínio amino-terminal, ou pelo catalítico.

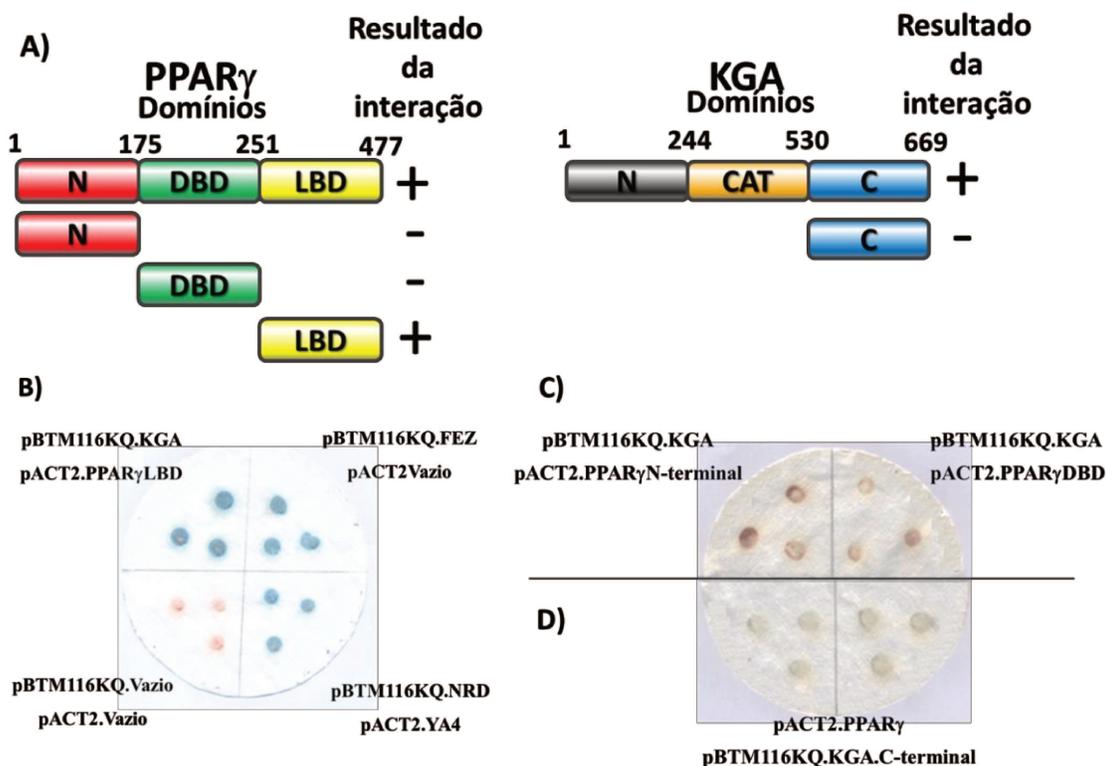


Figura 27: Identificação dos domínios de PPAR γ e KGA responsáveis pela interação entre as proteínas. **A)** Esquema dos domínios de PPAR γ e KGA subclonados em pACT. Teste da β -galactosidase em papel filtro mostrando que o domínio LBD é o responsável pela interação com a proteína KGA (**B**) e que os domínios N-terminal e DBD não interagem com a proteína KGA (**C**). **D)** O mesmo teste realizado com a proteína PPAR γ e o domínio C-terminal KGA, mostrou que esta região da KGA não é responsável pela interação. **pBTM116KQ.Fez** + **pACTvazio** e **pBTM116KQ.NRD** (Domínio regulatório da proteína NEK1⁷²) + **pACT2.YA4** (YA4: proteína 14-3-3 *protein eta*⁷⁴) são controles positivos, pBTM116KQvazio + pACTvazio é um controle negativo.

5.3.3 Purificação

Como mencionado anteriormente, o clone de PPAR γ em vetor de expressão pet28A foi gentilmente fornecido pela Dra Ana C.M. Figueira. Após cromatografia de troca iônica (Figura 28 A) e filtração em gel (Figura 28 B) foi possível obter proteína com grau de pureza alto (Figura 28 C), possibilitando a execução dos ensaios posteriores.

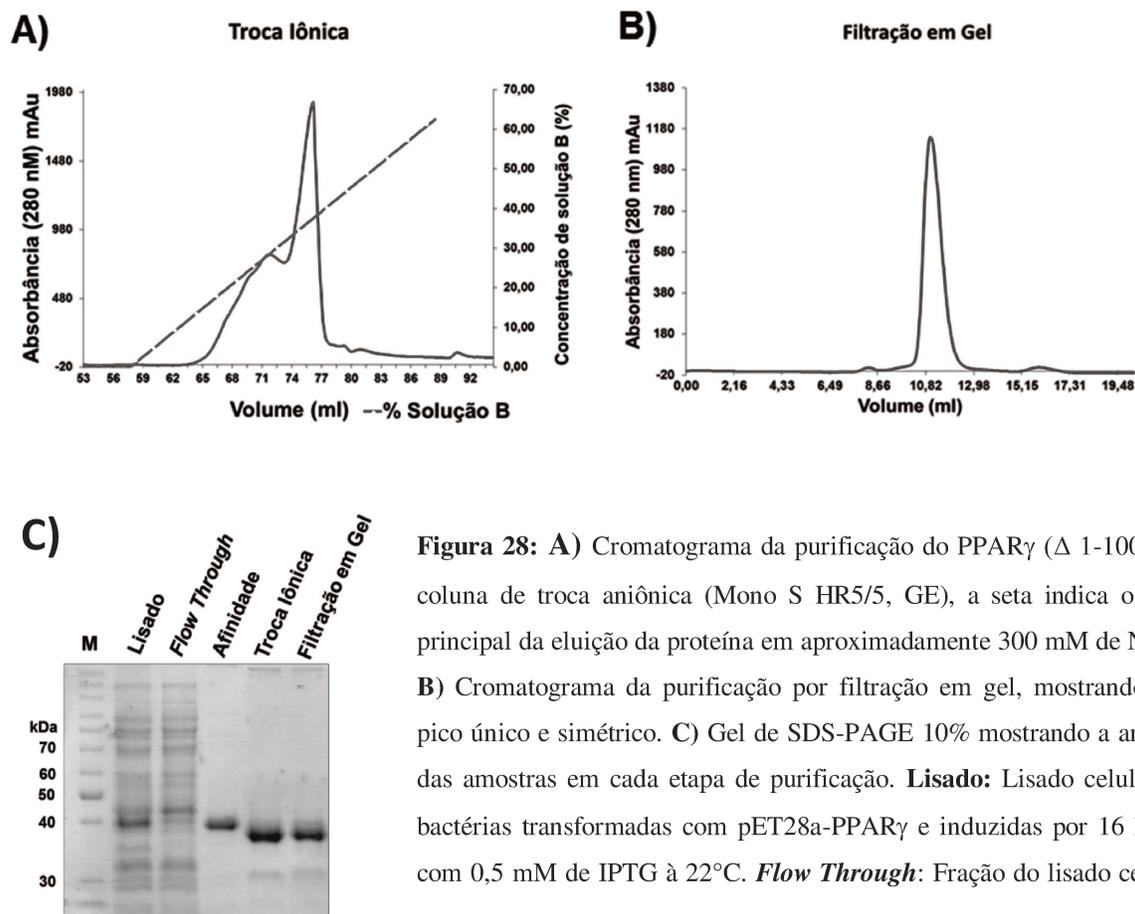


Figura 28: **A)** Cromatograma da purificação do PPAR γ (Δ 1-100) em coluna de troca aniônica (Mono S HR5/5, GE), a seta indica o pico principal da eluição da proteína em aproximadamente 300 mM de NaCl. **B)** Cromatograma da purificação por filtração em gel, mostrando um pico único e simétrico. **C)** Gel de SDS-PAGE 10% mostrando a análise das amostras em cada etapa de purificação. **Lisado:** Lisado celular de bactérias transformadas com pET28a-PPAR γ e induzidas por 16 horas com 0,5 mM de IPTG à 22°C. **Flow Through:** Fração do lisado celular

que não interagiu com a resina após a passagem pela mesma. **Afinidade:** Fração eluída da resina Talon. **Troca Iônica:** Fração referente ao pico maior na eluição da troca iônica (com a fusão His removida). **Filtração em Gel:** Fração referente ao único pico da filtração em gel. **M:** Marcador de massa molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas).

5.3.4 Pull-Down

O experimento de *pull-down* foi realizado utilizando-se ambas as proteínas purificadas. Os resultados obtidos mostraram uma potencial interação na presença de 1 mM de glutamato. Entretanto, dado ao alto nível de interação inespecífica da His-KGA com a resina, os resultados ficaram com interpretação prejudicada (Figura 29).

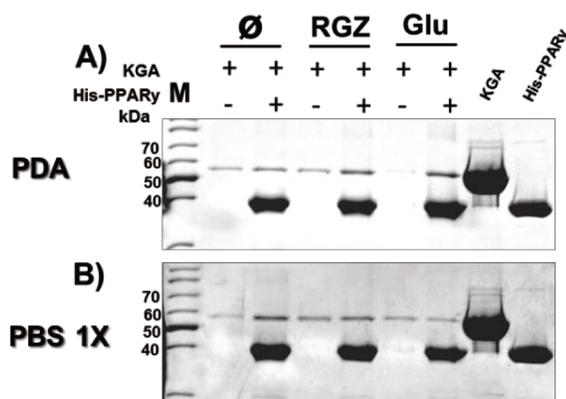


Figura 29: Análise por SDS-PAGE corado com *Coomassie brilliant blue* do ensaio de *pull-down* entre as proteínas His-PPAR γ (300 nM) e KGA (3 μ M) expressas em sistema heterólogo e purificadas. Ensaio realizado com as soluções PDA (A) ou PBS 1X (B). \emptyset , ausência de rosiglitazona e glutamato. **RGZ**, 2 μ moles rosiglitazona. **Glu**, 1 mM glutamato. **M**, marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas).

Como nova tentativa de avaliar a interação entre as proteínas expressas heterologicamente, realizou-se novo ensaio de *pull-down* entre a KGA e o domínio LBD do PPAR γ , sabidamente envolvida na interação entre as proteínas pelo ensaio de duplo híbrido (item 4.1.4). Os dados não indicaram interação entre as proteínas, o que pode refletir a necessidade de uma proteína adaptadora (presente em levedura) e/ou modificações pós-traducionais não obtidas na expressão em *E. coli* (Figura 30).

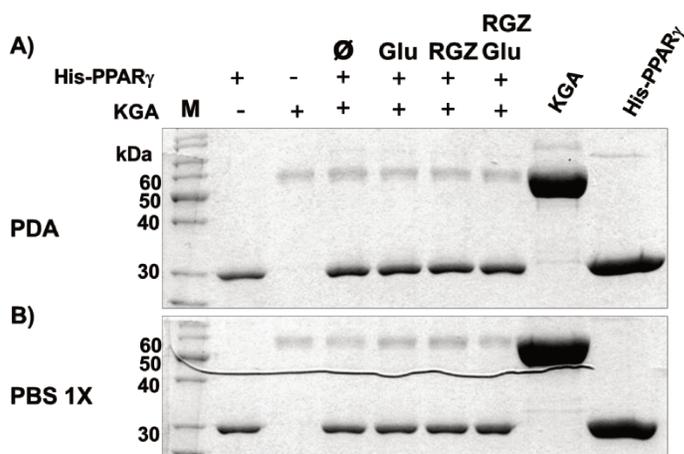


Figura 30: SDS-PAGE corado com *Coomassie brilliant blue* do ensaio de *pull-down* entre (4,4 μ M) KGA e His-PPAR γ -LBD (1,1 μ M pmoles). Ensaio realizado com as soluções PDA (A) ou PBS 1X (B). Ø, ausência de rosiglitazona ou glutamato. RGZ, 400 pmoles rosiglitazona. Glu, 1 mM glutamato. M, marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas).

5.3.5 Análise por Cromatografia de Exclusão Molecular

Tanto KGA quanto PPAR γ foram analisadas por filtração em gel individualmente ou após incubação por 15 horas à 4°C. Neste último caso, as proteínas foram aplicadas em coluna equilibrada em solução 30 mM Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl e 0,5 mM TCEP ou PBS 1X, 0,5 mM TCEP. Os resultados dos cromatogramas não mostram um pico diferencial que indique a formação de complexos KGA:PPAR γ (Figura 31). Entretanto, as frações não foram avaliadas por SDS-PAGE para confirmação, assim como a coluna não foi calibrada para cálculo do peso molecular das proteínas eluídas.

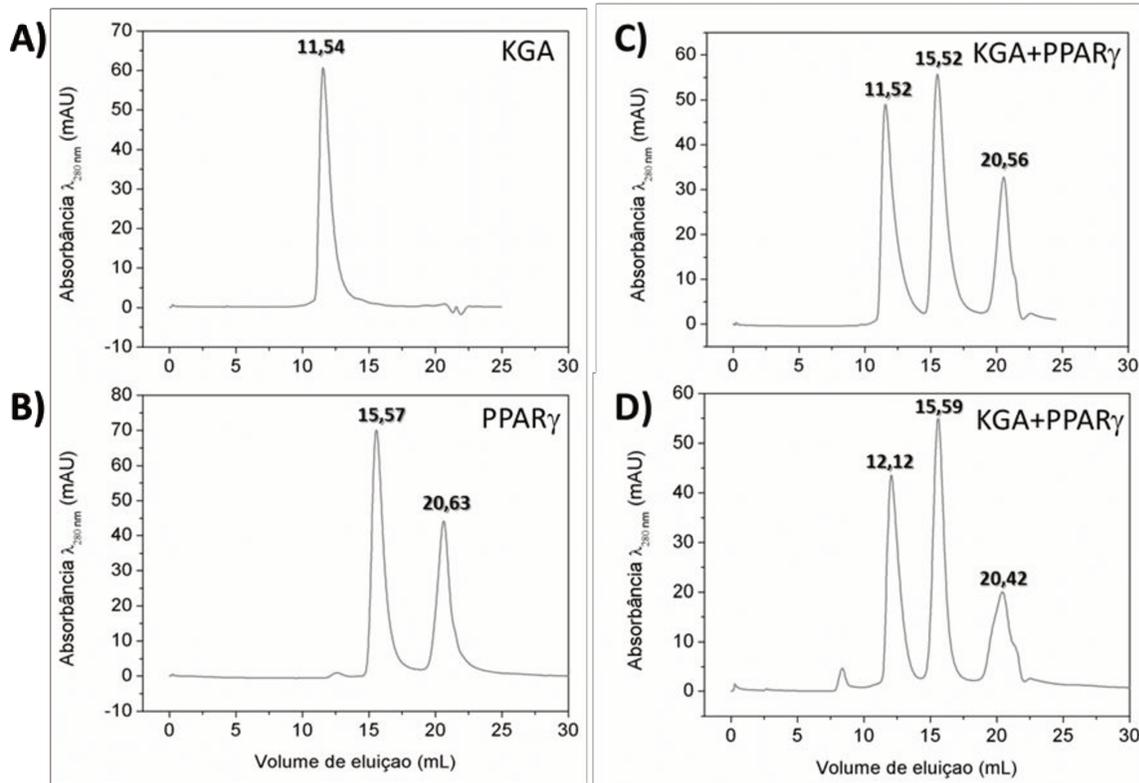


Figura 31: Cromatografia de filtração em gel analítica em coluna Superdex 200 HR 10/30, acoplada a aparelho AKTA-FPLC (GE) para análise da formação do complexo KGA-PPAR γ . **A)** Perfil cromatográfico de KGA (150 nmoles); **B)** Perfil cromatográfico do PPAR γ (450 nmoles). **C)** Perfil cromatográfico da mistura KGA-PPAR γ (1:3 razão molar) na presença de rosiglitazona e glutamato em solução PBS 1X. **D)** Mesmo ensaio do item C na presença de rosiglitazona, glutamato em solução 30 mM Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl e 0,5 mM TCEP.

5.3.6 Anisotropia de Fluorescência

Para determinar a constante de dissociação da interação KGA-PPAR γ , assim como os elementos importantes para tal, realizamos ensaios de anisotropia de fluorescência empregando KGA marcada com FITC. KGA-FITC e PPAR γ foram incubados por 24 horas a temperatura ambiente em solução 30 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl sem aditivos, e na presença de 1mM glutamato, ou 50 mM K₂HPO₄, ou 100 μ M de rosiglitazona. Verificamos que não há muita diferença nos K_d medidos na presença de glutamato, rosiglitazona ou sem os mesmos ($4,6 \pm 0,5 \mu$ M, $5,6 \pm 0,4 \mu$ M, $4,9 \pm 0,5 \mu$ M, respectivamente), entretanto, a

afinidade é reduzida e o K_d elevado para $7,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ na presença de K_2HPO_4 (Figura 32). Sendo a estequiometria diferente de 1:1, o que ainda não definimos adequadamente, os coeficientes de Hill obtidos indicam uma cooperatividade positiva de interação entre KGA e $\text{PPAR}\gamma$, uma vez que na presença de glutamato, rosiglitazona, K_2HPO_4 ou sem os mesmos os valores foram $2,5 \pm 0,3$, $2,8 \pm 0,3$, $1,9 \pm 0,2$ e $2,9 \pm 0,4$, respectivamente.

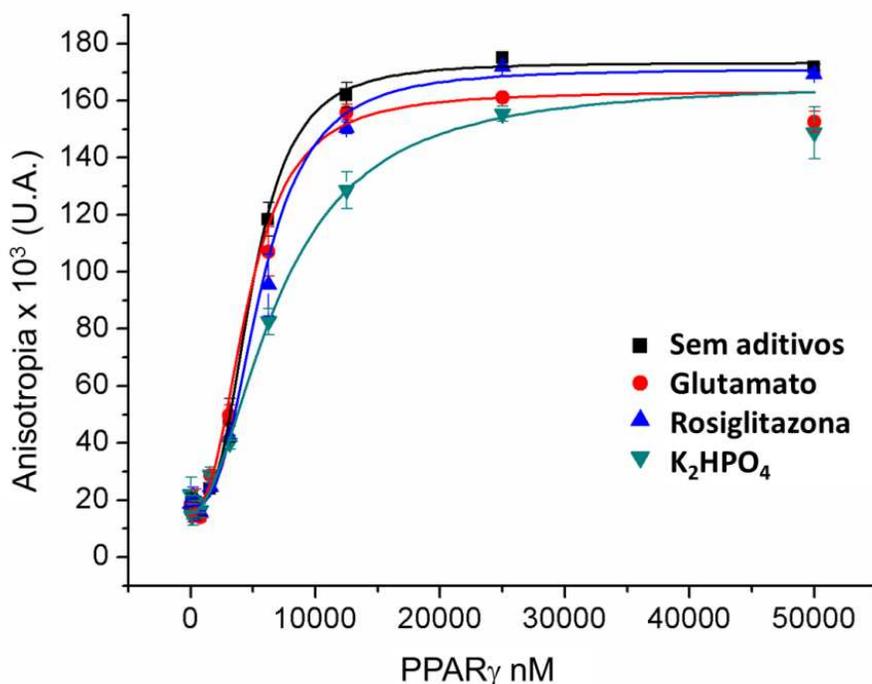


Figura 32: Anisotropia de fluorescência de 5 nM de KGA marcada com FITC incubadas com 0 a 50 μM $\text{PPAR}\gamma$ não marcado.

5.3.7 Eletroforese em Gel Nativo

No ensaio de eletroforese em gel nativo observa-se que ao titularmos 100 pmoles de KGA com $\text{PPAR}\gamma$ (1:3, 1:5 e 1:7) há desaparecimento da banda da KGA indicando a formação de complexos (Figura 33 A). O mesmo ensaio foi realizado com 100 pmoles de $\text{PPAR}\gamma$ titulados com KGA (1:3, 1:5 e 1:7), obtendo-se o mesmo padrão (Figura 33 B). Não foram avaliadas se as adições de rosiglitazona, K_2HPO_4 , ou a ausência de ambos desestabilizam o complexo.

A estequiometria indicada pelos resultados muito provavelmente foge da real, dado a potenciais erros na medida de concentração, baixa qualidade da amostra e concentração molar abaixo do K_d de interação. Assim, métodos mais precisos precisam ser empregados para avaliação da estequiometria.

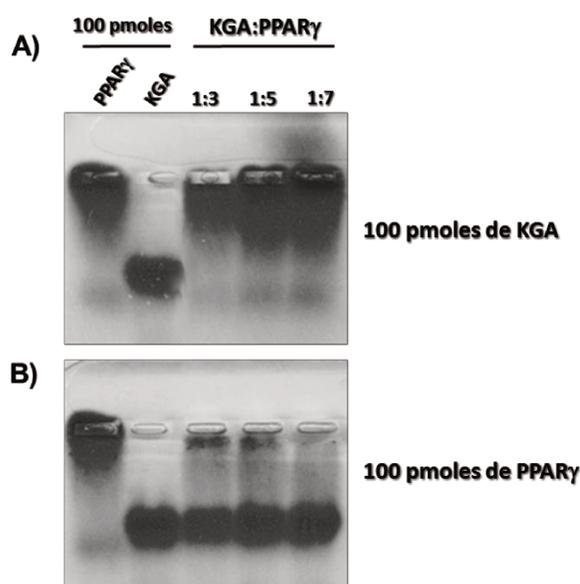


Figura 33: Eletroforese em gel nativo da KGA incubada com PPAR γ em solução contendo 1 mM de glutamato por 24 horas. **A)** Gel com concentração fixa de KGA em 100 pmoles titulados com PPAR γ ; **B)** Mesmo ensaio realizado fixando PPAR γ em 100 pmoles e titulando KGA nas taxas 1:3; 1:5 e 1:7.

5.3.8 Crosslinking

A análise da banda excisada do gel de SDS-PAGE (Figura 34 A e B) por LC/MS-MS (Figura 35) do ensaio de *crosslinking* entre KGA:PPAR γ , conforme descrito no item 4.1.8, indicou um *crosslink* entre as lisinas 245, presente no domínio catalítico da KGA, e 192 do LBD do PPAR γ (Figura 36), corroborando com os resultados obtidos no ensaio de duplo híbrido em levedura que indicou a interação do LBD do PPAR γ com a KGA. As restrições obtidas com a distância entre as lisinas foram usadas para definição de um modelo de *docking* (Figura 34 C). Este modelo não corrobora com a interação da KGA com o PPAR γ via a

segunda região LXXLL da porção aminoterminal (circulada em vermelho na Figura 34 C; ver também Figura 4). Se envolve alguma das outras duas regiões LXXLL da KGA (a primeira no N-terminal ou a do C-terminal), o modelo não será capaz de prever dado que estas porções estão ausentes na estrutura.

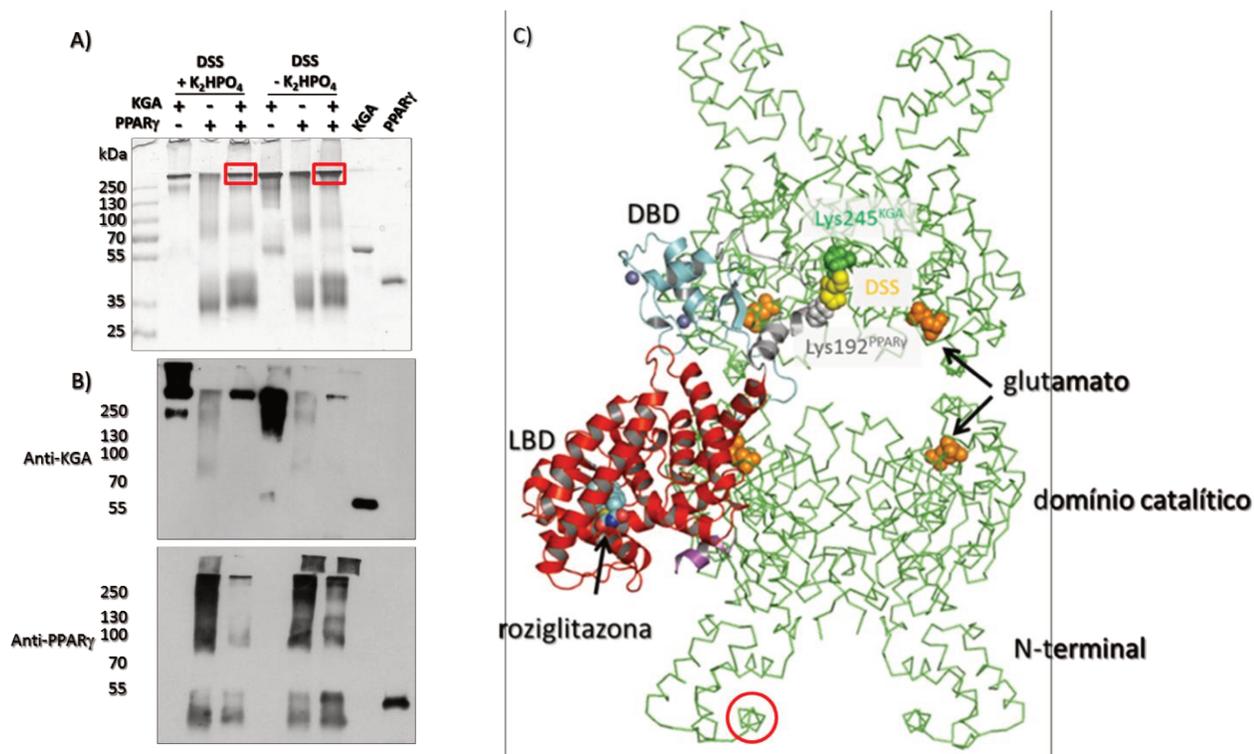


Figura 34: A) SDS-PAGE corado com *Coomassie brilhante blue* do ensaio de *crosslinking*. Os retângulos em vermelho destacam as bandas que foram excisadas. B) Análise por *western blotting* do ensaio de *crosslinking* com anticorpos contra KGA e PPAR γ . C) Modelo de *docking* da KGA (PDB ID 3SS3²⁹) com PPAR γ (PDB ID 3DZY⁵¹) empregando-se o programa desenvolvido no LNBio baseado no *software* Rosetta⁷¹. O modelo apresentado é o de menor energia dado a parâmetros de restrição estérica e distância estipulada pelo **DSS** (esperas em amarelo). São indicadas as lisinas detectadas como *crosslinked* pela espectrometria de massas (esferas em cinza e verde), o domínio **DBD** (*cartoon* em azul), **LBD** (*cartoon* em vermelho), **hinge** (*cartoon* em cinza). KGA está representada em *ribbon* (verde). Indica-se também o **glutamato** co-cristalizado com a KGA (esferas laranjas), a **roziglitazona** co-cristalizada com PPAR γ (esferas em azul), peptídeo co-ativador co-cristalizado com PPAR γ (*cartoon* em magenta) e zinco co-cristalizado com PPAR γ (esferas em cinza). Dentro do círculo em vermelho encontra-se o domínio LXXLL presente nesta estrutura. O glutamato, rosiglitazona, peptídeo co-ativador e zinco não foram considerados na geração do modelo de *docking* e estão representados na figura com objetivo ilustrativo.

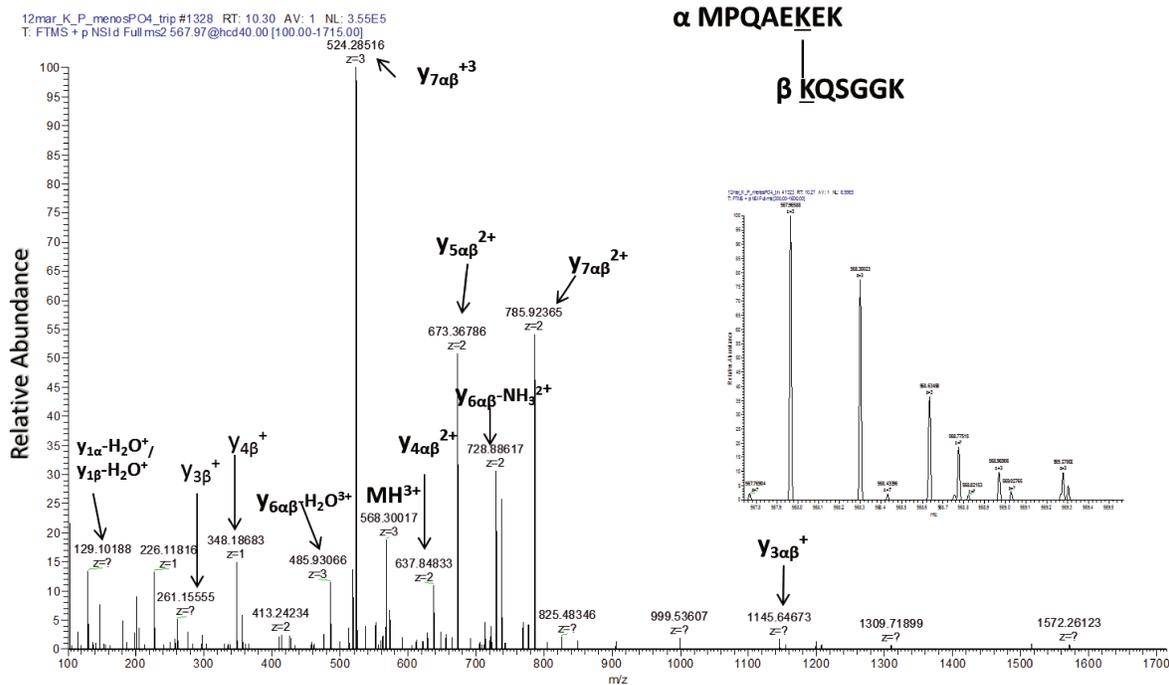


Figura 35: Análise de espectrometria de massas do ensaio de *crosslinking*. O espectro contendo os íons da série y e b foram manualmente anotados para validação do *crosslinking* entre os resíduos Lys²⁴⁵ (KGA) e Lys¹⁹² (PPAR γ). A sequência de aminoácidos α corresponde ao PPAR γ enquanto que a β a KGA.

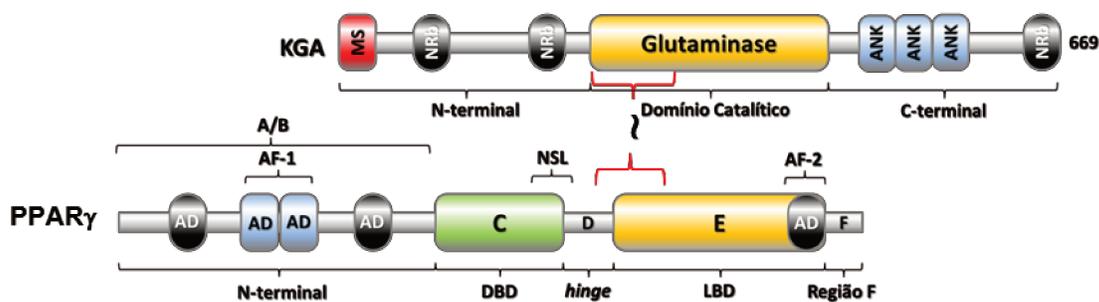


Figura 36: Representação dos domínios da KGA e do PPAR γ , onde indica-se com as chaves em vermelho as regiões envolvidas no *crosslinking* com DSS entre as duas proteínas.

5.3.9 Localização por imunofluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência das proteínas KGA e PPAR γ endógenas indicam que ambas as proteínas co-localizam principalmente no citoplasma das células, tendo sido obtidos valores de correlação de Pearson (*Thresholded*) de 0,6 para a linhagem de células SKBR3 e 0,7 para a linhagem PC3 (Figura 37). Conforme a tabela 5, valores entre 0,5 e 1 indicam que as proteínas estão fortemente co-localizadas. Além disso, os valores de coeficiente de sobreposição de *voxels* para PC3 e SKBR3 são de 0,97 e 0,98, respectivamente, onde 1 corresponde ao valor máximo, corroborando com os de correlação de Pearson. Quando o foco das análises é restrito ao núcleo das células os valores de correlação de Pearson caem para 0,1 em PC3 e 0,02 em SKBR3.

Correlação	Negativa	Positiva
Nula	-0.09 to 0.0	0.0 to 0.09
Pequena	-0.3 to -0.1	0.1 to 0.3
Média	-0.5 to -0.3	0.3 to 0.5
Forte	-1.0 to -0.5	0.5 to 1.0

Tabela 5: Valores para avaliação da correlação de Pearson ⁷⁵.

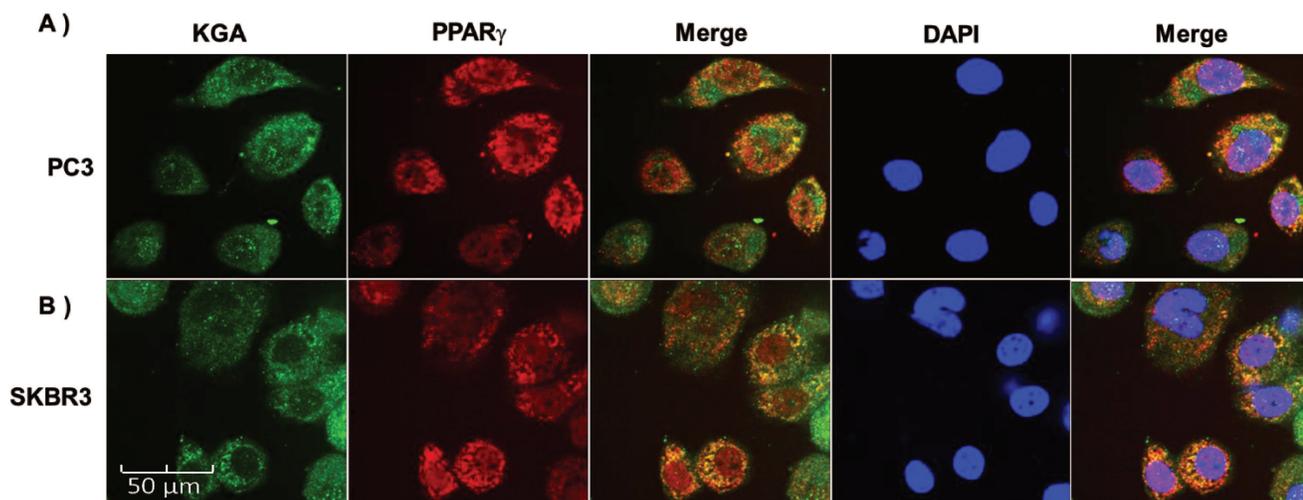


Figura 37: Imagens do ensaio de co-localização por imunofluorescência da KGA e do PPAR γ em linhagem de células de câncer de próstata (PC3) (A) e mama (SKBR3) (B). Em verde, a localização da KGA, conforme revelado por anticorpo secundário Alexa 488 (Invitrogen), em vermelho, localização de PPAR γ (Alexa 633) e, em azul, os núcleos das células corados com DAPI. Os valores de correlação de Pearson são de 0,7 e 0,6 e de coeficiente de sobreposição 0,97 e 0,98 para PC3 e SKBR3, respectivamente.

5.3.10 Immunogold labelling

Dado a indicação de localização da KGA no núcleo por imunofluorescência, decidimos investigar a mesma por microscopia eletrônica de transmissão de células SKBR3 seguido de marcação com anticorpo com partículas de ouro. Os resultados mostraram que KGA de fato se localiza no núcleo onde apresenta um interessante padrão de marcação heterocromático (Figura 38). Tentativas de co-localização com PPAR γ ainda não foram bem sucedidas.

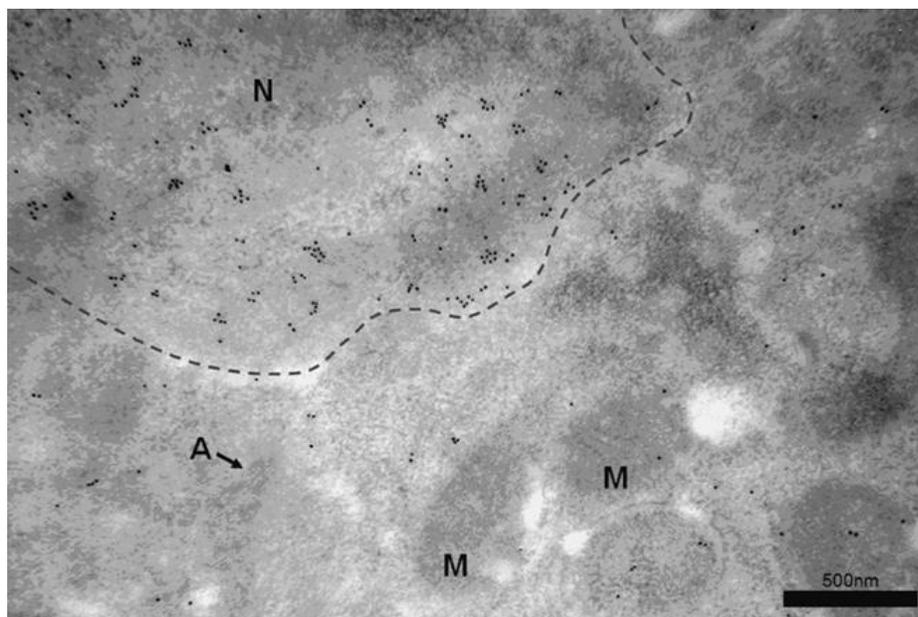


Figura 38: Micrografia eletrônica de transmissão de células SKBR3 marcadas com anticorpo anti-KGA revelado com secundário anti-mouse contendo partículas de ouro (10 nm). Envoltório nuclear indicado pela linha pontilhada. M: mitocôndrias. A: Actina.

5.3.11 Ensaio de Atividade Enzimática

Sabe-se que a presença do íon fosfato aumenta a atividade glutaminolítica da KGA e, considerando esse fato, foi decidido estudar a influência da presença da proteína PPAR γ nesta atividade.

Inicialmente foi testada a atividade glutaminolítica da KGA purificada, com e sem o íon fosfato. Os resultados mostraram que a enzima respondeu ao fosfato conforme esperado (diminuição de K_m e aumento de K_{cat} ²⁹) (Erro! Fonte de referência não encontrada.).

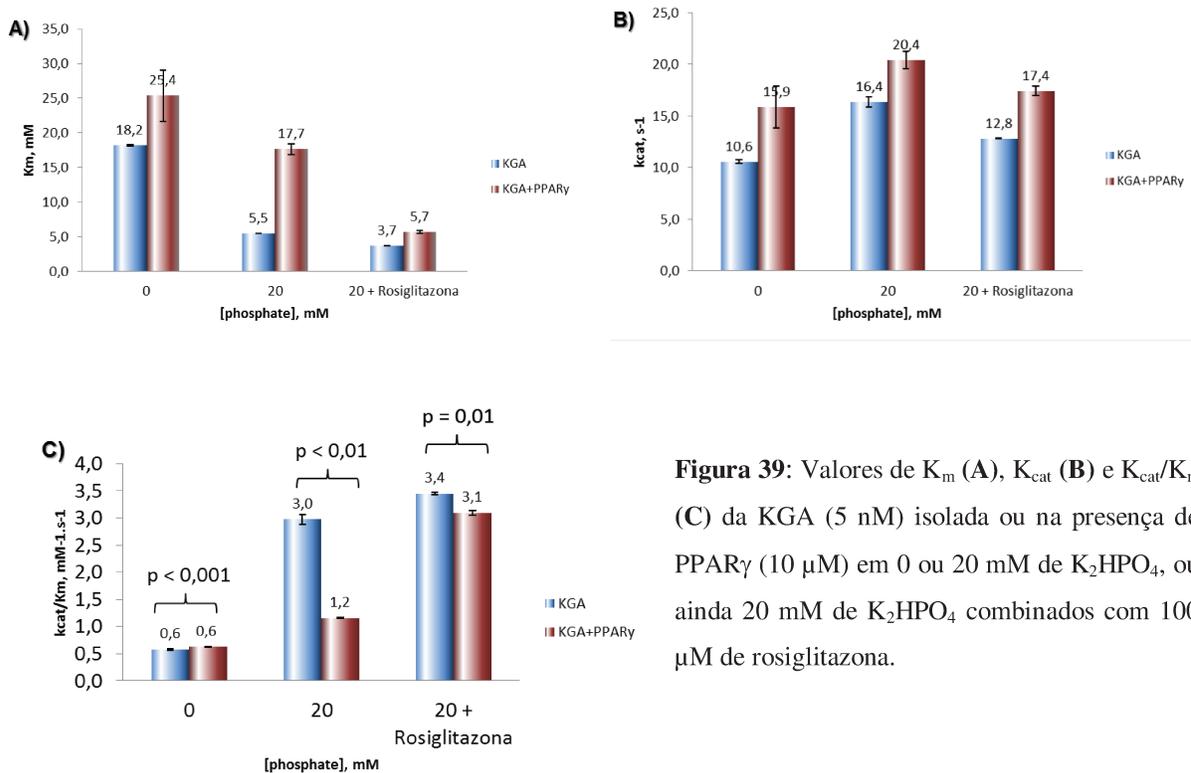


Figura 39: Valores de K_m (A), K_{cat} (B) e K_{cat}/K_m (C) da KGA (5 nM) isolada ou na presença de PPAR γ (10 μ M) em 0 ou 20 mM de K_2HPO_4 , ou ainda 20 mM de K_2HPO_4 combinados com 100 μ M de rosiglitazona.

Entretanto, na presença de um excesso molar de 2.000 X de PPAR γ , houve uma diminuição da eficiência catalítica da KGA na presença de 20 mM de K_2HPO_4 (K_{cat}/K_m de KGA foi 3,0 mM/s na ausência de PPAR γ e 1,3 mM/s na presença deste receptor nuclear). A presença do ativador de PPAR γ , rosiglitazona (100 μ M), afetou o resultado aumentando a

eficiência catalítica da glutaminase mesmo na presença do PPAR γ , o que nos leva a especular que a ativação do PPAR γ pelo seu agonista desfavorece a formação do complexo KGA-PPAR γ , permitindo a KGA realizar sua função glutaminolítica. Levando-se em conta que a interação ocorra via domínio catalítico da KGA, como sugere o ensaio de *crosslinking*, a ligação do PPAR γ com esta região pode de alguma maneira afetar a interação da enzima com a glutamina, direta ou indiretamente, via rompimento da oligomerização necessária para a atividade da enzima²⁹.

5.3.12 Ensaio de transativação celular

Para verificar se a proteína KGA é capaz de afetar a atividade de transativação do receptor PPAR γ , um ensaio de gene repórter (luciferase) dirigido por elemento responsivo ao PPAR γ foi realizado. Conforme mostrado na figura 40, foi possível verificar que KGA promoveu a inibição da atividade do PPAR γ mesmo na presença do seu agonista rosiglitazona (1 μ M).

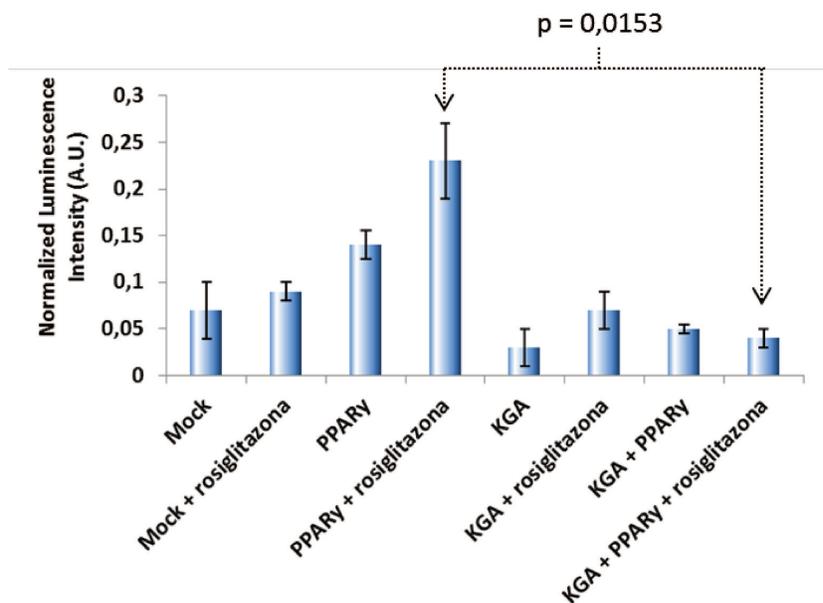


Figura 40: Ensaio de transativação de gene repórter com PPAR γ em células HEK 293T. **Mock:** plasmídeo pCMV vazio. Rosiglitazona é um conhecido agonista do PPAR γ .

5.3.13 qPCR

O ensaio de qPCR indicou uma redução significativa na transcrição do gene ACADL, alvo do PPAR γ , nas células PC3 com superexpressão da KGA (Figura 41). O resultado corrobora com o obtido no ensaio de transativação celular (item 5.3.12) onde a presença da KGA reduziu a transcrição do gene repórter ativado pelo PPAR γ . Não observamos mudanças nos níveis transcripcionais do gene CPT1 o que pode refletir a ação dos outros subtipos de PPAR γ .

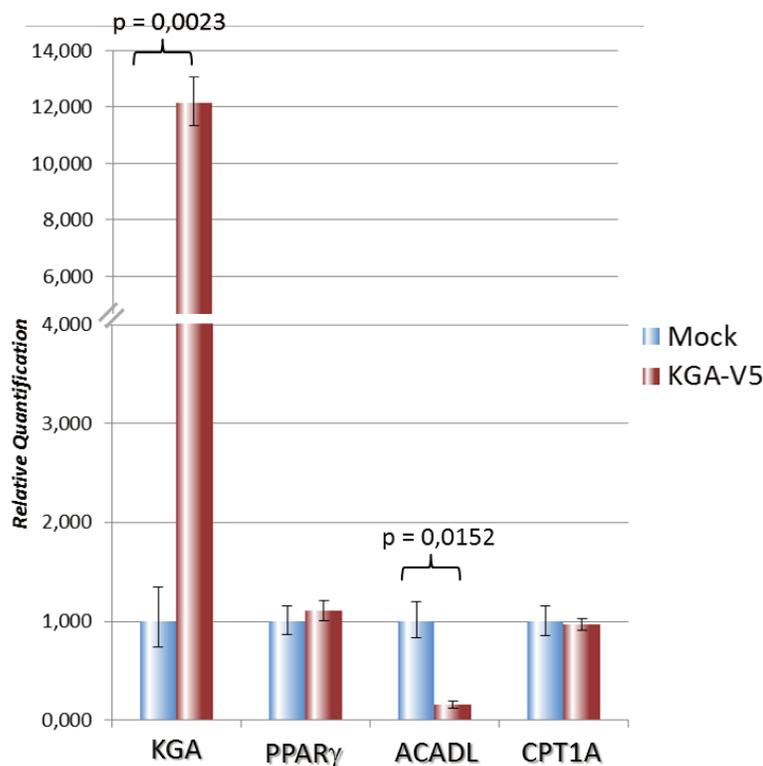


Figura 41: Análise do ensaio de q-PCR realizado com biblioteca de cDNA extraída de linhagens de células de câncer de próstata PC3 com expressão constitutiva da KGA em fusão com V5 e *primers* específicos para os genes ACADL, CPT1A, alvo do PPAR γ , bem como *primers* para o próprio PPAR γ e KGA.

6 Discussão

A possível interação entre a KGA e a Aldolase A, inicialmente identificada no ensaio de *pull-down* entre a KGA expressa e purificada de sistema heterólogo, exposto no projeto inicial (Figura 5) não foi confirmada nos ensaios de *pull down* e co-imunoprecipitação realizados durante o mestrado, nas condições empregadas.

Diversos ensaios de expressão para a BNIP-H foram realizados com o vetor petSUMO, porém a proteína parece não ter uma expressão significativa em sistema heterólogo nesse vetor. Por outro lado, testes de expressão com a construção pGEX4T1-BNIP-H levou a identificação de uma banda com uma massa molecular esperada para a BNIP-H. Contudo, não obtivemos quantidades significativas da proteína purificada em fração solúvel para realizar outros ensaios. Além disso, os ensaios de imunofluorescência indicam que ambas as proteínas, KGA e BNIP-H, transfectadas com fusão V5 e FLAG, respectivamente, não se encontram em compartimentos celulares compatíveis com a co-localização nas células de câncer de mama SKBR3 (experimentos apropriados de co-localização não foram feitos). Os dados foram corroborados por ensaios de co-imunoprecipitação que não mostraram interação entre as proteínas. Além disso, a expressão endógena da BNIP-H em oito linhagens de células disponíveis no laboratório, avaliada através da análise dos lisados totais dessas células por *wester blotting* contra o anticorpo da BNIP-H, foi baixa ou inexistente.

Assim, nossos esforços foram voltados para os estudos de interação entre KGA e PPAR γ , identificado em nosso laboratório inicialmente por duplo híbrido em levedura. O estudo da interação da KGA com PPAR γ é de particular interesse dado à relação do mesmo com o metabolismo celular. O receptor PPAR γ está envolvido na expressão de vários genes

presentes na diferenciação celular, no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios e na tumorigênese^{52,76-78}. Há estudos que mostram que a atividade de PPAR γ previne tumorigênese em tecidos como cólon, mama, próstata e pulmão, promovendo o aumento da diferenciação terminal, inibindo o crescimento celular, aumentando os níveis de apoptose e diminuindo a resposta inflamatória^{79,80}. Estudos em modelos animais demonstram que agonistas do PPAR γ tem alto potencial de prevenir ou tratar cânceres, dado a sua ação inibitória da tumorigênese e da progressão de tumores em pacientes com lipossarcoma, câncer de cólon, mama e próstata⁸¹.

Ensaio de duplo híbrido indicaram que a interação envolve o domínio LBD do PPAR γ . Essa informação é plausível, considerando o fato de também ser através do domínio LBD que PPAR γ exerce interação com co-ativadores, co-repressores e forma homo/heterodímeros com outros receptores^{37,61}.

As proteínas foram expressas em sistema heterólogo (*E. coli*) e purificadas para determinar-se se a interação era direta. Os estudos de *pull-down* e cromatografia de filtração em gel analítica não indicaram a interação entre KGA e PPAR γ nas condições testadas. Entretanto, ensaios de anisotropia de fluorescência mostraram interação entre KGA:PPAR γ onde, na presença do produto da reação catalizada pela enzima da KGA, glutamato, obteve-se um K_d de $4,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (Figura 32). O valor de K_d da ordem de micromolar pode explicar a dificuldade em se capturar o complexo pelas técnicas de *pull-down* e filtração em gel, as quais possuem etapas que podem dissociar a formação de complexos que não estejam fortemente ligados. Ainda, eletroforese em condições nativas confirmaram a interação direta entre as proteínas na presença de glutamato.

Ensaio de duplo híbrido mostraram que o domínio LBD do receptor está envolvido na interação com a KGA, mas não foi possível ainda determinar, por esta técnica, a região da KGA envolvida na interação, processo que encontra-se em andamento em nosso laboratório. Ensaio de *crosslinking* com DSS entre as proteínas KGA e PPAR γ expressas em sistema heterólogo, indicou um *crosslink* entre o domínio catalítico da KGA e o LBD do PPAR γ , apontando uma proximidade entre esses dois domínios e corroborando informações obtidas com o duplo híbrido. A região do PPAR γ envolvida no *crosslink* está próxima da sequência NSL (*Nuclear Signal Localization*). Esta observação nos permite especular que a interação do PPAR γ com a KGA possa impedir a atuação da sequência NSL em direcionar o PPAR γ ao núcleo. Entretanto a superfície de interação entre as duas proteínas (KGA:PPAR γ) precisam ser validadas por mutagênese sítio dirigida seguida ensaios de anisotropia de fluorescência.

Para buscar indícios da interação entre KGA e PPAR γ no contexto celular tumoral realizamos ensaios de co-imunolocalização por microscopia confocal. Os valores de Correlação de Pearson obtidos indicam co-localização no citoplasma (mas não no núcleo). A localização da KGA no núcleo foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão e *immunogold labeling*. Tentativas de co-localização pela mesma técnica ainda não foram bem sucedidas. Realizamos ainda ensaios de qPCR, envolvendo células com superexpressão de V5-KGA, com *primers* específicos para os genes alvos do PPAR γ , ACADL e CPT1. As análises mostraram que expressão do ACADL foi reduzida drasticamente em relação ao controle. A proteína codificada pelo gene ACADL pertence à família de acil-CoA desidrogenase, que é uma família de flavoenzimas mitocondriais envolvidas no metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos de cadeia ramificada. Esta proteína é uma das quatro enzimas que catalisam o primeiro passo da beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos de cadeia

linear. Os defeitos neste gene são a causa da deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCAD), levando à hipoglicemia não-cetônica ⁸². O gene CPT1 (carnitina-palmitoiltransferase I) não sofreu alterações significativas no ensaio de q-PCR. CPT1 é a enzima chave no transporte de ácidos graxos de cadeia longa, dependente de carnitina, através da membrana mitocondrial interna e sua deficiência resulta em uma diminuição na taxa de beta-oxidação de ácidos graxos ⁸³.

As consequências da interação de KGA com PPAR γ apontam para a redução da sua atividade glutaminolítica como definido por ensaio *in vitro* realizado com as proteínas purificadas. A atividade de PPAR γ também foi reduzida no ensaio de transativação celular na presença de KGA, mesmo com a co-adição de seu agonista sintético rosiglitazona. Considerando a co-localização e os indícios de interação intracelular entre PPAR γ e KGA no citoplasma das células avaliadas, especulamos que este evento possa impedir a migração de PPAR γ ao núcleo, evitando que este desempenhe a função de receptor nuclear na ativação de genes alvo específicos. Tal inibição pode ter importantes consequências para a proliferação celular.

7 Perspectivas

Apesar da comprovação da interação entre KGA e PPAR γ utilizando-se técnicas *in vitro*, acreditamos na necessidade da realização da técnica de *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET), cujo resultado irá comprovar a interação entre as proteínas dentro das células.

Além disso, a baixa expressão de PPAR γ nas células testadas poderá ser compensada pela expressão ectópica da proteína em fusão com outro epítipo, como FLAG por exemplo, permitindo assim a análise da interação KGA-PPAR γ pela técnica de co-immunoprecipitação. Ainda, a expressão ectópica pode ser aliada à purificação de compartimentos celulares de maneira a aumentar a concentração das proteínas e definir a localização da interação.

A identificação dos domínios envolvidos na interação KGA-PPAR γ é de suma importância para o entendimento deste evento, bem como as consequências trazidas por ele. Neste sentido, os estudos de duplo híbrido em levedura para determinação do(s) domínio(s) da KGA envolvidos na interação, que já se encontram em execução, nos trarão respostas para preencher a lacuna sobre qual domínio da KGA interage com o PPAR γ , além de confirmar as interações obtidas com *crosslinking* e LC/MS-MS. Neste campo, ainda poderemos empenhar estudos estruturais, empregando cristalografia por difração de raio X, da KGA em complexo com o PPAR γ .

Especulamos que a interação entre KGA e PPAR γ impeça o receptor nuclear de desempenhar sua função, assim, ensaios de qPCR *array* poderão revelar se outros genes são

afetados pela interação, permitindo-nos inferir sobre as consequências deste evento no metabolismo celular, principalmente no ambiente tumoral.

8 Conclusões

- Os ensaios empregados para avaliar a interação entre a KGA e Aldolase A indicam que não há interação entre essas proteínas, pelo menos nas condições testadas.
- Os resultados obtidos nos ensaios de imunoprecipitação e imunolocalização entre KGA e BNIP-H não demonstraram interação entre as duas proteínas na linhagem de câncer de mama SKBR3.
- Identificamos o receptor nuclear PPAR γ como parceiro de interação da KGA. Os estudos mostraram interação direta *in vitro* entre as proteínas, assim como apontaram indícios de interação citoplasmática (mas não nuclear) nas linhagens SKBR3 e PC3. PPAR γ afetou a atividade glutaminolítica da KGA, e, da mesma maneira, KGA afetou a função de transativação deste receptor nuclear. Dado o potencial anti-proliferativo dos alvos gênicos do PPAR γ especula-se que esta interação seja importante para a manutenção do fenótipo proliferativo das células tumorais.

9 Referências

1. Cooper, E. H., Barkhan, P. & Hale, A. J. Observations on the Proliferation of Human Leucocytes Cultured with Phytohaemagglutinin. *British Journal of Haematology* **9**, 101–111 (1963).
2. Hedekov, C. J. Early effects of phytohaemagglutinin on glucose metabolism of normal human lymphocytes. *The Biochemical journal* **110**, 373–80 (1968).
3. Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Molecular biology of the cell* **13**, 2276–88 (2002).
4. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism* **7**, 11–20 (2008).
5. Ruckenstuhl, C. *et al.* The Warburg effect suppresses oxidative stress induced apoptosis in a yeast model for cancer. *PloS one* **4**, e4592 (2009).
6. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
7. Warburg, O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Die Naturwissenschaften* **12**, 1131–1137 (1924).
8. Engelman, J. A. *et al.* Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature medicine* **14**, 1351–6 (2008).
9. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews. Cancer* **4**, 891–9 (2004).
10. Wise, D. R. *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18782–7 (2008).

11. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)* **324**, 1029–33 (2009).
12. Vizán, P. *et al.* Characterization of the metabolic changes underlying growth factor angiogenic activation: identification of new potential therapeutic targets. *Carcinogenesis* **30**, 946–52 (2009).
13. Shanware, N. P., Mullen, A. R., DeBerardinis, R. J. & Abraham, R. T. Glutamine: pleiotropic roles in tumor growth and stress resistance. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **89**, 229–36 (2011).
14. Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M. M. R., Pithon-Curi, T. C. & Curi, R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell biochemistry and function* **21**, 1–9 (2003).
15. DeBerardinis, R. J. & Cheng, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29**, 313–324 (2010).
16. DeBerardinis, R. J. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19345–50 (2007).
17. Wang, J.-B. *et al.* Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer cell* **18**, 207–19 (2010).
18. Chung-Bok, M. I., Vincent, N., Jhala, U. & Watford, M. Rat hepatic glutaminase: identification of the full coding sequence and characterization of a functional promoter. *The Biochemical journal* **324** (Pt 1, 193–200 (1997).
19. Porter, L. D., Ibrahim, H., Taylor, L. & Curthoys, N. P. Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiological genomics* **9**, 157–66 (2002).
20. Curthoys, N. P. & Watford, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual review of nutrition* **15**, 133–59 (1995).

21. Elgadi, K. M., Meguid, R. A., Qian, M., Souba, W. W. & Abcouwer, S. F. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiological genomics* **1**, 51–62 (1999).
22. Gómez-Fabre, P. M. *et al.* Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *The Biochemical journal* **345 Pt 2**, 365–75 (2000).
23. Márquez, J., De la Oliva, A. R. L., Matés, J. M., Segura, J. A. & Alonso, F. J. Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochemistry international* **48**, 465–71
24. Labow, B. I., Souba, W. W. & Abcouwer, S. F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. *The Journal of nutrition* **131**, 2467S–74S; discussion 2486S–7S (2001).
25. Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. & Peng, Z.-Y. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**, 1435–48 (2004).
26. Mulvey, C. M. *et al.* Subcellular proteomics reveals a role for nucleocytoplasmic trafficking at the DNA replication origin activation checkpoint. *Journal of proteome research* **12**, 1436–53 (2013).
27. Olalla, L. *et al.* Expression of the scaffolding PDZ protein glutaminase-interacting protein in mammalian brain. *Journal of neuroscience research* **86**, 281–92 (2008).
28. Gowda, B., Sar, M., Mu, X., Cidlowski, J. & Welbourne, T. Coordinate modulation of glucocorticoid receptor and glutaminase gene expression in LLC-PK1-F+ cells. *The American journal of physiology* **270**, C825–31 (1996).
29. Cassago, A. *et al.* Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1092–1097 (2012).

30. Izzo, P. *et al.* Human aldolase A gene. Structural organization and tissue-specific expression by multiple promoters and alternate mRNA processing. *European journal of biochemistry / FEBS* **174**, 569–78 (1988).
31. Merkulova, M. *et al.* Aldolase directly interacts with ARNO and modulates cell morphology and acidic vesicle distribution. *American journal of physiology. Cell physiology* **300**, C1442–55 (2011).
32. Mhaweche-Fauceglia, P. *et al.* Aldolase mRNA expression in endometrial cancer and the role of clotrimazole in endometrial cancer cell viability and morphology. *Histopathology* **59**, 1015–8 (2011).
33. Ojika, T., Imaizumi, M., Abe, T. & Kato, K. Immunochemical and immunohistochemical studies on three aldolase isozymes in human lung cancer. *Cancer* **67**, 2153–8 (1991).
34. Buschdorf, J. P., Chew, L. L., Soh, U. J. K., Liou, Y.-C. & Low, B. C. Nerve growth factor stimulates interaction of Cayman ataxia protein BNIP-H/Caytaxin with peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in differentiating neurons. *PloS one* **3**, e2686 (2008).
35. Buschdorf, J. P. *et al.* Brain-specific BNIP-2-homology protein Caytaxin relocalises glutaminase to neurite terminals and reduces glutamate levels. *Journal of cell science* **119**, 3337–50 (2006).
36. Ribeiro, R. C., Kushner, P. J. & Baxter, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annual review of medicine* **46**, 443–53 (1995).
37. Olefsky, J. M. Nuclear receptor minireview series. *The Journal of biological chemistry* **276**, 36863–4 (2001).
38. Elfaki, D. a H., Bjornsson, E. & Lindor, K. D. Review article: nuclear receptors and liver disease--current understanding and new therapeutic implications. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **30**, 816–25 (2009).
39. Benoit, G., Malewicz, M. & Perlmann, T. Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends in cell biology* **14**, 369–76 (2004).

40. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science (New York, N.Y.)* **294**, 1866–70 (2001).
41. Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, N.Y.)* **240**, 889–95 (1988).
42. Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & development* **14**, 121–41 (2000).
43. McKenna, N. J., Lanz, R. B. & O'Malley, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews* **20**, 321–44 (1999).
44. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* **81**, 1269–304 (2001).
45. Baniahmad, A. *et al.* The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Molecular and cellular biology* **15**, 76–86 (1995).
46. Chen, J. D. & Evans, R. M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454–7 (1995).
47. Hörlein, A. J. *et al.* Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397–404 (1995).
48. Ribeiro, R. C. *et al.* X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **65**, 133–41 (1998).
49. Shiau, A. K. *et al.* The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**, 927–37 (1998).
50. Moras, D. Structure of full-length PPARgamma-RXRalpha: a snapshot of a functional complex? *Cell metabolism* **9**, 8–10 (2009).

51. Chandra, V. *et al.* Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **456**, 350–6 (2008).
52. Robinson-Rechavi, M. The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* **116**, 585–586 (2003).
53. Jin, Q. *et al.* Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *The EMBO journal* **30**, 249–62 (2011).
54. Nebbioso, A. *et al.* HDACs class II-selective inhibition alters nuclear receptor-dependent differentiation. *Journal of molecular endocrinology* **45**, 219–28 (2010).
55. Darimont, B. D. *et al.* Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & development* **12**, 3343–56 (1998).
56. Feng, W. Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. *Science* **280**, 1747–1749 (1998).
57. Nolte, R. T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* **395**, 137–43 (1998).
58. Damdimopoulos, A. E., Miranda-Vizuete, A., Treuter, E., Gustafsson, J.-A. & Spyrou, G. An alternative splicing variant of the selenoprotein thioredoxin reductase is a modulator of estrogen signaling. *The Journal of biological chemistry* **279**, 38721–9 (2004).
59. Hu, X.-D. *et al.* BTG2 is an LXXLL-dependent co-repressor for androgen receptor transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications* **404**, 903–9 (2011).
60. Li, H. *et al.* Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science (New York, N.Y.)* **289**, 1159–64 (2000).
61. Kolluri, S. K. *et al.* A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer cell* **14**, 285–98 (2008).

62. Michalik, L., Desvergne, B. & Wahli, W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nature reviews. Cancer* **4**, 61–70 (2004).
63. Peters, J. M., Shah, Y. M. & Gonzalez, F. J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature reviews. Cancer* **12**, 181–95 (2012).
64. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of biological chemistry* **276**, 37731–4 (2001).
65. Fucci, A. *et al.* The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the esophageal, gastric, and colorectal cancer. *PPAR research* **2012**, 242498 (2012).
66. Lefebvre, A. M. *et al.* Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nature medicine* **4**, 1053–7 (1998).
67. Márquez, J., De la Oliva, A. R. L., Matés, J. M., Segura, J. A. & Alonso, F. J. Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochemistry international* **48**, 465–71
68. Gronemeyer, V. L. and H. The Nuclear Receptor FactsBook. at <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124377356>>
69. Fluorescence Polarization. Technical Resource Guide. Fourth Edition. Invitrogen.
70. Crosslinking Technical Handbook. *Thermo Scientific Pierce* (2009).
71. Chaudhury, S., Lyskov, S. & Gray, J. J. PyRosetta: a script-based interface for implementing molecular modeling algorithms using Rosetta. *Bioinformatics (Oxford, England)* **26**, 689–91 (2010).
72. Surpili, M. J., Delben, T. M. & Kobarg, J. Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry* **42**, 15369–76 (2003).

73. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**, 402–8 (2001).
74. Yaffe, M. B. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS letters* **513**, 53–7 (2002).
75. Sedgwick, P. Pearson's correlation coefficient. *BMJ* **345**, e4483–e4483 (2012).
76. Nagy, Z. S., Czimmerer, Z. & Nagy, L. Nuclear receptor mediated mechanisms of macrophage cholesterol metabolism. *Molecular and cellular endocrinology* (2012).doi:10.1016/j.mce.2012.04.003
77. Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C. & Sharma, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* **2**, 236–40 (2011).
78. Karki, S. *et al.* The multi-level action of fatty acids on adiponectin production by fat cells. *PloS one* **6**, e28146 (2011).
79. Grommes, C., Landreth, G. E. & Heneka, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *The lancet oncology* **5**, 419–29 (2004).
80. Koeffler, H. P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 1–9 (2003).
81. Demetri, G. D. *et al.* Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3951–6 (1999).
82. Maher, A. C., Mohsen, A.-W., Vockley, J. & Tarnopolsky, M. A. Low expression of long-chain acyl-CoA dehydrogenase in human skeletal muscle. *Molecular genetics and metabolism* **100**, 163–7 (2010).
83. Amengual, J., Petrov, P., Bonet, M. L., Ribot, J. & Palou, A. Induction of carnitine palmitoyl transferase 1 and fatty acid oxidation by retinoic acid

in HepG2 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*
44, 2019–27 (2012).