



AMANDA PETRINA SCOTÁ FERREIRA

ENTENDENDO O MECANISMO DE
ATIVAÇÃO E AS DIFERENÇAS CINÉTICAS
ENTRE AS ISOFORMAS *KIDNEY-TYPE*
GLUTAMINASE E GLUTAMINASE C

“UNDERSTANDING THE MECHANISM OF ACTIVATION AND
KINETIC DIFFERENCES BETWEEN THE ISOFORMS *KIDNEY-TYPE*
GLUTAMINASE AND GLUTAMINASE C”

CAMPINAS
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

AMANDA PETRINA SCOTÁ FERREIRA

**Entendendo o mecanismo de ativação e as diferenças cinéticas
entre as isoformas *Kidney-type* Glutaminase e Glutaminase C**

“Understanding the mechanism of activation and kinetic differences between the
isoforms *Kidney-type* Glutaminase and Glutaminase C”

Este exemplar corresponde à redação final da
Dissertação defendida pela candidata

Amanda Petrina Scotá Ferreira

ANDRE AM
e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título
de Mestra em Ciências, na área de Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde.

Dissertation presented to the Institute of
Biology at UNICAMP as part of
requirements for obtaining the Master of
Science title in the field of Pharmaceuticals,
Drugs and Supplies for Health.

Orientador: Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio

CAMPINAS,

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F413e Ferreira, Amanda Petrina Scotá, 1988-
Entendendo o mecanismo de ativação e as diferenças cinéticas entre as isoformas *Kidney-type* Glutaminase e Glutaminase C / Amanda Petrina Scotá Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Andre Luis Berteli Ambrosio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glutaminase. I. Ambrosio, Andre Luis Berteli. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Understanding the mechanism of activation and kinetic differences between the isoforms *Kidney-type* Glutaminase and Glutaminase C

Palavras-chave em inglês:

Glutaminase

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Andre Luis Berteli Ambrosio [Orientador]

Artur Torres Cordeiro

Leandro Martínez

Data de defesa: 13-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 13 de dezembro de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio



Assinatura

Dr. Artur Torres Cordeiro



Assinatura

Prof. Dr. Leandro Martinez



Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Aparicio

Assinatura

Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

Assinatura

ABSTRACT

Title: Understanding the mechanism of activation and kinetic differences between the isoforms Kidney-type Glutaminase and Glutaminase C

The energy production in cancer cells is abnormally dependent on aerobic glycolysis, resulting in increased consumption of glutamine to supply anabolic processes. The hydrolysis of glutamine is made by glutaminases, which have three isoforms identified in mammals: Kidney-type glutaminase (KGA), Glutaminase C (GAC) and the Liver-type Glutaminase (LGA). Although isoforms of KGA and GAC are identical in their catalytic domain, both have distinct catalytic efficiencies for glutamine. This project aims to find the reason for this difference catalytic, structurally studying these isoforms. The asymmetric unit of the crystallographic structure of GAC is composed by a tetramer, and this tetramerization is essential step for accessibility of the substrate glutamine, possibly stabilizing a “gating loop” in an open conformation. Site-directed mutations of residues from the “gating loop” (L321RFNKL326) disrupted the enzyme activity, which correlated directly with the ability of oligomerization: mutant which had lost activity were unable to form higher oligomers than tetramer. By transmission electron microscopy images using negative staining, we saw that the GAC forms filamentous structures in the presence of phosphate. Interestingly, a mutant in the region of the gating loop, called GAC.K325A, showed a very high catalytic efficiency and was able to form large oligomers. Furthermore, this mutant is insensitive to phosphate and BPTES. The mutant GAC.R322A lost activity and was unable to form polymers even in the presence of phosphate activator. Therefore, the oligomerization ability justifies the glutaminase activity exhibited by the protein: GAC - the higher glutaminase activity - formed the largest linear polymers, followed by KGA and, respectively, by LGA (low enzymatic efficiency and insensitive to inorganic phosphate). Furthermore, we showed the mechanism of BPTES inhibition is explained by disruption of oligomers. We present a mechanism for the formation of these oligomers, through a combination of deletions, point mutations, electron microscopy, molecular dynamics and docking. We simulated the acetylation of Lys311, and we found that this post-translational modification can maybe control enzymatic levels by down regulate the fiber formation. Using fluorescent labeling, we were able to define apparent dissociation constants of GAC and KGA isoforms. As the label interfered in the enzymatic activity, we believe that the technique produced artifacts unsuitable for the perception of differential interaction between isoform’s superstructures. MDA-MB 231 cells with endogenous expression and knocked down GAC were used in cellular assays. Transfections with GAC.K325A-V5 proliferated more, consumed more glutamine from the culture medium and had higher turnover in glutaminase activity measurements. Collectively, these are evidence that the formation of superstructure glutaminases in vivo provides adaptive advantages to tumor cells and shows the importance of the enzyme as a therapeutic target.

RESUMO

Título: Entendendo o mecanismo de ativação e as diferenças cinéticas entre as isoformas *Kidney-type* Glutaminase e Glutaminase C

A produção de energia em células cancerosas é anormalmente dependente da glicólise aeróbica, resultando em aumento do consumo de glutamina para suprir os processos anabólicos. A hidrólise da glutamina é feita pelas glutaminases, as quais possuem três isoformas identificadas em mamíferos: *Kidney-type glutaminase* (KGA), *Glutaminase C* (GAC), e a *Liver-type Glutaminase* (LGA). Apesar das isoformas KGA e GAC serem idênticas em seu domínio catalítico, ambas apresentam distintas eficiências catalíticas para glutamina. Este projeto tem como objetivo encontrar a razão para esta diferença catalítica, estudando estruturalmente estas isoformas. A estrutura cristalográfica da GAC continha uma unidade assimétrica tetramérica, e como passo essencial para a acessibilidade do substrato glutamina essa tetramerização possivelmente estabiliza um “*gating loop*” em conformação aberta. Mutações sítio-dirigidas de resíduos do “*gating loop*” (L₃₂₁RFNKL₃₂₆) perturbaram a atividade da enzima, o que se correlacionou diretamente com a capacidade de oligomerização: mutantes que perderam atividade não foram capazes de formar oligômeros maiores que tetrâmero. Por imagens de microscopia eletrônica de transmissão, utilizando *negative staining*, vimos que a GAC forma estruturas filamentosas na presença de fosfato. Curiosamente, um mutante da região do *gating loop*, denominado GAC.K325A, apresentou uma eficiência catalítica alta e foi capaz de formar oligômeros extensos. Além disso, o mutante é insensível a fosfato e ao BPTES. O mutante GAC.R322A perdeu a atividade e não foi capaz de formar polímeros nem mesmo na presença de ativador fosfato. Portanto, a capacidade de oligomerizar das glutaminase justifica a atividade apresentada pela proteína: a GAC – a glutaminase de maior atividade – formou os maiores polímeros lineares, seguida pela KGA e, respectivamente, pela LGA (de baixa eficiência enzimática e insensível ao fosfato inorgânico). Além disso, mostramos que o mecanismo de inibição do BPTES é explicado pelo rompimento dos oligômeros. Apresentamos um mecanismo para a formação destes oligômeros, através da combinação de deleções, mutações pontuais, microscopia eletrônica, dinâmica e *docking* molecular. Nós simulamos a acetilação da Lis311 e sugerimos que esta modificação pós-traducional pode controlar níveis enzimáticos ao regular negativamente a formação de fibra. Por marcação com fluoróforo, determinamos constantes de dissociação aparentes para as espécies oligoméricas das isoformas GAC e KGA. Como a marcação interferiu na atividade enzimática, acreditamos que a técnica criou artefatos impróprios para percepção de interação diferencial entre superestruturas dessas isoformas. Células MDA-MB 231 com expressão endógena e *knocked down* de GAC foram utilizadas em ensaios celulares. Transfecções com GAC.K325A-V5 proliferaram mais, consumiram mais glutamina do meio de cultura e apresentaram maior *turnover* na medição de atividade de glutaminase. Coletivamente, estes indícios de que a formação de superestrutura de glutaminases *in vivo* propicia vantagens adaptativas às células tumorais mostram a importância da enzima como alvo terapêutico.

SUMÁRIO

ABSTRACT	vii
RESUMO	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxi
1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Glicose e Glutamina: o perfil metabólico da proliferação celular	1
1.2 Glutamina exerce papéis importantes para a célula	6
1.3 Organização genômica e análise sequencial das isoformas de Glutaminases	8
1.4 Relevância da Glutaminase C no metabolismo tumoral	10
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Clonagem e expressão heteróloga	17
3.2 Purificação das proteínas recombinantes	17
3.3 Mutações pontuais	20
3.4 Subclonagem da construção GAC.H556	21
3.5 Ensaio de atividade	23
3.6 Diluição seriada	24
3.7 Imagens das superestruturas por Microscopia Eletrônica de Transmissão	25
3.8 Análise do cross-linking dos oligômeros de GAC por LC-MS/MS	26

3.9	Anisotropia de fluorescência	27
3.10	Ensaio celular	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Purificação das proteínas recombinantes	33
4.2	Ensaio de atividade e diluições seriadas	34
4.3	Formação de superestruturas entre as isoformas de glutaminases.....	39
4.4	BPTES é capaz de romper as superestruturas	42
4.5	Mecanismo de formação das superestruturas.....	43
4.6	Anisotropia de fluorescência.....	47
4.7	Ensaio celular	51
5.	DISCUSSÃO.....	53
6.	CONCLUSÕES.....	57
7.	ANEXOS DE FIGURAS E TABELAS.....	59
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9.	ARTIGO EM ANEXO.....	71

Dedico essa Dissertação a todos fizeram parte da construção deste trabalho. Também dedico à minha fonte de motivação: meus pais João e Ana, e ao meu irmão Danilo.

Agradecimentos,

À Deus, por me abençoar até aqui.

Ao meu orientador Andre, por trabalhar arduamente neste trabalho, pela receptividade e amizade. E pelas brilhantes ideias que me nortearam.

À Sandra, pela cooperação, empenho e valiosas sugestões.

Aos meus amigos de laboratório pela convivência e ajuda mútua. Agradeço, em especial, ao Alexandre Cassago, por dividir comigo este projeto e por todos os ensinamentos.

Agradeço as minhas amigas, que fizeram meu caminho mais fácil: Camila Fornezari, Robertinha, Pati, Ju Oliveira, Joice, Amanda Silva e Angela Saito. Também agradeço ao meu amigo Emerson Rodrigo, por toda descontração.

Aos meus pais e ao meu irmão Danilo, pelo amor incondicional, pela inspiração e pela compreensão.

As minhas madrinhas Maria e Máxima, pelos gestos de ternura e carinho que sempre me fizeram voltar de casa mais feliz.

Agradeço a imensurável afeto da minha irmã, Ana Paula.

Ao Thales, por ser paciente com minhas lamúrias, pelo cuidado e por fazer meus dias mais agradáveis.

Aos distantes, porém constantes em minha saudade: minha família, meus queridos afilhados, as MALAS, a Nayara, Felipe e Nayane.

A todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório Nacional de Biociências, pela contribuição a minha formação científica.

À UNICAMP e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Tecnologias de Produtos Bioativos, pela formação acadêmica de qualidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo 2011/15107-0).

Lista de Figuras

Figura 1: Metabolismo da glicose e glutamina suprem a proliferação celular.

Figura 2: Esquema representativo do metabolismo da glutamina em células proliferativas.

Figura 3: Principais funções celulares da glutamina.

Figura 4: Organização estrutural das isoenzimas das glutaminases e o perfil de expressão tecido específico.

Figura 5: Estrutura cristalográfica da GAC sem ligante.

Figura 6: Resíduos substituídos na Glutaminase C.

Figura 7: Esquema de ensaio cinética da atividade de glutaminase.

Figura 8: Experimento de anisotropia de fluorescência.

Figura 9: Perfil cromatográfico e análise em SDS-PAGE 10% da GAC e KGA, respectivamente.

Figura 10: Caracterização do perfil cinético dos mutantes pontuais GAC.R322A, GAC.R392S, GAC.N324A e GAC.E330A comparados a enzima selvagem GAC.

Figura 11: Ensaios de diluições seriadas para GAC selvagem e mutantes pontuais GAC.R322A, GAC.R392S, GAC.N324A e GAC.E330A.

Figura 12: Caracterização do perfil cinético comparativo do mutante GAC.K325A e a enzima selvagem GAC, na presença e ausência do inibidor BPTES (30 μ M).

Figura 13: Perfil cromatográfico de diluições seriadas e gráfico representativo do Raio de Stokes da fração eluída da gel filtração para GAC selvagem na ausência de fosfato e presença de fosfato; e GAC.K325A na presença de fosfato e ausência de fosfato.

Figura 14: Caracterização do perfil cinético comparativo da deleção GAC.H556 e as enzimas selvagens GAC e KGA.

Figura 15: A polimerização da Glutaminase C na presença de fosfato.

Figura 16: A formação de superestruturas é responsável pela ativação.

Figura 17: Análise por *negative staining* de formação de superestruturas das glutaminases.

Figura 18: Perfil de dose-resposta da inibição por BPTES das enzimas GAC e GAC.K325A, na presença de 20 mM de fosfato.

Figura 19: Análise por *negative staining* do efeito do BPTES na inibição de formação das superestruturas da GAC e GAC.K325A.

Figura 20: Resumo dos pares de lisina “crosslinkados” validados por busca no MassMatrix, separados em grupos de ligações presentes no tetrâmero ou superoligômero da GAC.

Figura 21: Mutações de lisinas identificadas como “crosslinkadas” e mimético de acetilação.

Figura 22: Modelo de formação de superestrutura.

Figura 23: Gel SDS 10% das isoformas GAC e KGA analisado por fluorescência com FITC no equipamento *Gel Logic 2200 Imaging System* e em seguida corado com *coomassie blue*.

Figura 24: Resultados preliminares do ensaio de Anisotropia de Fluorescência.

Figura 25: Resultados normalizados de anisotropia versus concentração protéica.

Figura 26: Proliferação celular e consumo de glutamina favorecidos pela transfecção de GAC.K325A.

Figura 27: Superestrutura da GAC em modelos celulares.

Figura de anexos 1: Alinhamento das sequências de aminoácidos das isoformas de glutaminases.

Figura de anexos 2: Espectros MS/MS das amostras de *cross-linking* da GAC.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tampões de purificação das proteínas heterólogas mGAC e rKGA.

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas mutagêneses da mGAC..

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na clonagem do cDNA mGAC.H556.

Tabela 4: Valores de constantes de dissociação obtidos no ensaio de Anisotropia.

Tabela de anexos 1: Parâmetros físicos e químicos das proteínas heterólogas.

Tabela de anexos 2: Parâmetros cinéticos da glutaminase GAC, recombinantes selvagem e mutantes.

Tabela de anexos 3: Parâmetros cinéticos da GAC e mutantes relacionados com o mecanismo de formação de oligômeros.

Tabela de anexos 4: Parâmetros cinéticos da KGA, GAC e deleção GAC.H556.

Tabela de anexos 5: Parâmetros cinéticos para curvas de dose-resposta a BPTES da GAC e do mutante GAC.K325A.

Tabela de anexos 6: Comparação dos parâmetros cinéticos da KGA, GAC e respectivas marcações com FITC.

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C - Graus Celsius

2-HG - 2-hidroxiglutarato

ϵ - Coeficiente de Extinção Molar

μL - Microlitros

μM - Micromolar

μm - Micrômetros

μm^2 - Micrômetros quadrados

ATP - Adenosina Trifosfato

BPTES - *Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide*

cm - Centímetros

Da - Daltons

DSS - *Disuccinimidyl suberate*

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FITC - Isotiacianato de Fluoresceína

FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*

mGAC - *Mus musculus* Glutaminase C

GDH - Glutamato Desidrogenase

GLS1 e GLS2 - Nomenclatura dos genes que codificam as glutaminases em humanos

GLS1 - Nomenclatura referente as isoformas protéicas codificadas pelo gene *GLS1*

HCD - Higher Energy C-trap Dissociation

I_{\parallel} - Intensidade da luz polarizada na direção paralela

I_{\perp} - Intensidade da luz polarizada na direção perpendicular

IC₅₀ - Concentração de inibidor necessária para um nível de 50% de inibição

IDH - Isocitrato Desidrogenase

IPTG - *Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside*

K_2HPO_4 - Fosfato de Potássio Dibásico

K_{av} - Coeficiente de partição

K_{cat} - Constante Catalítica

KDa - Quilodaltons

rKGA - *Rattus norvegicus Kidney-type* Glutaminase

K_m - Constante de Michaelis-Menten

kV - Quilovolts

L - Litros

LB - *Lysogeny broth*

LGA - *Liver-type* Glutaminase

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

mA - Mili-amperes

mg - Miligramas

ms - Milisegundos

MS - *Mass Spectrometry*

NA - Não aplicável

NaCl - Cloreto de Sódio

NAD^+ - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina oxidado

NADH - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina reduzido

$NADP^+$ - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina fosfato oxidado

NADPH - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina fosfato reduzido

$NaVO_4$ - Ortovanadato de Sódio

ng - Nanogramas

nL/min - nanolitro/minuto

nM - Nanomolar

nm - Nanômetros

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsufonil

ppm - Partes por milhão

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

R_s - Raio de Stokes

s - Segundos

SDS-PAGE - Dodecil-sulfato de Sódio de poliacrilamida

TCA - Ciclo do Ácido Tricarboxílico

TCEP - Tris (2-carboxietil) fosfina

V_0 - Volume morto (*void*)

V_e - Volume de eluição

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Glicose e Glutamina: o perfil metabólico da proliferação celular

Uma característica evidente de tumores é a proliferação celular descontrolada. As células cancerosas adquirem essa habilidade devido ao aumento do crescimento celular, autossuficiência a sinais proliferativos, evasão a estímulos pró-apoptóticos, imortalidade, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (Hanahan & Weinberg 2000). Recentemente, a ciência passou a reconhecer dois novos fenótipos adquiridos durante o desenvolvimento de tumores: a capacidade de reprogramar o metabolismo energético e a capacidade de evitar a detecção do sistema imune (Hanahan & Weinberg 2011). Estudos sobre alterações metabólicas das células tumorais objetivam apontar alvos terapêuticos para o tratamento de câncer (Zhao *et al.* 2013).

Um atributo da adaptação metabólica tumoral é a preferência pela via glicolítica, mesmo em presença de oxigênio (Figura 1). O processo de glicólise aeróbica em células neoplásicas foi descrito pelo fisiologista alemão Otto Warburg e, por isso, ficou conhecido como “Efeito Warburg” (Warburg 2008). A hipótese de Warburg era que células de câncer apresentariam defeitos mitocondriais que as impediam de realizar a fosforilação oxidativa, e que a disfunção mitocondrial seria a responsável por causar a doença (Koppenol *et al.* 2011), porém ainda é elusiva a relação entre alterações metabólicas e disfunções mitocondriais. Aparentemente, a adaptação para o metabolismo glicolítico na presença de oxigênio está relacionada ao controle de sinais celulares e não a um defeito mitocondrial *per se* (Gogvadze *et al.* 2008).

Em condições de normóxia, células normais oxidam a glicose através da fosforilação oxidativa, com rendimento de aproximadamente 36 moléculas de ATP por cada molécula de glicose metabolizada. (Koppenol *et al.* 2011). Em condições anaeróbicas (ausência de oxigênio), o metabolismo energético ocorre a partir da fermentação láctica, que produz um saldo líquido de 2 ATPs por molécula de glicose e regenera NAD^+ , importante para a manutenção da via glicolítica. Como descrito por Warburg, células tumorais convertem preferencialmente o esqueleto carbônico da glicose em lactato mesmo em normóxia. Sugere-se que o fluxo rápido da via glicolítica permita às células tumorais

superar a produção de energia de uma célula normal e sobreviver na ausência de oxigênio (Vander Heiden *et al.* 2009), dado que células tumorais tem um perfil de expressão aumentada de enzimas da via glicolítica e captam mais glicose por apresentarem grande quantidade de transportadores (Gatenby & Gillies 2004, Wise *et al.* 2008 e Le *et al.* 2012). A maior produção de intermediários da via glicolítica também favorece a intensificação da via das pentoses fosfato, responsável pela produção de ribose, precursor de nucleotídeos (DeBerardinis *et al.* 2008). O acúmulo de lactato no ambiente tumoral também é favorável ao desenvolvimento do tumor, pois auxilia a migração celular (Goetze *et al.* 2011) e permite nutrição do tumor através de angiogênese (Shi *et al.* 2001).

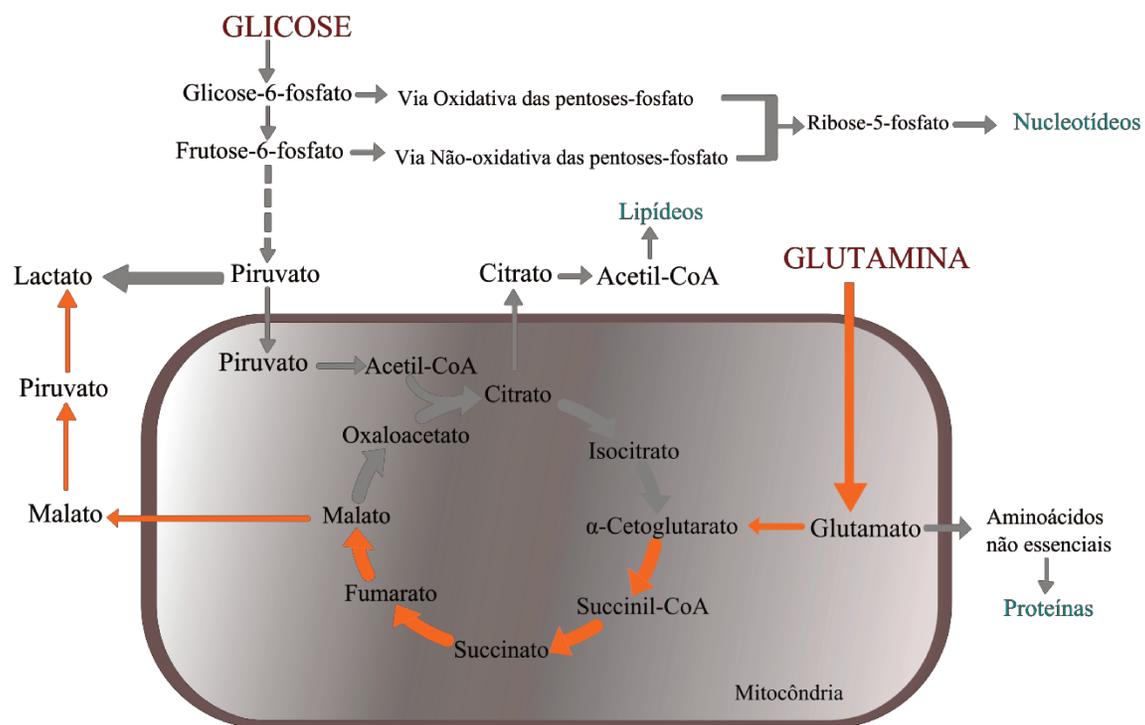


Figura 1: Metabolismo da glicose e glutamina suprem a proliferação celular. No citosol ocorre a glicólise aeróbica, que suprirá a necessidade energética e a síntese de nucleotídeos através da via das pentoses-fosfato. Devido a menor entrada de piruvato glicolítico, ocorre nas células tumorais um truncamento do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA). Intermediários do TCA são, então, repostos a partir do catabolismo de glutamina. Seta descontínua demonstra que a via glicolítica não está totalmente representada, e setas em laranja indicam o caminho definido como glutaminólise. Adaptado de Deberardinis *et al.* 2007.

Como resultado do Efeito Warburg, pouco piruvato glicolítico é direcionado para alimentar o Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA). Este ciclo é vital e indispensável por

gerar os precursores biossintéticos, principalmente para células com alta taxa mitótica como tumores que necessitam de intensa produção de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Por isto, células cancerosas apresentam um aumento de consumo de glutamina como rota alternativa para repor os intermediários do TCA (Deberardinis *et al.* 2007).

Em condições de normóxia, concomitante a glicólise anaeróbia, a bioenergética de células proliferativas conta ainda com o metabolismo oxidativo da glutamina (glutaminólise) (Wise *et al.* 2011 e Scott *et al.* 2011). A glutaminólise é caracterizada pela oxidação no ciclo do TCA do α -cetoglutarato gerado do corpo carbônico da glutamina, culminando na produção de malato que é convertido a piruvato (Figura 1). O piruvato, por sua vez, é metabolizado a lactato (Deberardinis *et al.* 2007). Nesta via ocorre intensa síntese de poder redutor na forma de NADPH, que é requerido para a lipogênese. Ao suprir a necessidade anaplerótica do TCA, a glutaminólise também propicia concentrações de oxaloacetato necessárias para a síntese de aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos (Deberardinis *et al.* 2007).

Como não são todos os tipos de tumores que apresentam metabolismo glutaminolítico, especula-se que a glutaminólise não seja um evento ocasionado pela transformação celular, mas uma consequência da presença de um oncogene específico (Wise *et al.* 2008). A expressão dos genes necessários para glutaminólise é coordenada pelo oncogene Myc, o mesmo oncogene capaz de regular glicólise aeróbica (C. V Dang *et al.* 2009).

Outros oncogenes podem mediar a reprogramação metabólica do consumo de glutamina. Células tumorais com hiperativação de Rho GTPases exibem elevado nível de atividade de glutaminase (Wang *et al.* 2010). A inibição do oncogene K-Ras em linhagens de carcinoma humano aumentou a atividade glicolítica e a utilização de glutamina como fonte anabólica (Gaglio *et al.* 2011). Destoando da glutaminólise, células de câncer pancreático PDAC estabelecem uma rota distinta de consumo da glutamina, regulada por K-Ras (Son, C. A. Lyssiotis, *et al.* 2013). *Knockdown* de glutaminase afetou a proliferação celular, e surpreendentemente, apenas glutamato (e não α -cetoglutarato) foi capaz de resgatar essas células. O caminho da glutamina nessas células (Figura 2-A) é caracterizado pela produção de aspartato na mitocôndria. O aspartato pode ser produzido pela conversão de glutamato a α -cetoglutarato (que ao intersectar o ciclo do TCA culmina na produção de

oxaloacetato), ou pode ser produzido pela aspartato transaminase mitocondrial GOT2, que doa o grupamento amina do glutamato para o oxaloacetato, produzindo o aspartato. A segunda opção é aparentemente a via mais importante, pois *knockdown* de GOT2 afetou o crescimento de PDAC e levou a diminuição de aspartato derivado de glutamina. O aspartato produzido é transportado para o citosol, onde será convertido a piruvato com produção de NADH, mantendo o balanço redox das células. É importante ressaltar que o perfil metabólico tumoral não depende apenas do oncogene expresso, mas também do tecido de origem (Yuneva *et al.* 2012).

Células altamente proliferativas, quando em hipóxia, podem optar por uma via alternativa de metabolismo da glutamina. Na ausência de oxigênio, essas células incorporam grande parte do carbono da glutamina na forma de isocitrato, a partir da redução do α -cetoglutarato. Por este motivo, caracterizou-se esse mecanismo como metabolismo redutivo da glutamina (Wise *et al.* 2011, Scott *et al.* 2011 e Metallo *et al.* 2012).

As células tumorais utilizam a atividade reversa da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) (Siebert *et al.* 1956 e Roche 1948) para a conversão de α -cetoglutarato em isocitrato (Figura 2-B), que pode então, através de sua posterior redução em citrato, servir de substrato para a produção de lipídeos. São conhecidas três isoformas de IDH em mamíferos, codificadas por diferentes genes. A isoforma citosólica é denominada IDH1, e é dependente de NADP⁺, assim como a isoforma mitocondrial IDH2. A terceira isoforma IDH3 também é mitocondrial, porém dependente de NAD⁺ (Metallo *et al.* 2012). IDH3 é um complexo multienzimático que faz parte do ciclo do TCA, uma vez que produz NADH para a geração de energia. A reação catalisada por esta isoforma é irreversível, além de esta enzima sofrer inibição alostérica pelo excesso de α -cetoglutarato (Reitman & Yan 2010). A catálise reversível é realizada pelas outras duas isoformas, IDH1 e IDH2. Portanto, células altamente proliferativas fazem uso dessas duas isoformas para reduzir α -cetoglutarato em isocitrato.

Vários estudos relacionam mutações das isoformas IDH1 e IDH2 com a formação do oncometabólito 2-hidroxiglutarato (2HG). Essas mutações ocasionam uma reorganização do sítio ativo da enzima de forma a favorecer a redução de α -cetoglutarato (também denominado 2-oxaloglutarato) para 2-HG (Roche 1948, Ward *et al.* 2010,

Reitman & Yan 2010, L. Dang *et al.* 2009 e Yan *et al.* 2009). Este composto é caracterizado como oncometabólito pela sua capacidade de regular características epigenéticas de células tumorais, como a regulação da metilação de histonas, interferindo assim na estrutura da cromatina (Chowdhury *et al.* 2011 e Sasaki *et al.* 2012). Em células altamente proliferativas, como as células tumorais, além de fonte de carbono para a biossíntese de macromoléculas, aparentemente o metabolismo da glutamina proporciona a estas células um sofisticado mecanismo de regulação do padrão de metilação do DNA, conferindo a capacidade de controlar a expressão gênica.

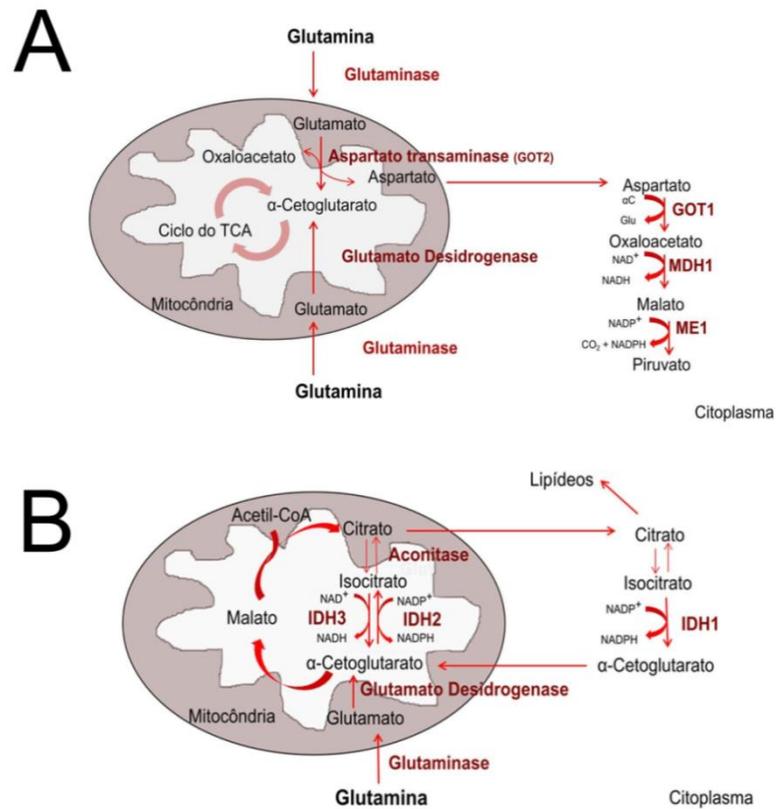


Figura 2: Esquema representativo do metabolismo da glutamina em células proliferativas. Em (A), aspartato é derivado de glutamina e transportado para o citosol para ser convertido em oxaloaceto, que por sua vez será utilizado para produção de piruvato. Em (B), células proliferativas em hipóxia reprogramam o uso do esqueleto carbônico da glutamina para a produção de lipídeos, através do metabolismo redutivo. Adaptado de Son, J. *et al.* 2013 e Ward *et al.* 2010. GOT1 se refere a aspartato transaminase, MDH1 a malato desidrogenase e ME1 é a sigla para enzima málica.

Persisti a discussão científica sobre a localização celular onde ocorre a carboxilação redutiva, se no citosol ou na mitocôndria, conseqüente do desconhecimento da isoforma responsável pelo processo. Porém, recentemente, se estabeleceram as condições fisiológicas que controlam o metabolismo da glutamina. A preferência celular pela redução ocorre sempre que a proporção de α -cetoglutarato por citrato está elevada (Fendt *et al.* 2013). Níveis elevados de citrato foram obtidos ao suplementar com acetato células que consomem glutamina pelo caminho redutivo. A diminuição da razão α -cetoglutarato/citrato reverteu o fenótipo para consumo oxidativo.

1.2 Glutamina exerce papéis importantes para a célula

A glutamina é um aminoácido tradicionalmente visto como não essencial, cuja função primária é a de armazenamento de nitrogênio nos músculos e principal transportador de nitrogênio entre os órgãos. Mamíferos podem sintetizar glutamina em diversos tecidos, porém, durante períodos de rápido crescimento ou de doenças, onde a demanda por esse aminoácido excede a sua disponibilidade, torna-se, nesse contexto, um aminoácido essencial (DeBerardinis & Cheng 2010).

A glutamina exerce papéis importantes na célula: 1) junto à alanina é responsável pelo transporte de nitrogênio entre tecidos; 2) por participar da formação de GSH atua na manutenção do balanço redox celular; 3) como já descrito, atua como fonte de intermediários biossintéticos; 4) é fonte de energia e 5) é requerida para a captação de aminoácidos essenciais e ativação de mTORC1. A estimulação da mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) age na regulação do crescimento, mobilidade e sobrevivência celular, além de atuar no processo de transcrição e síntese de proteínas através mediação de vias de sinalização (Wullschleger *et al.* 2006).

O destino metabólico do γ -nitrogênio da glutamina segue para a biossíntese de nucleotídeos e de hexosaminas. Nesse caso, é precursora direta da síntese tanto de anéis purínicos como pirimidínicos. Os γ -nitrogênios de duas moléculas de glutamina são utilizados para produzir um anel purínico e um terceiro é utilizado na conversão de xantina monofosfato a guanosina monofosfato. Na formação de anéis pirimidínicos é utilizado um nitrogênio do grupo amino da glutamina e um do aspartato, e outro nitrogênio proveniente de um grupo amino é adicionado à uridina trifosfato para formar citidina trifosfato

(DeBerardinis & Cheng 2010). Uma segunda via faz uso do α -nitrogênio e/ou do esqueleto carbônico (Figura 3). Esses grupos químicos contribuem para a síntese de aminoácidos não-essenciais, como aspartato e alanina, e agentes antioxidantes, como a glutathiona (GSH). Adicionalmente, o metabolismo oxidativo da glutamina contribui para a geração de combustível respiratório através da sua catálise no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A oxidação do esqueleto carbônico desse aminoácido dentro da mitocôndria é uma das principais fontes de energia em linfócitos, enterócitos, fibroblastos e diversas linhagens tumorais (Chem *et al.* 1979).

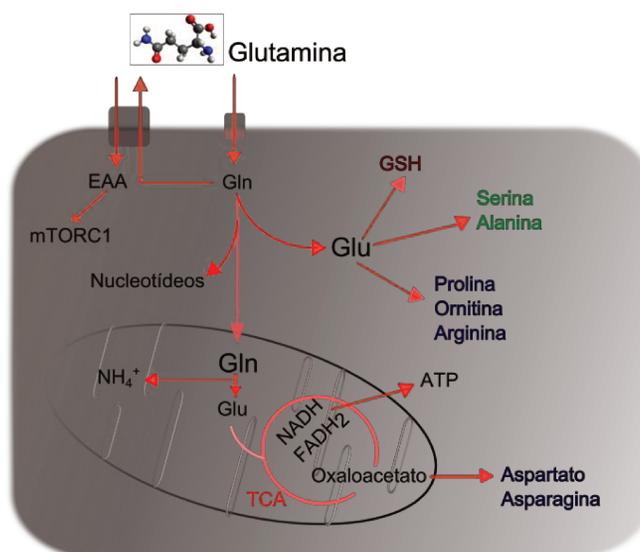


Figura 3: Principais funções celulares da glutamina. A glutamina é importante no transporte de aminoácidos essenciais (EAA), que ativam mTORC1. O γ -nitrogênio da glutamina vai para a biossíntese de nucleotídeos. O α -nitrogênio e/ou do esqueleto carbônico na forma de glutamato contribuem para a síntese de aminoácidos não-essenciais. Em verde estão os aminoácidos formados com α -nitrogênio, e em azul aminoácidos que adicionalmente são originados do esqueleto carbônico. Agentes antioxidantes, como a glutathiona (GSH), também requerem glutamato para sua produção. A glutamina é de total importância para a anaplerose do Ciclo do Ácido Cítrico (TCA). A formação de α -cetoglutarato durante a reação de glutaminólise contribui para a reposição dos intermediários do TCA e formação de NADH e FADH₂, que serão poder redutor para a produção de energia na forma de ATP. O íon amônio produzido é indutor de autofagia. Gln: glutamina, Glu: Glutamato. Adaptado de Wise & Thompson 2010 e Dayer & Wellen 2012.

Um ponto importante é a necessidade celular do aminoácido glutamato. Apesar de, como mencionado acima, a glutamina ser um nutriente abundante, o glutamato não o é. A

produção deste é catalisada pelas **glutaminases** e gera, pela quebra hidrolítica da cadeia lateral da glutamina, glutamato e mais um íon amônio. Glutamato é então processado em α -cetoglutarato, que servirá como fonte de carbono para manter as reações oxidativas e redutivas do metabolismo da glutamina. O íon amônio produzido é importante para indução de autofagia celular (Cheong *et al.* 2011).

1.3 Organização genômica e análise sequencial de Glutaminases

As glutaminases (EC 3.5.1.2) catalisam a hidrólise da glutamina em glutamato e amônia. O modelo atual diz que as glutaminases de mamíferos estão associadas à membrana mitocondrial (McGivan *et al.* 1980), em transição de estado oligomérico induzida pela presença de íons fosfato, de dímero inativo para tetrâmero ativo (Morehouse & Curthoys 1981 e Godfrey *et al.* 1977).

Em humanos, as isoformas de glutaminases são codificadas por dois genes, localizados em cromossomos diferentes (Aledo *et al.* 2000). O gene *GLS1*, constituído de 19 éxons e presente no cromossomo 2 (Kenny *et al.* 2003), codifica para duas isoformas produzidas por splicing alternativo, denominadas KGA e GAC (Porter *et al.* 2002). *Kidney-type* glutaminase (KGA) é expressa no cérebro, rins, intestino e em células do sistema imune (Elgadi *et al.* 1999 e Gómez-Fabre *et al.* 2000). A Glutaminase C (ou GAC) é comumente encontrada em coração, pâncreas, e pulmão, assim como em tecidos tumorais (Gómez-Fabre *et al.* 2000), e sua expressão é feita por regulação pós transcricional controlada pelo oncogene Myc (Gao *et al.* 2009). Contém a sequência que codifica para os éxons 1-15, enquanto a KGA é formada pelos éxons 1-14 acrescido do 16-19. Compartilham completa identidade sequencial desde o N-terminal até o fim do domínio glutaminase, com identidade da porção C-terminal de apenas 12%. Ao final deste documento, na página 81, apresentamos um alinhamento entra a GAC de *Mus musculus* e a KGA de *Rattus norvegicus*, que são as proteínas utilizadas durante este trabalho para a purificação heteróloga, comparando essas sequências com suas respectivas sequências de humano.

O gene *GLS2*, presente no cromossomo 12 (Kenny *et al.* 2003), consiste em 18 éxons e codificam para a enzima LGA, ou *Liver-type* Glutaminase. Originalmente identificada no fígado, LGA também é encontrada em tecidos cerebrais e no pâncreas

(Gómez-Fabre *et al.* 2000). O gene *GLS2* está suprimido em tumores com perda de função para o regulador transcricional p53 (Suzuki *et al.* 2010). Além disso, a LGA é independente de ativação por fosfato e não é inibida pelo acúmulo do produto final de catálise, o glutamato (Campos-Sandoval *et al.* 2007). Isto a diferencia das demais isoformas (KGA e GAC), que são ativadas por fosfato e inibidas por glutamato. Mesmo codificadas por genes distintos, as sequências de nucleotídeos que codificam para as isoenzimas KGA e LGA são diferentes somente no éxon inicial e nos que procedem ao sítio catalítico (éxons 16 ao 19 em KGA e 16 ao 18 em LGA) (Porter *et al.* 2002). O éxon 18 da LGA possui o menor índice de similaridade entre as duas isoenzimas (29.4%) (Márquez *et al.* 2006).

Na Figura 4 encontramos uma representação esquemática da organização estrutural das três isoenzimas. Apesar de sua atuação enzimática, essas proteínas possuem, tanto na porção N- como na C-terminal, algumas sequências consenso de motivos e domínios que sugerem o envolvimento dessas proteínas em outras funções celulares. Por exemplo, na região N-terminal das mesmas foi identificada uma sequência de cinco aminoácidos do tipo LXXLL (Heery *et al.* 1997), também chamada de NRbox (*Nuclear Receptor box*), encontrada em proteínas que regulam o funcionamento de receptores nucleares, levantando a hipótese de que estes segmentos estejam envolvidos na associação das glutaminases com receptores nucleares. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a localização de LGA no núcleo em algumas células (Olalla *et al.* 2002), e resultados do nosso laboratório mostrarem que o mesmo ocorre para a KGA na linhagem de células de tumor de mama SKBR3, o receptor alvo (caso exista), ou o mecanismo pelo qual KGA e LGA são direcionadas para este compartimento permanecem desconhecidos.

Repetições de domínio conhecido como *ankyrin* são encontradas na região C-terminal da KGA e LGA, adjacente ao domínio catalítico. Repetições de *ankyrin* tipicamente medeiam interações proteína: proteína e são um dos motivos mais comuns para tal função. Essas repetições são bastante frequentes em proteínas que regulam ciclo o celular, o transporte de íons, a transmissão de sinais e a transcrição (Li *et al.* 2006).

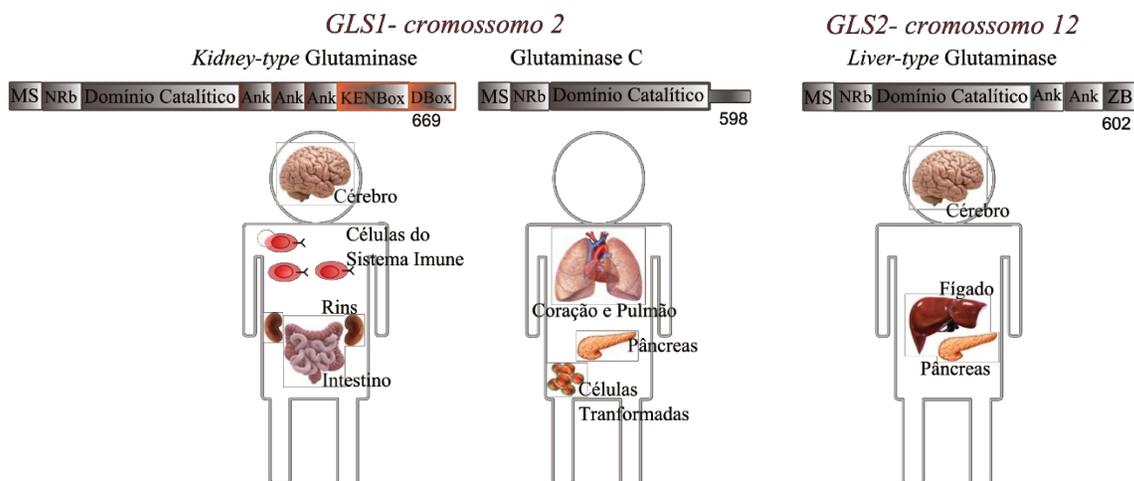


Figura 4: Organização estrutural das isoenzimas das glutaminases e o perfil de expressão tecido específico. Em comum, as três proteínas possuem o sinal de localização mitocondrial (MS), o domínio catalítico Glutaminase (identidade sequencial de 80%), além de um motivo NRbox. KGA e LGA ainda possuem prováveis domínios *ankyrin*. Não há predição de motivos para região C-terminal da GAC, enquanto KGA apresentaria motivos KENbox e Dbox, e LGA um domínio PDZ. O peptídeo sinal MS é clivado após as isoenzimas serem direcionadas para a mitocôndria. Adaptado de Márquez *et al.* 2006.

LGA e KGA contém sequências KEN, essenciais para o motivo KENbox (Pfleger & Kirschner 2000). Este motivo é uma região de interação com complexos de ubiquitinas ligases que sinalizam para degradação protéica. Porém, este motivo só foi comprovado como funcional para a KGA (Colombo *et al.* 2010), devido a presença de um motivo Dbox próximo (sequência desses motivos estão descritas em Moncada *et al.* 2012). O reconhecimento pela ubiquitina ligase requer o KEN e o Dbox, sendo apenas o KENbox insuficiente (Colombo *et al.* 2011). Sugere-se que a expressão de KGA seja regulada durante o ciclo celular por ubiquitinação, com expressão estabilizada na fase G1, permitindo proliferação e aumento da biomassa celular neste período. Adiantando o tópico seguinte, a GAC é a isoforma de atividade glutaminolítica essencial para células tumorais, e a notável ausência desses motivos de reconhecimento de ubiquitinas torna-a ainda mais atraente para células cancerosas.

1.4 Relevância da Glutaminase C para células tumorais

Discutimos até aqui sobre a importância das glutaminases para células altamente proliferativas (como as células tumorais) e a implicação do metabolismo da glutamina na

construção de blocos biossintéticos para manutenção da ocorrência de mitose. Também detalhamos sobre as isoformas de glutaminases e suas diferenças sequenciais. Todo o discurso acima nos concede argumentos para entender o interesse da comunidade científica em compreender o mecanismo de ação das glutaminases no processo de transformação tumoral.

Um trabalho de 2010, no qual o orientador deste trabalho é co-autor junto com o grupo do Dr. Richard Cerione (Cornell, USA), mostrou a correlação entre a via de sinalização das *small* GTPases da família das Rho (RhoC, Rac e CDC42) e a atividade da enzima glutaminase. As Rho GTPases estão relacionadas a atividades importantes para a oncogênese. Neste trabalho, foi mostrado que um composto, chamado 968, bloqueia a habilidade de Rho superativadas de induzir transformação celular e formação de tumor em ratos (Wang *et al.* 2010). Além disso, o trabalho mostrou que o uso do composto 968 complexado com biotina e imobilizado em resina de agarose com streptavidina levaram a identificação da isoforma GAC como alvo de ação do mesmo. Outro dado interessante foi que a transfecção de células NIH3T3 com expressão estável de CDC42(F28L) (uma GTPase *fast-cycler* constitutivamente ativada) com GAC, e não KGA, levou à um aumento significativo na capacidade destas células de formar focos de proliferação. O indício de que a Glutaminase C seria a isoforma chave para o metabolismo da glutamina e para a tumorigênese foi a motivação para outro trabalho com enfoque estrutural e bioquímico desta enzima (Cassago *et al.* 2012), realizado pelo grupo de pesquisa do qual faço parte.

Para estudar o nível de expressão das isoformas de glutaminase, foram feitas análises de imunohistoquímica. Esta análise não foi realizada para a LGA, pois já constava na literatura que tumores de próstata e mama apresentavam baixo nível de mRNA de LGA quando comparados a células normais (Suzuki *et al.* 2010 e Hu *et al.* 2010). Notamos que o nível protéico tanto da KGA como da GAC estavam aumentados em tumores de mama, e que este aumento se correlacionava positivamente com a malignidade e grau do tumor (Cassago *et al.* 2012).

Apesar de ambas as isoformas KGA e GAC apresentarem altos níveis protéicos, por *immunoblotting* com anticorpo específico para cada isoforma, verificamos que em células tumorais de mama, próstata e pulmão, somente a GAC estava localizada na mitocôndria (Cassago *et al.* 2012). Este resultado corrobora com a análise de imunofluorescência de

linhagem de células de tumor de mama SKBR3, cujo GAC se apresenta novamente na mitocôndria e a KGA se localiza no citosol (Cassago *et al.* 2012).

Após averiguar a diferença de nível de expressão e de localização celular entre as isoformas de glutaminase, procedeu-se a caracterização cinética das isoformas na ausência e na presença do ativador fosfato, usando enzimas heterólogas e purificadas. Nossos resultados apontam que a GAC é a enzima com maior eficiência catalítica e que a diferença na eficiência das isoformas se torna notável a medida que se aumenta a concentração de fosfato (Cassago *et al.* 2012). Esta diferença acentuada nas concentrações mais altas de fosfato é particularmente interessante por haver evidências de que os níveis mitocondriais de fosfato inorgânico são aumentados em hipóxia, situação à qual as células tumorais são frequentemente expostas (Gorman *et al.* 1997). Estas informações levantam a hipótese de que, enquanto a GAC seria a enzima glutaminolítica mitocondrial responsável pela sustentação do fenótipo proliferativo tumoral, a KGA pode ter funções diversas na célula.

Justificado nosso interesse pela GAC, no mesmo artigo apresentamos a estrutura cristalográfica desta enzima em três diferentes estados: livre de ligante, na presença do ativador fosfato e na presença do produto L-glutamato. Em todas as estruturas percebemos um *loop* desordenado de seis resíduos próximo ao sítio ativo, o qual designamos “*gating loop*” (L₃₂₁RFNKL₃₂₆, de acordo com a sequência referência do NCBI NP_001106854.1). A tradução da denominação é dada como *loop* portão, remetendo a nossa hipótese inicial de que este *loop* seria a região responsável por abrir ou fechar o sítio ativo. Apresentamos na figura 5 a estrutura cristalográfica da GAC livre de ligantes (PDB 3ss3), contendo um tetrâmero na unidade assimétrica e evidenciando a região do *gating loop*.

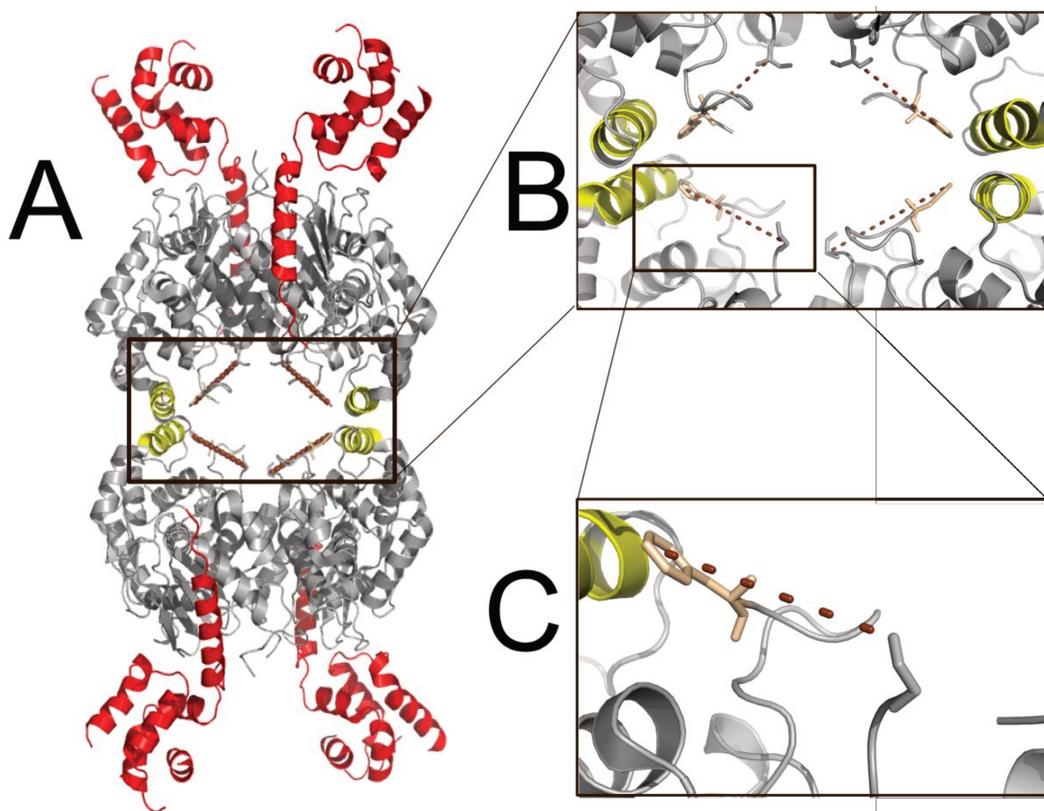


Figura 5: Estrutura cristalográfica da GAC sem ligante. O tetramero da unidade assimétrica (A) está representado pela região N-terminal em vermelho e pelo domínio catalítico em cinza (com a região da interface de tetramerização em amarelo). A porção C-terminal estava desordenada na estrutura apresentada. Próximo ao sítio ativo da enzima (B) é possível observar uma região desordenada, que de acordo com a sequência da proteína consiste num *loop* de seis resíduos (L₃₂₁RFNKL₃₂₆). Esta região desordenada foi denominada de *gating loop*, e é evidenciada em (C) pela linha marrom pontilhada entre os resíduos F327 (rosa) e G320.

O sítio ativo da enzima se mostrou eletropositivo e o fosfato se ligou a mesma região do sítio catalítico que o glutamato (Cassago *et al.* 2012). Aparentemente, o fosfato compete com o glutamato pelas mesmas interações, liberando a enzima da inibição pelo produto (Kenny *et al.* 2003) e explicando o aumento no k_{cat} induzido por fosfato. Ensaios de atividade sem fosfato realizados com a GAC e KGA, aumentando apenas a concentração de enzima, levaram a uma diminuição do K_m , menos significativa no valor de K_m da a KGA. Estudos de filtração em gel mostraram que somente o aumento da concentração protéica é suficiente para deslocar as isoformas para formas maiores que dímeros, com a KGA tendo uma tendência menor a se oligomerizar. Desta maneira traçamos um paralelo

entre a atividade enzimática e a capacidade de oligomerização. Porém, verificamos que o aumento da concentração de proteína não interferiu na eficiência catalítica das mesmas, o que somente aconteceu na presença de fosfato, o qual aumentou a taxa de *turnover* da enzima. Especulamos que o fosfato é importante para a liberação da enzima da repressão causada pelo produto glutamato, dado que ambos competem pelos mesmos resíduos, conforme verificado em estruturas cristalográficas obtidas (Cassago *et al.* 2012).

A partir dos dados gerados pela estrutura cristalográfica, selecionamos alguns resíduos para realizar mutações sítio-dirigidas e em seguida, realizamos ensaios cinéticos com estes mutantes. Uma mutação pontual na região de tetramerização, correspondendo ao mutante GAC.F394S, quebrou o tetrâmero em dímeros, mesmo na presença de altas concentrações de fosfato (Cassago *et al.* 2012). A baixa eficiência catalítica deste mutante reforça a importância da tetramerização para a ativação desta proteína.

Para averiguar se o “*gating loop*” teria alguma influência na atividade da enzima, devido a sua proximidade ao sítio ativo, foi realizada uma mutação pontual no primeiro resíduo ordenado após este *loop* (GAC.F327S). Este mutante surpreendentemente apresentou uma eficiência catalítica alta, confirmando que de alguma forma esta região é essencial para a ação da enzima (Cassago *et al.* 2012). Por isso, neste trabalho, exploramos mais a fundo o mecanismo de ativação da enzima glutaminase relacionado com o “*gating loop*”.

No artigo publicado por nosso grupo (Cassago *et al.* 2012) mostramos que deleção da região C-terminal da GAC (resíduo R539 à S603), compreendendo resíduos em comum com a KGA (R539 a R555), promoveu a dissociação do tetrâmero e perda de atividade da enzima. Com esta deleção havíamos concluído que, apesar da interface de tetramerização compreender somente o domínio catalítico, a sequência deletada da GAC seria importante para a estabilidade do oligômero e consequentemente sua atividade (Cassago *et al.* 2012). Estudos posteriores mostraram que, de fato, a deleção envolveu resíduos da interface dimérica de maneira que a mesma levou à dissociação da proteína em dímeros, o que de certo foi responsável pela perda de atividade da mesma. Refizemos a deleção de um fragmento menor que compreenda somente o C-terminal da GAC (resíduos H556 a S603, exclusivos da GAC), e avaliamos se esta porção é chave para a atividade diferenciada da GAC em relação à KGA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Entender a natureza molecular das diferenças cinéticas observadas entre as isoformas GAC e KGA assim como aprofundar no conhecimento do seu mecanismo de ativação.

2.2 Objetivos específicos

- Expressão em sistema heterólogo e purificação até a homogeneidade das isoformas m(*mouse*)GAC (L128-S603) e r(*rat*)KGA (M128-L674) e seus mutantes.
- Construção da mGAC com deleção do C-terminal (H556-S603) e mutações sítio-dirigidas dos aminoácidos R322A, N324A, e K325A do “*gating loop*”, e dos aminoácidos próximos R392S e E330A. Mutação de mimético de acetilação K316Q.
- Ensaio de atividade do mutante deletional GAC.H556 e dos diferentes mutantes pontuais.
- Caracterizar a capacidade de oligomerização dos mutantes pontuais através de ensaios de diluição seriada.
- Curva de dose-resposta da inibição por BPTES da GAC e da GAC.K325A.
- Análise da capacidade de formação de estruturas fibrilares pelas diferentes isoformas de glutaminases e pelos mutantes pontuais GAC.K325A e GAC.R322A por microscopia eletrônica de transmissão (*negative staining*).
- Estabelecimento das constantes de dissociação aparente (K_{d-app}) da KGA e GAC pela técnica de anisotropia de fluorescência.
- Descrever o mecanismo de formação das estruturas filamentosas, e confirmar a importância dos resíduos envolvidos através de mutagênese, ensaios de cinética enzimática e diluição seriada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem e expressão heteróloga

O cDNA da isoenzima *Kidney-type* glutaminase de *Rattus norvegicus* (Δ 1-128), clonado em vetor pET15b (Novagen) para expressão heteróloga em sistema bacteriano foi gentilmente cedido pelo laboratório do Dr. Norman Curthoys, da Universidade do Colorado, nos Estados Unidos. O cDNA da isoenzima Glutaminase C de *Mus musculus* (Δ 1-128) foi clonado em vetor pET28a (Novagen) pelo orientador deste projeto. Por motivos de solubilidade e estabilidade da proteína em *E. coli*, os primeiros 128 resíduos de aminoácidos foram removidos das construções (Kenny *et al.* 2003).

Para propagação e estoque das construções usadas, plasmídeos contendo a sequência codificadora foram transformados por choque térmico em bactérias *E. coli* TOP10 (Novagen) quimicamente competentes. Para superexpressão heteróloga controlada da proteína recombinante de interesse, esses plasmídeos foram transformados por choque térmico em bactérias *E. coli* da cepa Rosetta-2 (Novagen).

A expressão em larga escala das isoformas recombinantes foi feita inoculando 6 mL de pré-inóculo em cada 1 L de meio LB complementados de antibiótico de seleção, seguida pelo crescimento das bactérias sob agitação a 37 °C, por 5 horas. Após esse tempo, a cultura de bactéria foi resfriada a 18 °C. Para indução da expressão foram adicionados 0,2 mM de IPTG. As culturas ficaram sob agitação, entre 12 e 14 horas. Para armazenamento a -80 °C, a massa celular resultante foi centrifugada e congelada em nitrogênio líquido.

3.2 Purificação das proteínas recombinantes

Para se iniciar o processo de purificação, as células foram descongeladas e ressuspensas em tampão de solubilização de acordo com a tabela 1. A lise das bactérias foram feitas adicionando ao extrato 120 mg de lisozima, 60 mg de DOC (ácido deoxicólico) e 3 mg de DNase por litro de cultura. As células foram mantidas em banho de gelo por uma hora. A amostra foi centrifugada a 39000 g, por 50 minutos, a 4 °C (Centrifuga SORVALL RC6+, rotor F10S-6x500y). Sob tais condições, as proteínas recombinantes estavam solúveis no sobrenadante utilizado nas etapas de purificação.

O protocolo de purificação a ser descrito apresenta uma combinação de técnicas cromatográficas que explorou diferentes propriedades físico-químicas da proteína alvo visando isolá-la das demais (ver tabela de anexos 1, página 59). Todo o processo de purificação foi realizado a 4°C, por questões de estabilidade das proteínas. Os passos de purificação foram os mesmos para qualquer construção, variando apenas os tampões, descritos na tabela abaixo:

Tabela 1: Tampões de purificação das proteínas heterólogas mGAC e rKGA.

Tampão de Ressuspensão
Tris-Base 50 mM pH 8,5 contendo 500 mM NaCl, 10% glicerol, 2 mM β -mercaptoetanol e 1 mM PMSF
Tampão de Afinidade
Tris-Base 50 mM pH 8,5 contendo 10 mM de NaCl
Tampão de Troca Iônica A
Tris-Base 50 mM pH 8,5 acrescido de 10 mM NaCl e 2 mM de DTT
Tampão de Troca Iônica B
Tris-Base 50 mM pH 8,5 acrescido de 1 M NaCl e 2 mM de DTT
Tampão de Gel Filtração
Tris-Base 30 mM pH 8,5 contendo 0,5 M de NaCl e 0,5 mM de TCEP.

O primeiro passo de purificação foi a cromatografia por afinidade a metais imobilizados. A proteína recombinante apresenta em sua região amino-terminal uma sequência artificial composta por seis resíduos de histidina consecutivos, que interagem com metais divalentes. Para este procedimento, utilizamos a resina TALON (Clontech) que apresenta íons de cobalto ligados à matriz da resina. A cauda se liga ao cobalto, e assim toda a proteína recombinante fica seletivamente imobilizada na resina. Utilizamos 1,5 mL da resina de afinidade por litro de cultura, previamente equilibrada com cinco vezes o volume de resina de um tampão de afinidade (ver tabela 1). O extrato celular solúvel foi então aplicado na resina. Em seguida, a resina foi lavada extensivamente com o mesmo tampão de afinidade, acrescido de 2 mM de β -mercaptoetanol. Em teoria, qualquer componente do extrato celular que não estiver ligado à resina deveria ser eliminado nesta

etapa. Também foram feitas lavagens com baixas concentrações de imidazol (5 mM e 20 mM) para retirar tudo que interage inespecificamente. A proteína foi eluída da resina através da adição de 320 mM de imidazol ao tampão de afinidade com 2 mM de β -mercaptoetanol. O imidazol é uma molécula semelhante ao radical da cadeia lateral da histidina, e que em grandes quantidades é capaz de competir com o aminoácido por interações com o cobalto e assim promover o desligamento da proteína da resina. O eluato da afinidade ficou incubado com 60 unidades de Trombina (Sigma Aldrich), por 16 horas a 4°C para a remoção da cauda de poli-histidina

Um segundo passo de purificação foi realizado explorando a carga líquida negativa das proteínas na solução de eluição da afinidade, situação ideal para interação com uma resina de troca aniônica (propriedades de ponto isoelétrico das enzimas em tabela de anexos 1, página 59). Para tanto, utilizamos uma coluna do tipo Mono-Q HR 5/50 (GE Healthcare), que é constituída por uma matriz porosa carregada positivamente. Esta cromatografia líquida foi realizada em sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare), sob um fluxo de 1 mL/min. Inicialmente, a resina foi equilibrada com cinco vezes o seu volume com o tampão de Troca Iônica A. Apenas para a deleção GAC.DeIC, devido a alteração de pI, o tampão de troca iônica usado tinha pH igual a 9. Antes de ser aplicada, a amostra foi centrifugada a 3200g por 10 minutos para evitar particulados. Posteriormente à injeção da amostra, a coluna foi lavada com gradiente salino crescente e linear, para remoção de contaminantes presos por interações inespecíficas e a subsequente eluição da proteína. O sal se dissocia em íons, e assim, a eluição foi feita pela competição dos íons Cl^- com a proteína pela ligação a resina. Este gradiente iniciou-se com 10 mM de NaCl e terminou na concentração de 1M. Este gradiente é gerado pelo próprio FPLC, misturando o tampão de Troca Iônica A com o tampão de Troca Iônica B.

Para garantir características como alto grau de pureza e homogeneidade de estado oligomérico, foi feita gel filtração para exclusão por tamanho. Usamos a coluna Superdex 200 10/30 (GE Healthcare), que possui capacidade de separar proteínas entre 10 e 600 kDa. Esta cromatografia líquida também foi feita em sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare), sob um fluxo de 0,5 mL/min, em tampão de Gel Filtração.

3.3 Mutações pontuais

Com o objetivo de se estudar a importância do “*gating loop*” (L₃₂₁RFNKL₃₂₆) da GAC, foram feitas mutações pontuais nesta região (R322A, N324A, K325A) e em regiões indicadas como importantes na modelagem da estrutura cristalográfica da mGAC (R392S e E330A). Também foi realizada a mutação pontual K316Q, para verificar o papel da acetilação *in vivo* desta lisina. Após uma análise de *cross-linking* da GAC, as lisinas identificadas como envolvidas na formação de fibra foram substituídas por um glutamato, que possui carga oposta (K202E, K207E, K512E). Na figura 6 são representadas todas as mutações pontuais feitas no tetrâmero da GAC. Todas essas mutações foram feitas utilizando o *Kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis*, usando os primers listados na tabela 2.

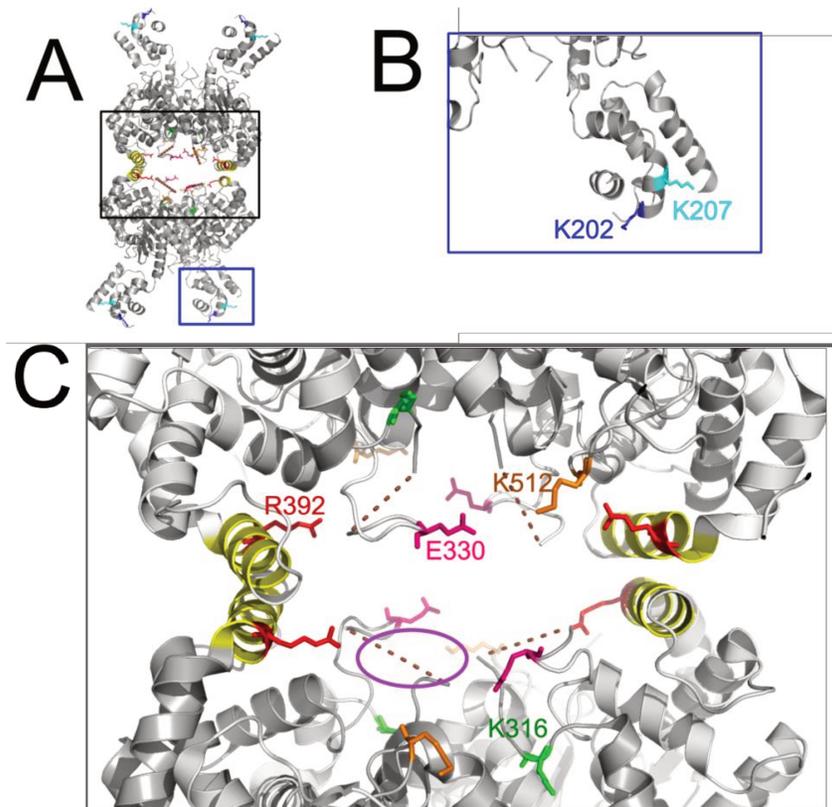


Figura 6: Resíduos substituídos na Glutaminase C. Em (A) estão delimitadas as regiões de mutagênese. Em (B) apresentamos os resíduos substituídos da porção N-terminal: K202 e K207. Em (C) apresentamos as os resíduos mutados do sítio catalítico E330, K316, R392 e K512. O *gating loop* corresponde à região circulado em roxo, e abrange os resíduos mutados R322, N324 e K325 (representados pela linha pontilhada por estarem desordenados na estrutura cristalográfica).

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas mutagêneses da mGAC.

Oligos	Sequência
mGAC.F316Q.F	5'-TACATCGCTATGTTGGGCAGGAGCCAAGTGGATTA-3'
mGAC.F316Q.R	5'-TAATCCACTTGGCTCCTGCCAACATAGCGATGTA-3'
mGAC.F392S.F	5'-AACGAGAAAGTGGAGATAGCAATTTT-3'
mGAC.F392S.R	5'-TATCCTATTGCAAAATTGCTATCTCCA-3'
mGAC.N324A.F	5'-AGTGGATTAAGATTCGCCAAACTCTTTTTGAAT-3'
mGAC.N324A.R	5'-ATTCAAAAAGAGTTTGGCGAATCTTAATCCACT-3'
mGAC.R322A.F	5'-AGGAGCCAAGTGGATTAGCATTCAAC-3'
mGAC.R322A.R	5'-AAAGAGTTTGTGTAATGCTAATCCACT-3'
mGAC.K325A.F	5'-GTGGATTAAGATTCACACTCTTTT-3'
mGAC.K325A.R	5'-TTCATTCAAAAAGAGTGC GTTGA ACTC-3'
mGAC.K202E.F	5'-GTGTCATGCTAGCAGAAGATCTTTTTAAAA-3'
mGAC.K202E.R	5'-TTTTAAAAAGATCTTCGTCTAGCATGACAC-3'
mGAC.K207E.F	5'-AAAGATCTTTTTAAAGAGTGTGTTCAAAGCA-3'
mGAC.K207E.R	5'-TGCTTTGAACACACTCTTTAAAAAGATCTTT-3'
mGAC.K512E.F	5'-TCTCCTCCTCTTGACGAGATGGGCAACAGTG-3'
mGAC.K512E.R	5'-CACTGTTGCCCATCTCGTCAAGAGGAGGAGA-3'
mGAC.E330A.F	5'-AAACTCTTTTTGAATGCCGATAAACACAT-3'
mGAC.E330A.R	5'-ATGTGGTTTATCGGCATTCAAAAAGAGTTT-3'

3.4 Subclonagem da construção GAC.H556

A sequência nucleotídica que codifica os resíduos H556 a S603 da mGAC recombinante, correspondente ao clone da mGAC com a porção C-terminal deletada, foi amplificada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, foi utilizado um par de primers, que hibridizavam na porção 5' do vetor pET28a contendo o cDNA da mGAC e na porção 3' antecedente a região C-terminal, de forma a deletar do clone recombinante todos os aminoácidos a partir do correspondente ao 556.

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na clonagem do cDNA mGAC.H556.

Oligos	Sequência
T7promoter (Novagen)	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
mGAC.H556_XhoI	5'-TAGTCGTA CT CGAGTTACCTTTGATCACCTCCTC-3'

A reação de PCR foi realizada no termociclador *Vapo.protect* (Eppendorf), com um volume constituído de 11,5 µL de *AccuPrime™ PCR Systems* (Invitrogen), 100 ng de primer reverso, 100 ng de primer forward e 50 ng de cDNA molde (GAC wt). A reação final de 26 µL foi obtida completando o volume com água MilliQ. As condições de amplificação foram caracterizadas por uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 31 ciclos de uma desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização à 60 °C por 1 minuto e extensão a 68 °C por um minuto e meio. A extensão final foi feita a 68 °C por 7 minutos, e a reação foi interrompida por resfriamento a 4 °C.

O produto total da amplificação foi aplicado em gel de agarose preparativo a 1% contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo, em tampão TAE 1x (80 mM Tris pH 8,3; 40 mM ácido acético glacial e 2,5 mM EDTA), e em seguida o gel foi submetido a uma tensão de 100V por 30 minutos. Ao fim da eletroforese, a banda foi analisada com luz UV. Após a visualização do tamanho correto do fragmento de DNA obtido, a banda foi excisada e purificada com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). O DNA recuperado, assim como o vetor pET28a, foram digeridos com 20U de cada enzima de restrição (*Nde I* e *Xho I*) com uma concentração de 3 µg de cDNA, adicionados a 5 µL do tampão 10x *NEBuffer 4*. A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 4 horas. Após digestão, o material digerido foi aplicado em um gel de agarose 1%, e a eletroforese foi conduzida a 100V por 50 minutos. Tanto a banda correspondente ao vetor como a banda referente à GAC com deleção da porção C-terminal foram extraídos do gel com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), e este material foi utilizado na reação de ligação.

Foi utilizado para a reação de ligação 100 ng do vetor pET28A, 81 ng do inserto, 5U da enzima *T4 DNA Ligase* (Fermentas) e 1,5 µL do tampão 10x *T4 DNA Ligase Buffer*. A reação de ligação foi incubada a 16 °C por 12 horas. Todo o produto da ligação foi transformado em bactéria *E. coli* TOP10 (Novagen). Após seleção das colônias e posterior extração de DNA por miniprep caseira, foi feito um PCR usando a DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq) produzida no próprio laboratório para confirmação da clonagem. As condições de amplificação foram caracterizadas por uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de uma desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização à 58°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. A

extensão final foi feita a 72 °C por 7 minutos, e a reação foi interrompida por resfriamento a 4 °C. O produto desta PCR foi aplicado em um gel de agarose 1%, e a eletroforese foi feita a 100V por 30 minutos. Para as colônias em que aparentemente a clonagem havia funcionado, foi feito sequenciamento.

3.5 Ensaio de atividade

O ensaio de atividade de glutaminase foi executado de acordo com protocolo estabelecido no laboratório, onde a obtenção dos parâmetros cinéticos da atividade de glutaminase é realizada através de uma medição indireta (Cassago *et al.* 2012): o ensaio é acoplado a deaminação de glutamato a α -cetoglutarato pela Glutamato Desidrogenase (GDH), a qual reduzirá neste processo uma Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD^+) em NADH, composto que absorve UV a 340 nm (Figura 7). Desta forma, a velocidade de reação é medida pela formação de NADH e não de glutamato, uma vez que o glutamato não absorve luz no espectro UV visível.

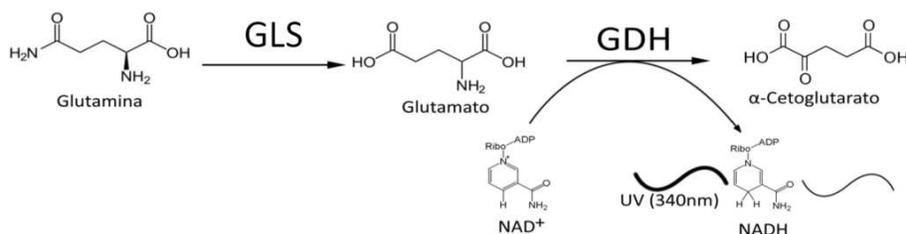


Figura 7: Esquema de ensaio de cinética da atividade de glutaminase.

O ensaio é realizado com concentrações diversas de glutamina (60 mM, 30 mM, 15 mM, 7,5 mM, 3,7 mM e 1,8 mM). Apenas para o mutante mGAC.K325A, devido a sua atividade elevada e K_m muito pequeno, houve a necessidade de fazer o ensaio com concentrações de 0,9 mM, 0,45 mM, 0,225 mM, 0,112 mM, 0,056 mM e 0,028 mM. Um valor de coeficiente angular é obtido da reta dada pela formação de NADH com o tempo para cada concentração de glutamina. Assim, cada concentração de glutamina apresentou um valor respectivo de coeficiente angular que representou a velocidade indireta, e a curva de Michaelis-Menten foi obtida plotando esta velocidade versus a concentração de glutamina.

Para realizar o ensaio cinético, 5 nM da enzima glutaminase purificada foi incubada em tampão Tris-Acetato 50 mM pH 8.6 contendo 0.2 mM EDTA, 30 mM NAD⁺, 3 unidades de GDH (Extração de Fígado Bovino, Sigma Aldrich, EUA), 0 e 20 mM K₂HPO₄. A solução de K₂HPO₄ serviu como fonte de fosfato inorgânico para a reação, e assim, fonte de ativador. A concentração final de 20 mM K₂HPO₄ foi escolhida por ser a que mais se aproxima da concentração fisiológica de fosfato inorgânico em condições de hipóxia (Gorman *et al.* 1997). A leitura foi realizada em um leitor de placas PerkinElmer Enspire 2300 MultiLabel Reader no comprimento de onda de 340 nm. O ajuste das curvas de Michaelis-Menten foi feito com o programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, EUA).

Para os ensaios de inibição e curvas de dose-resposta, BPTES foi preparado como uma solução estoque com concentração de 50 mM em DMSO. Foram feitas diluições dessa solução de forma a manter a concentração final de 0,5% de DMSO no ensaio. As curvas de dose-resposta foram feitas variando as concentrações de BPTES em escala logarítmica de base 10, e por isso os parâmetros da curva foram obtidos através de uma função logística utilizando o programa Origin, descrita pela equação:

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{\left(1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p\right)}$$

Onde A_1 e A_2 são, respectivamente, as assíntotas esquerda e direita. O ponto de inflexão das curvas é x_0 , que matematicamente é o valor de IC₅₀. O valor p simboliza o coeficiente de Hill.

3.6 Diluição seriada

Para comprovar se as mutações ocasionaram mudança no estado oligomérico, calculamos os raios de Stokes (R_s) das proteínas através da “calibração” de uma coluna de Gel Filtração Analítica Superdex 200 10/30 (GE Healthcare), em tampão Tris 30 mM pH 8,5 acrescido de 0,1 M de NaCl e 0,5 mM de TCEP, em um fluxo de 0,5 mL/min. Aplicamos um conjunto de proteínas de alto de peso molecular do *Gel Filtration Calibration kit HMW* (GE-Healthcare), que são padrões de massa e Raios de Stokes

definidos: Aldolase (48,1 Å), Conalbumina (NA), Blue Dextran 2000, Thiroglobulina (85 Å), Ferritina (61 Å) e Ovalbumina (30,5 Å). O padrão *Blue Dextran 2000* foi utilizado para determinar o V_o (Volume morto) da coluna. Sabendo o V_e (volume de eluição) das proteínas calculou-se o K_{av} sendo ele dado por:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}, \text{ onde } V_t \text{ é o volume total da coluna.}$$

Os valores obtidos foram plotados como $\sqrt{-\log(K_{av})}$ versus R_s das proteínas padrões. Obteve-se uma equação da reta, a qual foi empregada para o cálculo do R_s das proteínas em estudo. Para a determinação da massa molecular, utilizou-se equação de reta obtida através da correlação entre o logaritmo da massa das proteínas padrões e o K_{av} das mesmas.

3.7 Imagens das superestruturas por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os ensaios de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram realizados por *negative staining* no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), também no campus do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em colaboração com os doutores Rodrigo Villares Portugal, Alexandre Cassago e Jefferson Bettini. Olsen e colaboradores (1973) (Olsen *et al.* 1973b), através da mesma técnica já haviam mostrado que glutaminase purificada de rim de porco formava superestruturas na presença de fosfato e borato de sódio. Para visualização homogênea dos oligômeros por MET, a amostra dessas estruturas foi estabilizada por *cross-linking* químico com DSS, na ausência ou presença de 20 mM de ativador fosfato e/ou de inibidor, em um excesso molar de 10x de BPTES. A incubação com ativador e /ou inibidor foi sempre de uma hora, e a proteína foi purificada em tampão 30 mM Hepes pH 8,0 acrescido de 0,1 M de NaCl e 0,5 mM de TCEP. O *cross-linking* foi feito com uma concentração de proteína de 18 μ M. Após a incubação com um excesso molar de 10x de DSS por mais uma hora, as proteínas foram submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular (coluna Superdex 200, GE Healthcare) para retirada do excesso de DSS e separação das frações oligoméricas. As superestruturas eluíram no *void* da coluna.

Para visualização por *negative staining*, as amostras de proteínas foram diluídas para concentrações de 0,5 a 1 μ M e depositadas em uma grade ultrafina de filme de

carbono (TED PELLA), previamente ionizadas (Pelco easiGlow) a 15 mA por 25 segundos. Foram colocados sobre a grade de carbono 3 μ L de proteína por 1 minuto, seguido por secagem com papel filtro. Após este passo, foram feitas três lavagens de 1 minuto com 3 μ L de tampão 30 mM Tris pH8,5 acrescido de 100 mM NaCl e 0,5 mM TCEP. Por fim, houve a adição de 3 μ L de acetato de uranila (2%) por 30 segundos, seguida por secagem com papel filtro. As imagens foram adquiridas usando um JEM-2100 Electron Microscope – JEOL operando a 200 kV com uma câmera CMOS F-416 (TVIPS, Alemanha).

3.8 Análise do cross-linking dos oligômeros da GAC por LC-MS/MS

A banda de oligômero de GAC recortada do gel de SDS-PAGE foi reduzida com 5 mM de ditioneitol, 25 min à 56 °C, e alquilado com 14 mM de iodoacetamida, 30 min à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, a amostra foi digerida com tripsina (Promega) e seca num concentrador de vácuo e reconstituída em 0,1% de ácido fórmico. A preparação da amostra para espectrometria de massas foram realizadas pelos Doutores Alexandre Cassago e Juliana Oliveira.

No espectrômetro de massa LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific), um LC-MS/MS acoplado ao sistema de cromatografia líquida EASY-nLC system (Thermo Fisher Scientific) e com uma fonte de íons Proxeon nanoelectrospray, foi analisado 4,5 μ g de peptídeos resultantes da digestão. Os peptídeos foram separados por um gradiente de 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico, usando uma pré-coluna EASY-coluna (2 cm x ID100 μ m, 5 μ m de tamanho de partículas) e uma coluna analítica PicoFrit Column (20 cm x ID75 μ m, 5 μ m de tamanho de partícula, New Objective) a um fluxo de 300 nL/min durante 65 min. A voltagem do *nanoelectrospray* foi ajustado para 2,2 kV e a temperatura da fonte era de 275 °C. O método realizado no instrumento LTQ Velos Orbitrap foi especificado no modo de aquisição depende de dados de fragmentação HCD. A verificação completa do espectro MS (m/z 300-1,600) foram adquiridos no analisador Orbitrap após a acumulação de um valor alvo de 1 e⁶. 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. O limiar para detecção MS/MS foi de ao menos 80.000 contagens, com tempo de ativação de 0,1 ms. Foi habilitado para exclusão

dinâmica uma lista de exclusão de tamanho de 400 e duração da exclusão de 60 s, e repetição de contagem de 2.

Para análise de *cross-linking*, os arquivos de dados brutos foram gerados no Xcalibur v.2.1. (Thermo Fisher Scientific) e convertidos para um formato de lista de pico (MGF) usando a versão Discoverer Proteome 1.3 (Thermo Fisher Scientific). Os arquivos mgf foram analisados pelo software MassMatrix (www.massmatrix.net (Xu & Freitas 2007)) para pesquisar automaticamente ligação química cruzada contra a base de dados que contém as sequências de aminoácidos do GAC. Os parâmetros foram carbamidometilação (+57.021460 Da) como modificação fixa, a oxidação da metionina (15,99491 Da) como modificação variável, ligações químicas cruzadas com DSS (138,06808 Da), quatro clivagens perdidas da tripsina e tolerância de 10 ppm para o íon precursor e 0,02 Da para os íons fragmentos (Aragão *et al.* 2012). Potenciais peptídeos com *cross-linking* foram validados manualmente. Este experimento foi realizado quatro vezes para amostra de tetrâmeros e sete vezes para amostras de superoligômero. Os dados foram coletados e analisados pelo *facility* de espectrometria de massas (MAS) do LNBio, em colaboração com a Dr.^a Adriana Franco Paes Leme.

3.9 Anisotropia de fluorescência

Para este ensaio, as proteínas foram marcadas com fluoróforo FITC (Thermo Scientific). Este fluoróforo reage covalentemente com aminas primárias, marcando a proteína principalmente em suas lisinas livres. A etapa de gel filtração foi feita em tampão 30 mM Hepes pH 8,0 acrescido de 0,5 mM de TCEP. A marcação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, e a remoção de excesso de fluoróforo foi feita em uma HiTrap Desalting (GE Healthcare). Para montar o ensaio, todos os poços de leitura da placa de 394 poços OptiPlate-96 Black (PerkinElmer) continham 5 nM de glutaminase marcada, concentração essa em que tanto GAC e KGA estão em estado dimérico. A proteína marcada foi diluída para essa concentração no mesmo tampão citado acima, porém acrescido de 500 ou 100 mM de NaCl. Proteína não marcada, recém-purificada, era diluída de forma seriada e titulada sobre os poços. Um poço do ensaio continha apenas a proteína

marcada, para ser referido como valor inicial de anisotropia. O ensaio era incubado a 25°C, e o tempo de estabilização da anisotropia para os dados finais foi de 48h.

Os dados foram coletados no equipamento EnVision (PerkinElmer) nos comprimentos de onda de excitação (494 nm) e de emissão (518 nm) do fluoróforo. O equipamento detecta a emissão de luz tanto na direção vertical quanto horizontal (Figura 8-A). Moléculas pequenas (neste experimento, caracterizadas pela glutaminase em estado dimérico), devido a sua rotação acelerada, emitem luz em ambas as direções, ocasionando a despolarização da luz emitida (Figura 8-B). O inverso ocorre para as moléculas em solução no estado ligado (caracterizado pela formação de oligômeros maiores), pois o movimento browniano será lento devido ao aumento do tamanho da molécula. Conseqüentemente, a emissão da luz pelo fluoróforo presente nessas moléculas será no mesmo plano da energia de excitação (vertical), e assim a luz emitida continuará polarizada (Figura 8-C).

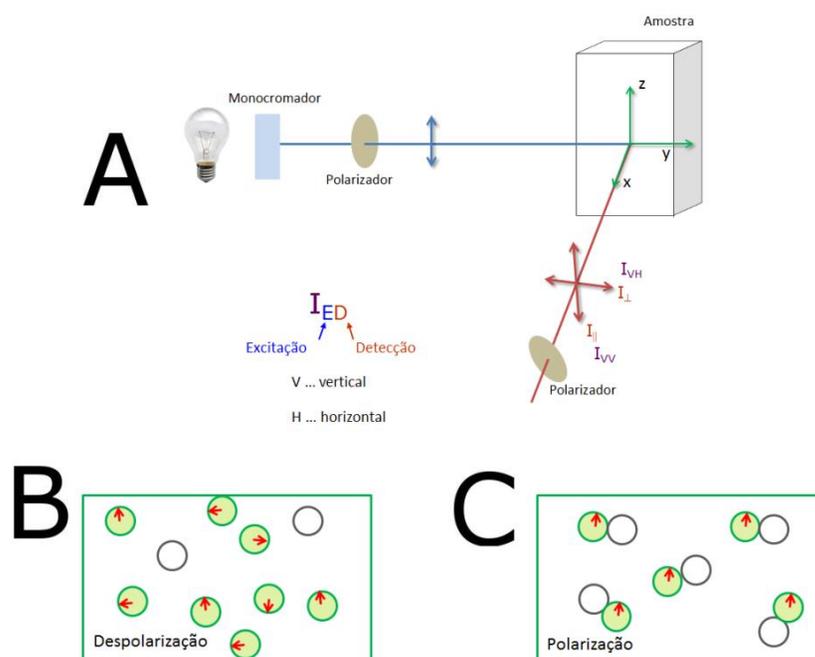


Figura 8: Experimento de anisotropia de fluorescência. Em (A) apresentamos o arranjo experimental do equipamento, onde uma luz monocromática passa por um polarizador e é incidida sobre a amostra estando polarizada no plano vertical. O detector irá medir a emissão de luz polarizada. Em (B e C) nota-se que quanto maior for a molécula, mais lenta será sua rotação, e conseqüentemente a luz emitida pelo fluoróforo continuará no plano vertical, caracterizando a emissão de luz polarizada. Para moléculas menores com uma rotação acelerada, a emissão é detectada tanto na direção horizontal como vertical, levando a uma despolarização da luz. Adaptado de Lakowicz 2007.

Basicamente, as medidas de polarização irão revelar um deslocamento angular médio do fluoróforo que ocorre entre a absorção e subsequente emissão do fóton. Esse deslocamento angular é dependente da taxa de difusão rotacional durante a vida média do estado excitado do fluoróforo, e pode ser descrito em função da anisotropia (r). Quando a emissão estiver polarizada paralelamente à direção da excitação polarizada, a intensidade observada é chamada $I_{||}$. Quando a emissão polarizada for perpendicular à direção da excitação polarizada, a intensidade observada é chamada I_{\perp} . Assim, a anisotropia (r) é definida como:

$$r = \frac{(I_{||} - I_{\perp})}{(I_{||} + 2I_{\perp})}$$

Os valores de K_d foram estimados utilizando-se os valores de anisotropia obtidos versus a concentração de proteína no poço (em escala logarítmica de base 10), e os parâmetros da curva foram obtidos através de uma função logística utilizando o programa Origin (OriginLab), descrita pela equação:

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{\left(1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p\right)}$$

Onde A_1 e A_2 são, respectivamente, as assíntotas esquerda e direita. O ponto de inflexão das curvas é x_0 , que matematicamente é o valor de K_d . O valor p simboliza o coeficiente de Hill.

3.10 Ensaio celulares

Linhagens de câncer de mama MDA-MB 231 (ATCC[®] HTB-26[™]) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB, Cultilab) a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas pela Dr. Kaliandra A. Gonçalves, que também realizou os experimentos de medição de consumo de glutamina e proliferação celular.

O clone pcDNA3.1/V5-His (Life Technologies)-hGAC (GAC.WT-V5) foi gentilmente cedido pelo Dr. Richard Cerione (Cornell University, EUA), e a mutação K320A (equivalente a K325A em *Rattus norvegicus*) foi feita de acordo com o item 3.3. As células foram transfectadas com Lipofectamina G418 e selecionadas para expressão estável pela aluna de mestrado Carolline Fernando R. Ascensão. A confirmação da expressão dos

genes transfectados, realizada pela mesma aluna, foi feita por *Western Blotting* : as células foram lisadas com 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 acrescido de 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 1 mM de NaVO₄, 1 mM de fosfato de β-glicerol, 11 µg/mL aprotinina, 11 µg/mL de pepstatina e 1 mM de PMSF. Os lisados foram resolvidos por SDS-PAGE (Laemmli 1970), e as proteínas transferidas para membranas de PVDF. As membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários diluídos em 20 mM de Tris acrescido de 135 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20. Para detecção, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, seguido por exposição ao substrato do kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Foram utilizados anti-V5 1:10000 (Life Technologies), anti-GAC (Genescript) a 1 µg/mL, anti-vinculina 1:1000 (Cell Signaling) e anti-VDAC 1:1000 (Cell Signaling).

Para os estudos de consumo de glutamina, células MDA-MB 231 foram semeadas em placa (Becton Dickson) a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/cm², e cultivadas durante 48 horas a 37 °C com 5 % de CO₂. A partir do meio de cultura foi avaliado o consumo de glutamina utilizando o Bio-Profile Basic 4 (Nova Biomedical). Após a análise do meio de cultura, as células foram fixadas e permeabilizadas com 3,7% de formaldeído em PBS acrescido de 0,2% de Triton X-100. Para os ensaios de proliferação celular, núcleos foram corados com 2,5 µg/mL DAPI (Sigma). Os dados foram coletados com a placa Fluorescence Microscope Operetta (Perkin Elmer) e número de células quantificado usando o software Harmony 3.0.

Foram feitos ensaios da atividade de glutaminase com lisado de células. As células foram lisadas por ressuspensão em 25 mM de Hepes pH 8,0 acrescido de 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0,01% de Triton X-100 e 1x Solução de Inibição de Protease (Qiagen), e em seguida uma lise mecânica foi feita através de 20 passagens em uma agulha de insulina. A quantificação de proteínas foi feita por Bradford (Bradford 1976), e utilizamos 5 µg de lisado, feito de acordo com o item 3.5. A estimativa da concentração molar de glutamina intracelular para tumor de mama foi feita a partir de um dado obtido por Yuneva *et al.* 2012, que reportaram uma relação de 40 a centenas de nmoles de glutamina para cada grama de proteína. A pós-doutoranda Kaliandra de A. Gonçalves calculou os diâmetros das células transfectadas Mock, GAC e GAC.K325A. Ela obteve respectivamente os diâmetros

10,6; 10,9 e 13,3 μm . Assumindo que essas células são esféricas, calculamos que o volume dessas células são 1,2 nL (GAC.K325A) e 0,6 nL (GAC e Mock). Usando Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific), observamos que 2×10^6 células contém aproximadamente 0,233g de proteína total. Considerando o dado mais baixo citado por Yuneva (40 nmoles/g de proteína), estimamos que o meio intracelular apresente concentrações entre 3,7 e 7,4 mM de glutamina. Por isso, o ensaio de atividade de lisado celular foi feito em uma concentração de glutamina de 7 mM.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação das proteínas recombinantes

A sequência do processo de purificação foi feita por cromatografia de afinidade com resina de cobalto, troca aniônica e gel filtração. Após cada purificação realizada, as frações eluídas em todas as etapas foram analisadas em gel SDS-PAGE 10%. Isto foi feito para verificar o grau de pureza da amostra. Observamos na Figura 9 os respectivos cromatogramas e géis da purificação da GAC e da KGA. Mutantes pontuais da GAC foram purificados pelo mesmo protocolo, apresentando pouca variação no perfil cromatográfico da proteína nativa.

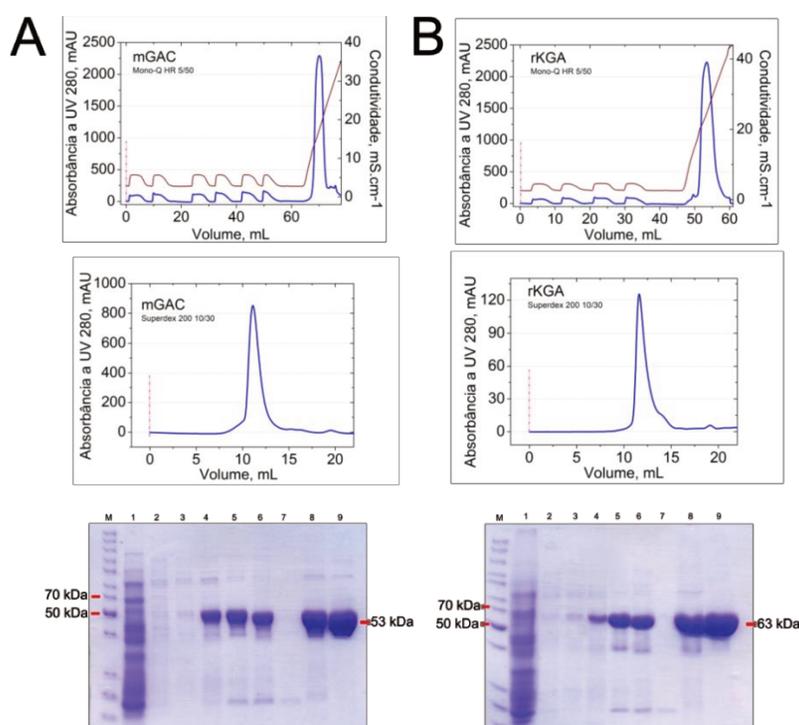


Figura 9: Perfil cromatográfico e análise em SDS-PAGE 10% da GAC e KGA, respectivamente. Cromatografia de troca aniônica usando Mono Q HR 5/50 (GE Healthcare), cromatografia de gel filtração Superdex 200 10/30 (GE Healthcare) e gel de SDS-PAGE 10% das frações protéicas purificadas da (A) GAC e (B) KGA. As frações do gel estão enumeradas na seguinte ordem: M - Marcador de massa molecular; 1 - *Flow-through* da afinidade; 2 - Lavagem da afinidade sem imidazol; 3 - Lavagem contendo 5 mM de imidazol da afinidade; 4 - Lavagem contendo 20 mM de imidazol da afinidade; 5 - Eluição contendo 320 mM de imidazol da afinidade; 6 - Eluição contendo 320 mM de imidazol da afinidade clivada *overnight* com trombina; 7 - *Flow-through* da troca iônica; 8 - Eluição da troca iônica; 9 - Eluição da gel filtração.

4.2 Ensaios de atividade e diluições seriadas

A atividade da enzima GAC selvagem recombinante, assim como a atividade dos mutantes pontuais e da forma deletional GAC.H556, foram medidos usando um ensaio indireto, descrito em Material e Métodos (ver item 3.5).

O “*gating loop*” (L₃₂₁RFNKL₃₂₆) se encontra muito próximo a região do sítio ativo, e acreditamos ter uma grande importância na regulação da atividade enzimática. Para testar nossa hipótese, várias mutações foram feitas nessa região. As mutações pontuais GAC.N324A e GAC.R322A ocasionaram perda da atividade mesmo na presença de fosfato (Figura 10, Tabela de anexos 2 – página 59) devido ao aumento no K_m dessas enzimas mutantes. O mesmo foi observado para o mutante GAC.R392S, que também está localizado próximo ao sítio ativo. Isto indica que a região do “*gating loop*” interfere na afinidade das glutaminases pela glutamina.

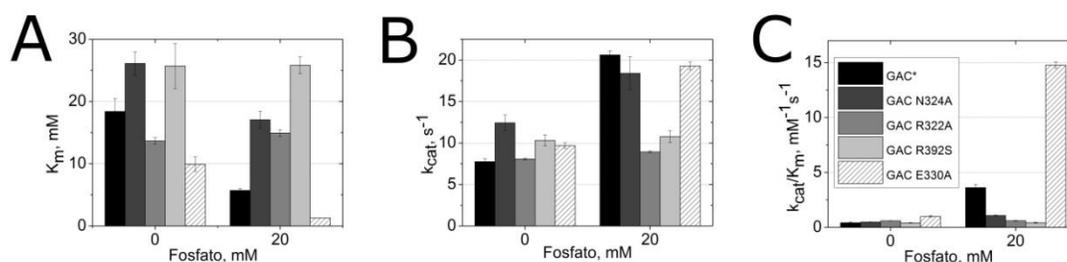


Figura 10: Caracterização do perfil cinético dos mutantes pontuais GAC.R322A, GAC.R392S, GAC.N324A e GAC.E330A comparados a enzima selvagem GAC*. O símbolo de * significa que estes dados já foram publicados (Cassago *et al.* 2012). Apresentamos em (A) os valores da constante de Michaelis-Menten (K_m), em (B) os valores da constante catalítica (k_{cat}) e em (C) os valores da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m), todos medidos na ausência e na presença de 20 mM de fosfato.

Curiosamente, outro mutante pontual adjacente ao *gating loop*, denominado GAC.E330A, apresentou uma eficiência catalítica ao menos três vezes maior que a apresentada pela enzima selvagem na presença de 20 mM de fosfato (ver Figura 10, Tabela de anexos 2 – página 59). Também notamos que este mutante, durante a etapa de purificação em gel filtração, tinham um perfil de eluição deslocado para um volume pouco menor que o volume da isoforma selvagem, enquanto os mutantes que perderam atividade eram eluídos em um volume relativamente maior.

Para conferir se havia alguma correlação com o estado oligomérico desses mutantes e suas atividades, foram feitos ensaios de diluição seriada das proteínas purificadas. Através de dados de calibração da coluna de gel filtração foi possível calcular o raio de Stokes da GAC selvagem, delimitando o volume de eluição do seu estado dimérico (inativo) e de seu estado tetramérico (ativo). Por este experimento verificamos que as mutações GAC.R322A, GAC.R392S, e GAC.N324A impediram a tetramerização, o que explica a eficiência catalítica diminuída. Já o mutante GAC.E330A, assim como a própria GAC, se apresentaram em um estado oligomérico maior que tetrâmero na presença de fosfato (Figura 11).

Pela troca de um resíduo do “*gating loop*” por uma alanina, mutante denominado GAC.K325A, geramos uma proteína superativa com uma eficiência catalítica de aproximadamente 60 vezes maior que a enzima selvagem, e na ausência de fosfato esta eficiência se torna 600 vezes maior (Figura 12, Tabela de anexos 2 – página 59). Inferimos, então, que por algum mecanismo desconhecido esta enzima se torna ativa independentemente do ativador fosfato.

Para avaliar a hipótese de que o estado oligomérico é o fator determinante para ativação da enzima, o mutante GAC.K325A foi submetido ao ensaio de diluição seriada. Este mutante (previamente purificado) eluiu junto volume morto da coluna de gel filtração utilizada, mesmo na ausência de fosfato (Figura 12), indicando que a capacidade de formar oligômeros muito grandes está relacionada à alta eficiência catalítica da enzima, seja ela na forma selvagem ou mutante. O mutante GAC.K325A apresentou mais uma característica interessante: além da independência por fosfato para a sua ativação, este mutante é insensível ao inibidor BPTES (Figura 12, Tabela de anexos 2 – página 59), apresentando uma eficiência catalítica 80 vezes maior que a isoforma selvagem na presença de fosfato e de 30 μ M de BPTES. O BPTES é um inibidor não competitivo das isoformas de *splicing* alternativo do gene *GLSI* (KGA e GAC), e seu mecanismo de inibição é exatamente impedir a formação de oligômeros maiores, permitindo apenas a formação de tetrâmeros inativos (Robinson *et al.* 2007).

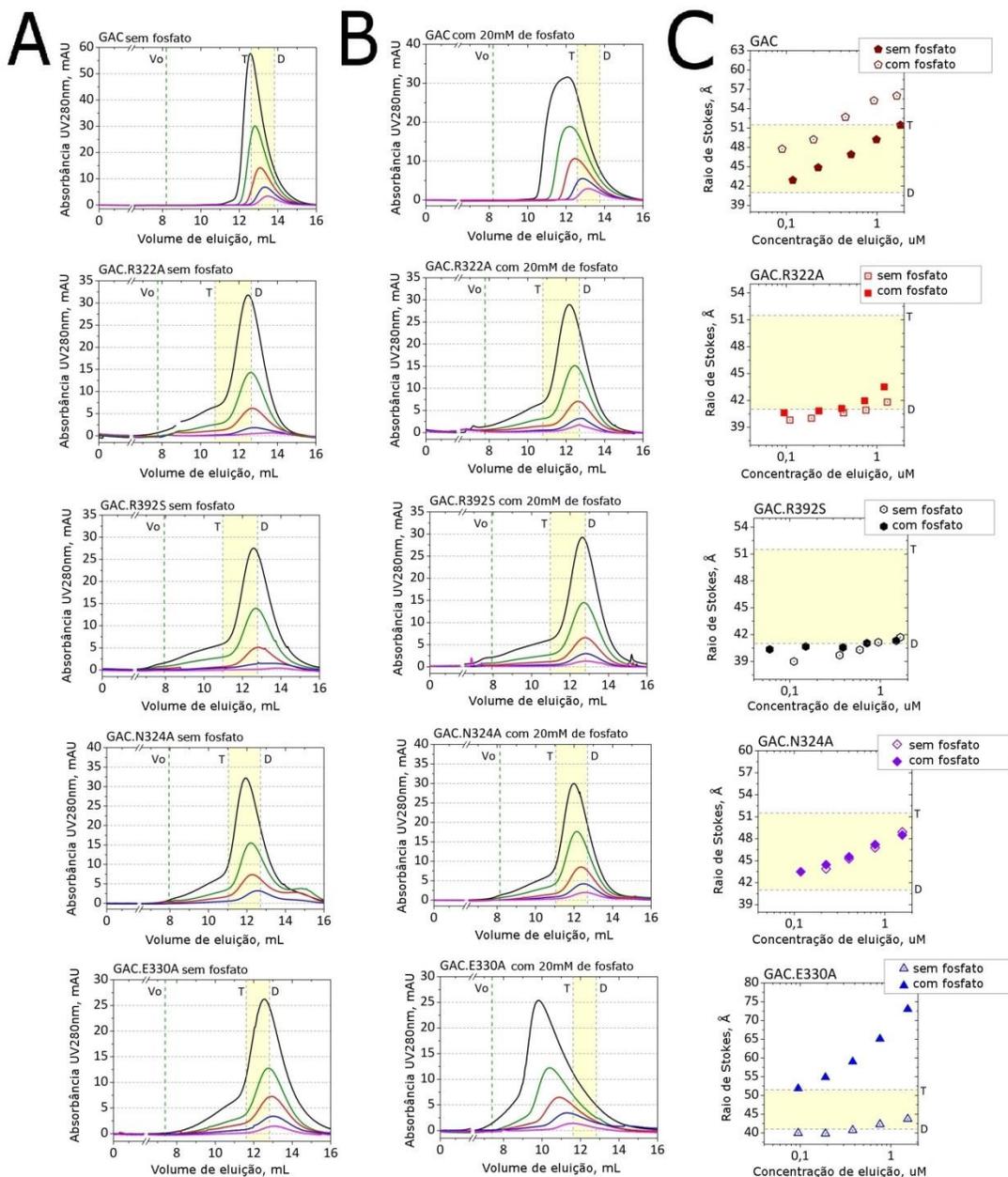


Figura 11: Ensaios de diluições seriadas para GAC selvagem e mutantes pontuais GAC.R322A, GAC.R392S, GAC.N324A e GAC.E330A. Em (A) apresentamos os picos de eluição da cromatografia em gel filtração obtidos na ausência de fosfato; e em (B) apresentamos o mesmo perfil cromatográfico obtido na presença de fosfato. Em (C) temos um esquema representativo em que as esferas representam os raios de Stokes das respectivas proteínas, e os raios de Stokes da mGAC (51 e 41 Å para tetrâmero - T - e dímero - D - , respectivamente) foram calculados a partir do modelo cristalográfico empregando-se o programa HIDROPRO e são representados pelas barras verticais de área amarela. A curva em preto é correspondente a concentração de entrada na gel filtração de 0,82 mg/mL, e as demais curvas seguem um padrão de diluição seriada em todos os experimentos apresentados.

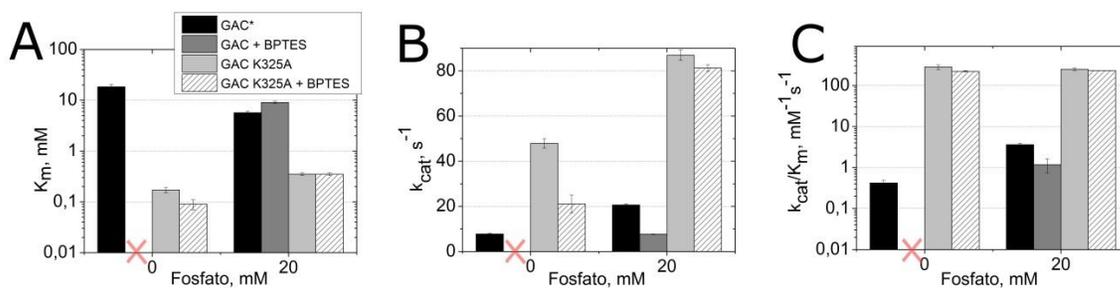


Figura 12: Caracterização do perfil cinético comparativo do mutante GAC.K325A e a enzima selvagem GAC (o asterisco significa que o valor foi retirado de (Cassago *et al.* 2012)), na presença e ausência do inibidor BPTES (30 μ M). Apresentamos em (A) os valores da constante de Michaelis-Menten (K_m), em (B) os valores da constante catalítica (k_{cat}) e em (C) os valores da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m). O símbolo X na Figura significa que a inibição por BPTES da GAC na ausência do fosfato não foi medida, uma vez que sem ativador a enzima não apresenta atividade.

Outro resultado surpreendente foi o ensaio de atividade da enzima deletional GAC.H556. Foi feita a deleção da região C-terminal da GAC, restando apenas a região N-terminal e o domínio catalítico (que são as sequências idênticas à KGA), para testar se a diferença cinética entre as isoformas GAC e KGA seria justificada por uma diferença sequencial. Verificamos, entretanto, que a deleção GAC.H556 apresentou a mesma eficiência catalítica da enzima selvagem (Figura 14, Tabela de anexos 4 – página 60). Além disso, o valor da eficiência catalítica da GAC.H556, assim como da GAC selvagem, equivale a pouco mais que o dobro do valor da eficiência catalítica da KGA, na presença de 20 mM do ativador fosfato.

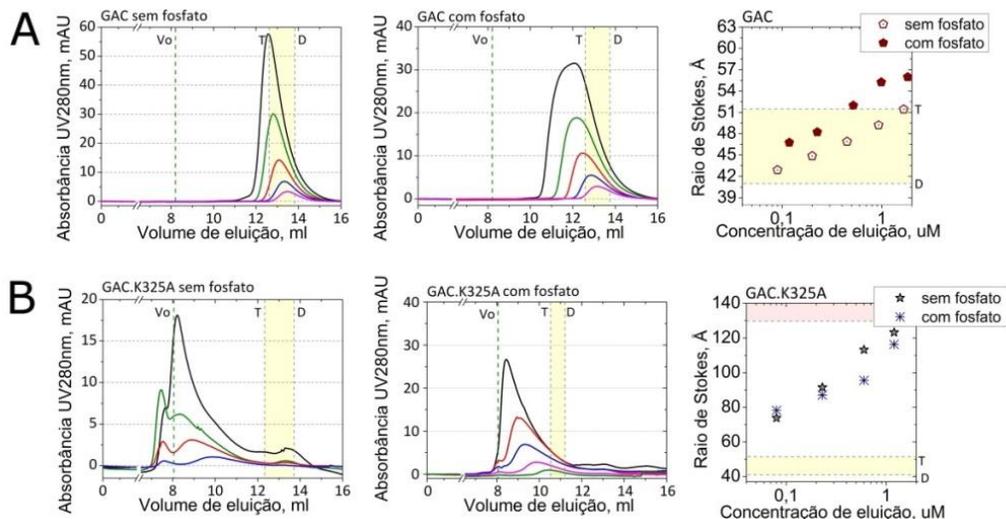


Figura 13: Perfil cromatográfico de diluições seriadas e gráfico representativo do Raio de Stokes da fração eluída da gel filtração para (A) GAC selvagem na ausência de fosfato e presença de fosfato; (B) GAC.K325A na presença de fosfato e ausência de fosfato. É possível perceber que GAC.K325A forma oligômeros maiores, mesmo na ausência de fosfato. As esferas representam os raios de Stokes da eluição, e as barras verticais com área amarela do gráfico delimita raios de Stokes da mGAC (51 e 41 Å para tetrâmero e dímero, respectivamente), que foram calculados a partir do modelo cristalográfico empregando-se o programa HIDROPRO.

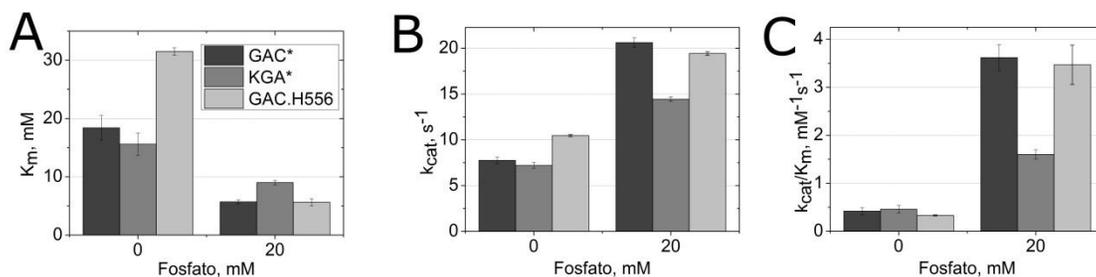


Figura 14: Caracterização do perfil cinético comparativo da deleção GAC.H556 e as enzimas selvagens GAC e KGA (o asterisco significa que o valor foi retirado de (Cassago *et al.* 2012)). Apresentamos em (A) os valores da constante de Michaelis-Menten (K_m), em (B) os valores da constante catalítica (k_{cat}) e em (C) os valores da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m).

4.3 Formação de superestruturas das isoformas de glutaminases

Na tentativa de melhor entender a natureza da formação destes superoligômeros foram feitas *grids* de *negative staining* para a proteína recombinante mGAC, na ausência e presença de fosfato. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que a Glutaminase C é capaz de formar polímeros quando na presença de 20 mM de fosfato inorgânico (Figura 15-A). Sabemos que equilíbrio entre espécies oligoméricas de glutaminase pode ser modificado pelo aumento da concentração de proteína que desloca o equilíbrio para a formação de espécies moleculares maiores, assim como a presença de ativador fosfato. Em contrapartida, altas concentrações de cloreto de sódio atrasam este processo (Cassago *et al.* 2012). Então, para evitar a dissociação de proteína ocasionada pelo próprio equilíbrio do meio, e para assim possibilitar melhor caracterização dos filamentos por microscopia, as amostras de superoligômeros foram ligadas covalentemente por reação com DSS (*cross-linking*), de acordo com a metodologia descrita no item 3.8. Isto resultou na detecção de filamentos que abrangem centenas de nanômetros de comprimento (Figura 15-B).

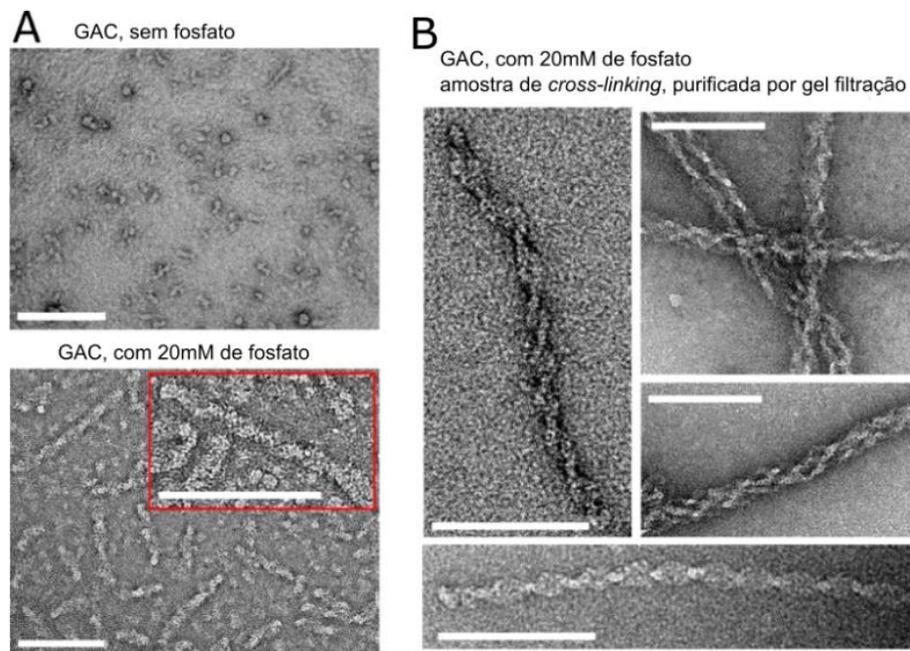


Figura 15: A polimerização da Glutaminase C na presença de fosfato. Em (A) apresentamos imagens de microscopia eletrônica de transmissão por *negative staining* que mostra a capacidade de polimerização da GAC quando na presença de seu ativador fosfato. Em (B) temos as fotos de microscopia da amostra de superoligômeros “crosslinkada” quimicamente com DSS.

Para avaliar a formação de polímeros por proteínas superativas, amostras de GAC.K325A e de GAC.R322A (mutação pontual também na região do “gating loop” que levou a perda de atividade) sem *cross-linking* foram analisadas por microscopia eletrônica (Figura 16). A análise de TEM da amostra “não-crosslinkada” da GAC.K325A mostrou que esta proteína é capaz de formar filamentos até mesmo na ausência de fosfato, o que justifica sua alta eficiência catalítica mesmo na ausência de ativador. O mutante GAC.R322A não foi capaz de formar fibras na presença de 20 mM de fosfato, corroborando com nossos dados de cinética que este mutante inativo é irresponsivo ao fosfato.

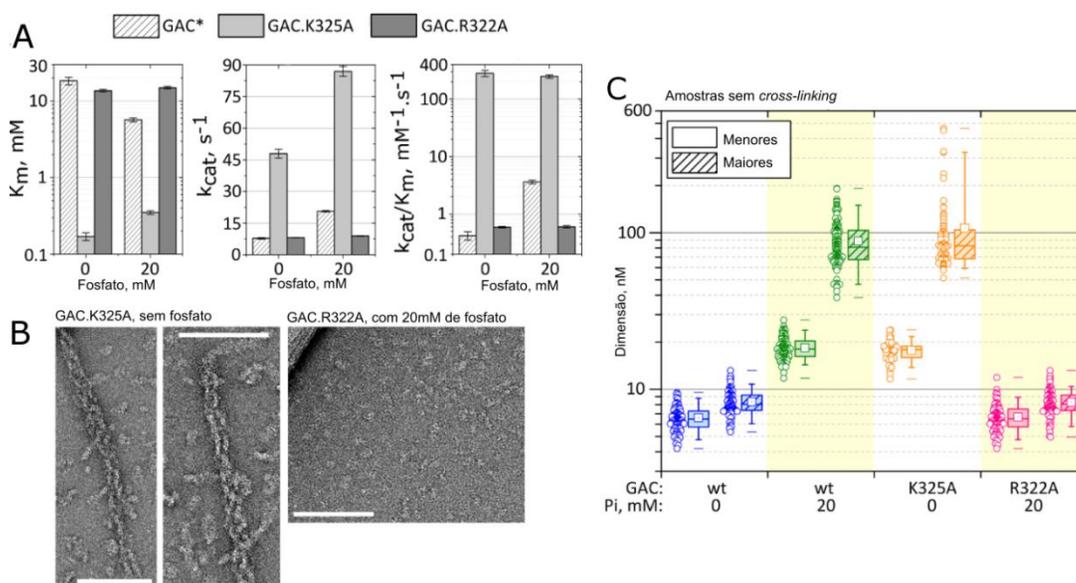


Figura 16: A formação de superestruturas é responsável pela ativação. Em (A) apresentamos dados de cinética enzimática: o mutante pontual GAC.K325A apresentou valores baixos de constante de Michaelis-Menten (K_m), bem como uma alta taxa de *turnover* para o substrato L-glutamina (representado pelos valores de k_{cat}) mesmo na ausência de fosfato, o que resulta numa eficiência catalítica muito elevada quando comparada a GAC selvagem e ao mutante GAC.R322A. Em (B) é possível notar que a alta eficiência catalítica da GAC.K325A é bem correlacionada a sua capacidade de formar polímeros, dispensando a presença de ativador fosfato. Reciprocamente, o mutante GAC.R322A, inativo, se mantém na forma tetramérica mesmo na presença de fosfato. A barra de escala se refere a 100 nm. Em (C), pela representação na forma de boxplot, é possível analisar a distribuição das medidas de dimensão das partículas.

Como já mostrado na introdução desta dissertação, a GAC é a isoforma mais ativa dentre as três isoformas de glutaminases de mamíferos, em resposta ao fosfato (Cassago *et*

al. 2012). Para investigar melhor a correlação entre o aumento da atividade e a presença de espécies oligoméricas maiores, a habilidade de ambas as isoformas *Kidney-type* Glutaminase (KGA) e *Liver-type* Glutaminase (LGA) de formarem superestruturas foi visualizada por TEM. A preparação da amostra de LGA foi feita pelo doutorando Igor Monteze Ferreira. Como já descrito em Material e Métodos, a formação de superestrutura foi induzida por 20 mM de fosfato inorgânico, estabilizada por *cross-linking*, e purificadas por gel filtração. As imagens obtidas são apresentadas na Figura 17. Como esperado, GAC – a glutaminase de maior atividade em 20 mM de fosfato (Cassago *et al.* 2012) – formou os maiores polímeros lineares, seguida pela KGA e logo após, LGA, a qual já foi demonstrada ser enzimaticamente insensível ao fosfato inorgânico.

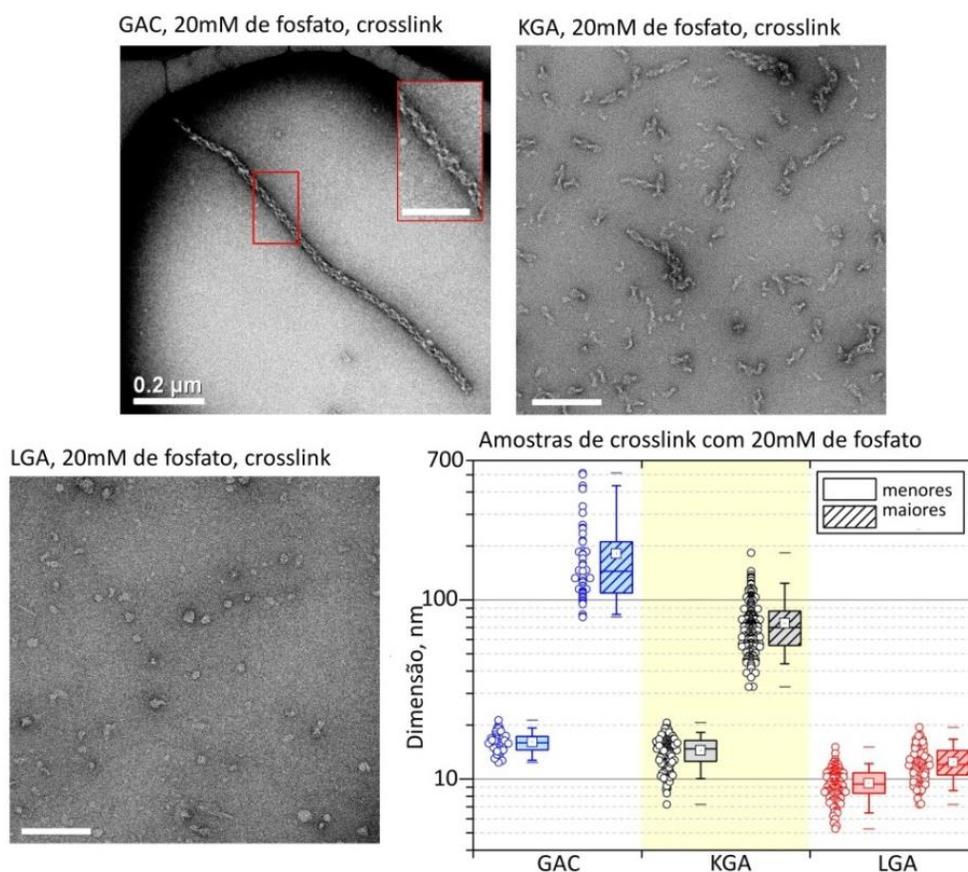


Figura 17: Análise por *negative staining* de formação de superestruturas das glutaminases. A distribuição das medidas de dimensão das partículas é apresentada na caixa inferior à direita, representada na forma de boxplot.

4.4 BPTES é capaz de romper as superestruturas

De acordo com a literatura, o BPTES prende enzimas GLS1 em um tetrâmero inativo (Robinson *et al.* 2007). Com o interesse em entender melhor o efeito ocasionado pela inibição deste composto, fizemos uma curva de dose-resposta para a GAC na presença de 20 mM de fosfato. Esta concentração de fosfato foi usada durante todos os ensaios de cinética por ser a representação fisiológica em condições de hipóxia (Gorman *et al.* 1997). O efeito inibitório do BPTES ocorre em concentração nanomolar, afetando a constante catalítica aparente ($k_{cat-app}$) sem alterar o K_{m-app} para a glutamina. Este fenômeno caracteriza o BPTES como um inibidor não-competitivo. Após a concentração de 200 nM de BPTES, em efeito secundário foi observado: o inibidor passa a afetar o K_{m-app} , redefinindo o BPTES como um inibidor misto.

A partir dos dados cinéticos obtidos e utilizando uma função logística para analisá-los, obtivemos um IC_{50} de $80,4 \pm 7,2$ nM para o decréscimo de $k_{cat-app}$ com o aumento da concentração do inibidor (ver Figura 18-A). Este valor é consistente com o obtido por DeLaBarre e colaboradores (DeLaBarre *et al.* 2011). O coeficiente de Hill para a sigmoide foi de $1,7 \pm 0,2$, com um $R^2 = 0,99$, indicando que o processo é cooperativo. Em relação ao efeito do inibidor sobre K_{m-app} , obtivemos um IC_{50} de 629 ± 61 nM, um coeficiente de Hill positivo de $2,0 \pm 0,3$, com um $R^2 = 0,99$. Dados numéricos da curva de dose-resposta são apresentados na tabela de anexos 5 – página 61. É possível ver nestes dados que concentrações acima de $10 \mu M$ de BPTES são capazes de inibir a atividade enzimática da GAC.

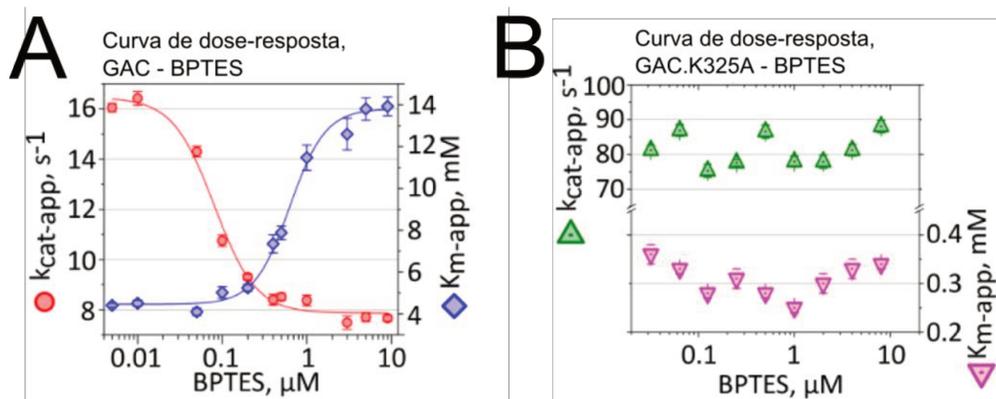


Figura 18: Perfil de dose-resposta da inibição por BPTES das enzimas (A) GAC e (B) GAC.K325A, na presença de 20 mM de fosfato.

Após verificar que a atividade de glutaminases está relacionada a formação de superestruturas, decidimos verificar o efeito do inibidor BPTES neste processo. A amostra de GAC preparada na presença de fosfato e de inibidor e subsequentemente “crosslinkada”, analisada por microscopia eletrônica (*negative staining*), mostrou que independente da ordem de incubação (BPTES antes ou depois da adição de fosfato), as superestruturas são completamente rompidas pela adição de 30 μ M de BPTES (Figura 19-A). A dimensão das partículas rompidas pelo BPTES se correlaciona com o tamanho do tetrâmero cristalográfico (Cassago *et al.* 2012) e com a dimensão da GAC sem fosfato obtida na microscopia eletrônica.

Também determinamos uma curva de dose-resposta para o mutante GAC.K325A. Em resultados enzimáticos previamente apresentados o BPTES não foi capaz de inibir este mutante, e isto se confirma na curva de dose-resposta. Nem mesmo concentrações altas de BPTES foram capazes de afetar as constantes cinéticas deste mutante (ver Figura 18-B e dados em tabela de anexos 5). Além disso, é possível perceber na Figura 19-B que o BPTES é incapaz de romper superoligômeros de GAC.K325A (não “crosslinkados”), independente da presença ou ausência de fosfato.

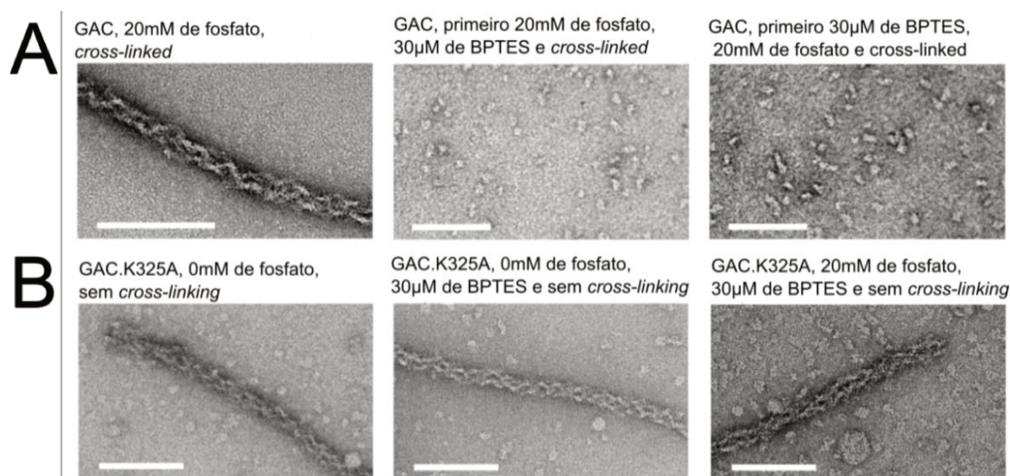


Figura 19: Análise por *negative staining* do efeito do BPTES na inibição de formação das superestruturas da (A) GAC e (B) GAC.K325A. A barra de escala representa 100 nm.

4.5 Mecanismo de formação das superestruturas

Amostras de *cross-linking* com DSS da GAC, tanto de tetrâmeros quanto de superoligômeros foram purificadas por filtração em gel, digeridas com tripsina e então

fragmentadas nas análises de espectrometria de massas (MS/MS). Os espectros obtidos são apresentados na Figura de anexo 2, na página 63. Os resultados revelaram ligações exclusivas no tetrâmero (Figura 20), entre os resíduos de lisina 181 e 207 (localizados na região N-terminal), resíduos de lisina 202 e 578 (localizados na região C-terminal), e lisinas 403 e 512 entre cadeias (presentes na região de domínio catalítico, flanqueando o sítio ativo).

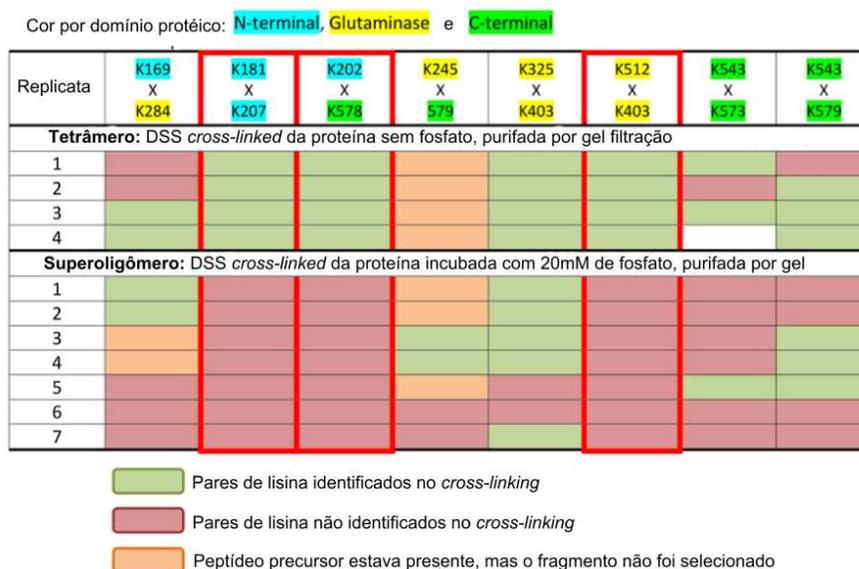


Figura 20: Resumo dos pares de lisina “crosslinkados” validados por busca no MassMatrix, separados em grupos de ligações presentes no tetrâmero ou superoligômero da GAC.

Um resíduo de lisina de cada par foi substituído por um glutamato, que possui carga oposta. Estes mutantes pontuais foram denominados GAC.K207E, GAC.K202E e GAC.K512E, e foram analisados por ensaio de cinética enzimática e diluição seriada por gel filtração (Figura 21). A glutaminase com mutação pontual no domínio catalítico, GAC.K512E, perdeu a capacidade de ativação enzimática por fosfato concomitante com o desaparecimento da capacidade de formar superoligômeros. Curiosamente, os dois mutantes pontuais da região N-terminal, GAC.K202E e GAC.K207E, resultaram no aumento da atividade enzimática, o qual foi coerente com a formação de partículas maiores que a GAC selvagem (Figura 21). Os três mutantes pontuais, além de reforçar a necessidade de formação de superoligômeros para a ativação enzimática da proteína,

adicionalmente mostram a importância dessas regiões independentes e distantes do sítio catalítico na formação de filamentos.

O resíduo de lisina 311 foi identificado como alvo de acetilação de GLS1 de humano, através de espectrometria de massas de alta resolução (Choudhary *et al.* 2009). Esta lisina se localiza no domínio catalítico de glutaminase, porém em face oposta ao sítio catalítico e ao “*gating loop*”. Portanto, não compõe a região onde efetivamente ocorre a reação enzimática. Para avaliar se esta modificação pós-traducional reversível poderia influenciar na formação de superestruturas em células, e assim controlar a ativação da enzima, geramos um mutante mimético a enzima acetilada. Como a acetilação neutraliza a carga positiva de lisinas, a substituição foi feita por um resíduo de glutamina (que não possui carga). Como a enzima recombinante é de *Mus musculus*, o resíduo equivalente neste organismo é o 316, e por isso o mutante foi denominado GAC.K316Q. No perfil cinético o mutante se mostrou menos responsivo à fosfato, e simultaneamente, apresentou reduzida tendência a superoligomerização com relação a enzima selvagem (Figura 21).

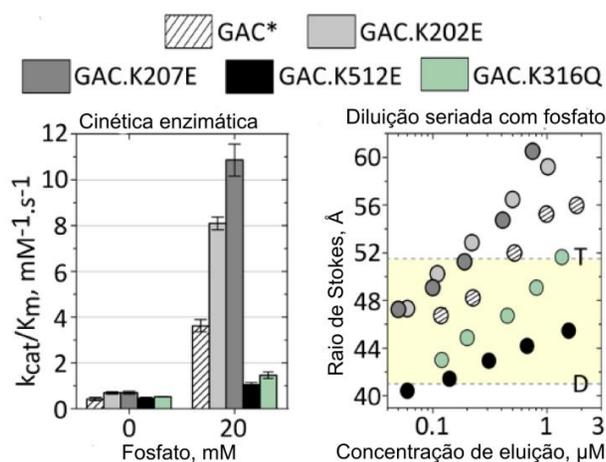


Figura 21: Mutações de lisinas identificadas como “crosslincadas” e mimético de acetilação. Foram obtidos os parâmetros de cinética enzimática e os perfis de diluição seriada: a glutaminase com mutação pontual no domínio catalítico GAC.K512E, assim como o mimético de acetilação GAC.K316Q, perderam atividade com concomitante diminuição da capacidade do formar superoligômeros. Dois mutantes pontuais da região N-terminal, GAC.K202E e GAC.K207E, resultaram no aumento da atividade enzimática, o qual é coerente com a formação de partículas maiores que a GAC selvagem. As esferas representam os raios de Stokes da eluição, e as barras horizontais com área amarela do gráfico delimitam raios de Stokes da mGAC (51 e 41 Å para tetrâmero e dímero, respectivamente), que foram calculados a partir do modelo cristalográfico empregando-se o programa HIDROPRO. O asterisco significa que o valor foi previamente publicado (Cassago *et al.* 2012).

Kenny e coautores já haviam demonstrado a importância da porção N-terminal para a ativação de glutaminases (Kenny *et al.* 2003). Porém, a estrutura cristalográfica da GAC mostra que não há resíduos da região N-terminal que participem do processo de catálise enzimática ou que sejam necessários para o correto enovelamento do sítio ativo. Baseado nas dimensões observadas na estrutura cristalográfica, a largura média de 66 Å para um filamento único (Figura 22-A) indica que a filimentação desta fita ocorre ao longo do eixo de tetrâmeros (Figura 22-B), sugerindo uma interação de ponta a ponta pela região N-terminal. O crescimento do filamento único é favorecido em uma direção e aparentemente ocorre indefinidamente, já que a ponta final N-terminal estará sempre livre para a adição de um novo tetrâmero em ambas as pontas (esta hipótese será importante no experimento de anisotropia de fluorescência, discutido no próximo item). Em adição, as imagens obtidas por TEM sugeriram fortemente que o superoligômero é formado por duas fitas de tetrâmeros em uma organização do tipo super-hélice.

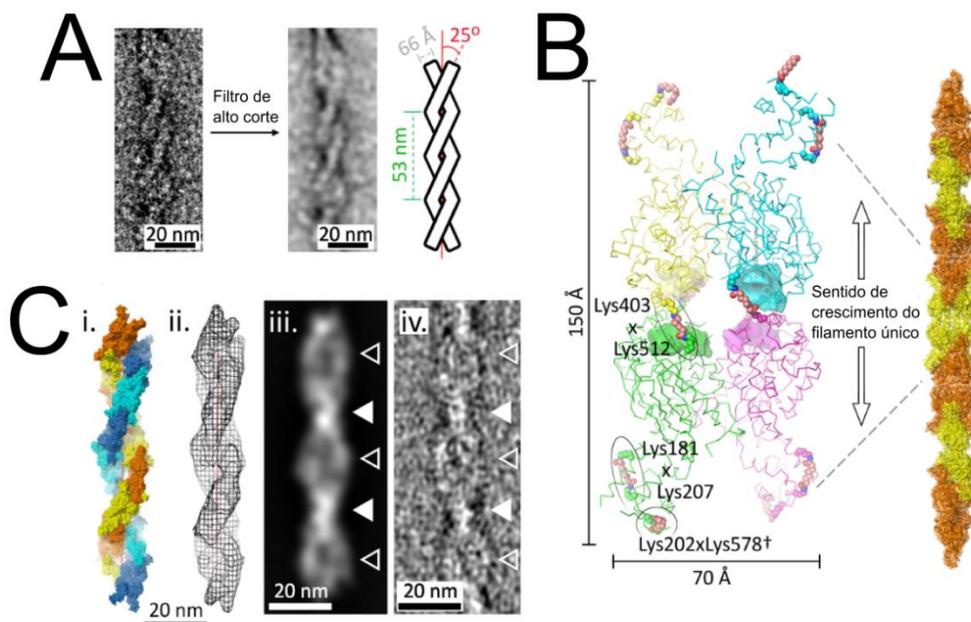


Figura 22: Modelo de formação de superestrutura. A exclusão de altas frequências associadas a ruído das micrografias em (A) permitiu medidas de comprimento e ângulo da superestrutura, além de destacar a característica de fita dupla de mão direita. Em (B) apresentamos o mecanismo de formação de um filamento único, destacando os pares de lisina “crosslinkados” identificados por MS. Em (C) apresentamos o modelo de fita dupla obtido por modelagem manual (i), o mapa de densidade eletrônica calculado do modelo obtido (ii) e a validação do modelo pela projeção 2D da estrutura (iii). As regiões de alta densidade (triângulos cheios) e baixa densidade (triângulos vazios) da projeção são comparáveis as mesmas regiões na foto de microscopia (iv).

Para gerar um modelo para o polímero fita dupla, dois filamentos únicos foram manualmente enrolados usando parâmetros apresentados na Figura 22-A como restrição. De acordo com as dimensões de comprimento e ângulos, a estimativa de unidade mínima de repetição – por uma volta da hélice – foi de sete subunidades tetraméricas em cada fita entrelaçada (Figura 22-B). Devido à simetria diedral dupla do tetrâmero (Cassago *et al.* 2012) não é necessário determinar se a fita dupla hélice é de natureza paralela ou antiparalela. Para validar o modelo contra os dados experimentais, um Fator de estrutura de Fourier calculado a partir do mapa de densidade eletrônica foi gerado (na resolução máxima de 35 Å), usando somente os fatores de estrutura calculados dos arquivos da projeção tridimensional da fita dupla e subsequentemente projetados teoricamente em duas dimensões, usando ferramentas de *software* de microscopia Image. O resultado final apresentou características totalmente comparáveis com as observadas na micrografia representativa (Figura 22-C iv), principalmente com relação a regiões estreitas de alta densidade (regiões compactas), e regiões de ampla baixa densidade (regiões em forma de disco). Dada a limitação experimental que apenas permite um modelo de baixa resolução, não foi possível descrever as interações específicas que prendem os filamentos únicos e a fita dupla hélice juntas.

4.6 Anisotropia de fluorescência

A anisotropia de fluorescência foi proposta para medir, em solução, o equilíbrio de interação da GAC com dímeros da própria GAC marcada com um fluoróforo (FITC). O mesmo ensaio foi realizado para a KGA com o intuito de comparar as constantes de dissociação das duas isoformas.

O gel SDS-PAGE 10% apresentado na Figura 23 foi fotografado no equipamento *Gel Logic 2200 Imaging System*, nos comprimentos de onda próximos aos de excitação e emissão do FITC (485 nm e 512 nm, respectivamente), e exposto por um segundo. Em seguida, o mesmo gel foi corado com *coomassie blue*. A Figura mostra que as proteínas marcadas não apresentam contaminantes ou degradação que poderiam interferir no ensaio.

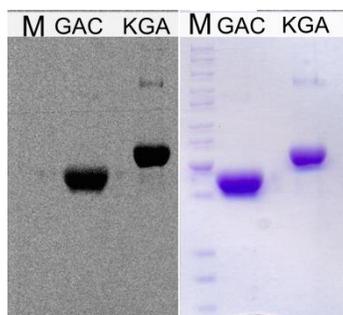


Figura 23: Gel SDS 10% das isoformas GAC e KGA analisado por fluorescência com FITC no equipamento *Gel Logic 2200 Imaging System* e em seguida corado com *coomassie blue*. Pela fluorescência é possível perceber que a marcação foi eficiente e que não há sinal de fluoróforo livre.

Como explicado em Material e Métodos item 3.9, durante o ensaio foram aplicadas concentrações crescentes de proteína não marcada sobre uma concentração de 5 nM de proteína marcada (concentração em que tanto GAC quanto KGA estão em estado dimérico). A ideia inicial era de que a dinâmica de formação do tetrâmero poderia ser avaliada neste estudo, uma vez que em concentrações altas de proteína não marcada, toda a proteína marcada se encontraria ligada na forma de tetrâmero, estabilizando anisotropia. Porém, para as duas isoformas, GAC e KGA, não conseguimos alcançar um extenso *plateau* superior (Figura 24), fato que indica que o equilíbrio não foi alcançado. Avaliando o mecanismo de formação da fibra apresentado no item acima, acreditamos que, quaisquer que sejam as interfaces formadas, sempre haverá uma extremidade N-terminal livre para a incorporação de mais uma subunidade à fibra, ou seja, está pode crescer indefinidamente. Portanto, não podemos dizer que a dinâmica em solução que foi analisada por anisotropia de fluorescência se refere à tetramerização, mas provavelmente a amostras heterogêneas de tamanhos maiores. Por este motivo, a constante de dissociação apresentada foi denominada aparente.

Além disso, as concentrações finais de proteína utilizadas no ensaio são superiores as utilizadas nas análises de formação de fibra por MET, e próximas as concentrações aplicadas nos ensaios de diluição seriada (que foram de 1 μ M e 18 μ M, respectivamente). Por isso, as concentrações utilizadas na anisotropia de fluorescência (ver tabela 4) são suficientes para garantir uma dinâmica de oligomerização, mesmo os ensaios sendo feitos

na ausência de fosfato. Tentamos analisar essas espécies oligoméricas por DLS, porém a polidispersão da amostra dificultou a detecção do tamanho das espécies em solução.

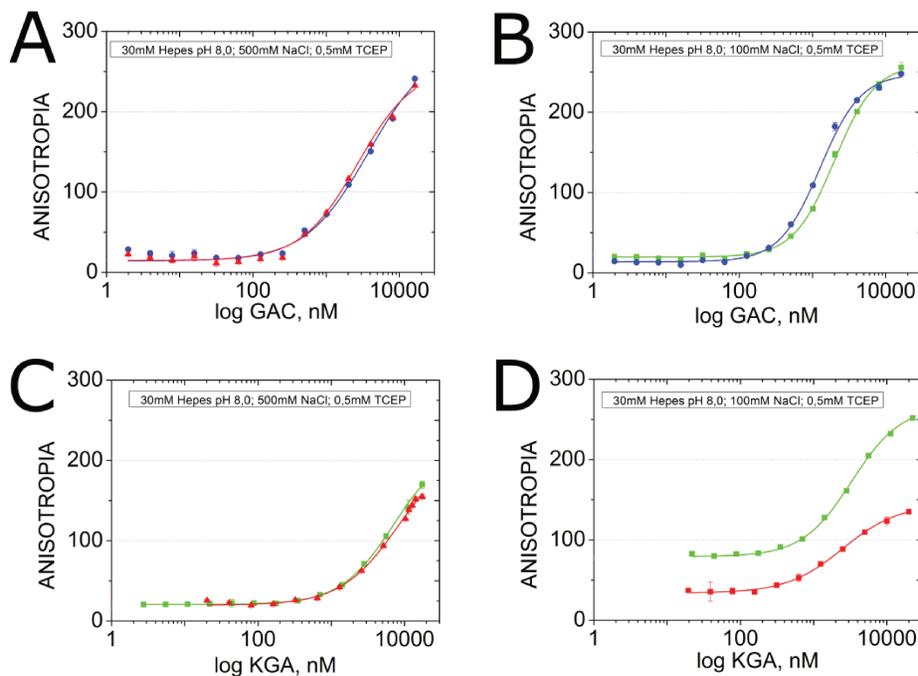


Figura 24: Resultados preliminares do ensaio de Anisotropia de Fluorescência. Em (A) e (B) apresentamos o resultado obtido para a GAC, numa concentração de 500 e 100 mM de NaCl, respectivamente. Em (C) e (D) apresentamos a sigmoide obtida para a KGA, nas concentrações de 500 e 100 mM de NaCl, respectivamente.

Já descrevemos previamente que altas concentrações de NaCl são capazes de romper a formação de superoligômeros. Então, ensaios foram feitos em tampão com alta concentração salina (500 mM NaCl). Avaliando os dados finais de anisotropia, na tabela 4, é possível constatar que independente da concentração de sal ou da isoforma de glutaminase, o valor da constante de dissociação (K_{d-app}) variou apenas entre 1,5 a 8 mM, valor que consideramos pouco significativo. Estudos de Calorimetria de Titulação Isotérmica da interação entre a proteína Calmodulina e um peptídeo derivado de 20 resíduos de aminoácidos de Miosina Quinase (denominado RS20) apresentou uma constante de dissociação de 10 μ M (Tsvetkov *et al.* 1999), próxima aos valores obtidos para a KGA e GAC. Variando a concentração de sal de 100 mM para 150 mM, o K_{d-app} aumentou numa ordem de 10^3 para esta interação. Aumentando a concentração de sal para a GAC e KGA, a constante de dissociação aumentou aproximadamente duas vezes (Tabela

4). Mesmo que sejam estudos de interações de proteínas não relacionadas, esperávamos que o sal fosse capaz de afetar mais a constante de dissociação das glutaminases.

Tabela 4: Valores de constantes de dissociação obtidos no ensaio de Anisotropia.

	GAC com 500 mM de NaCl		KGA com 500 mM de NaCl	
K_{d-app} (μ M)	$3,76 \pm 0,78$	$2,68 \pm 0,24$	$7,03 \pm 0,84$	$8,51 \pm 1,9$
Coefficiente de Hill	$1,01 \pm 0,12$	$1,13 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,11$
Concentração final de proteína (nM)	16250		17500	
	GAC com 100 mM de NaCl		KGA com 100 mM de NaCl	
K_{d-app} (μ M)	$1,99 \pm 0,16$	$1,3 \pm 0,1$	$3,30 \pm 0,11$	$2,49 \pm 0,14$
Coefficiente de Hill	$1,6 \pm 0,07$	$1,54 \pm 0,1$	$1,28 \pm 0,05$	$1,14 \pm 0,05$
Concentração final de proteína (nM)	16250		22500	22000

Uma visualização normalizada dos dados foi feita utilizando como referência o valor de anisotropia máxima observada dentre todas as medições (considerada como 1), e utilizando apenas um dado representativo das duplicatas para facilitar a visualização do resultado. É possível notar um aspecto interessante dos resultados de anisotropia de fluorescência observando a Figura 25: não há diferença na anisotropia devido a adição de sal, mas as curvas sugerem diferença anisotrópica entre GAC e KGA. Isto sugere que a GAC possivelmente está presente em estruturas pouco maiores que a KGA.

Como o fluoróforo reage com aminas primárias, este é capaz de marcar lisinas. Porém, como mostrado pelas diversas mutações pontuais apresentadas, as lisinas são resíduos essenciais para a atividade de glutaminase. Decidimos verificar se a marcação com FITC atrapalharia a capacidade catalítica das glutaminases (resultado apresentado na tabela de anexos 6 – página 61). As enzimas perderam atividade com eficiências catalíticas comparáveis, o que corrobora com os valores próximos de K_{d-app} . Porém, não podemos traçar uma correlação entre a marcação e a oligomerização, pois não conseguimos detectar os estados finais de superestrutura presentes em solução. Provavelmente, a marcação ocorre em alguma lisina importante para a cinética de enzima, criando artefatos que inviabilizam este ensaio para a análise de interações dessas glutaminases. Uma alternativa seria usar fluoróforos que marcam cisteínas, como *Fluorescein-5-maleimide* e *5-Iodoacetamido-fluorescein*.

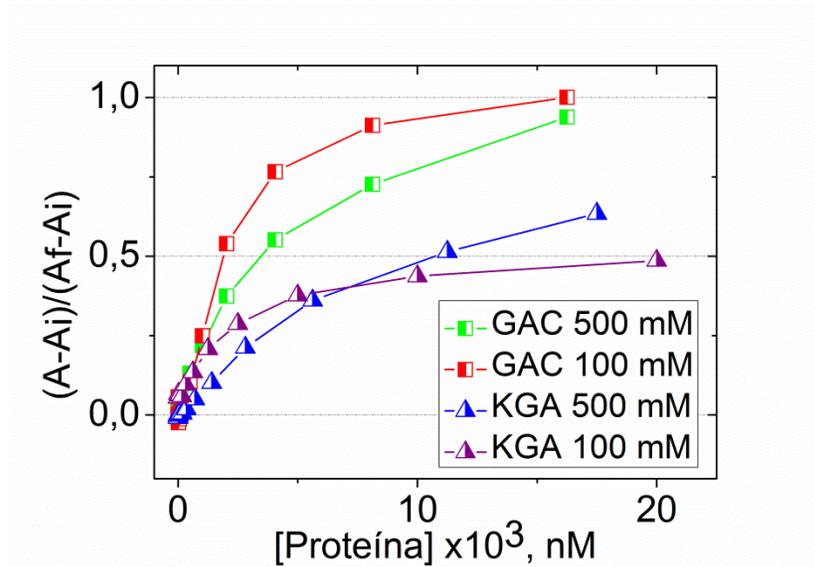


Figura 25: Resultados normalizados de anisotropia versus concentração protéica. Valores de anisotropia medidos a cada nova adição de proteína não marcada está simbolizado por A, o valor de anisotropia apenas da sonda livre (referente ao ensaio de maior valor de anisotropia medido experimentalmente) é determinado por A_i e $A_{máx}$ é o maior valor de anisotropia entre todos os ensaios.

4.7 Ensaios celulares

No intuito de estudar a importância da ativação e consequente oligomerização de glutaminase em sistema vivo, clones estáveis de linhagem de câncer de mama MDA-MB 231 expressando tanto GAC-V5, GAC.K325A-V5 e plasmídeo vazio (Mock) foram gerados pela mestranda Caroline F. R. Ascenção. A aluna também gerou os clones *Knockdown* de GAC endógena (Figura 26-B). Um detalhe experimental a ser ressaltado é que apesar de nos ensaios celulares denominarmos GAC.K325A com intuito de manter coerência com os ensaios estruturais, a sequência na verdade contém a mutação equivalente K320A, pois se trata da Glutaminase C de humano.

Na Figura 26-A podemos perceber que os clones transfectados com GAC.K325A-V5 foram capazes de proliferar mais, apresentando maior velocidade de catálise 40 a 50% maior que o controle e a enzima selvagem, além de consumir mais glutamina presente no meio de cultura. Células transfectadas com GAC-V5 e Mock apresentaram a mesma capacidade de consumir glutamina ($0,78 \pm 0,09$ e $0,81 \pm 0,07$ nmol/L por célula, respectivamente), enquanto o mutante consumiu 40% mais ($1,16 \pm 0,07$ nmol/L por célula).

As mesmas análises foram feitas em clones *knockdown* de GAC (Figura 26-C), para anular a contribuição endógena no crescimento e desenvolvimento dessas células. Diferenças fenotípicas ficaram mais acentuadas para o mutante GAC.K325A-V5, que consumiu duas vezes mais glutamina que células transfectadas com GAC-V5, continuou a proliferar mais, e apresentou um nível de atividade 75% maior que o controle. Essas características certamente são resultado da expressão ectópica de uma glutaminase hiperativa e propensa a formação de superestruturas, a GAC.K325A. Estes resultados são indícios de que a tendência à oligomerização promove vantagens ao desenvolvimento celular. Mais resultados celulares podem ser encontrados no artigo em anexo.

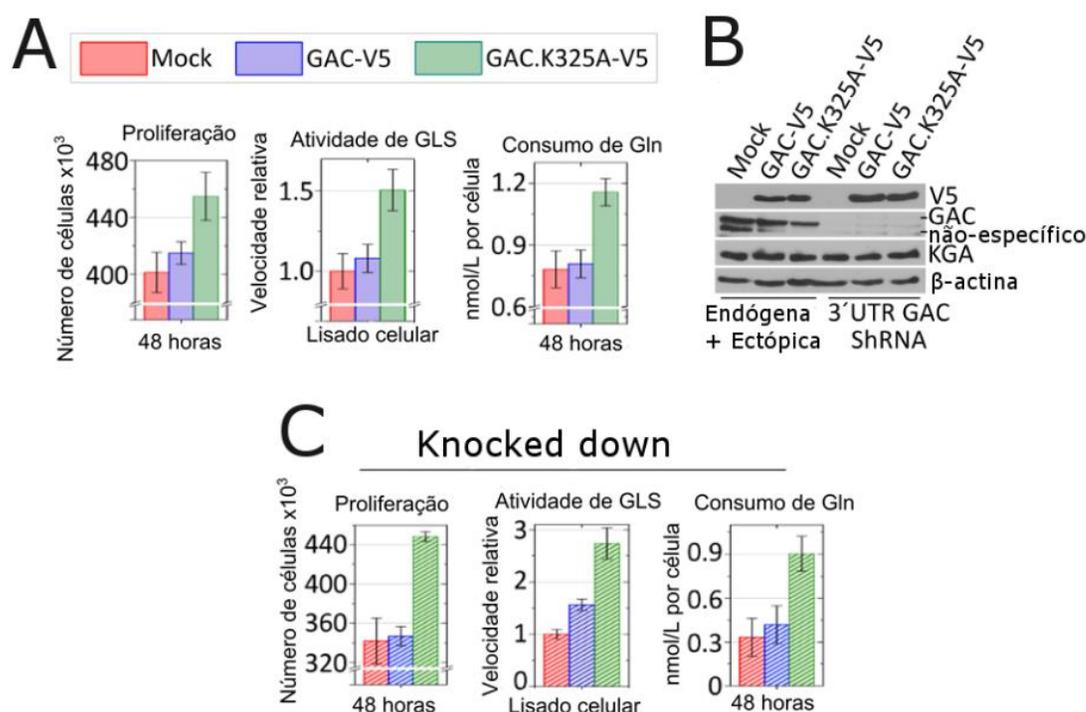


Figura 26: Proliferação celular e consumo de glutamina favorecidos pela transfecção de GAC.K325A. Em (A) apresentamos os resultados para clones estáveis com expressão endógena. Em (B) confirmamos por *Western blotting* a expressão da GAC endógena dos clones utilizados e o *knockdown* de GAC. Em (C) células *knockdown* transfectadas com GAC.K325A-V5 apresentaram fenótipos mais acentuados.

5. DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, a dinâmica cinética de glutaminases é caracterizada por dímeros inativos, que na presença de fosfato deslocam para tetrâmeros enzimaticamente ativos (Morehouse & Curthoys 1981 e Godfrey *et al.* 1977). Nosso trabalho comprovou que a ativação dessas enzimas é, na verdade, dependente da capacidade de formação de superestruturas: ao considerarmos as três isoformas de glutaminases (GAC, KGA e LGA) na presença de fosfato, percebemos a correlação direta da formação de superestruturas e as diferenças cinéticas entre essas isoformas.

Observamos ao longo das purificações que mutantes superativos eluíam em um volume maior que a GAC selvagem. Como estas amostras eram bastante heterogêneas em termos de espécies moleculares, decidimos que a melhor técnica para estudá-las era a microscopia eletrônica. Para nossa surpresa, qualquer mutante ativo da GAC, ou mesmo a enzima selvagem na presença de fosfato, formavam filamentos que cresciam em apenas uma direção. Como prova de que a constatação dessas superestruturas não é um artefato de *cross-linking*, expressão heteróloga ou construções de proteínas truncadas, quarenta anos atrás essas fibras foram observadas em glutaminase purificada de rim de porco (Olsen *et al.* 1970 e Olsen *et al.* 1973a). Esses polímeros extensos foram usados como propriedade para posterior purificação da enzima nativa, possibilitando a primeira caracterização bioquímica (Curthoys *et al.* 1976).

Uma mutante interessante foi o GAC.K325A, capaz de formar superestruturas e com uma constante de Michaelis extremamente baixa. Estas características do mutante são recorrentes mesmo na ausência de fosfato, o que nos leva a sugerir maior acessibilidade do sítio ativo para o substrato mediante polimerização. Um fenômeno reverso foi obtido com outra mutação de neutralização de carga positiva, também no *gating loop*, denominada GAC.R322A. Portanto, o presente trabalho revela um novo papel para o *gating loop*, que além de regular a acessibilidade do substrato para o sítio ativo, também controla a polimerização da proteína.

Na presença de fosfato, a adição de 10 μ M de BPTES foi capaz de diminuir em 80% a eficiência catalítica da GAC, corroborando dados já publicados (Robinson *et al.* 2007) e nos nossos ensaios de atividade (Tabela de anexos 5 – página 61). Pelo perfil da curva de

dose-resposta da Glutaminase C, o inibidor apresentou-se como misto a partir da concentração de 200 nM de BPTES. Ao traçarmos a mesma curva de dose-resposta para GAC.K325A, deixamos claro que mesmo concentrações muito altas de BPTES foram incapazes de inibir este mutante.

Inicialmente acreditávamos que a região do “*gating loop*” seria exclusivamente a região responsável por controlar acessibilidade da glutamina ao sítio ativo, simplesmente pelo fato de que ao assumir uma conformação aberta na forma tetramérica, o *loop* permitiria a exposição do sítio ativo da enzima. Porém, como mostrado pela nossa estrutura cristalográfica da GLS1 complexada ao BPTES (artigo em anexo) e por outra publicação (Thangavelu *et al.* 2012), o BPTES mantém o *gating loop* em conformação aberta, e desta forma o estado oligomérico trava em tetrâmero. Aparentemente não é a simples movimentação do “*gating loop*” sobre o sítio ativo, quando a proteína vai de dímero para tetrâmero, que controla a eficiência da enzima, e sim a capacidade de formação fibra. Nossa hipótese é que a ligação do BPTES, o qual interage extensivamente por várias ligações de hidrogênio com a interface de tetramerização e com o *gating loop*, é responsável pela perda de flexibilidade do tetrâmero. A conformação rígida adquirida pelo *gating loop* na interação com BPTES dificultaria torções de unidades monoméricas do tetrâmero necessárias para a formação das fibras. Estas torções do tetrâmero não podem ser previstas a partir de nosso modelo construído manualmente, mas futuramente poderiam ser observadas a partir de dados experimentais de maior resolução, como por exemplo, imagens de Crio Microscopia Eletrônica.

Devido às limitações experimentais, geramos a um modelo de baixa resolução (35Å) e identificamos regiões possivelmente envolvidas na superestrutura. Descrevemos um mecanismo de formação filamento único e da dupla fita, mas encontramos limitações técnicas para descrever as interações específicas da superoligomerização. No entanto, com base nos efeitos gerados principalmente pelas mutações pontuais, é plausível sugerir que a complementaridade de cargas é a força motriz para a filamentação, que só ocorre após cargas superficiais específicas serem aumentadas ou neutralizadas. Aparentemente, essas interações tem um caráter eletrostático, fenômeno ilustrado pelo efeito antagônico das mutações GAC.K325A e GAC.R322A. Por este motivo a filamentação requer íon fosfato, que possui carga negativa. Assim, o íon fosfato é importante para o aumento da eficiência

catalítica da GAC não apenas por manter a taxa de *turnover* da enzima (Cassago *et al.* 2012), mas também por permitir a formação de superoligômeros.

Como a única diferença sequencial entre GAC e KGA está na porção C-terminal, uma primeira deleção dos resíduos finais foi feita em (Cassago *et al.* 2012), denominado GAC.DelC. Porém, neste clone foram deletados alguns resíduos em comum entre GAC e KGA. Foi feita então uma segunda clonagem, onde removemos os resíduos de aminoácidos que eram particulares da GAC, que são os resíduos H556 a S603, e por isso denominamos esta deleção de GAC.H556. Este mutante possui apenas a porção N-terminal e o domínio catalítico, que são idênticos para as duas isoformas. No ensaio de cinética, percebemos que a atividade do mutante delecional é praticamente igual a atividade da enzima selvagem, resultado também descrito para a enzima recombinante de humano (Hartwick & Curthoys 2012). Isto nos leva a inferir que há algo mais que apenas uma diferença sequencial entre as isoformas KGA e GAC que modula a eficiência catalítica das duas isoformas. Nossa hipótese é de que a porção C-terminal maior da KGA seria um impedimento estérico para a formação de grandes oligômeros.

O ensaio de anisotropia de fluorescência foi proposto inicialmente para comparar valores de constantes de dissociação da interação entre dímeros (formando tetrâmeros) entre a KGA e a GAC. Com o andamento do trabalho, descobrimos não haver tal equilíbrio em solução devido ao fenômeno de oligomerização, com um perfil heterogêneo que impossibilitou a detecção dos exatos estados que avaliamos neste experimento. Contribuindo para a inviabilidade do uso desta técnica para analisar glutaminases, não conseguimos formar um *plateau* superior. Acreditamos que o equilíbrio será sempre deslocado à medida que a concentração de proteína final variar no ensaio, pois sempre haverá uma extremidade coesiva livre (na superestrutura) para adição de uma nova subunidade. Além disso, a marcação com fluoróforo inibiu a atividade das enzimas, provavelmente por reagir com algum resíduo de lisina chave para a catálise. Apesar do insucesso da técnica, uma sutil diferença no perfil anisotrópico entre as duas isoformas, numa concentração próxima de proteína e mesma condição experimental, sugere que elas possuem potenciais de oligomerização diferentes em solução, mesmo na ausência de

fosfato. Já havíamos mostrado por MET que a GAC forma polímeros maiores, mas estas micrografias foram feitas com as enzimas incubadas com fosfato.

Nossos resultados sugerem que a acetilação detectada *in vivo* no resíduo de Lis311 pode atuar como uma modificação pós-traducional reversível conduzir a atividade enzimática a partir da regulação negativa da formação de superestruturas. É preciso ressaltar que não acreditamos na formação de polímeros com micrômetros de comprimento (como as superestruturas apresentadas nas micrografias) no interior da mitocôndria. Presumimos que haja formação de oligômeros curtos e heterogêneos. Em colaboração com muitos alunos do nosso grupo e por diferentes abordagens tentamos visualizar as estruturas de glutaminases na mitocôndria de células vivas, no entanto, não obtivemos sucesso ainda. Contudo, no percurso deste trabalho, e novamente com a participação do meu grupo, conseguimos evidências que sugerem peculiaridades que essas superestruturas poderiam proporcionar à célula, como maior proliferação, maior aptidão a glutamina e maior capacidade proliferativa.

6. CONCLUSÕES

- Mostramos que existe correlação direta entre oligomerização e atividade das isoformas de glutaminases: GAC é a mais eficiente e capaz de formar as maiores estruturas;
- Inibição por BPTES ocorre por rompimento das superestruturas;
- GAC oligomeriza em hélice de dupla fita, contendo sete tetrâmeros por volta que interagem via domínios N-terminais;
- Suspeitamos que a formação de superestruturas seja proporcionada pela flexibilidade do loop L₃₂₁RFNKL₃₂₆;
- Acetilação in vivo da lisina 311 pode ser um mecanismo de regulação negativa da formação de superestruturas e da ativação da proteína;
- Expressão ectópica do mutante superativo GAC.K325A em células de câncer MDA-MB 231 propiciou vantagens proliferativas;
- Não esperamos polímeros de GAC de micrômetros de comprimento dentro da mitocôndria. Ao invés disso, imaginamos que talvez ocorra a presença de filamentos menores e heterogêneos.

7. ANEXOS

Tabela de anexos 1: Parâmetros físicos e químicos das proteínas heterólogas.

	mGAC Δ1-128	mGAC.H556	rKGA Δ1-128
Número de aminoácidos	480	432	551
Massa molecular (Da)	53393	47963	61420
Ponto Isoelétrico teórico	6,53	7,63	6,43
Coefficiente de Extinção Molar*	38850	30370	41830
Absorbância (1g/L)*	0,728	0,633	0,681

*Considerando todos os resíduos de Cisteínas reduzidos.

Tabela de anexos 2: Parâmetros cinéticos da glutaminase GAC, recombinantes selvagem e mutantes. Parâmetros marcados com asterisco foram retirados de (Cassago *et al.* 2012).

K_m , mM								
Pi, mM	GAC*	GAC+BPTES	GAC.N324A	GAC.R322A	GAC.R392S	GAC.E330A	GAC.K325A	K325A+BPTES
0	18,40 ± 2,10	--	26,12 ± 1,85	13,67 ± 0,52	25,71 ± 3,62	9,92 ± 1,17	0,17 ± 0,02	0,09 ± 0,02
20	5,70 ± 0,33	9,08 ± 0,45	17,08 ± 1,38	14,94 ± 0,53	25,81 ± 2,41	1,31 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,02
k_{cat} , s ⁻¹								
Pi, mM	GAC*	GAC+BPTES	GAC.N324A	GAC.R322A	GAC.R392S	GAC.E330A	GAC.K325A	K325A+BPTES
0	7,75 ± 0,35	--	12,44 ± 0,95	8,07 ± 0,11	10,32 ± 0,65	9,70 ± 0,32	47,91 ± 2,10	21,07 ± 3,99
20	20,62 ± 0,34	7,66 ± 0,13	18,40 ± 1,96	8,92 ± 0,12	10,77 ± 0,72	19,29 ± 0,47	86,92 ± 2,33	81,21 ± 1,47
k_{cat}/K_m , mM ⁻¹ .s ⁻¹								
Pi, mM	GAC*	GAC+BPTES	GAC.N324A	GAC.R322A	GAC.R392S	GAC.E330A	GAC.K325A	K325A+BPTES
0	0,42 ± 0,07	--	0,48 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,98 ± 0,08	281,8 ± 35,4	222,69 ± 7,67
20	3,62 ± 0,27	1,18 ± 0,45	1,08 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,42 ± 0,04	14,78 ± 0,28	248,3 ± 15,7	232,02 ± 0,75

Tabela de anexos 3: Parâmetros cinéticos da GAC e mutantes relacionados com o mecanismo de formação de oligômeros. Parâmetros com asterisco foram previamente publicados em (Cassago *et al.* 2012).

K_m, mM					
Pi (mM)	GAC*	GAC.K202E	GAC.K207E	GAC.K512E	GAC.K316Q
0	18,40 ± 2,10	25.54 ± 1.27	23.64 ± 1.50	29.67 ± 1.61	21.29 ± 0.29
20	5,70 ± 0,33	4.04 ± 0.11	2.85 ± 0.15	19.77 ± 0.99	12.76 ± 1.16
k_{cat}, S⁻¹					
Pi (mM)	GAC*	GAC.K202E	GAC.K207E	GAC.K512E	GAC.K316Q
0	7,75 ± 0,35	17.57 ± 0.41	16.45 ± 0.47	13.75 ± 0.35	11.14 ± 0.28
20	20,62 ± 0,49	32.68 ± 0.23	30.94 ± 0.38	21.03 ± 0.44	18.75 ± 0.63
k_{cat}/K_m, mM⁻¹.s⁻¹					
Pi (mM)	GAC*	GAC.K202E	GAC.K207E	GAC.K512E	GAC.K316Q
0	0,42 ± 0,07	0.69 ± 0.05	0.70 ± 0.06	0.46 ± 0.04	0.52 ± 0.01
20	3,62 ± 0,27	8.09 ± 0.28	10.86 ± 0.70	1.06 ± 0.08	1.46 ± 0.14

Tabela de anexos 4: Parâmetros cinéticos da KGA, GAC e deleção GAC.H556. Parâmetros com asterisco foram previamente publicados em (Cassago *et al.* 2012).

K_m, mM			
Pi (mM)	GAC*	KGA*	GAC.H556
0	18,40 ± 2,10	15,60 ± 1,90	31,51 ± 0,63
20	5,70 ± 0,33	9,00 ± 0,40	5,63 ± 0,61
k_{cat}, S⁻¹			
Pi (mM)	GAC*	KGA*	GAC.H556
0	7,75 ± 0,35	7,20 ± 0,31	10,46 ± 0,11
20	20,62 ± 0,49	14,44 ± 0,26	19,41 ± 0,19
k_{cat}/K_m, mM⁻¹.s⁻¹			
Pi (mM)	GAC*	KGA*	GAC.H556
0	0,42 ± 0,07	0,46 ± 0,08	0,33 ± 0,01
20	3,62 ± 0,27	1,60 ± 0,10	3,47 ± 0,41

Tabela de anexos 5: Parâmetros cinéticos para curvas de dose-resposta a BPTES da GAC e do mutante GAC.K325A.

GAC + 20 mM fosfato			GAC.K325A + 20 mM fsfato		
BPTES, nM	$k_{cat-app}$, s^{-1}	K_{m-app} , mM	BPTES, nM	$k_{cat-app}$, s^{-1}	K_{m-app} , mM
0	16.56 ± 0.09	4.43 ± 0.07	0	86.92 ± 2.33	0.35 ± 0.02
0 (+0.5% DMSO)	16.62 ± 0.15	4.63 ± 0.12	0 (+0.5% DMSO)	79.04 ± 1.44	0.29 ± 0.01
5	16.05 ± 0.12	4.41 ± 0.10	32	81.21 ± 1.47	0.35 ± 0.02
10	16.42 ± 0.18	4.51 ± 0.15	63	86.86 ± 1.67	0.33 ± 0.01
50	14.30 ± 0.21	4.10 ± 0.17	125	75.26 ± 1.84	0.28 ± 0.02
100	10.75 ± 0.22	5.02 ± 0.28	250	77.57 ± 0.94	0.31 ± 0.01
200	9.30 ± 0.10	5.25 ± 0.16	500	86.54 ± 1.88	0.28 ± 0.01
400	8.40 ± 0.21	7.34 ± 0.43	1000	77.90 ± 1.56	0.25 ± 0.01
500	8.51 ± 0.14	7.88 ± 0.32	2000	77.85 ± 1.91	0.30 ± 0.02
1000	8.37 ± 0.21	11.47 ± 0.60	4000	81.21 ± 1.70	0.33 ± 0.02
3000	7.49 ± 0.26	12.59 ± 0.76	8000	88.03 ± 1.84	0.34 ± 0.01
5000	7.70 ± 0.18	13.80 ± 0.54			
9000	7.66 ± 0.13	13.93 ± 0.45			

Tabela de anexos 6: Comparação dos parâmetros cinéticos da KGA, GAC e respectivas marcações com FITC. Parâmetros com asterisco foram previamente publicados em (Cassago *et al.* 2012).

K_m , mM				
Pi (mM)	GAC*	KGA*	GAC.FITC	KGA.FITC
0	$18,40 \pm 2,10$	$15,60 \pm 1,90$	$26,58 \pm 1,4$	$28,13 \pm 1,9$
20	$5,70 \pm 0,33$	$9,00 \pm 0,40$	$16,56 \pm 1,4$	$19,47 \pm 1,15$
k_{cat} , s^{-1}				
Pi (mM)	GAC*	KGA*	GAC.FITC	KGA.FITC
0	$7,75 \pm 0,35$	$7,20 \pm 0,31$	$12,92 \pm 0,33$	$14,14 \pm 0,46$
20	$20,62 \pm 0,49$	$14,44 \pm 0,26$	$19,31 \pm 0,63$	$20,46 \pm 0,5$
k_{cat}/K_m , $mM^{-1}.s^{-1}$				
Pi (mM)	GAC*	KGA*	GAC.FITC	KGA.FITC
0	$0,42 \pm 0,07$	$0,46 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,04$
20	$3,62 \pm 0,27$	$1,60 \pm 0,10$	$1,16 \pm 0,18$	$1,05 \pm 0,3$

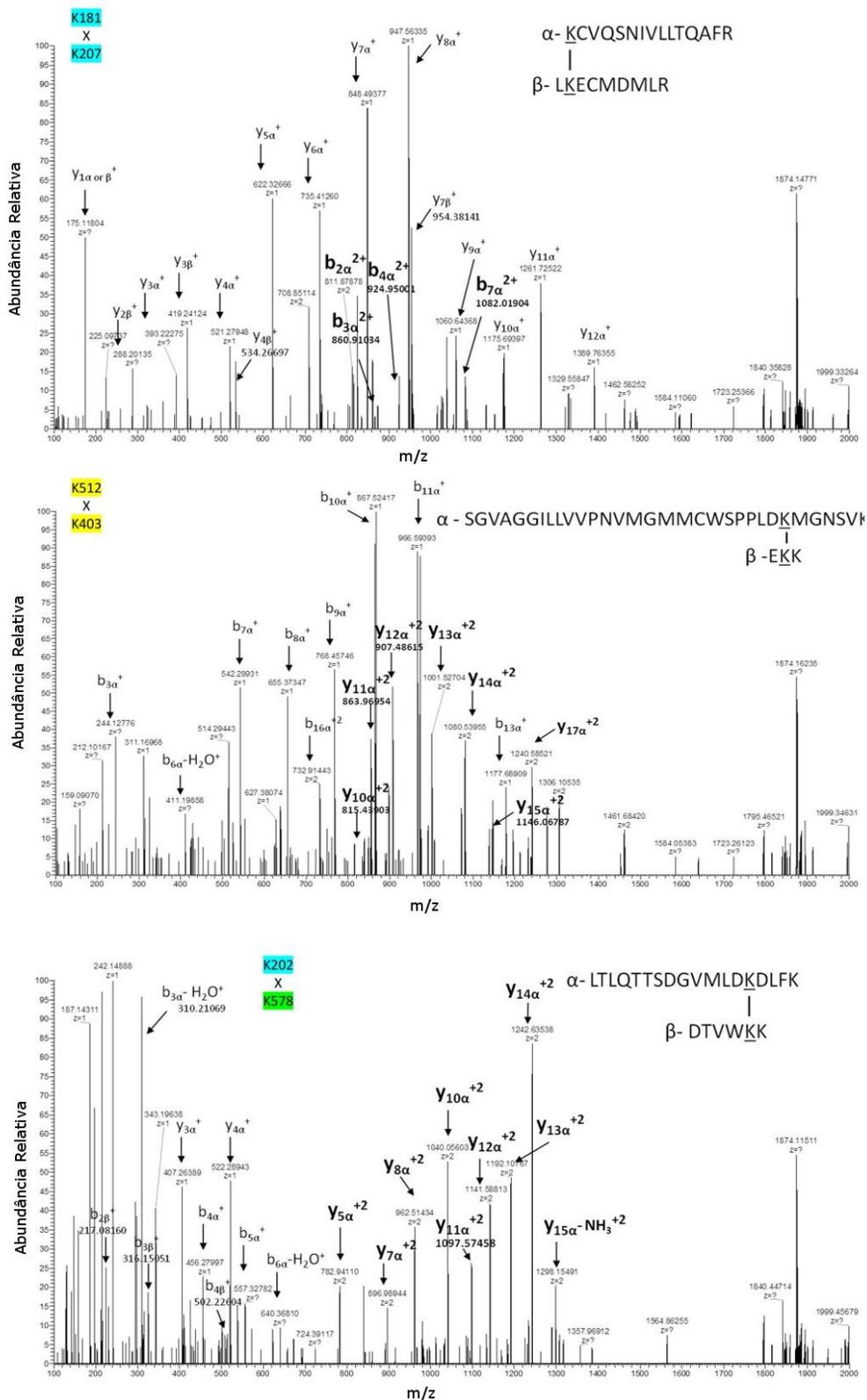


Figura de anexos 2: Espectros MS/MS das amostras de *cross-linking* da GAC. Espectros contendo os íons y e b foram manualmente validados para cadeias α e β dos peptídeos “crosslinkados”. Íons que continham *cross-linking* estão em **negrito**.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aledo, J.C. *et al.*, 2000. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mammalian Genome*, 11(12), pp.1107–1110.
- Aragão, A.Z.B. *et al.*, 2012. Identification of novel interaction between ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) and thioredoxin-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(51), pp.43071–43082.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Campos-Sandoval, J. a *et al.*, 2007. Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: affinity purification, kinetic and molecular characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(4), pp.765–773.
- Cassago, A. *et al.*, 2012. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), pp.1092–1097.
- Chem, J.B., Reitzer, J. & Wice, M., 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(8), pp.2669–2676.
- Cheong, H. *et al.*, 2011. Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(43), pp.17856–17856.
- Choudhary, C. *et al.*, 2009. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science*, 325 (5942), pp.834–840.
- Chowdhury, R. *et al.*, 2011. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Reports*, 12(5), pp.463–469.
- Colombo, S.L. *et al.*, 2010. Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), pp.18868–18873.
- Colombo, S.L. *et al.*, 2011. Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), pp.21069–21074.
- Curthoys, N.P., Kuhlenschmidt, T. & Godfrey, S.S., 1976. Regulation of renal ammoniogenesis: Purification and characterization of phosphate-dependent glutaminase from rat kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 174(1), pp.82–89.
- Dang, C. V, Le, A. & Gao, P., 2009. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clinical Cancer Research*, 15(21), pp.6479–6483.
- Dang, L. *et al.*, 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), pp.739–744.
- Daye, D. & Wellen, K.E., 2012. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(4), pp.362–369.

- DeBerardinis, R.J. *et al.*, 2007. 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(49), pp.19345–19350.
- DeBerardinis, R.J. *et al.*, 2008. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(1), pp.54–61.
- DeBerardinis, R.J. & Cheng, T., 2010. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29(3), pp.313–324.
- DeLaBarre, B. *et al.*, 2011. Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor. *Biochemistry*, 50(50), pp.10764–10770.
- Elgadi, K.M. *et al.*, 1999. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiological Genomics*, 1(2), pp.51–62.
- Fendt, S.-M. *et al.*, 2013. Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nature Communications*, 4(2236), pp.1–11.
- Gaglio, D. *et al.*, 2011. Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Molecular Systems Biology*, 7(523), pp.1–15.
- Gao, P. *et al.*, 2009. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239), pp.762–765.
- Gatenby, R. a & Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4(11), pp.891–899.
- Godfrey, S., Kuhlenschmidt, T. & Curthoys, P., 1977. Correlation between activation and dimer formation of rat renal phosphate-dependent glutaminase. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(6), pp.1927–1931.
- Goetze, K. *et al.*, 2011. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *International Journal of Oncology*, 39(2), pp.453–463.
- Gogvadze, V., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B., 2008. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends in Cell Biology*, 18(4), pp.165–173.
- Gómez-Fabre, P.M. *et al.*, 2000. Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *The Biochemical Journal*, 345, pp.365–375.
- Gorman, M.W. *et al.*, 1997. Inorganic phosphate as regulator of adenosine formation in isolated guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 272(2), pp.H913–H920.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, pp.57–70.
- Hartwick, E.W. & Curthoys, N.P., 2012. BPTES inhibition of hGA(124-551), a truncated form of human kidney-type glutaminase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(6), pp.861–867.

- Heery, D.M. *et al.*, 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387(6634), pp.733–736.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. & Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), pp.1029–1033.
- Hu, W. *et al.*, 2010. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), pp.7455–7460.
- Kenny, J. *et al.*, 2003. Bacterial expression, purification, and characterization of rat kidney-type mitochondrial glutaminase. *Protein Expression and Purification*, 31(1), pp.140–148.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L. & Dang, C. V, 2011. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(5), pp.325–337.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lakowicz, J.R., 2007. Principles of fluorescence spectroscopy. In *Springer*. p. 980 p.
- Le, A. *et al.*, 2012. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metabolism*, 15(1), pp.110–121.
- Li, J., Mahajan, A. & Tsai, M.-D., 2006. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry*, 45(51), pp.15168–15178.
- Márquez, J. *et al.*, 2006. Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochemistry International*, 48(6-7), pp.465–471.
- McGivan, J.D., Lacey, J.H. & Joseph, S.K., 1980. Localization and some properties of phosphate-dependent glutaminase in disrupted liver mitochondria. *The Biochemical Journal*, 192(2), pp.537–542.
- Metallo, C.M. *et al.*, 2012. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481(7381), pp.380–384.
- Moncada, S., Higgs, E.A. & Colombo, S.L., 2012. Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *The Biochemical Journal*, 446(1), pp.1–7.
- Morehouse, R.F. & Curthoys, N.P., 1981. Properties of rat renal phosphate-dependent glutaminase coupled to Sepharose. *The Biochemical Journal*, 193, pp.709–716.
- Olalla, L. *et al.*, 2002. Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), pp.38939–38944.
- Olsen, B.R. *et al.*, 1970. Formation and ultrastructure of enzymically active polymers of pig renal glutaminase. *Journal of Molecular Biology*, 52(2), pp.239–245.
- Olsen, B.R. *et al.*, 1973a. Ultrastructure of pig renal glutaminase. Evidence for conformational changes during polymer formation. *Journal of Molecular Biology*, 74(2), pp.239–251.

- Pfleger, C.M. & Kirschner, M.W., 2000. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & Development*, 14(6), pp.655–665.
- Porter, L.D. *et al.*, 2002. Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiological Genomics*, 9(3), pp.157–166. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045296> [Accessed July 18, 2013].
- Reitman, Z.J. & Yan, H., 2010. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(13), pp.932–941.
- Robinson, M.M. *et al.*, 2007. Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *The Biochemical Journal*, 406(3), pp.407–414.
- Roche, H., 1948. Biosynthesis of tricarboxylic acids by carbon dioxide fixation. *The Journal of Biological Chemistry*, 174(1), pp.133–157.
- Sasaki, M. *et al.*, 2012. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature*, 488(7413), pp.656–659.
- Scott, D.A. *et al.*, 2011. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(49), pp.42626–42634.
- Shi, Q. *et al.*, 2001. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene*, 20(28), pp.3751–3756.
- Siebert, G., Carsiotis, M. & Plaut, G., 1956. The enzymatic properties of isocitric dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(2), pp.977–991.
- Son, J., Lyssiotis, C.A., *et al.*, 2013. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*, 496(7443), pp.101–105.
- Suzuki, S. *et al.*, 2010. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), pp.7461–7466.
- Thangavelu, K. *et al.*, 2012. Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), pp.7705–7710.
- Tsvetkov, P.O. *et al.*, 1999. Apocalmodulin Binds to the Myosin Light Chain Kinase Calmodulin Target Site. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), pp.18161–18164.
- Wang, J.-B. *et al.*, 2010. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*, 18(3), pp.207–219.
- Warburg, O., 2008. On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), pp.309–314.
- Ward, P.S. *et al.*, 2010. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, 16(17), pp.225–234.

- Wise, D.R. *et al.*, 2011. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), pp.19611–19616.
- Wise, D.R. *et al.*, 2008. 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(48), pp.18782–18787.
- Wise, D.R. & Thompson, C.B., 2010. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(8), pp.427–433.
- Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), pp.471–484.
- Xu, H. & Freitas, M.A., 2007. A mass accuracy sensitive probability based scoring algorithm for database searching of tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*, 20(8), p.133.
- Yan, H. *et al.*, 2009. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 19(360), pp.765–773.
- Yuneva, M.O., Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D. V, Tsukamoto, T., Alonso, F.J., *et al.*, 2012. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metabolism*, 15(2), pp.157–170.
- Zhao, Y., Butler, E.B. & Tan, M., 2013. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death & Disease*, 4(3), p.e532.

ARTIGO EM ANEXO

Protein Structure and Folding:
Active Glutaminase C Self-assembles into a
Supratetrameric Oligomer That Can Be
Disrupted by an Allosteric Inhibitor



Amanda Petrina Scotá Ferreira, Alexandre Cassago, Kaliandra de Almeida Gonçalves, Marília Meira Dias, Douglas Adamoski, Caroline Fernanda Rodrigues Ascensão, Rodrigo Vargas Honorato, Juliana Ferreira de Oliveira, Igor Monteze Ferreira, Camila Fornezari, Jefferson Bettini, Paulo Sérgio Lopes Oliveira, Adriana Franco Paes Leme, Rodrigo Villares Portugal, Andre Luis Berteli Ambrosio and Sandra Martha Gomes Dias
J. Biol. Chem. 2013, 288:28009-28020.
doi: 10.1074/jbc.M113.501346 originally published online August 8, 2013

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M113.501346](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501346)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 32 references, 6 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/288/39/28009.full.html#ref-list-1>

Active Glutaminase C Self-assembles into a Supratetrameric Oligomer That Can Be Disrupted by an Allosteric Inhibitor*

Received for publication, July 14, 2013, and in revised form, August 6, 2013. Published, JBC Papers in Press, August 8, 2013, DOI 10.1074/jbc.M113.501346

Amanda Petrina Scotá Ferreira^{†1}, Alexandre Cassago^{§1}, Kaliandra de Almeida Gonçalves^{†1}, Marília Meira Dias[‡], Douglas Adamoski[‡], Carolline Fernanda Rodrigues Ascensão[‡], Rodrigo Vargas Honorato[‡], Juliana Ferreira de Oliveira[‡], Igor Monteze Ferreira[‡], Camila Fornezari[‡], Jefferson Bettini[§], Paulo Sérgio Lopes Oliveira[‡], Adriana Franco Paes Leme[‡], Rodrigo Villares Portugal[§], Andre Luis Berteli Ambrosio^{‡2,3}, and Sandra Martha Gomes Dias^{‡2,4}

From the Laboratórios Nacionais de [‡]Biociências e [§]Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas-SP 13083-100, Brazil

Background: GAC supplies for increased metabolic needs of tumors because of exclusive localization and kinetic properties.

Results: Higher than tetramer oligomers are the active form in *in vitro* and in cellular assays. Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide disrupts oligomers.

Conclusion: A novel molecular mechanism for GAC activation is proposed.

Significance: The data affect the development of therapies targeting GAC in tumors, with emphasis on allosteric inhibitors.

The phosphate-dependent transition between enzymatically inert dimers into catalytically capable tetramers has long been the accepted mechanism for the glutaminase activation. Here, we demonstrate that activated glutaminase C (GAC) self-assembles into a helical, fiber-like double-stranded oligomer and propose a molecular model consisting of seven tetramer copies per turn per strand interacting via the N-terminal domains. The loop³²¹LRFNKL³²⁶ is projected as the major regulating element for self-assembly and enzyme activation. Furthermore, the previously identified *in vivo* lysine acetylation (Lys³¹¹ in humans, Lys³¹⁶ in mouse) is here proposed as an important down-regulator of superoligomer assembly and protein activation. Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide, a known glutaminase inhibitor, completely disrupted the higher order oligomer, explaining its allosteric mechanism of inhibition via tetramer stabilization. A direct correlation between the tendency to self-assemble and the activity levels of the three mammalian glutaminase isozymes was established, with GAC being the most active enzyme while forming the longest structures. Lastly, the ectopic expression of a fiber-prone superactive GAC mutant in MDA-MB 231 cancer cells provided considerable

proliferative advantages to transformed cells. These findings yield unique implications for the development of GAC-oriented therapeutics targeting tumor metabolism.

Cancer cells have a well established dependence on glutamine metabolism to support their highly proliferative status. Apart from acting as a source for nitrogen as well as reductive power, its anabolic carbon skeletons can be siphoned from the TCA cycle to be used as building blocks for the growing and dividing cells (1, 2). Both Myc and Rho GTPases have been shown to stimulate glutaminase C (GAC),⁵ an isozyme that possesses a distinct cellular localization as well as activation levels purported to provide the aforesaid proliferative advantage to cancer cells (3–5).

We have recently described the structural determinants of the phosphate-dependent activation mechanism of GAC, based on the tetramerization-induced lifting of a so-called gating loop (³²¹LRFNKL³²⁶; NCBI sequence NP_001106854.1), which controls substrate accessibility to the active site. We showed that phosphate binds inside the catalytic pocket, resulting in allosteric stabilization of tetramers and facilitating substrate entry by outcompeting with the product, glutamate, to guarantee enzyme cycling (5). Additionally, recent publications have provided structural insights into glutaminase inhibition by making use of the small molecules BPTES and 968 (6–9). Nevertheless, the precise descriptions of their modes of inhibition are still lacking.

Renewed interest in cancer metabolism has prompted an innovative warfront against metabolic enzymes, aiming at the development of alternative and efficient therapeutic opportunities. Glutaminase C is a key target in this sense (2, 4, 10, 11),

* This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under Grants 2009/10875-9 (to S. M. G. D.) and 2010/05003-0 and 2012/14298-9 (to A. L. B. A.) and Fellowships 2010/05987-0 (to A. P. S. F.), 2010/05987-0 (to A. C.), 2011/06654-7 (to K. A. G.), and 2009/54067-3 (to A. F. P. L.). This work was also supported in part by the Laboratório Nacional de Biociências.

The atomic coordinates and structure factors (code 4jkt) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>).

¹ These authors contributed equally to this work.

² These authors contributed equally to this work.

³ To whom correspondence may be addressed: LNBio, CNPEM, Rua Giuseppe Máximo Solfaro, 10.000, Pólo II de Alta Tecnologia, Campinas, SP, 13083-100, Brazil. Tel.: 55-19-3512-1115; Fax: 55-19-3512-1004; E-mail: andre.ambrosio@lnbio.cnpem.br.

⁴ To whom correspondence may be addressed: LNBio, CNPEM, Rua Giuseppe Máximo Solfaro, 10.000, Pólo II de Alta Tecnologia, Campinas, SP, 13083-100, Brazil. Tel.: 55-19-3512-1115; Fax: 55-19-3512-1004; E-mail: sandra.dias@lnbio.cnpem.br.

⁵ The abbreviations used are: GAC, glutaminase C; BPTES, bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide; TEM, transmission electron microscopy; KGA, kidney-type glutaminase; LGA, liver-type glutaminase; DSS, disuccinimidyl suberate.

Supratetrameric Oligomerization-dependent GAC Activation

and the need for new and accurate biochemical and structural information to speed up and improve the development of successful therapies is therefore essential. In this regard, we now provide novel information demonstrating that the assembly of higher order, fiber-like GAC oligomers, henceforth termed the GAC superstructure, is necessary for proper enzyme activation both *in vitro* and in a cancer cell model. First, we demonstrate that the superstructure is mandatorily present when GAC is in the active form, as shown by negatively stained samples analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The tendency toward the superstructure correlates well with the activation levels induced by phosphate among GAC and the other two mammalian glutaminase isozymes: the kidney-type glutaminase (KGA) and the liver-type glutaminase (LGA). Although LGA is a synonym for the GLS2 glutaminase, KGA and its splicing variant GAC are both usually indistinguishably referred to as GLS1. Moreover, we observe that the addition of the GLS1 inhibitor BPTES hampers protein polymerization by stabilizing inactive tetramers.

Further research identified a subset of key residues involved in the superstructure formation process. They are located in the gating loop, as well as at the N and C termini, which have been previously shown to be key structural features for enzyme activation (5, 12). One specific gating loop mutant, GAC.K325A, both assembles into the superstructure and shows a 600-fold enhancement in catalytic efficiency toward L-glutamine, even in the absence of phosphate. Conversely, GAC.R322A, also at the gating loop, abrogated protein activation and impeded superstructure formation. A previously identified *in vivo* post-translational modification of human GLS1 (13), the acetylation of Lys³¹⁶ (equivalent to Lys³¹¹ in human), was also studied in this context. We show that the acetylation mimetic GAC.K316Q does not assemble into higher order oligomers, and this modification likely inhibits protein activity in cells. By combining data from point mutants, TEM, MS, and computational biology, we offer a low resolution model for the superstructure assembly. The superstructure is based on a double-stranded helix, with each strand containing tetramers interacting with each other via the N terminus domain. Lastly, we demonstrate that MDA-MB 231 cells silenced for the endogenous GAC expression and stably expressing an ectopic fiber-prone superactive mutant, proliferate more, consume higher amounts of glutamine, and grow bigger than the wild-type and mock transformed cells. Our results shed new light on the molecular mechanism of phosphate-dependent activation of the glutaminases and highlight the importance of the development of allosteric inhibitors when targeting GAC in tumors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein Production, Enzymatic Assay, Size Exclusion Serial Dilution, and Site-directed Mutagenesis—Recombinant protein expression and purification, the streamlined glutaminase activity assay, and the size exclusion analysis of serial dilutions were performed as previously published (5). Point mutants were generated with the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) following the manufacturer's instructions. The inhibition assays using BPTES (kindly provided by Dr. Chi Van Dang, Abramson Cancer Center, University of Pennsylvania,

Philadelphia, PA) were done with GAC or GAC.K325A at 5 nM and BPTES diluted in Me₂SO, the last always at a 0.5% final concentration. Measurements were done in triplicate and analyzed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software) and Origin 8.1 (Originlab). The parameters of the dose-response curve were determined by fitting an error bar-weighted logistic function, in the form of $y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$, where A_1 is the initial apparent turnover rate (absence of inhibitor), A_2 is the turnover rate at saturating concentrations of inhibitor, x_0 is the half-maximum inhibitory concentration, or IC₅₀, and p is the Hill slope.

Transmission Electron Microscopy—For visualization of negatively stained grids, protein samples, at a concentration ranging from 0.5 to 1 μM, were deposited onto glow-discharged holey carbon-coated grids for 60 s followed by two steps of blotting and staining with 2% uranyl acetate. Images were acquired between -1- and -3-μm defocus at 15,000–80,000× magnification using a Jeol JEM-2100 operating at 200 kV and recorded on a F-416 CMOS camera (Tietz Video and Image Processing Systems).

Crystallization and X-ray Crystallography—Crystallization experiments were performed at 291 K using the conventional sitting drop vapor diffusion technique. Drops were made by mixing three parts of protein (at 3.3 mg/ml) to one of well solution, containing 17% PEG 3350, 0.2 M NaCl, and 0.1 M Bis-Tris, pH 6.5. Clusters of plates were observed after 5 days and used as seeds for a standard streak seeding in a mother liquor solution containing 11% PEG 3350, 0.2 M NaCl, and 0.1 M Bis-Tris, pH 6.5. Before data collection at cryogenic temperature (100 K), harvested crystals were cryoprotected with 10% ethylene glycol added to the mother liquor. X-ray diffraction data were obtained at the D03B-MX1 Beamline at Laboratório Nacional de Luz Síncrotron in Brazil. The data were processed using Mosflm (14) and Scala (15). The first set of phases was obtained by the molecular replacement as implemented in Phaser (16), using the data set from the ligand-free form of GAC, available under Protein Data Bank code 3ss3 (5). Positional and B-factor refinement cycles were carried out with Phenix (17). Manual building of the extra portions and real space refinement, including Fourier electron density map inspection, were performed with Coot (18). The overall stereochemical quality of the final models and the agreements between them and experimental data were assessed by the program Molprobity (19) and the appropriate Coot routines.

Cross-linking Analysis of GAC Complexes by LC-MS/MS—GAC complexes were reduced (5 mM dithiothreitol, 25 min at 56 °C), alkylated (14 mM iodoacetamide, 30 min at room temperature in the dark), and digested with trypsin (Promega). The samples were lyophilized in a vacuum concentrator and reconstituted in 0.1% formic acid. Then 4.5 μl (1 μg) of the resulting peptide was analyzed on an LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled with LC-MS/MS by an EASY-nLC system (Thermo Fisher Scientific) through a Proxeon nanoelectrospray ion source. Peptides were separated by a 2–90% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid using a pre-column EASY-Column (2 cm × 100-μm inner diameter, 5-μm particle size) and an analytical column PicoFrit Column (20 cm × 75-μm inner diameter, 5-μm particle size; New Objec-

tive) at a flow rate of 300 nl/min over 65 min. The nano-electrospray voltage was set to 2.2 kV, and the source temperature was 275 °C. The instrument methods in LTQ Velos Orbitrap were set up in the data-dependent acquisition mode of higher-energy collisional dissociation fragmentation. The full scan MS spectra (m/z 300–1,600) were acquired in the Orbitrap analyzer after accumulation to a target value of 1×10^6 . The resolution in the Orbitrap system was set to $r = 60,000$, and the five most intense peptide ions with charge states of ≥ 2 were sequentially isolated to a target value of 50,000 and fragmented in HCD with normalized collision energy of 40% with the resolution in the Orbitrap system was set to $r = 7,500$ for MS/MS. The signal threshold for triggering an MS/MS event was set to 80,000 counts, and an activation time of 0.1 ms was used. Dynamic exclusion was enabled with exclusion size list of 400, exclusion duration of 60 s, and repeat count of 2. For cross-linking analysis, the raw data files generated by Xcalibur v.2.1 (Thermo Fisher Scientific) were converted to a peak list format (mgf) using Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific). The mgf files were analyzed in MassMatrix software to automatically search chemical cross-linkage against database containing the GAC amino acid sequences. The parameters for cross-linking analysis were carbamidomethylation (+57.021460 Da) as fixed modification, oxidation of methionine (+15.99491 Da) as variable modifications, chemical cross-linked with disuccinimidyl suberate-DSS (138.06808 Da) non-cleavable by enzymes, four trypsin missed cleavages, and a tolerance of 10 ppm for precursor and 0.02 Da for fragment ions (20). Potential cross-linked peptides were manually validated. This experiment was independently performed four times for the tetramer form and seven times for the superoligomer form. Unique lysine linkages (underlined in the following peptides) were only observed in the tetramer samples, between residues Lys¹⁸¹ and Lys²⁰⁷ (α -KCVQSNIVLLTQAFR and β -LKECMDMLR), Lys²⁰² and Lys⁵⁷⁸ (α -LTLQTTS²⁰²SDGVM⁵⁷⁸LDKDLFK and β -DTVWKK), and Lys⁴⁰³ and Lys⁵¹² (α -SGVAGGILLVVPNVMGMMCWSPPLDKMGNSVK and β -EKK).

Computational Biology—To obtain a model of the glutaminase fiber, we applied a previously developed rigid body docking algorithm restrained by experimental DSS cross-linking data (20). Initially, we reconstructed both the N- and C-terminal regions of the monomers using a loop reconstruction routine and placed a copy of the tetramer, namely the ligand domain, on the N-terminal of the receptor domain. Using only the exclusive intermonomer linkage that was observed in our reconstructed model (Lys¹⁸¹–Lys²⁰⁷), we selected the decoy that was in the lowest energy range and within 11 Å of lysine pair distance.

Cell Assays—MDA-MB 231 cells were purchased from ATCC (initial passage of 29) and cultivated in RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab). The pcDNA3.1/V5-His-hGAC (GAC-V5) clone was kindly provided by Dr. Richard Cerione (Cornell University, Ithaca, NY), and the mutation K320A (equivalent to K325A in the mouse gene) performed with the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (GAC.K325A-V5) following the manufacturer's instructions. Lipofectamine-transfected cells were G418 selected for stable expression, which was confirmed by Western blotting. The mock control

was obtained by transfecting cells with empty vector. To accomplish the endogenous GAC knockdown, the same cell clones were transduced with lentiviral particles containing pLKO-shGAC plasmid (forward, 5'-CCGGCCTCTGTTCTGTCAGAGTTCTCGAGAACTCTGACAGAACAGAGGTTT-TTG-3', and reverse, 5'-AATTCAAAAACCTCTGTTCTGT-CAGAGTTCTCGAGAACTCTGACAGAACAGAGG-3'), and a pool of cells was selected for puromycin resistance. The cells were lysed with 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaVO₄, 1 mM β -glycerol phosphate, 11 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ aprotinin, 11 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pepstatin, and 1 mM PMSF. The lysates were resolved by SDS-PAGE, and the proteins were transferred to polyvinylidene fluoride membranes. The membranes were incubated overnight with the primary antibodies diluted in 20 mM Tris, 135 mM NaCl, and 0.1% Tween 20. The primary antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies followed by exposure to Pierce SuperSignal West Pico Substrate. We used anti-V5 1:10,000 (Invitrogen), anti-GAC custom made by Genescript as previously described in Ref. 5 at 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, anti-Vinculin 1:1,000 (Cell Signaling) and anti-VDAC 1:1,000 (Cell Signaling). As for the immunofluorescence and glutamine consumption studies, MDA-MB 231 cells were seeded in a 6-well plate (Becton Dickson) at a density of 2.5×10^5 cells $\cdot\text{cm}^{-2}$, cultivated for 48 h at 37 °C with 5% of CO₂ and then fixated and permeabilized with 3.7% formaldehyde in PBS, 0.2% Triton X-100. The cells were blocked with 3% BSA in PBS, 0.8% Triton X-100, and incubated at room temperature for 1 h, with anti-V5 1:20,000 diluted in 3% BSA in PBS/0.8% Triton X-100. Goat secondary anti-mouse-Alexa 633 (Invitrogen), diluted in blocking solution (1:200) was used to reveal ectopically expressed V5-tagged GAC. The nuclei and actin were stained with 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DAPI (Sigma) and phalloidin-Alexa 488 (1:40), respectively. Data were collected with the plate reader Fluorescence Microscope Operetta (PerkinElmer Life Sciences), and the cell number and area quantified were using the software Harmony 3.0. Glutamine consumption from the culture medium was assessed using the Bio-Profile Basic 4 (Nova Biomedical). BPTES-treated cells were allowed to attach for 24 h and then had the medium replaced by fresh medium added with 10 μM of the inhibitor for 48 h. For the whole cell lysate glutaminase activity assay, the cells were lysed by resuspension in 25 mM Hepes, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% Triton X-100, and 1 \times Protease Inhibition Solution (Qiagen) followed by 20 strokes through an insulin needle. Glutaminase activity assay of the whole cell extracts was performed following the published streamlined assay (5), using 5 μg of lysate/well and L-glutamine concentration of 7.5 mM. Diameter of detached viable cells was measured by the Countess (Invitrogen) after trypsinization and trypan blue incubation.

In Cell Protein Cross-linking—Approximately 3×10^6 cells were seeded in 10-cm plates and allowed to adhere overnight. The next day, the medium was removed, and the cells were washed twice with PBS and incubated for 24 h with 2 mM L-photo-leucine and 4 mM L-photo-methionine (Pierce) in leucine- and methionine-free DMEM supplemented with 10% PBS-dialyzed FBS. After this incubation, the medium was removed, and cells were washed twice with PBS and then irradiated at 365 nm for 15 min in the Epi Chemi II Darkroom equipment (UVP Laboratory Products). The cells were harvested for lysis, and

Supratetrameric Oligomerization-dependent GAC Activation

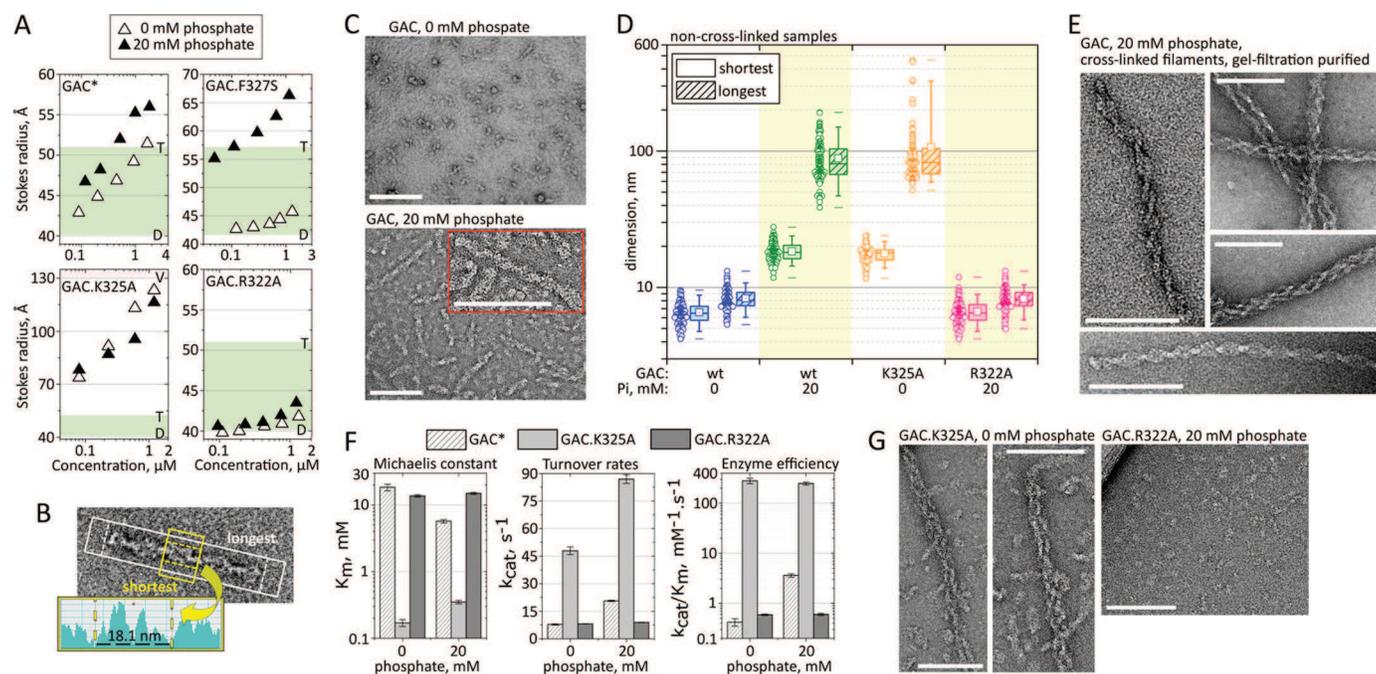


FIGURE 1. GAC polymerization is essential for enzymatic activation. *A*, size exclusion chromatography analysis of serial dilutions for wild-type and mutated GAC in the presence or absence of 20 mM phosphate. The green region delimits the expected Stokes radii between GAC dimers (*D*) and tetramers (*T*), calculated based on the crystal structure (3s53) dimensions. The light purple region, delimited by *V* in the GAC.K325A graph, indicates the void volume of the gel-filtration column used. The asterisk indicates a previously published result for wild-type GAC (5). *B*, the software DigitalMicrograph (Gatan) was used to estimate the two orthogonal size distributions (short and long dimensions) of the wild-type and point mutant glutaminase particles, formed under the diverse conditions described in the main text (absence or presence of 20 mM phosphate and cross-linked versus non-cross-linked particles). *C*, supratetrameric organization of GAC upon the addition of 20 mM phosphate, a well known activator of GLS1 glutaminases. *D*, box plot and scatter representation of the two orthogonal dimensions for GAC wild-type and point mutants, as taken from the TEM micrographs. *E*, chemically cross-linked GAC superoligomers. Some of the observed filaments resemble lateral association between two simple filaments. *F*, GAC.K325A presents a much higher catalytic efficiency, already in the absence of phosphate, when compared with wild-type GAC and the inactive GAC.R322A. *G*, the high enzymatic efficiency of GAC.K325A correlates well with its tendency to self-assemble into rod-like polymers, regardless of the presence of the activator inorganic phosphate (left and middle panels) and DSS. Conversely, the catalytically inactive GAC.R322A protein remains in its tetrameric form, even in the presence of 20 mM phosphate (right panel). The scale bars represent 100 nm.

cross-linked proteins were resolved by 3–15% step gradient SDS-PAGE (3, 9, and 15% SDS-PAGE solutions prepared with 50:1 acrylamide:bisacrylamide mix, poured one after another in volume proportions of 1.5:2:1). The immunoblotting was performed with the anti-V5 1:10,000 (Invitrogen) as described in the preceding section.

Estimation of Intracellular Glutamine Concentration in Breast Tumor Cells—From metabolomics experiments on tumor samples, Yuneva *et al.* (21) reported a relationship of 40 to hundreds of nanomoles of glutamine for each gram of protein. We have found that unattached GAC.K325A-V5, GAC-V5, and mock transformed MD-MBA 231 cells have average diameters of 13.3, 10.9, and 10.6 μm , respectively. Assuming a spherical shape for these cells, the following cell volume can be calculated: 1.2 nl (GAC.K325A-V5 cells) and 0.6 nl (GAC-V5 and mock cells). Using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo-Scientific), we quantified an average of 0.23 grams of protein for 2×10^6 cells, sampling from the three cell clones. Based on the lowest detected glutamine amount from Yuneva *et al.* (21) of 40 nmol Gln/g of protein, we estimate that these cells contained between 3.7 and 7.4 mM glutamine.

Quantitative PCR—RNA samples were extracted using the kit RNAeasy Mini (Qiagen) following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis and PCR amplification were performed with the kits SuperScript III first strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen) and Power SYBR Green PCR

Master Mix (Applied Biosystems), respectively, as instructed by the manufacturers. Samples were run on the Applied Biosystems 7500 real time PCR system and analyzed following the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. Primers used: (i) both endogenous and ectopic GAC: forward, 5'-GATCAAAGGCATTCTTTGG-3', and reverse, 5'-TACTACAGTTGTAGAGATGTCC-3'; (ii) ectopic GAC only: forward, 5'-AGAATGGAAAGTCTGGGAGAGAAA-3', and reverse, 5'-CCGAGGAGAGGGTTAGGGATA-3'; (iii) SN2: forward, 5'-GGCTTGGTAGTGTTCAT-3', and reverse, 5'-GGCAAAGAGTAAACCCACA-3; (iv) ASCT2: forward, 5'-ATGAAACACTTGGGCTAC-3', and reverse, 5'-ATGACCGAAACAAGGAAA-3'; (v) rRNA 18 S: forward, 5'-ATTCCGATAACGAACGAGAC-3', and reverse, 5'-TCA-CAGACCTGTTATTGCTC-3'.

RESULTS

Active GAC Forms a Rod-like Supratetrameric Structure—We have previously documented that wild-type GAC, when in the presence of its activator P_i , showed a tendency to form molecular species larger than tetramers and that this behavior was counteracted when the concentration of NaCl, a known glutaminase inhibitor, was increased in the protein solution (5, 12). Although the structural nature of the higher order species remained elusive at that time, it was curious to note that there was a significantly major shift toward higher than tetramer olig-

omers in the case of the activity-enhancer mutation F327S (GAC.F327S; Fig. 1A, top right panel).

In the course of further studies of the molecular mechanism of activation of mammalian glutaminase, we used TEM to better understand the self-assembly process. First, recombinant GAC (in the absence of P_i) was used to set up negatively stained grids. Image analysis, after sampling ~ 100 randomly chosen particles, allowed the determination of two perpendicular size distributions (exemplified in Fig. 1B): a short dimension, with a mean size of 7 ± 1 nm, and a longer one of 8 ± 1 nm (Fig. 1C, upper panel), both close to the expected dimensions for the dimer particle (5). In contrast, particles formed in the presence of 20 mM phosphate had a larger and more heterogeneous size distribution on the grid. Whereas the shorter dimension doubled on average (18 ± 3 nm), there was clearly favored growth across the long dimension, averaging 88 ± 31 nm (Fig. 1C, lower panel). The box chart with scatter plot for the size survey is shown in Fig. 1D.

The equilibrium between the GAC oligomeric species depends on protein concentration, phosphate, and NaCl (5). To circumvent the dissociative effects of protein dilution and work at appropriate protein concentrations for TEM characterization, superstructure assembly was stabilized by adding the cross-linking agent DSS in the presence of 20 mM phosphate and then purified by gel filtration. Under the conditions used, the superstructures eluted in the void volume of the column. The appropriate DSS concentration and time of incubation was previously established by a dose-response assay (data not shown). The negative-stained micrographs showed evidence for the formation of elongated, chain-like, nonbranched filaments, heterogeneous in length, that favored side-on adsorption to the carbon film (Fig. 1E). Some of the observed particles, such as those in the rightmost panels of Fig. 1E, seem to resemble side by side aggregation of simpler filaments (left and bottom panels).

We have previously identified the gating loop as essential for the phosphate-dependent activation process of the GLS1 isoforms (5). By replacing residues in the gating loop by alanine, we identified a point-mutation (GAC.K325A) that conferred a 670-fold increase in catalytic efficiency over that found for the wild-type enzyme, even in the absence of inorganic phosphate (GAC.K325A $k_{cat-app}/K_{m-app}$ of $281.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ compared with $0.42 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for GAC) (Fig. 1F). Both negative staining TEM (Fig. 1G, left panel) and size exclusion chromatography (Fig. 1A, bottom left panel) confirmed a much greater particle size distribution for this mutant, even in non-cross-linked samples. For example, TEM analysis showed dimensions of 17 ± 2 and 107 ± 79 nm, for the short and long dimensions, respectively, in the absence of phosphate (Fig. 1D). More importantly, this mutant assembles into oligomers visually similar to the ones formed with the wild-type protein (Fig. 1E, rightmost panels), guaranteeing that the mutation is only enhancing the oligomerization capability. The K325A mutation uncouples the protein dependence on phosphate for activation and further confirms the positive correlation between the superstructure assembly and enzyme activation. On the other hand, a second point mutation within the gating loop, affecting Arg³²² (termed GAC.R322A), was enough to generate a catalytically inactive mutant irre-

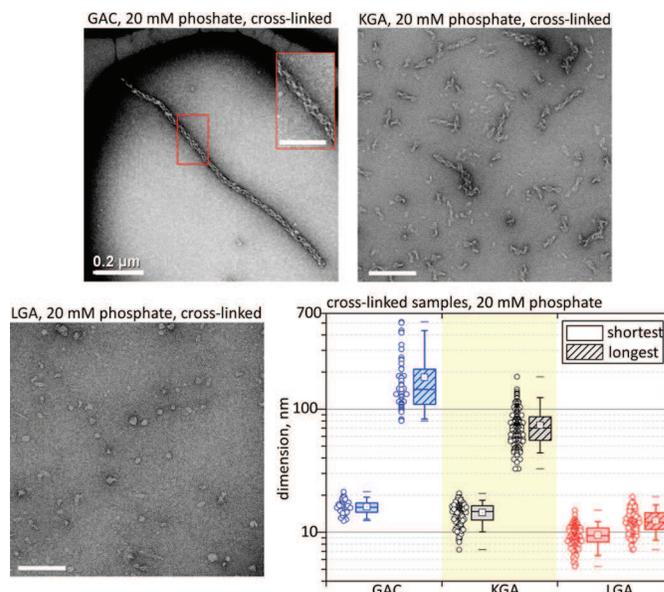


FIGURE 2. Glutaminase isozymes versus self-assembly tendency. TEM analysis of the three glutaminase isozymes, cross-linked after incubation with 20 mM phosphate. The average length of the superstructure correlates positively with the previously published glutaminase activity levels (5). GAC is the most active isozyme and forms the longest polymers (top left panel), followed by KGA (top right panel), with lower activity and shorter structures, and lastly LGA, which is insensitive to phosphate and accordingly does not form filaments (bottom left panel). Unless otherwise specified, the scale bars represent 100 nm.

sponsive to phosphate ($k_{cat-app}/K_{m-app}$ of $0.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ at 20 mM P_i against $3.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for the wild type), which accordingly did not assemble into superoligomers (Fig. 1, F and G, right panel). The dimensions observed for particles of GAC.R322A in the presence of 20 mM P_i were very similar to those for the wild-type protein in the absence of P_i (7 ± 1 and 8 ± 2 nm, for the short and long dimensions, respectively) (Fig. 1D).

Superstructure among Glutaminase Isozymes—GAC is the most active of the three known mammalian glutaminase isozymes in response to inorganic phosphate (5). To further investigate the correlation between increased activity and larger oligomeric species, we observed the ability of KGA and LGA (also known as GLS2) to assemble into supratetrameric structures by TEM. Superstructure assembly was induced at 20 mM phosphate, stabilized by cross-linking with DSS, and subsequently gel filtration-purified. A tendency toward longer oligomers correlates well with the activity levels of the three isozymes. More specifically, GAC—the most active glutaminase at 20 mM P_i —forms the longest rod-shape oligomers (Fig. 2, top left panel), followed by KGA (Fig. 2, top right panel) and then LGA (Fig. 2, bottom left panel), which has been previously shown to be enzymatically insensitive to P_i (5, 22) and to not form the superstructure. The mean values for the shortest and longest dimensions of the particles are 16 ± 2 and 181 ± 108 nm for GAC, 14 ± 3 and 74 ± 26 nm for KGA, and 9 ± 2 and 12 ± 3 nm for LGA (Fig. 2, bottom right panel).

BPTES Disrupts GAC Superstructure—Counterintuitive to the current dimer to tetramer model of activation for GLS1, the inhibitor BPTES has been shown to lock GLS1 into an inactive yet tetrameric form (6). Interested in deciphering the mode of

Supratetrameric Oligomerization-dependent GAC Activation

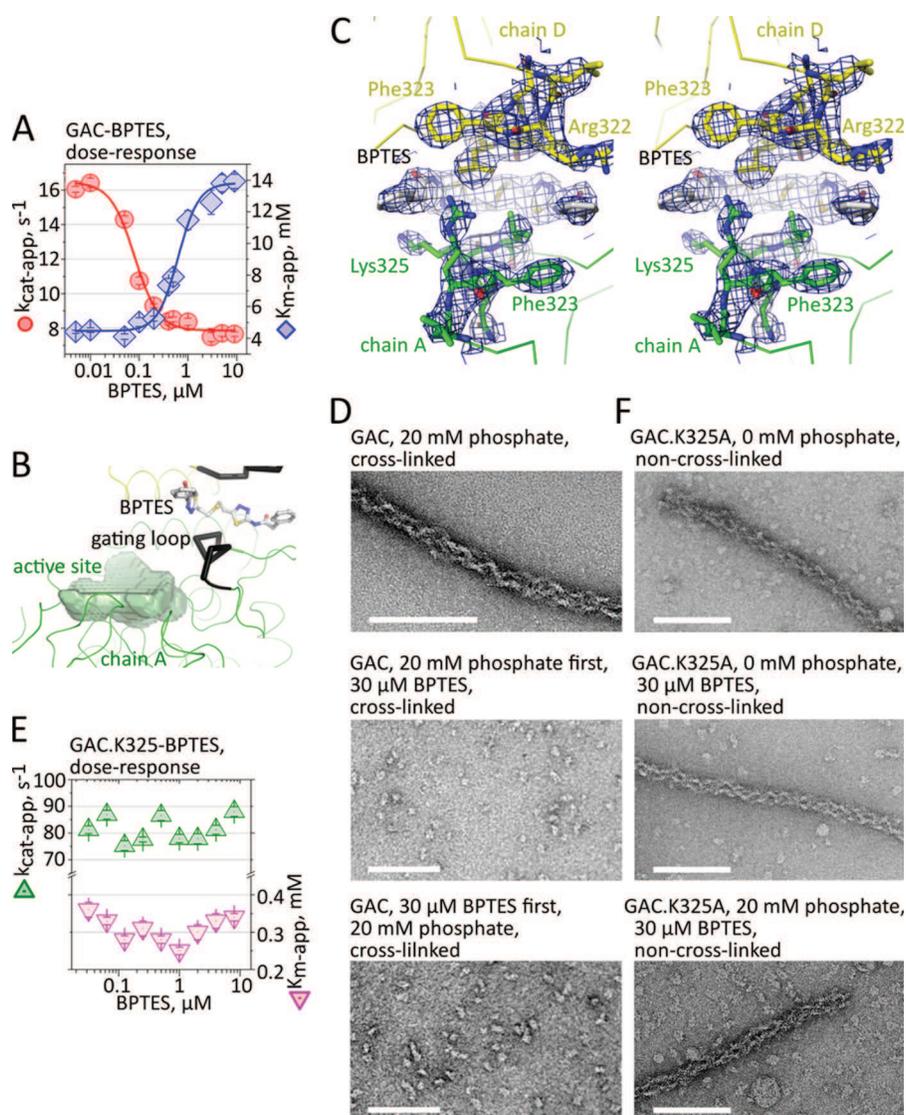


FIGURE 3. BPTES inhibits GAC superstructure formation. *A*, dose-response profile of BPTES inhibition on GAC, assayed in the presence of 20 mM phosphate, showing two complementary effects on the apparent turnover rates and the Michaelis constant of the enzyme. *B*, BPTES traps the gating loop (black ribbons) in a rigid open conformation relative to the catalytic pocket of GAC (delimited by a green surface). *C*, stereographic view of a Fourier $2F_{obs} - F_{calc}$ map (at 1σ) confirming the proposed conformation in the refined crystallographic model. *D*, TEM analysis of the effects of BPTES on the formation of GAC superstructure. The filament formation is hindered regardless of whether BPTES is added to the protein solution prior to (middle panel) or after (bottom panel) incubation with 20 mM phosphate. *E* and *F*, conversely, GAC.K325A is catalytically insensitive to BPTES treatment (*E*), and this inhibitor is also incapable of disrupting the non-cross-linked GAC.K325A filaments (*F*).

inhibition by which BPTES exerts its effect and its relationship with the formation of the superstructure, we determined a detailed BPTES dose-response curve for GAC in the presence of 20 mM Pi. This phosphate concentration was chosen because it is closer to the physiological one under hypoxic conditions (23) and substantially stimulates GAC catalytic activity (5). We observed a strong inhibitory effect on GAC, where nanomolar levels of BPTES affected the maximum catalysis rate, $k_{cat-app}$, without changing the K_{m-app} for glutamine (Fig. 3A), a clear indication of an allosteric noncompetitive inhibitor as already published by others (6, 7). Curiously, beyond 200 nM BPTES, a secondary effect is observed and the inhibitor started affecting also the K_{m-app} (a 3-fold increase compared with the absence of BPTES), redefining BPTES as a mixed mode inhibitor (Fig. 3A). By fitting an error bar-weighted logistic sigmoid function to explain the decrease in the turnover rates of the enzyme caused

by the increased presence of inhibitor, we obtained an IC_{50} of 80.4 ± 7.2 nM for BPTES, which is consistent with the value provided by DeLaBarre *et al.* (7). Upper and lower limits for the catalytic rates are 16.4 and $7.9 s^{-1}$, respectively, with a Hill slope of 1.7 ± 0.2 ($R^2 = 0.99$), indicating cooperative binding (Fig. 3A). Concerning the effect on K_{m-app} , the upper and lower limits are 4.6 and 13.8 mM, with an IC_{50} of 629 ± 61 nM for BPTES (Hill slope of 2.0 ± 0.3 , $R^2 = 0.99$).

Concomitant with the studies above, we have also determined the crystal structure of mouse GAC in complex with BPTES (2.77 Å resolution, R_{factor} of 25.3%, and R_{free} of 29.5%; Table 1). Although similar to previously reported BPTES-bound glutaminase structures, with two inhibitor molecules tightly accommodated at the tetramer interface and average backbone root mean square deviations of 0.44 and 0.56 Å when superposed to Protein Data Bank structures 3UO9 and 3VOZ,

TABLE 1**X-ray crystallography data collection parameters and structure refinement statistics of BPTES-bound mouse glutaminase C (Protein Data Bank code 4jkt)**

The data for the outer shell are shown in parentheses. LNLS, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Data collection	
Beamline	D03B-MX1 at LNLS, Brazil
Wavelength (Å)	1.608
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell parameters <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	100.7, 140.2, 180.9
Resolution range (Å)	38.4–2.77 (2.82–2.77)
Unique reflections	63,967 (2,039)
Multiplicity	3.3 (2.6)
<i>R</i> _{p.i.m.} (%)	11.0 (24.0)
Completeness (%)	95.5 (46.2)
< <i>I</i> /σ(<i>I</i>)>	4.5 (2.8)
Average mosaicity (°)	1.0
B-factor Wilson Plot (Å ²)	40.5
Monomers/AU	4
Solvent content (%)	59.2
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	3.01
Model refinement	
Resolution range (Å)	20.0–2.77
Reflections (cross-validation)	63,892 (5,952)
<i>R</i> _{factor} / <i>R</i> _{free} (%)	25.3/29.5
Average B-factor (Å ²)	
Main chain (no. of residues)	32.9/3.4 (1,563)
Side chain (no. of residues)	32.8/4.3 (1,362)
BPTES (no. of molecules)	44.1/9.2 (2)
Solvent (no. of molecules)	24.4/5.9 (265)
Root mean square deviation from standard geometry	
Bond length (Å)	0.003
Bond angles (°)	0.783
Ramachandran plot	
Most favored (%)	94.5
Allowed (%)	4.8
Outlier (%)	0.7

respectively (7, 8), our crystal form presents a key unique feature. As a consequence of the binding of the small molecule to the tetramer interface, the main chain of the gating loop—consistently poorly ordered across all the GAC crystallographic models—is in a stable open conformation in all four monomers. This is due especially to the contacts made mainly between BPTES and Lys³²⁵, and consequently the loop assumes the conformation of a one-turn helix (Fig. 3, *B* and *C*). Fifteen hydrogen bonds are made between a dimer of GAC and one BPTES molecule (data not shown). Eleven residues from each monomer share the interface with BPTES, occluding a combined total area of 620 Å². Of the total solvent-accessible surface of BPTES (788 Å²), 80% is buried upon interaction with the enzyme.

Next, we assessed the effects of BPTES on the formation of GAC superoligomers. TEM and size exclusion chromatography of wild-type GAC samples prepared in the presence of phosphate and the inhibitor and subsequently cross-linked showed that regardless of whether BPTES is added prior or after protein incubation in 20 mM phosphate; complete disruption of the superstructure is observed at a concentration of 30 μM of BPTES (Fig. 3*D*). The distribution of the disrupted particles on the grids is similar to the wild-type protein in the absence of phosphate and BPTES, as shown in Fig. 1*A* (*top panel*).

Finally, we observed that the mutant GAC.K325A, besides being hyperactive, is also catalytically insensitive to BPTES as determined by a dose-response curve (Fig. 3*E*). Accordingly, BPTES is incapable of disrupting non-cross-linked GAC.K325A

oligomers, assembled in the presence or absence of phosphate (Fig. 3*F*).

Superstructure Characterization—Because of its heterogeneous length distribution, the GAC superstructure is intrinsically inappropriate for crystallization. However, by combining TEM, chemical cross-linking followed by MS analysis, and computational biology, we provide a low resolution model for the superstructure. The extended particles tend to adsorb to the microscopy grids in a very limited number of orientations. However, the best micrographs show a combination of translational and rotational symmetry elements lying parallel to the polymer, thus yielding a helical symmetry along its longitudinal axis. Detailed analysis of low pass filtered images provided its geometrical attributes. The observed spiral polymer, under particular staining conditions, resembles a right-handed double-stranded helix, with a rise per turn of $\sim 53 \pm 2$ nm, a strand inclination of 25°, and an average width for a single strand of 6.6 ± 0.7 nm (Fig. 4*A*).

Simultaneously, size exclusion-purified cross-linked polymers—as well as GAC cross-linked in the tetrameric form (used as a control)—were digested with trypsin, and the resulting peptides were subjected to liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The cross-linked peptides were modeled based on the crystal structure of the tetramer, using a spacer arm length for DSS of ~ 11.4 Å as a restraint for maximum distance between the side chain amine groups of linked lysines. This was necessary to distinguish between the different possible inter- and intramolecular cross-links. Unique linkages were only observed in the tetramer samples (spectra shown in Fig. 4*B*), between residues Lys¹⁸¹ and Lys²⁰⁷ (both located in the outer N-terminal portion of the same monomer), Lys²⁰² and Lys⁵⁷⁸ (the latter located at the C terminus), and Lys⁴⁰³ and Lys⁵¹² (both within the glutaminase domains, flanking the active site of two different monomers) as depicted in Fig. 4*C*. The observation that these DSS-mediated links are unable to form upon polymerization suggests occlusion of their respective surfaces from the solvent when in the superstructure form. One lysine residue from each of the cross-linked pairs was then substituted by an oppositely charged glutamate residue, and the individually mutated proteins (termed GAC.K202E, GAC.K207E, and GAC.K512E) were tested for superoligomer-dependent glutaminase activity. Both N-terminal mutants, GAC.K202E and GAC.K207E, resulted in enzymes with enhanced activity (Fig. 4*D*, *left panel*), which coherently formed bigger particles, when compared with wild-type GAC (Fig. 4*D*, *right panel*). Conversely, the glutaminase domain mutant GAC.K512E fully lost the phosphate-dependent enzymatic capability and, accordingly, the ability to self-assemble into the superoligomers. The three point mutations reinforce the need for superoligomer formation for protein enzymatic activity and, most importantly, further show the importance of regions unrelated to and distant from the catalytic pocket for superoligomer formation and enzyme activation.

In the original biochemical characterizations of recombinant GLS1, Kenny *et al.* (12) demonstrated the importance of the GLS1 N-terminal portion for enzyme activity by generating a truncated, catalytically inactive, recombinant construct. Nevertheless, subsequent crystal structures of GAC clearly showed

Supratetrameric Oligomerization-dependent GAC Activation

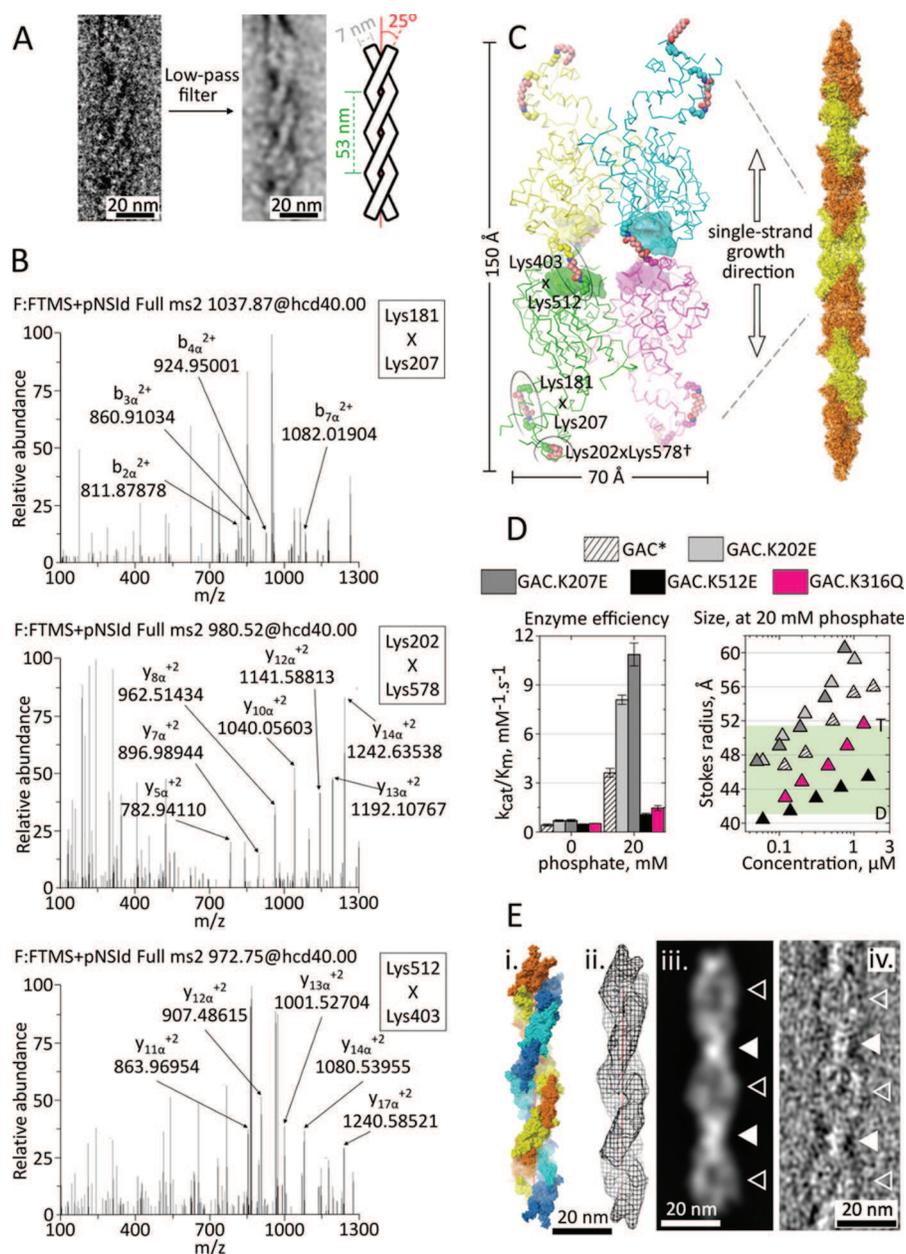


FIGURE 4. A model of GAC superoligomer assembly. *A*, the removal of high frequencies (strongly associated with noise) from the TEM micrographs highlights the right-handed double-strand nature of the superstructure, allowing the determination of its geometric features. *B*, cross-linked MS/MS spectra were manually validated for *b* and *y* ion series of the α and β chains of cross-linked peptides (between residues Lys¹⁸¹ and Lys²⁰⁷, Lys²⁰² and Lys⁵⁷⁸, and Lys⁴⁰³ and Lys⁵¹²). The ions are indicated by arrows with corresponding *m/z* value. *C*, relative position of DSS-linked lysine pairs in the tetramer, as identified by MS. The boundaries of the active sites are delimited by solid surfaces. †, Lys⁵⁷⁸ is not modeled in the crystal structure. The proposed single strand growth direction is across the longest axis of the tetramer, via an end to end interaction between pairs of N-terminal domains. Alternating orange and yellow colors facilitate the identification of the tetramers along the single strand. *D*, one lysine residue from each cross-linked pair was individually substituted by a glutamate and assayed for enzymatic activity (*left panel*) and superstructure formation (*right panel*). The N-terminal region mutants (GAC.K202E and GAC.K207E) enhanced both effects. On the other hand, GAC.K512E, within the glutaminase domain, generated a nonfunctional protein, similarly to the acetylation mimetic GAC.K316Q. The green region delimits the expected Stokes radii between GAC dimers (*D*) and tetramers (*T*), calculated based on the crystal structure dimensions. The asterisk indicates a previously published result for wild-type GAC (5). *E*, the double strand was manually modeled (*panel i*), using two entwined copies of the single strand from *C* and following the geometric restrictions of *A*. In *panel ii*, the calculated Fourier F_{calc} map (with amplitudes and phases from the double strand model)—limited to 35 Å maximum resolution—is two-dimensionally projected, and the end result is shown in *panel iii*. All features are comparable to those observed in *panel iv*, concerning the presence of alternating high density narrow regions (indicated by filled triangles) and low density broad, disc-like regions (indicated by open triangles).

no direct participation of residues belonging to the N-terminal portion in catalysis or even their requirement for the proper folding or stabilization of the active site. Based on the dimensions observed in the GAC crystal structures, the average width of 66 Å for a single strand indicates that polymerization occurs along the longest axis of the tetramer, thus suggesting an end

to end interaction via N-terminal regions. The growth is thus consistently favored in one direction and may occur indefinitely, because N-terminal sticky ends will always be available at both termini (computational docking of several tetramers simulating strand growth is shown in Fig. 4C, *left panel*). Therefore, because activity is dependent on filament assembly and the N-ter-

minimal portion is key for such, we provide a plausible explanation for the findings of Kenny *et al.* (12).

Next, to generate a model for the double-stranded filamentous structure, the coordinate files of two single strands were manually coiled around each other, using the helical parameters as restraints (Fig. 4E). The Gaussian low pass filter applied to the reference micrographs remove spatial frequencies higher than 0.028 \AA^{-1} , thus resulting in an estimated 35 \AA resolution in real space. According to its overall dimensions, both length-wise and angle-wise, the estimated minimum repeating unit (one full helical turn) is composed of seven tetramers in each of the entwined strands. The intrinsic 2-fold dihedral symmetry of the tetramer (5) renders it unnecessary to determine whether the double-stranded helix is of a parallel or anti-parallel nature because each strand is apolar. To validate the model against the experimental data, an F_{calc} Fourier electron density map was generated by the program FFT (24) (to 35 \AA maximum resolution), using structure factors calculated from the three-dimensional double-stranded coordinate file and subsequently theoretically projected in two-dimensions using the electron microscopy software Imagic (25). The end result is shown in the *right panel* of Fig. 4E and presents features that are fully comparable to those observed in the representative micrographs of Fig. 1E (*bottom panel*), especially concerning the presence of an alternating pattern of narrow, compact regions of high density interspersed with broad, disc-like regions of low density.

Lastly, Lys³¹¹ in human GLS1 glutaminases was found to be a target for *in vivo* acetylation by high resolution mass spectrometry analysis (13). This lysine residue belongs to the glutaminase domain and is located on the opposite surface in relation to the catalytic pocket and the gating loop, with no direct participation in the active site. To evaluate the effects of this reversible, post-translational modification over superstructure formation and therefore protein activation, we have generated a point mutant in the equivalent residue of the mouse protein (GAC.K316Q), replacing it with a glutamine residue, so as to mimic the noncharged nature of acetylated lysine. Interestingly, the newly mutated protein was characterized as less sensitive to the activator phosphate with the concomitant lowered tendency to assemble into the superoligomers, keeping the protein in sizes compatible with only tetramers and dimers (Fig. 4D, *left and right panels*).

GAC Superstructure in Cell Model—To further demonstrate the importance of the superstructure assembly for GAC enzymatic activation, we generated stable clones of the MDA-MB 231 breast cancer cell line expressing either the human V5-tagged wild-type or the GAC.K325A mutant proteins, as well as cells transformed with a mock plasmid. Although in humans the appropriate numbering should be GAC.K320A (NCBI reference sequence AAD47056.1), we have decided to keep GAC.K325A (mouse GAC) for the sake of coherence throughout the paper. Cell clones were selected to present comparable levels of ectopic V5-tagged mRNA and protein while not presenting abnormally higher levels of ectopic expression (Fig. 5, A and B). Proper mitochondrial localization of the ectopic protein was confirmed by cell fractionation and immunoblotting (data not shown). Two distinct phenotypes were readily observed for the GAC.K325A-V5 cells, when com-

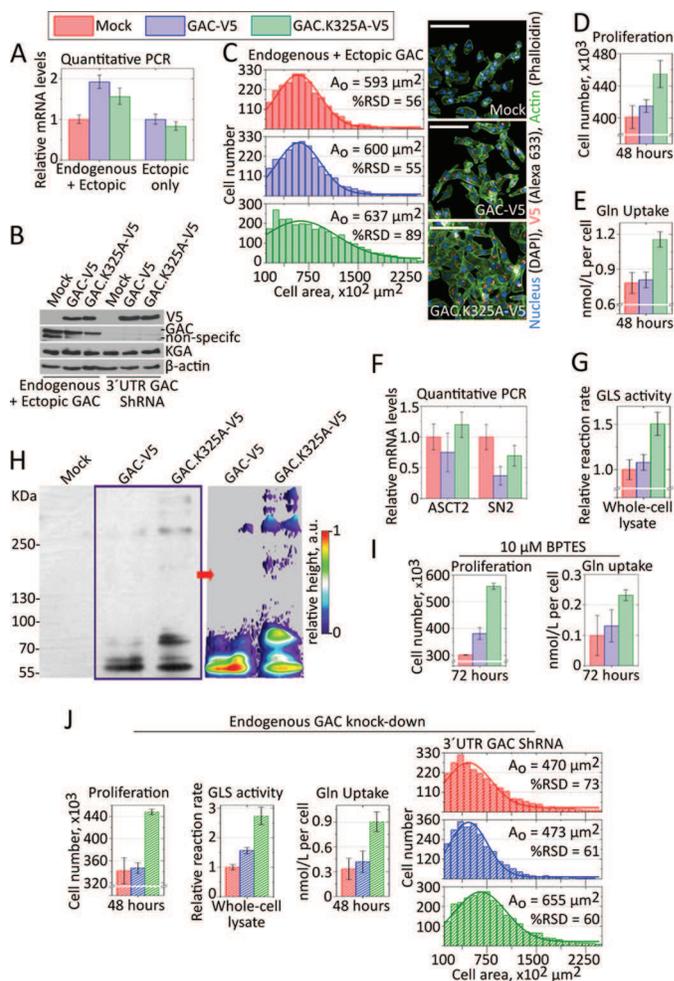


FIGURE 5. GAC superstructure in cell models. A and B, endogenous and V5-tagged ectopic proteins expressed to similar levels. C–E, a stable MDA-MB 231 clone selected after GAC.K325A-V5 transfection presented larger and more heterogeneous cell area (C), proliferated more (D), and consumed more glutamine from the culture media (E), all compared with cells bearing the V5-tagged wild-type protein or a mock plasmid. F, relative mRNA levels of ASCT2 and SN2 glutamine transporters, as defined by quantitative PCR using rRNA 18 S as a housekeeping gene, showing that the GAC.K325A-V5 cells do not overexpress these transporters. G, glutaminase activity from whole cell lysate, in the presence of 20 mM phosphate, showing consistently higher turnover rates for the GAC.K325A-V5 samples, against the physiological glutamine levels in tumors. H, *left panel*, step gradient SDS-PAGE (3–15%) followed by immunoblotting (anti-V5) of UV-induced cross-linked intracellular protein with incorporated photo-reactive amino acids, showing the tendency of the GAC.K325A-V5 to form higher molecular weight superstructures within the cells. The UV-induced cross-linking was performed in living, intact cells in culture. *Right panel*, densitometry was performed in conditions of nonsaturated signal, using ImageJ, to evidence the differential cross-linking of bigger species for GAC.K325A-V5. I, similar to what was observed for the recombinant protein, cells expressing the fiber-prone hyperactive GAC.K325 mutant (GAC.K325A-V5) were less sensitive to BPTES treatment, still proliferating more (*left panel*) and consuming more glutamine (*right panel*) than BPTES-treated counterparts. J, the knockdown of endogenous GAC favored the enhancing of the phenotypic differences observed above, better highlighting the outcome from GAC.K325A-V5 expression.

pared with the GAC-V5 and mock counterparts. First, GAC.K325A-V5 cells were, on average, much larger and heterogeneous in size, as based on the measurement of cell area (Fig. 5C). More specifically, whereas the GAC-V5 and the mock transformed cells presented similar, normally distributed cell areas, peaking at 593 and $600 \mu\text{m}^2$, respectively, the GAC.K325A-V5 population was much more heterogeneous in

Supratetrameric Oligomerization-dependent GAC Activation

size (relative standard deviation of 89%) and still ~7% larger, averaging $637 \mu\text{m}^2$. Second, the mutant-transformed cells proliferated ~10% more than the wild-type and mock transfected cells, as determined by the quantification of cell numbers (Fig. 5D). The average diameter of unattached (trypsinized) cells was also assessed to account for the effects of cell spreading on the area measurements. GAC.K325A-V5 cells presented the largest diameters, averaging at $13.3 \mu\text{m}$ ($n = 178$), when compared with the wild-type GAC-V5 ($10.9 \mu\text{m}$, $n = 151$) and mock cells ($10.6 \mu\text{m}$, $n = 174$) (data not shown).

Next, glutamine uptake from the culture medium was evaluated after 48 h of plating. We found that although the glutamine consumption levels for the GAC and the mock transformed cells was deemed indistinguishable (0.78 ± 0.09 and 0.81 ± 0.07 nmol/liter per cell, respectively), GAC.K325A-V5 cells consumed 40% more glutamine (1.16 ± 0.07 nmol/liter per cell), as shown in Fig. 5E. In parallel, we showed that GAC.K325A-V5 cells do not express more of the glutamine transporters ASCT2 and SN2 (Fig. 5F). To account for the observed increase in glutamine consumption, we assessed the glutaminase activity in a physiological level of L-glutamine (7.5 mM) and observed that the reaction rates for the GAC.K325A-V5 cells are 40–50% higher when compared with the other two clones (Fig. 5G). Faster turnover rates were also consistently observed for the recombinant mutant protein, as shown in the first section.

To inspect for higher than tetramer oligomer formation within the living cells, cells were grown in the presence of photo-reactive amino acids and then exposed to UV light (at 365 nm), followed by immunoblotting against the whole cell extract. The data clearly showed that GAC.K325A-V5 was cross-linked *in cell* into higher molecular weight species than GAC-V5 (Fig. 5H). Although the cross-linked species did not extend as far as those observed for the recombinant protein *in vitro*—likely because of the hetero-oligomerization between the V5-tagged mutant protein and endogenous wild-type GAC inside the mitochondria—the differential cross-linking pattern is evident. We have shown that the enzymatic activity of the recombinant mutant GAC.K325A is unaffected by BPTES treatment (Fig. 3E), which, accordingly, did not disrupt the superstructure (Fig. 3F). As a further confirmation that the superoligomer formation is important for the observed phenotypes, we treated cells with $10 \mu\text{M}$ of BPTES. As expected, GAC.K325A-V5 cells still grew more and consumed higher amounts of glutamine than BPTES-treated control cells (Fig. 5I). BPTES treatment has drastically decreased the glutamine consumption on all the cell clones because it likely disrupted hetero-oligomers (formed by endogenous wild-type GAC and ectopic GAC.K325A-V5) and because it is also inhibits KGA (6). Despite this, the ectopic expression of GAC.K325A was able to improve the proliferation and growth phenotype of the cells.

Lastly, to exclude the possibility that the difference in cell proliferation and growth, as well as Gln uptake for the GAC.K325A-V5 cells were due to higher amounts of endogenous enzyme (in comparison to control cells), as well as to highlight the ectopic protein activity, we knocked down endogenous GAC by using a shRNA target to its mRNA 3'-UTR (Fig. 5B). Not surprisingly, the previously observed phenotypic differences became enhanced. The mutant-transformed cells grew

30% more and were 40% bigger, while consuming ~2.2 times more glutamine per cell, than the wild-type-expressing cells (Fig. 5J). Accordingly, the activity levels assessed from the whole cell extract in the presence of 7.5 mM L-glutamine were 75% higher than the control assays (Fig. 5J). Overall, this collection of results directly demonstrated that the phenotypic differences above resulted from the presence of an ectopically expressed, hyperactive, and higher molecular weight prone protein GAC.K325A-V5, which presented the same biochemical features and the intrinsic tendency to assemble into a superstructure as the recombinant mutant protein.

DISCUSSION

Previous biochemical studies have established that GLS1 glutaminases are mainly found as inactive dimers and that the presence of phosphate correlates with changes leading to tetramerization and enzyme activation (26, 27). We provide here novel information in that regard and show that the catalytic activation of the GLS1 glutaminases is directly linked to a fiber-like supratetrameric assembly, which correlates well with activation levels of the three glutaminase isozymes. The first observations of this phenomenon were provided ~40 years ago, using purified glutaminase from pig renal extract (28, 29). The formation of extended polymers was later used to purify the native enzyme by size exclusion, allowing its first biochemical and kinetic characterization (30), thus implying that our results are not an artifact of recombinantly expressed, truncated protein constructions, or even the chemically induced intermolecular cross-linking. Robinson *et al.* (6) have also documented larger oligomers for recombinant GLS1 in the presence of phosphate. The right-handed double-stranded molecular model that we propose here, when two-dimensionally projected using electron microscopy software, is not only in fully agreement with our experimental micrographs but also with the phosphate-borate induced form and the shadow casting reported by Olsen *et al.* (29) in 1973. Some of our micrographs suggest lateral association between two polymers, as seen, for instance in Figs. 1E (top right and middle panels) and 2 (top left box), as well as those of the GAC.K325A mutant (Figs. 1E and 3F). Regardless of these side by side associations, only the longitudinal growth seems to be connected to an increase in protein activity. Such a feature was also observed by Olsen *et al.* (29). Furthermore, it is also worth mentioning that with regard to the glutaminolytic pathway, polymerization is not exclusive to GLS1 glutaminases. Glutamic dehydrogenase from bovine liver has been shown to self-assemble into long multichain tubular structures under appropriate conditions (31). It is plausible then, that nonpathogenic polymer assembly may be a widespread process for the functioning of other metabolic enzymes.

Robinson *et al.* (6) first demonstrated biochemically that BPTES inhibits the GLS1 isoform (but not the liver-type isozyme, LGA/GLS2) by interfering with its phosphate-dependent allosteric activation and promoting the stabilization of the glutaminase into an inactive tetrameric form, later confirmed structurally (7, 8). Our collection of results indicates that BPTES inhibits GAC by trapping the gating loop at a rigid open conformation, which in turn prevents superoligomer formation. Although the tetramer- and phosphate-induced opening

of this loop is necessary for enzyme activity, its intrinsic flexibility seems to play a major role on the enzymatic process. Indeed, we verified by molecular dynamics simulation on the tetramer that although phosphate binding to the catalytic site increases the gating loop flexibility, both L-glutamate (enzyme inhibition by L-glutamate has been reported for the kidney isoform of GLS1 (32)), and the presence of BPTES freezes the gating loop into a less mobile state (data not shown).

We observed from the kinetic studies with the GAC.K325A mutant that filament formation results in a drastic decrease in the Michaelis constant of the protein, over 100-fold, compared with the wild-type enzyme, in the absence of the activator P_i . A much greater accessibility of the active site to the substrate is suggested upon polymerization, as well as a key role of the gating loop in this process, a phenomenon that is fully reversed when Arg³²² is replaced by alanine. Therefore, the present work unveils a new role for the gating loop, which besides regulating substrate accessibility to active site, also controls the reversible protein polymerization. Because of experimental limitations, which led to a low-resolution 35 Å model, we are unable to describe the specific interactions that hold both the single and the double strands together and result in a fully activated enzyme. However, based on the most diverse effects generated mainly by the individual point mutations, it is plausible to suggest that shape complementarity is the driving force for self-assembly and can only be fully achieved after specific surface charges are enhanced or neutralized, an outcome easily attainable in the presence of a polyanion such as the phosphate ion. This is especially true in the case of the gating loop, where the replacement of two closely positioned, long and positively charged residues (Arg³²² and Lys³²⁵) by alanine had antagonistic effects with regards to protein self-assembly and activation. Concomitantly, major torsions in the relative positions of the monomers inside the tetramer—that are still experimentally undetected, because all GAC crystal structures available to date are virtually identical—may be required for gating loop-mediated superoligomer formation. The binding of BPTES, which shares an extensive area and a large number of hydrogen bonds at the tetramer interface and which also holds the loop into a rigid conformation (besides reducing the flexibility of the tetramer), would also prevent the gating loop from making these contacts. Such torsions in the tetramer cannot be predicted from our manually built model but could possibly be described in the future from higher resolution experimental data, such as by cryoelectron microscopy.

Recently, Katt *et al.* (9) described a potential binding site for the GAC inhibitor 968. In the proposed model, the small molecule docks inside a concave surface region formed at the dimerization interface of two GAC glutaminase domains. The 968 binding region lies very close to the N-terminal portion of GAC, which is predicted here to be involved in the polymerization of the enzyme. The authors further showed that 968 is unable to bind and inhibit a previously phosphate-activated enzyme, which is in full consistency with what we present. Once GAC oligomers are assembled, because of the occlusion of the putative 968-binding site and the possible conformational changes in the N-terminal portion of the enzyme required for self-assembly, they cannot be reversed by the addition of 968,

explaining its limited inhibitory capacity on an already activated enzyme. However, if 968 is bound to free tetramers, then such conformational changes cannot be subsequently achieved, stopping GAC activation via self-assembly. Given the complementary modes of inhibition for BPTES and 968, acting at different stages of enzyme assembly and polymerization, one might envision that a synergy in inhibition would result when both are administered to glutaminase sensitive transformed cell. To our knowledge, this still needs testing.

Our findings also suggest a role for the previously detected *in vivo* acetylation of Lys³¹¹ in human GLS1 glutaminases (13). We propose that this post-translational modification down-regulates the enzymatic levels by antagonizing the formation of the active superoligomers. Given that acetylation is a reversible post-translational modification, it is plausible to suppose that glutaminase superactivation may, at least in part, be regulated by acetyltransferases and deacetylases yet to be identified.

Finally, we need to state that we would not expect that micrometer-long GAC polymers assemble inside the mitochondria. Rather, a more tangible scenario might be the presence of shorter, heterogeneous filaments, similar to those observed in Fig. 1A (*lower panel*). Nonetheless, direct visualization of such in the mitochondria has proven a difficult task. We showed that the superactive mutant GAC.K325A, intrinsically bound to self-assemble, was capable of providing growth and proliferation advantages to cells. However, a more important conclusion that can be drawn from these experiments is that an increased level of GAC in the mitochondria by itself is not sufficient to increase cell proliferation. The protein must be in the active form for such a phenotype to become evident. In cells, phosphate accumulation induced by hypoxia, for instance (23, 33), or even post-translational modifications, such as phosphorylation, could trigger polymerization, suggesting the possibility of distinct therapeutic opportunities for 968-like and BPTES-like inhibitors. Overall, our results reinforce the importance in focusing on the development of allosteric over active site-targeted inhibitors, glutamine analog inhibitors, when targeting GAC in tumors. This would result in preferred isoform-specific inhibitors, because LGA (GLS2), necessary for glutamine metabolism in the liver and brain, does not assemble into superoligomers, as well as avoiding the undesirable cross-inhibition of amidotransferases (21).

Acknowledgments—We thank the Laboratório Nacional de Biociências for access to its facilities (Laboratório de Purificação de Proteínas, Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria, Laboratório de Espectrometria de Massas, Laboratório de Bioensaios, Laboratório de Vetores Virais, and Robolab); Laboratório Nacional de Nanotecnologia for access to Laboratório de Microscopia Eletrônica; and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron for access to D03B-MX1 Beamline. We thank Dr. Alessandra Girasole for secretarial and technical support of Annelize Aragão and Romênia Domingues for helping with the MS analysis. We thank Dr. Richard C. Garratt (Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo) for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Gaglio, D., Metallo, C. M., Gameiro, P. A., Hiller, K., Danna, L. S., Balestrieri, C., Alberghina, L., Stephanopoulos, G., and Chiaradonna, F. (2011) Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 523
- Le, A., Lane, A. N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C. J., Slusher, B. S., Zhang, H., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Slebos, R. J., Lorkiewicz, P. K., Higashi, R. M., Fan, T. W., and Dang, C. V. (2012) Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.* **15**, 110–121
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T. C., Lee, Y. S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T., and Dang, C. V. (2009) c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutamine expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 762–765
- Wang, J. B., Erickson, J. W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K. F., Ambrosio, A. L., Dias, S. M., Dang, C. V., and Cerione, R. A. (2010) Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* **18**, 207–219
- Cassago, A., Ferreira, A. P., Ferreira, I. M., Fornezari, C., Gomes, E. R., Greene, K. S., Pereira, H. M., Garratt, R. C., Dias, S. M., and Ambrosio, A. L. (2012) 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
- Robinson, M. M., McBryant, S. J., Tsukamoto, T., Rojas, C., Ferraris, D. V., Hamilton, S. K., Hansen, J. C., and Curthoys, N. P. (2007) Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem. J.* **406**, 407–414
- DeLaBarre, B., Gross, S., Fang, C., Gao, Y., Jha, A., Jiang, F., Song, J. J., Wei, W., and Hurov, J. B. (2011) Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor. *Biochemistry* **50**, 10764–10770
- Thangavelu, K., Pan, C. Q., Karlberg, T., Balaji, G., Uttamchandani, M., Suresh, V., Schüler, H., Low, B. C., and Sivaraman, J. (2012) Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 7705–7710
- Katt, W. P., Ramachandran, S., Erickson, J. W., and Cerione, R. A. (2012) Dibenzophenanthridines as inhibitors of glutaminase C and cancer cell proliferation. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1269–1278
- Vander Heiden, M. G. (2011) Targeting cancer metabolism. A therapeutic window opens. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 671–684
- Jones, N. P., and Schulze, A. (2012) Targeting cancer metabolism. Aiming at a tumour's sweet-spot. *Drug Discov. Today* **17**, 232–241
- Kenny, J., Bao, Y., Hamm, B., Taylor, L., Toth, A., Wagers, B., and Curthoys, N. P. (2003) Bacterial expression, purification, and characterization of rat kidney-type mitochondrial glutaminase. *Protein Expr. Purif.* **31**, 140–148
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V., and Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets proteins complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**, 834–840
- Leslie, A. G. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **26**, 27–33
- Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D* **62**, 72–82
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser Crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674
- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D* **66**, 213–221
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* **66**, 486–501
- Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D* **66**, 12–21
- Aragão, A. Z., Nogueira, M. L., Granato, D. C., Simabuco, F. M., Honorato, R. V., Hoffman, Z., Yokoo, S., Laurindo, F. R., Squina, F. M., Zeri, A. C., Oliveira, P. S., Sherman, N. E., and Paes Leme, A. F. (2012) Identification of novel interaction between ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) and thioredoxin-1. *J. Biol. Chem.* **287**, 43071–43082
- Yuneva, M. O., Fan, T. W., Allen, T. D., Higashi, R. M., Ferraris, D. V., Tsukamoto, T., Matés, J. M., Alonso, F. J., Wang, C., Seo, Y., Chen, X., and Bishop, J. M. (2012) The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* **15**, 157–170
- Campos-Sandoval, J. A., López de la Oliva, A. R., Lobo, C., Segura, J. A., Matés, J. M., Alonso, F. J., and Márquez, J. (2007) Expression of functional human glutaminase in baculovirus system. Affinity purification, kinetic and molecular characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 765–773
- Gorman, M. W., He, M. X., Hall, C. S., and Sparks, H. V. (1997) Inorganic phosphate as regulator of adenosine formation in isolated guinea pig hearts. *Am. J. Physiol.* **272**, H913–H920
- Read, R. J., and Schierbeek, A. J. (1988) A phased translation function. *J. Appl. Crystallogr.* **21**, 490–495, DOI 10.1107/S002188988800562X
- Van Heel, M., Portugal, R., Rohou, A., Linnemayr, C., Bebeacqua, C., Schmidt, R., Grant, T. R., and Schatz, M. (2012) *Four-dimensional Cryo Electron Microscopy at Quasi Atomic Resolution. IMAGIC 4D in International Tables for Crystallography Volume F. Crystallography of biological macromolecules* (Arnold, E., Himmel, D. M., and Rossmann, M. G., eds) 2nd edition, pp. 624–628, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ
- Godfrey, S., Kuhlenschmidt, T., Curthoys, N. P. (1977) Correlation between activation and dimer formation of rat renal phosphate dependent glutaminase. *J. Biol. Chem.* **252**, 1927–1931
- Morehouse, R. F., and Curthoys, N. P. (1981) Properties of rat renal phosphate-dependent glutaminase coupled to Sepharose. Evidence that dimerization is essential for activation. *Biochem. J.* **193**, 709–716
- Olsen, B. R., Svenneby, G., Kvamme, E., Tveit, B., and Eskeland, T. (1970) Formation and ultrastructure of enzymically active polymers of pig renal glutaminase. *J. Mol. Biol.* **52**, 239–245
- Olsen, B. R., Torgner, I. A., Christensen, T. B., and Kvamme, E. (1973) Ultrastructure of pig renal glutaminase. Evidence for conformational changes during polymer formation. *J. Mol. Biol.* **74**, 239–251
- Curthoys, N. P., Kuhlenschmidt, T., and Godfrey, S. S. (1976) Regulation of renal ammoniogenesis, purification and characterization of phosphate-dependent glutaminase from rat kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **174**, 82–89, DOI 10.1016/0003-9861(76)90326-X
- Josephs, R., and Borisy, G. (1972) Self-assembly of glutamic dehydrogenase into ordered superstructures. Multichain tubes formed by association of single molecules. *J. Mol. Biol.* **65**, 127–155
- Curthoys, N. P., and Watford, M. (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 133–159
- Fan, T. W., Higashi, R. M., and Macdonald, J. M. (1991) Emergence and recovery response of phosphate metabolites and intracellular pH in intact *Mytilus edulis* as examined *in situ* by *in vivo* ³¹P-NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1092**, 39–47