

CAROLLINE FERNANDA RODRIGUES ASCENÇÃO

**ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR QUE
IMPACTAM NA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTAMINASE**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLLINE FERNANDA RODRIGUES ASCENÇÃO

“Estudo das vias de sinalização celular que impactam na atividade da enzima glutaminase”

Este exemplar corresponde à redação final da DISSERTAÇÃO defendida pela candidata

**CAROLLINE
FERNANDA
RODRIGUES
ASCENÇÃO**

e aprovada pela Comissão Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Dra. Sandra Martha Gomes Dias
Coorientadora: Dra. Marília Meira Dias

CAMPINAS,
2014

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

As22e Ascensão, Caroline Fernanda Rodrigues, 1989-
Estudo das vias de sinalização celular que impactam na atividade da enzima glutaminase / Caroline Fernanda Rodrigues Ascensão. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Sandra Martha Gomes Dias.

Coorientador: Marília Meira Dias.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glutaminase. 2. Câncer. 3. Tumores – Metabolismo. 4. Serina-treonina quinases TOR. I. Dias, Sandra Martha Gomes. II. Dias, Marília Meira, 1984-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Understanding the cell signalization pathways that impact on glutaminase activity

Palavras-chave em inglês:

Glutaminase

Cancer

Tumores - Metabolism

TOR serine threonine kinases

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Sandra Martha Gomes Dias [Orientador]

Adriana Franco Paes Leme

José Andrés Yunes

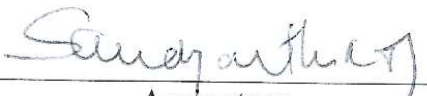
Data de defesa: 17-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 17 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

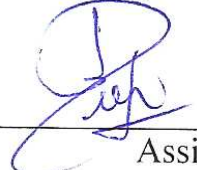
Dra. Sandra Martha Gomes Dias (orientadora)


Assinatura

Dra. Adriana Franco Paes Leme


Assinatura

Dr. José Andrés Yunes


Assinatura

Dr. Márcio Chaim Baigelman

Assinatura

Dra. Juliana Helena Costa Smetana

Assinatura

Resumo

A proliferação celular comanda os processos de embriogênese e de crescimento do organismo, sendo essencial para a correta função de vários tecidos adultos. Apesar de ser importante para a homeostase do organismo, a sua desregulação compõe a força motriz do desenvolvimento tumoral. Somente nos últimos vinte anos começou a ser evidenciada a relação entre as vias de tradução de sinais estimuladas por fatores de crescimento e a reorganização da atividade metabólica, a qual precisa priorizar a biossíntese e o aumento da biomassa, processos essenciais para a divisão celular. Em células tumorais, o consumo de glutamina é aumentando concomitante ao aumento da atividade de glutaminase. Três isoenzimas de glutaminase são expressas na maioria dos tecidos (*liver-type* glutaminase, *kidney-type* glutaminase e glutaminase C), todavia pouco se sabe sobre a necessidade específica de cada uma delas para o metabolismo tumoral. Vários artigos recentes têm definido o papel da glutaminólise, ou metabolismo da glutamina e seus subprodutos, na ativação da mTOR. Esta fato, associado ao de que mTOR é um regulador chave de vias biossintéticas celulares e, assim, proliferação, nós hipotetizamos que mTOR pudesse regular glutaminase. Desta maneira, resolvemos investigar se mTOR atua na regulação da atividade de glutaminase. Para tanto, realizamos *knockdown* estável de PTEN em células MDA-MB 231 e verificamos que não o mesmo afetou os níveis protéicos de GAC e KGA, assim como não houve mudança na localização subcelular das isoformas. Cinética enzimática da fração mitocondrial desta linhagem revelou que o *knockdown* de PTEN levou à uma diminuição do K_M da enzima sem alteração de V_{max} . De acordo, o tratamento com rapamicina, inibidor da mTOR, elevou o K_M para os níveis detectados nas células controles. A atividade de glutaminase de lisado total de MDA-MB 231, NIH 3T3, IMR90 e BJ5TA foi afetada pelo tratamento com rapamicina conforme julgado por ensaios de dose e tempo resposta. Mais, ensaios de privação de glicose, glutamina e de fatores de crescimento levaram à inibição de mTOR e concomitante redução da atividade de glutaminase. Somado a isso, o *knockdown* estável de TSC2 em MDA-MB 231 e BJ5TA, assim como o *knockout* de TSC2 em MEF, promoveu superestimulação de mTOR e foi capaz de aumentar a atividade de glutaminase. Dosagem de atividade de glutaminase de células MDA-MB 231 com *knockdown* de GAC, KGA ou GAC/KGA tratadas com rapamicina indicaram que mTOR possa agir em ambas as isoformas. Curioso foi que apenas células shGAC e shGAC/KGA apresentaram redução da fosforilação de S6K em Thr389 indicando que GAC ou o metabolismo de glutamina via esta isoforma, possa regular mTOR. Em adição, na comparação entre as linhagens de tumor de próstata PC3 e DU145, verificamos que DU145 apresentou maior expressão de GAC, maior consumo de glutamina, maior dependência de glutamina em seu crescimento, maior sensibilidade ao inibidor de glutaminase, BPTES, e por fim, se mostrou mais responsiva à metformina, ativador indireto de AMPK. A ativação dessa quinase por metformina mostrou diminuir a atividade de glutaminase em DU145, indicando uma potencial ação de AMPK nas glutaminases, provavelmente via mTOR.

Abstract

Cell proliferation is crucial for embryogenesis and organism growth, being also essential for the proper function of several adult tissues. Although important for the homeostasis of the organism, its deregulation composes the driving force of tumor development. In the past twenty years the relationship between the processes of signal translation stimulated by growth factors and the reorganization of metabolic activity has become more evident. Growing cells need to prioritize the biosynthesis and biomass increase, processes essential for cell division. In tumor cells, the glutamine consumption is increased concurrently with the increasing in the glutaminase activity. Three glutaminase isoenzymes are expressed in most tissues (liver- type glutaminase, kidney -type glutaminase and glutaminase C), but not much is known about the necessity of each isoform for the tumor metabolism. Several recent papers have defined the role of glutaminolysis or glutamine metabolism in mTOR activation. This, associated to the fact that mTOR controls several biosintetic pathways and cell proliferation led us to hypothesize that mTOR could regulate glutaminase. Thus, we decided to investigate whether mTOR can control glutaminase activity. To this end, we have made MDA - MB 231 cells stably knocked down for PTEN and verified no alteration in KGA and GAC protein levels, as well as there was no change on their subcellular location. Enzyme kinetics of the MDA-MB 231 mitochondrial fraction revealed that PTEN knockdown led to a decrease in the K_M of the enzyme without changing V_{max} . Accordingly, the treatment with rapamycin (mTOR inhibitor), led to an increase in K_M back to the level detected in control cells. The glutaminase activity of MDA - MB 231, NIH 3T3, IMR90 and BJ5TA total cellular lysates was also affected by rapamycin treatment in a dose- and time-response fashion. Moreover, glucose, glutamine and growth factors deprivation promoted mTOR inhibition and concomitant reduction on glutaminase activity. Glutaminase activity of MDA-MB 231 cells knocked down for GAC, KGA or GAC/KGA and treated with rapamycin indicated that mTOR can regulate both isoforms. Curiously, it was only on GAC or GAC/KGA knocked down cells that we observed a decrease in S6K Thr 389 phosphorylation, which indicated that GAC or the GAC dependent-glutamine metabolism could specifically regulate mTOR. Accordling, stable TSC2 knockdown in MDA-MB 231 and BJ5TA, as well as TCS2 *knockout* in MEF cells, promoted overstimulation of mTOR and increasing on glutaminase activity. Moreover, a comparison between the prostate cell lines PC3 and DU145 revealed that DU145 has higher GAC expression, consumes more glutamine, is more dependent on glutamine for its growth, more sensitive to the inhibitor of glutaminase, BPTES, and more responsive to metformin, an indirect AMPK activator. The activation of this kinase by metformin, led to a decrease on glutaminase activity in DU145 cells, indicating a potential action of AMPK in glutaminases, likely through mTOR.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1. EFEITO WARBURG	29
2.2. O CICLO DO TCA E GLUTAMINÓLISE	33
2.3. GLUTAMINASES	37
2.4. VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E METABOLISMO	39
3. OBJETIVOS.....	47
3.1. OBJETIVOS GERAIS	47
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. CULTURA DE CÉLULAS	49
4.2. CLONAGEM.....	49
4.3. TITULAÇÃO VIRAL E TRANSDUÇÃO CELULAR	51
4.4. <i>KNOCKDOWN</i> ESTÁVEL DE PTEN, TSC2 E RICTOR.....	52
4.5. EXPERIMENTOS DE PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES E FATORES DE CRESCIMENTO	52
4.6. EXPERIMENTOS DE TRATAMENTO CELULAR COM INIBIDORES/ATIVADORES QUÍMICOS DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E HORMÔNIOS	53
4.7. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE mTOR SOBRE KGA OU GAC	54
4.8. <i>WESTERN-BLOT</i>	54
4.9. PCR QUANTITATIVO.....	55
4.10. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS.....	56
4.11. PREPARO DE LISADO CELULAR TOTAL PARA DOSAGEM DE ATIVIDADE DE GLUTAMINASE.....	56
4.12. ENSAIO DE ATIVIDADE DE GLUTAMINASE	57
4.13. DOSAGEM DO CONSUMO DE GLICOSE, LACTATO, GLUTAMINA E GLUTAMATO	58
4.14. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	58
4.15. ESTATÍSTICA	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1. ATUAÇÃO DA VIA DA PI3K/Akt SOBRE AS GLUTAMINASE.....	61

5.2. ATUAÇÃO DE mTORC1 SOBRE AS GLUTAMINASES	64
5.3. ATUAÇÃO DE mTORC2 SOBRE AS GLUTAMINASES	72
5.4. ATUAÇÃO DE mTORC1 SOBRE AS ISOFORMAS DE GLUTAMINASE KGA E GAC	73
5.5. AÇÃO DA VIA DA AMPK SOBRE AS GLUTAMINASES	75
6. CONCLUSÕES	81
7. PERSPECTIVAS	85
8. REFERÊNCIAS	87
9. APÊNDICE 1 - PREDIÇÃO DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS EM KGA E GAC.....	97
10. APÊNDICE 2 - ALTERAÇÕES EM PROTEÍNAS DA VIA DA PI3K/AKT/MTOR E VIA DA AMPK NAS LINHAGENS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.....	101
11. ANEXO 1 – DECLARAÇÃO CIBio.....	103
12. ANEXO 2 – ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO.....	107

Agradecimento

Agradeço a Deus, minha rocha, minha fortaleza e meu refúgio, por todas as conquistas adquiridas ao longo desta experiência de crescimento profissional e por todos os desafios surgidos ao longo do percurso que despertavam em mim várias potencialidades e incitavam a criatividade que culminaram com os resultados positivos obtidos e com a descoberta de quão formidável é a área de pesquisa.

À minha família, pelas dores e alegrias vividas em conjunto, em especial a minha mãe, essa mulher de fibra a cujo exemplo de caráter e força se refletem hoje em minha personalidade, a vó Dalva e a Dindinha (*In memoriam*) pelo amor e carinho incondicionais que foram meu sustentáculo, a tia Shirlei, eterna incentivadora dos meus sonhos acadêmicos, ao meu namorado Daniel por ter sido a família mais próxima e o melhor amigo, se tornando hoje o Economista que mais entende de Bioquímica, glutaminase e câncer.

Aos amigos do laboratório DPC-32/LNBio pelo ambiente agradável de trabalho. Em especial à Marília e o Gui, por terem feito a Biologia Celular e a via da mTOR parecerem tão prazerosas. A Amandinha e ao Igor, amigos de longa data. A Carol, Kaliandra, Emerson, Robertinha e Patrick, por tornarem os dias de trabalho mais divertidos. A nossa técnica, Alessandra, pela responsabilidade com as compras relativas á nossos projetos.

A Sandra, pela oportunidade do mestrado, pela confiança ao decorrer desses dois anos, pelo entusiasmo que renovava em mim a paixão pela pesquisa, por ter acreditado e apoiado minhas ideias com relação aos experimentos, por toda a disponibilidade de tempo, por não ter me deixado desistir do projeto a cada dificuldade e por ser a grande responsável pelo meu crescimento profissional.

Agradeço também a FAPESP pelo financiamento e pelo CNPEM/LNBio pela estrutura disponibilizada.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Representação esquemática das diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbia e glicólise aeróbica (efeito Warburg).....	29
Figura 2 - Células tumorais obtêm os precursores biosintéticos a partir do metabolismo da glicose e glutamina.....	31
Figura 3 – Vias metabólicas controladas por vias de tradução de sinais.....	32
Figura 4 – Via glutaminolítica.....	35
Figura 5 – Representação das isoenzimas LGA e KGA e de suas isoformas.....	38
Figura 6 – A rede de sinalização que regula o metabolismo em células proliferativas.....	41
Figura 7 – A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.....	42
Figura 8 – Ativação lisossomal de mTORC1.....	44
Figura 9 – Esquema de avaliação cinética da atividade de glutaminase.....	57
Figura 10 – Atuação de PTEN (Via da PI3K) sobre as glutaminases.....	63
Figura 11 – Inibição de PI3K afeta a atividade das glutaminases.....	65
Figura 12 – Inibição de mTOR, via rapamicina e via privação de nutrientes levou à inibição da atividade de glutaminase em células MDA-MB 231 da atividade de glutaminase em MDA-MB 231.....	66
Figura 13 – Inibição de mTOR, via rapamicina levou à inibição da atividade de glutaminase em células não tumorais.....	67
Figura 14 – Inibição de mTOR, via privação de nutrientes levou à inibição da atividade de glutaminase em linhagens não tumorais.....	68
Figura 15 – Ativação de mTOR via <i>Knockdown</i> de TSC2 em MDA-MB 231 estimulou a atividade de glutaminase.....	70
Figura 16 – Ativação de mTOR via <i>Knockdown</i> de TSC2 em BJ5TA estimulou a atividade de glutaminase.....	71
Figura 17 - Ativação de mTOR via <i>knockout</i> de TSC2 em MEF estimulou atividade de glutaminase.....	71

Figura 18 – Inibição/Ativação de mTORC1 por nutrientes e fator de crescimento afeta a atividade de glutaminase.....	72
Figura 19 – mTORC2 age sobre as glutaminase provavelmente via mTORC1.....	73
Figura 20 – mTOR age sobre as duas isoformas de glutaminase.....	74
Figura 21 – Dependências relativas do metabolismo glicolítico e glutaminolítico de PC-3 e DU145.....	77
Figura 22 – Sensibilidades relativas ao inibidor de glutaminase, BPTES, em PC-3 e DU145.....	78
Figura 23 – Ativação de AMPK via metformina levou à redução do o metabolismo glutaminolítico em DU145.....	80
Figura 24 – mTOR regula positivamente a atividade de glutaminase.....	87

Tabelas

Tabela 1 – Oligonucleotídeos empregados nos experimentos de *knockdown* .

Tabela 2 – Oligonucleotídeos empregados nos experimentos de qPCR.

Tabela 3 – Predição de modificações pós traducionais em KGA.

Tabela 4 – Predição de modificações pós traducionais em GAC.

Tabela 5 – Alterações em proteínas das vias PI3K/Akt/mTOR e via da AMPK nas linhagens MDA-MB231, BJ5TA, NIH3T3, MEF, PC-3 e DU-145.

Lista de abreviaturas

mTOR – *mechanistic target of rapamycin*

PTEN – *Phosphatase and tensin homolog*

GAC – *Glutaminase C*

KGA – *Kidney-type-glutaminase*

LGA - *Liver-type-glutaminase*

TSC – *Tuberous sclerosis*

AMPK – *AMP-activated protein kinase*

PI3K – *Phosphoinositide 3-kinase*

Akt – *Serine/threonine protein kinase*

ATP – *Adenosine triphosphate*

TCA – *Tricarboxylic acid cycle*

OAA – *Oxaloacetate acid*

LDH -A – *Lactate dehydrogenase A*

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

FDG-PET – F^{18} -*deoxiglucose Positron Emission Tomography*

R5P – *Ribose 5-phosphate*

Ac-CoA- *Acetyl-Coenzyma A*

tRNA – *transfer RNA*

mRNA – *messenger RNA*

PDH – *Pyruvate dehydrogenase*

PDK – *Pyruvate dehydrogenase kinase*

ACC – *Acetyl-Coenzyma A carboxylase*

FAS – *Fatty acid synthase*

HIF – *Hypoxia-inducible factor*

Hk2 – *Hexokinase 2*

LKB – *Liver Kinase B*

NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form*

NADP⁺ - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

ACL – *ATP citrate lyase*

ME – *Malic enzyme*

MAL – CoA – *Malonyl – Coenzyme A*

MDH – *Malate dehydrogenase*

SREBP – *Sterol regulatory element-binding protein*

IDH – *Isocitrate dehydrogenase*

GLS 1 – *Glutaminase type 1*

GLS 2 – *Glutaminase type 2*

PDZ – br – *Bromo protein-interaction domain*

NRB – *Nuclear receptor box*

MS – *Mitochondrial signalling*

ANK – *Ankyrin repeat*

GIP – *Glutaminase interacting protein*

CDK – *Cyclin dependent kinase*

APC/C Cdh1 – *Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1*

Raptor – *Regulatory-associated protein of mtor*

Deptor – *Domain-containing mTOR-interacting protein*

Pras 40- *Proline-rich Akt substrate of 40 kDa*

mLST8 – *Mammalian lethal with SEC13 protein 8*

S6K – *Ribosomal protein S6 kinase beta-1*

4EBP - *Related eIF4E-binding protein 4*

Rictor - *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*

mSIN1 – *Mammalian stress-activated protein kinase-interaction protein*

PRR5 – *Proline rich 5 (renal)*

AGC – *Protein kinase A, G, and C families*

SGK 1 - *Serum/glucocorticoid kinase 1*

PIP – *Prolactin induced protein*

Foxo – *Forkhead transcription factor*

GSK3 β – *Glycogen synthase kinase 3 beta*

GAP – *GTPase activating protein*

Rheb – *Ras homolog enriched in brain*

GDP – *Guanine dinucleotide phosphate*

eIF4E – *Eukaryotic translation initiation factor 4E*

PKC – *Protein Kinase C*

FKBP12 – *12kDa – FK 506 Binding protein*

Rag – *Ras-related GTPase*

Sirt 4 – *Sirtuin 4*

ADP – *Adenosine diphosphate*

CREB2 – *cAMP response element-binding protein 2*

miRNA – *micro RNA*

FBS – *Fetal bovine serum*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*

DMEM/HAM F-12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

shRNA – *short hairpin RNA*

TRC – *The RNAi Consortium*

NEB – *New English Biolabs*

LVV – Laboratório de Vetores Virais

UFC – Unidades formadoras de colônias

MOI – *Multiplicity of infection*

GFP – *Green fluorescent protein*

NaCl- Cloreto de sódio

EDTA – *Diaminoethanetetraacetic acid*

Na₃VO₄ – *Ortovanadato de sódio*

PMSF – *Phenylmethysulfonyl fluoride*

SDS-PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis*

PVDF – *Polyvinylidene fluoride*

BSA – *Bovine serum albumin*

TBS – *Tris-buffered saline*

RNA – *Ribonucleic Acid*

cDNA – *complementary DNA*

qPCR – *Quantitative PCR*

rRNA – *ribosomal RNA*

GDH – *Glutamate dehydrogenase*

NAD – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

KH₂PO₄ – Fosfato monobásico de potássio

PBS – *Phosphate buffered saline*

K_M- Constante de Michaelis-Menten

V_{máx} – Velocidade máxima

Aicar – *[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-Carbamoyl-5-aminoimidazol-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl dihydrogen phosphate.*

2DG – *2-Deoxy-D-glucose*

GR – *Glucocorticoid receptor*

SDH – *Succinate dehydrogenase*

SREBP – *Sterol regulatory element-binding protein*

1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, a proliferação celular é necessária para os processos de embriogênese, crescimento, a correta função de vários tecidos adultos e, quando desregulada, pode levar ao desenvolvimento tumoral. Na iminência da proliferação, as células necessitam reprogramar o metabolismo celular uma vez que a produção de duas células filhas requer a duplicação de toda biomassa celular (proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos). Nos últimos vinte anos o estudo de diversos tipos de células proliferativas tem permitido o entendimento mais completo do metabolismo no estado celular proliferativo, o qual difere do metabolismo das células quiescentes pela alta taxa de glicólise, produção de lactato e a biossíntese de lipídeos e outras macromoléculas ⁽¹⁾.

Na década de 1920, Otto Warburg publicou a observação marcante de que células tumorais de rápida proliferação consumiam elevadas taxas de glicose em comparação a células normais não proliferativas e secretavam muito do carbono derivado da glicose como lactato (mesmo na presença de oxigênio), ao contrário de optar por sua completa oxidação via fosforilação oxidativa ^{(2) (3)}. Recentemente, a glicólise aeróbica foi reconhecida como um novo *hallmark* do câncer segundo Hanahan e Weinberg ⁽⁴⁾.

A explicação atual para o efeito Warburg é de que a alta taxa glicolítica proporciona diversas vantagens para as células. Se o fluxo glicolítico é alto o suficiente, como é o caso do metabolismo canceroso, o consumo da glicose para a produção de ATP, mesmo possuindo um baixo rendimento por molécula de glicose, resulta em uma porcentagem final de ATP que pode exceder à produzida pela fosforilação oxidativa ⁽¹⁾. A via glicolítica fornece diretamente intermediários para a síntese de lipídeos e do açúcar ribose dos nucleotídeos. Desta maneira, o efeito Warburg beneficiaria tanto a necessidade bioenergética quanto biossintética das células. Por fim, em contraste com a respiração mitocondrial, a geração de energia pela via glicolítica ocorre independentemente da oferta de oxigênio e permite às células sobreviverem e migrarem para áreas hipóxicas (com baixo nível de oxigênio), um fator crucial para o crescimento do tumor.

Para sintetizar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, as células também usam precursores do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA, *Tricarboxylic acid cycle*). Desta

maneira, o papel chave do ciclo TCA nas células em proliferação é o de agir como uma fonte de metabólitos para a biossíntese, sendo que muito do carbono que entra o ciclo TCA é usado em vias biosintéticas que consomem, ao contrário de produzir ATP ^{(1) (5) (6)}. De maneira a sustentar o funcionamento do ciclo TCA em face à cataplerose, as células precisam lançar mão de um influxo de metabólitos intermediários para suplementar os extraídos do ciclo, fenômeno conhecido como anaplerose. Uma fonte anaplerótica importante é o metabolismo de aminoácidos, particularmente o da glutamina, o aminoácido mais abundante em mamíferos. A glutaminólise usa diversos passos do ciclo TCA e torna a glutamina uma fonte também energética para as células proliferativas ^{(5) (6) (7)}. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear na presença de substratos marcados com C¹³ tem revelado o uso da glutamina como o principal precursor anaplerótico em células de glioma proliferativas ⁽⁸⁾. Estas observações sugerem que o metabolismo da glutamina permite às células proliferativas manter um fluxo anaplerótico compatível com o uso dos intermediários metabólicos do ciclo TCA como precursores biossintéticos.

Mamíferos contêm dois genes distintos que codificam para pelo menos três diferentes isoenzimas de glutaminases. O gene GLS1 (*Glutaminase type 1*) codifica para duas isoformas produzidas por *splicing* alternativo, denominadas *Kidney-type glutaminase* (KGA) e *Glutaminase C* (GAC) ^{(9) (10)}. Estudos conduzidos em nosso laboratório têm revelado que a isoforma GAC é mais responsiva que a KGA e LGA (*Liver-type Glutaminase*) à ativação por fosfato inorgânico ⁽¹¹⁾. Mais, somente a GAC foi encontrada exclusivamente na mitocôndria de células cultivadas (tumoriais e não transformadas) após estudos de fracionamento celular seguido de *imunoblot* com anticorpos específicos, levantando a hipótese de que a KGA possa ter funções diversas nas células ⁽¹¹⁾. O gene GLS2 (*Glutaminase type 2*), por sua vez, codifica para a isoenzima (LGA) ⁽¹²⁾, e está suprimido em tumores com perda de função para o regulador transcricional p53 ^{(13) (14)}.

Células adultas de mamíferos entram no ciclo celular somente quando são instruídas a fazê-lo através da ação de fatores de crescimento. Os fatores de crescimento, por sua vez, estimulam vias de sinalização intracelulares, impactando na expressão gênica e fisiologia celular. A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é altamente conservada e empregada pelas células para a resposta à fatores de crescimento ^{(15) (16)}. A ligação do fator de crescimento ao seu receptor de superfície leva à ativação da PI3K (PI3K, *Phosphoinositide 3-kinase*),

resultando na fosforilação dos lipídeos fosfatidilinositol da membrana plasmática. Esta ação leva ao recrutamento e ativação de efetores que vão atuar na cascata de sinalização, em particular a serina/treonina quinase Akt (Akt, *Serine/threonine protein kinase*) e mTOR (mTOR, *mechanistic target of rapamycin*). mTOR funciona como uma quinase central em dois distintos complexos multiprotéicos: TORC 1 e TORC 2. Tais complexos variam em composição e função fisiológica. A ativação da via da PI3K/Akt/mTOR suporta a biossíntese através do aumento da expressão de transportadores de nutrientes tais como glicose e aminoácidos ^{(17) (18) (19) (20)}. Além disto, através de efeitos na atividade enzimática da hexoquinase e fosfofrutoquinase, Akt aumenta o fluxo glicolítico e a produção de lactato, sendo suficiente para induzir o efeito Warburg em células não transformadas ou cancerosas ^{(21) (22)}, além do aumento da síntese de macromoléculas. Já foi extensivamente mostrado que PI3K e Akt estimulam a expressão de genes lipogênicos e glicolíticos ^{(23) (24)}, enquanto que mTOR é um conhecido regulador da síntese protéica ⁽²⁵⁾.

Em células normais a ativação da via PI3K/Akt/mTOR é controlada pela desfosforilação das espécies de fosfatidilinositol pela fosfatase PTEN (PTEN, *Phosphatase and tensin homolog*). Mutações que promovem a ativação constitutiva da PI3K desativam a PTEN ou estimulam/amplificam os receptores de membrana constituem uma das mais expressivas classes de mutações em tumores humanos ⁽¹⁾. Estudos mostraram que mTOR é capaz de sentir e responder aos níveis intracelulares de leucina e glutamina ⁽²⁶⁾ e tem sua atividade regulada pela glutaminólise ⁽²⁷⁾. Mais, foi mostrado que mTOR age como regulador da enzima glutamato desidrogenase (GDH, *Glutamate dehydrogenase*) ⁽²⁸⁾.

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK-*AMP-activated Kinase*) é uma proteína que desempenha um papel central na regulação da bioenergética e homeostase celular ⁽²⁹⁾. Em situações de níveis aumentados de AMP:ATP, como a desencadeada pela privação de nutrientes ou hipóxia, AMPK fosforila o complexo TSC1-TSC2 (TSC, *Tuberous sclerosis*), de uma forma LKB1-dependente (*Liver Kinase B*), para promover a inibição de mTOR e consequente inibição da síntese protéica e da biossíntese de lipídios pela acetil-Coenzima A carboxilase ^{(29) (30)} (ACC, *Acetyl Coenzyme A carboxylase*).

A atividade metabólica que diferencia crescimento celular (aumento em biomassa celular) da proliferação é a duplicação do genoma, o qual requer da célula o total

compromisso para a síntese de nucleotídeos. A família de genes myc (c-myc, l-myc, s-myc e n-myc) são fatores de transcrição que regulam o crescimento e a entrada no ciclo celular e estão altamente expressos em várias linhagens tumorais. C-myc também controla a expressão de enzimas glicolíticas e LDH-A^{(31) (32)} (*Lactate dehydrogenase A*), além de estar envolvido no metabolismo de nucleotídeos, extremamente necessário para a duplicação do genoma. Algumas células transformadas por c-myc mostraram possuir um forte requerimento por glutamina de maneira a se manterem viáveis, uma vez que a eliminação de glutamina do meio resulta na diminuição dos intermediários do ciclo TCA e leva a diminuição da proliferação celular^{(33) (34)}.

Em resumo, o consumo de glutamina é aumentando em células tumorais⁽⁶⁾, estando isto conectado ao aumento da atividade de glutaminase nestas células, um passo importante para o aumento dos processos biossintéticos e bioenergéticos das mesmas^{(6) (34)}. Artigos recentes têm definido o papel da glutaminólise, ou metabolismo da glutamina e seus subprodutos, na ativação da mTOR^{(25) (26) (27)}. Neste sentido é uma hipótese válida imaginar que mTOR possa regular glutaminase. Outro sensor energético que pode atuar sobre a atividade de glutaminase é a AMPK⁽³⁵⁾. Neste projeto foi avaliado o impacto das vias de sinalização da PI3K/Akt/mTOR e AMPK na atividade de glutaminase.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EFEITO WARBURG

Desde as últimas duas décadas, o estudo de diversos tipos de células proliferativas tem permitido o desenho do cenário completo do metabolismo no estado proliferativo. Este metabolismo difere do metabolismo das células quiescentes pela alta taxa de glicólise, produção de lactato, biosíntese de lipídeos e outras macromoléculas ⁽¹⁾. Em contraste com células normais diferenciadas, que majoritariamente realizam a fosforilação oxidativa mitocondrial, células tumorais optam por realizar a glicólise aeróbica, a qual é uma via menos eficiente de se gerar ATP. Tal fenômeno também é conhecido como “efeito Warburg” em homenagem ao bioquímico/fisiologista alemão que o descreveu. Otto Warburg, na década de 1920, descobriu que células tumorais de rápida proliferação consumiam glicose a taxas surpreendentemente rápidas em comparação a células normais e secretavam muito do carbono derivado da glicose como lactato (mesmo na presença de oxigênio), ao contrário de optar por sua completa oxidação ^{(2) (3)} (Figura 1) o que lhe rendeu o prêmio Nobel em 1931.

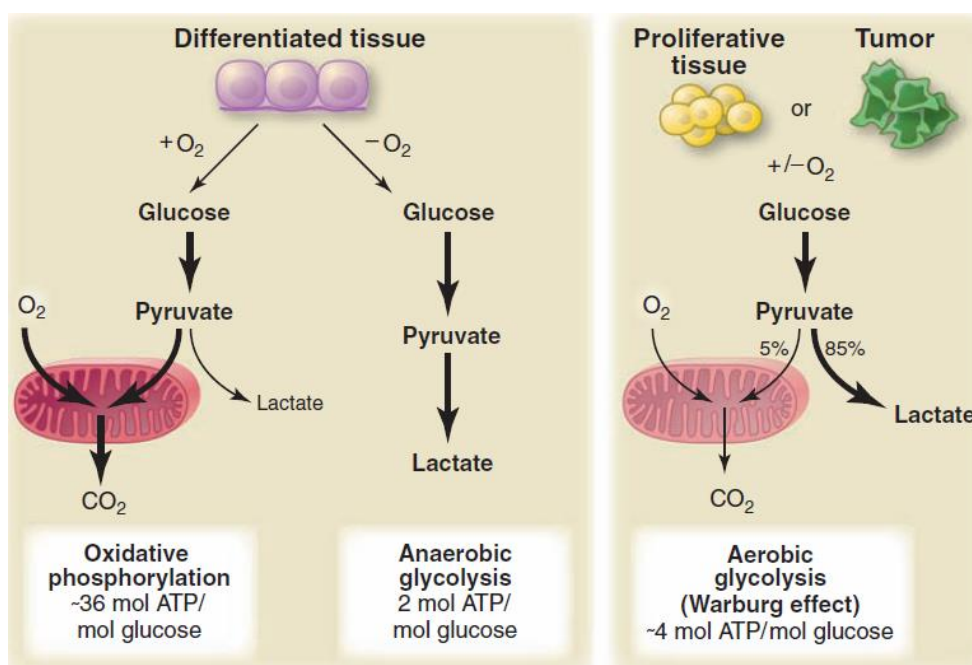


Figura 1 – Representação esquemática das diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbia e glicólise aeróbica (efeito Warburg). Na presença de oxigênio, tecidos não proliferativos (diferenciados), primeiramente metabolizam a glicose à piruvato o que é completamente oxidado à CO₂ durante o processo de

fosforilação oxidativa. Devido ao fato de que o oxigênio é o aceptor final da cadeia de transporte de elétrons, o O_2 é essencial para este processo. Quando o oxigênio é escasso, células podem redirecionar o piruvato gerado para a formação de lactato (glicólise anaeróbica). Essa geração de lactato durante a glicólise anaeróbica permite que a glicólise continue acontecendo dado que permite a ciclagem de NADH para NAD^+ , mas resulta em uma produção de ATP mínima quando comparada a produzida pela fosforilação oxidativa. Warburg observou que células tumorais tendem a converter muito da glicose a lactato mesmo na presença de oxigênio. Essa propriedade é compartilhada por tecidos normais proliferativos. A mitocôndria permanece funcional e alguma fosforilação oxidativa continua acontecendo em ambos, tecidos proliferativos e tumorais ⁽⁷⁾.

O efeito Warburg é atualmente explorado em análises clínicas através do uso da técnica F^{18} -*deoxyglucose Positron Emission Tomography* (FDG-PET) para a visualização de tumores com captação de glicose aumentada. A captação aumentada de glicose detectada pela técnica FDG-PET se correlaciona com um prognóstico ruim e alto potencial metabólico em vários tipos de tumor ⁽⁵⁾⁽⁷⁾.

Com as descobertas de Warburg, acreditava-se anteriormente que a preferência observada por células tumorais em realizar a glicólise aeróbica fosse devido a mutações inativadoras de genes das enzimas da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. A explicação atual é de que a alta taxa glicolítica proporciona diversas vantagens para as células. Se o fluxo glicolítico é alto o suficiente, como acontece no processo canceroso, o consumo da glicose para a produção de ATP, mesmo possuindo um baixo rendimento por molécula de glicose, resulta em uma porcentagem final de ATP que pode exceder à produzida pela fosforilação oxidativa ⁽¹⁾. Somado a isto, as células em estado de proliferação, e especialmente as células tumorais, dependem fortemente da disponibilidade de precursores metabólicos para a síntese das macromoléculas celulares (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos). A via glicolítica fornece diretamente intermediários para a síntese de lipídeos e do açúcar ribose dos nucleotídeos (Figura. 2).

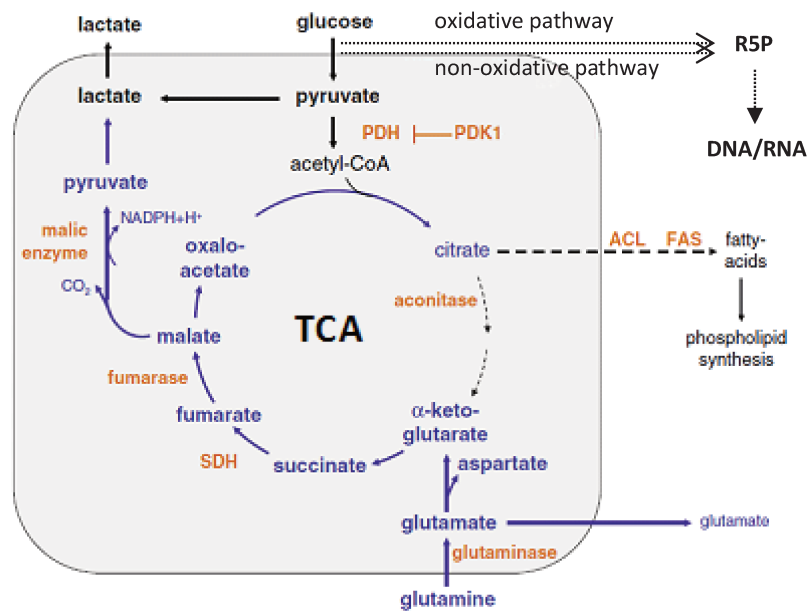


Figura 2 - Células tumorais obtêm os precursores biosintéticos a partir do metabolismo da glicose e glutamina. A glicose e a glutamina são os dois nutrientes mais abundantes no meio extracelular e fornecem carbono para a síntese de ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. A biosíntese de purina e pirimidina utiliza *ribose 5-phosphate* (R5P) produzida pelos braços oxidativos e não-oxidativos da via ribose fosfato, e aminoácidos como aspartato e alanina, derivados da glicose e glutamina. A síntese de ácidos graxos, necessária para a produção de lipídeos, requer *acetyl-CoA* (Ac-CoA) gerado a partir do citrato exportado da mitocôndria. A síntese de proteínas requer aminoácidos, tRNAs e ribossomos, sendo que ambas glicose e glutamina são usados para gerar estas moléculas. Glutamina também doa nitrogênio para nucleotídeos e para a síntese de aminoácidos. Adaptado de Vizán *et al.*, 2008 ⁽³⁶⁾. PDH, *pyruvate dehydrogenase*; PDK1, *pyruvate dehydrogenase kinase 1*; ACL, *ATP citrate lyase*; FAS, *fatty acid synthase*; SDH, *succinate dehydrogenase*.

Desta maneira, o efeito Warburg beneficiaria tanto a necessidade bioenergética quanto biossintética das células. Além disso, em contraste com a respiração mitocondrial, a geração de energia pela via glicolítica ocorre independentemente da oferta de oxigênio e permite às células sobreviverem e migrarem para áreas hipóxicas (com baixo teor de oxigênio), um fato diferencial pra o crescimento do tumor. A observação de que células derivadas de tumores hipóxicos cultivadas em condições de normóxia ainda mantêm o fenótipo glicolítico indica que a força dirigente do aumento da glicólise não é uma simples adaptação às condições de falta de oxigênio e que, ao contrário, mecanismos genéticos estabilizados promovem a ativação glicolítica dentro dos tumores ⁽¹⁾⁽⁵⁾.

Muitos oncogenes têm sido implicados no efeito Warburg, dentre eles pode-se citar Akt, que codifica uma proteína serina-treonina quinase envolvida no aumento da captação de glicose e na glicólise aeróbica de maneira independente de HIF1- α (*Hypoxia-inducible*

factor 1)⁽²³⁾. Akt mobiliza os transportadores de glicose para a superfície celular aumentando a captação de glicose e a ativação de hexoquinase 2 (Hk2, *hexokinase 2*), levando à um aumento do fluxo glicolítico sem afetar a fosforilação oxidativa mitocondrial. O fator de transcrição HIF-1 regula o metabolismo de glicose em resposta a hipóxia e fatores de crescimento. A diminuição do oxigênio celular estimula as células a consumir glicose e produzir lactato uma vez que transportadores de glicose, enzimas glicolíticas e LDH-A são alvos da HIF-1^{(37) (38)}. O oncogene MYC também desempenha papel fundamental na glicólise aeróbica, sendo responsável por ativar diversos genes envolvidos no metabolismo glicolítico como Hk2, enolase e LDH-A⁽³⁹⁾ (Figura 3).

Genes que codificam supressores de tumor também apresentam papel essencial na redução do efeito Warburg. Exemplos disso são LKB1/AMPK e p53 que diminuem o fluxo metabólico glicolítico em resposta ao estresse celular. AMPK inibe diretamente a fosfofrutoquinase impedindo a catálise de frutose 6-fosfato à frutose bifosfato (Figura 3)⁽⁷⁾.

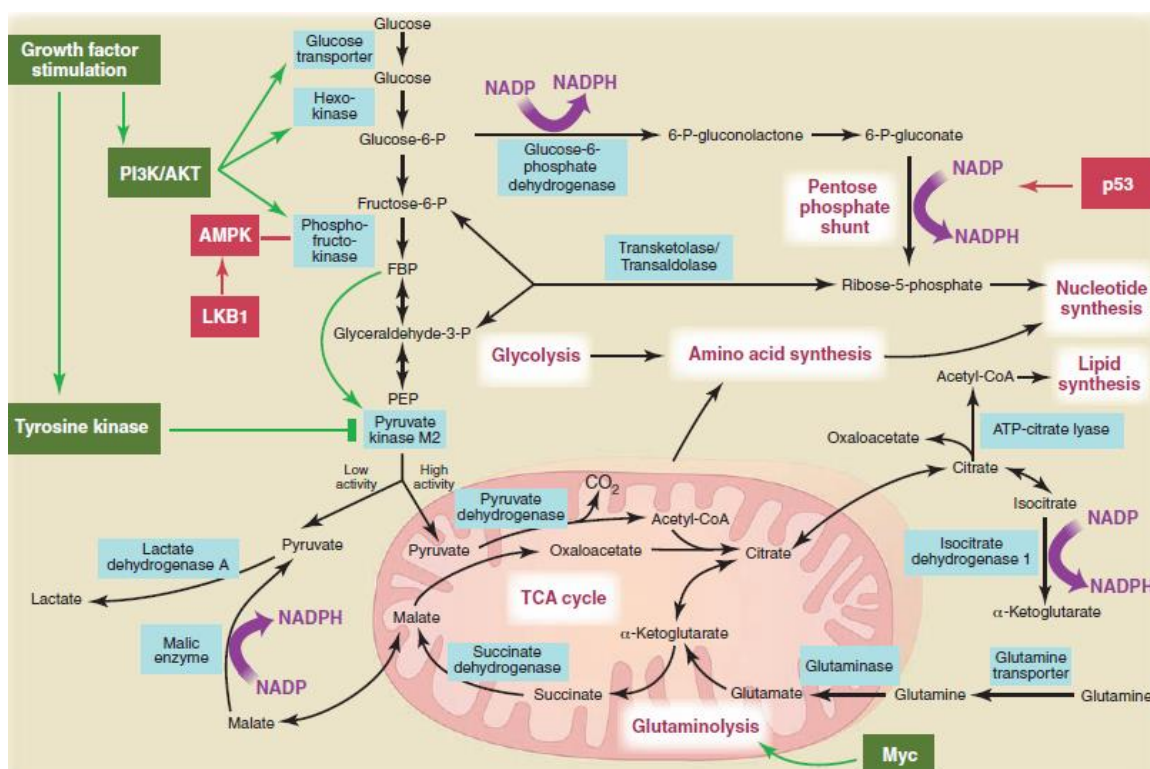


Figura 3 – Vias metabólicas controladas por vias de tradução de sinais. Vias metabólicas ativas nas células em proliferação são diretamente controladas por vias de sinalização envolvendo oncogenes e supressor de tumores. Este esquema mostra a nossa atual compreensão de como glicólise, fosforilação oxidativa, a via das pentoses fosfato e metabolismo de glutamina são interligados nas células em proliferação. Esta rede metabólica permite tanto a produção de NADPH e o fluxo de *acetyl – Coenzima A* para o citosol para biossíntese de lipídeos. Principais passos nestas vias metabólicas podem ser influenciadas pelas vias de

sinalização que se sabe serem importantes para a proliferação celular. A ativação dos receptores de membrana por fatores de crescimento leva a ativação da via da PI3K. Via Akt, a ativação de PI3K estimula a captação de glicose e fluxo através da glicólise. Myc impulsiona o metabolismo de glutamina, que também apoia a produção de NADPH. A sinalização por LKB1/AMPK e p53 diminui o fluxo metabólico através da glicólise em resposta ao stress celular. Diminuição do fluxo glicolítico em resposta a LKB / AMPK ou p53 pode ser uma resposta adaptativa para desligar o metabolismo proliferativo durante os períodos de baixa disponibilidade de energia ou estresse oxidativo. Supressores de tumor são mostrados em vermelho, e oncogenes estão em verde. Principais vias metabólicas são rotulados em roxo com caixas brancas, e as enzimas que controlam etapas críticas nessas vias são mostrados em azul. Algumas destas enzimas são candidatos como novos alvos terapêuticos no câncer ⁽⁷⁾.

2.2. O CICLO DO TCA E GLUTAMINÓLISE

Para sintetizar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, as células também usam precursores do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 4). Desta maneira, o papel chave do ciclo TCA nas células em proliferação é o de agir como uma fonte de metabólitos para a biossíntese. Isto representa uma diferença importante em relação ao metabolismo não proliferativo de tecidos oxidativos, como o cardíaco por exemplo, onde a principal função do TCA é a de servir para extração máxima de ATP a partir de substratos oxidáveis. Durante a proliferação celular, muito do carbono que entra o ciclo TCA é usado em vias biossintéticas que consomem, ao contrário de produzir ATP. O resultado é o contínuo efluxo de intermediários metabólicos (cataplerose) ⁽¹⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

A glicose metabolizada que entra no ciclo TCA dentro da mitocôndria na forma de piruvato é convertida a acetil-Coenzima A, e então em citrato. O citrato é transportado para fora da mitocôndria e, no citosol, convertido à oxaloacetato (OAA, *Oxaloacetate acid*) e acetil-Coenzima A (*Acetyl coenzyme A*) (precursor lipogênico) (Figura 4). A exportação de citrato para a síntese lipídica tem impacto sobre a função geral do ciclo resultando o que é chamado de ciclo “truncado”, devido à diminuição da quantidade relativa da fração de citrato mitocondrial que é oxidada ⁽⁷⁾. Outros intermediários do ciclo do TCA também são usados para a biossíntese de diferentes macromoléculas: OAA e α -cetoglutarato suplementam o *pool* de aminoácidos não essenciais que serão usados para a síntese de proteínas e nucleotídeos, contribuindo para o fenômeno de cataplerose.

De maneira a sustentar o funcionamento do ciclo TCA em face à cataplerose, as células precisam lançar de mão de um influxo de metabólitos intermediários para suplementar os intermediários extraídos do ciclo, fenômeno conhecido como anaplerose. Uma fonte importante de anaplerose é o metabolismo de aminoácidos, particularmente o da

glutamina, o aminoácido mais abundante no soro de mamíferos. As células podem oxidar a glutamina parcialmente de uma maneira análoga à oxidação parcial da glicose através da glicólise aeróbica. Esta via, conhecida como glutaminólise, usa diversos passos do ciclo TCA, e torna a glutamina uma fonte também energética para as células proliferativas ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾. Além disso, há a formação de glutamato e aspartato, os quais, junto com a glutamina por si, são precursores de ácido nucléico e serina. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear na presença de substratos marcados com C¹³ tem revelado o uso da glutamina como o principal precursor anaplerótico em células proliferativas de glioma ⁽⁸⁾. A superexpressão de Myc na linhagem celular de glioma SF188 levou a um processo de reprogramação genética que culminou com a expressão de genes relacionados com o catabolismo de glutamina e tornou as células dependentes deste nutriente ⁽⁴⁰⁾. Outro grupo mostrou que células com uma mutação em específico para isocitrato desidrogenase 1, comumente encontrada em gliomas e leucemia aguda mielogênica, e que torna a enzima incapaz de gerar α -cetoglutarato a partir de isocitrato, são particularmente sensíveis ao *knockdown* ou inibição, pelo composto BPTES (*Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide*), da enzima glutaminase ⁽⁴¹⁾.

Células metabolicamente ativas são constantemente expostas aos subprodutos da respiração mitocondrial, notavelmente as espécies reativas de oxigênio. O metabolismo da glutamina também possui como função o tamponamento das células contra os danos oxidativos por meio da doação de carbono e nitrogênio para a formação de glutathione, o principal antioxidante celular. Além disso, o metabolismo da glutamina gera o NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form*) necessário na manutenção da glutathione em seu estado reduzido, num mecanismo que envolve o fluxo do carbono derivado da glutamina, através da enzima málica na conversão de NADP⁺ (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) em NADPH ⁽⁴²⁾. Tomados em conjunto, estas observações sugerem que o metabolismo da glutamina permite às células proliferativas manter um fluxo anaplerótico compatível com o uso dos intermediários metabólicos do ciclo TCA como precursores biossintéticos, sendo também importante para o balanço redox celular.

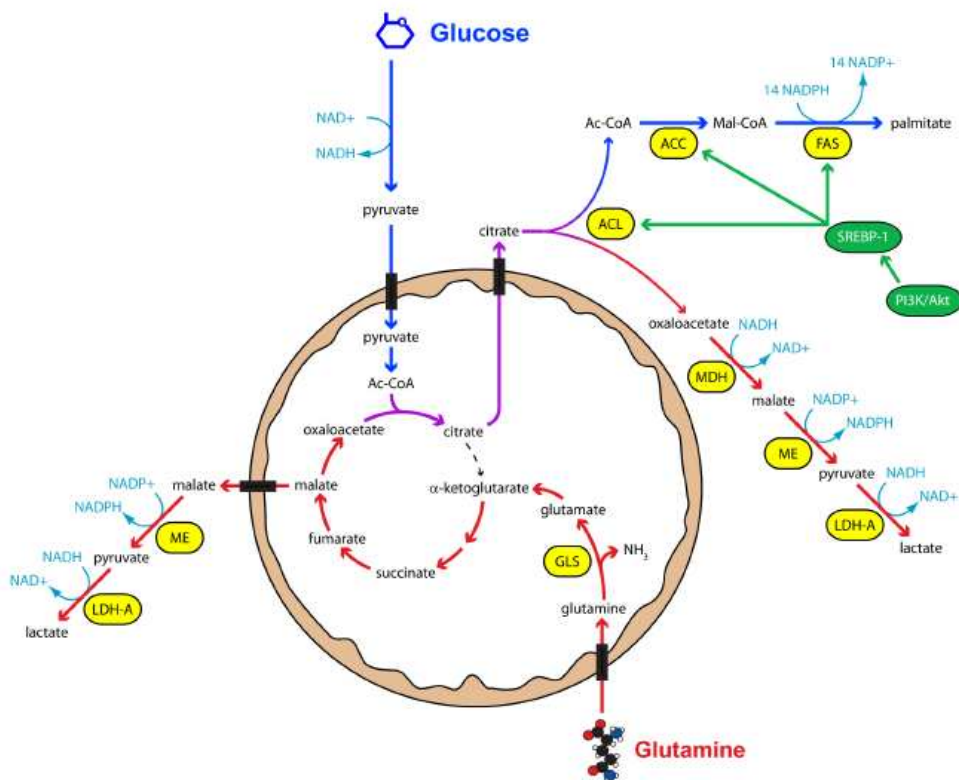


Figura 4 – Via glutaminolítica. A glicose proporciona às células uma fonte de *Acetyl - CoA* para a síntese dos ácidos graxos (setas azuis), que é aumentada em tumores devido a expressão induzida por oncogenes das enzimas lipogênicas, *ATP - citrate lyase* (ACL), *acetyl - Coenzima A carboxylase - 1* (ACC) e *fatty acid synthase* (FAS). No entanto, exportação contínua de citrato gera um déficit para o ciclo TCA, e este deve ser substituído por um fluxo anaplerótico para que ocorra a síntese dos ácidos graxos e o crescimento celular. O metabolismo de glutamina (setas vermelhas) oferece um “pool” de oxaloacetato mitocondrial para a síntese contínua de citrato. Após clivagem de citrato por ACL no citoplasma, o oxaloacetato resultante pode ser convertido em malato, piruvato e, finalmente, a lactato pela alta relação NAD⁺ / NADH criada pela rápida glicólise. A glutamina pode também ser convertida em lactato se o malato mitocondrial é exportado para o citoplasma e descarboxilado pela enzima málica (ME). Esta via parece ser uma importante fonte de NADPH para a síntese de ácidos graxos e outras biomoléculas em células tumorais. abreviações: Ac-CoA, *acetyl - Coenzima A*; Mal- CoA, *malonyl - Coenzima A*; MDH, *malate -dehydrogenase*; LDH - A, *lactate dehydrogenase - A*, GLS, *glutaminase*, SREBP - 1, *Sterol regulatory element-binding protein-1* ⁽⁵⁾.

Recentes estudos têm revelado que mutações em genes que codificam enzimas metabólicas, em especial enzimas do ciclo do TCA, são capazes de tornar tais enzimas potenciais oncogenes. Exemplos disso são recorrentes mutações somáticas em quatro genes envolvidos no metabolismo do citrato mitocondrial que causam ou predisõem as células à malignidade. Yan e colegas reportam que 70% ou mais dos gliomas de baixo grau compartilham mutações em duas ou mais isoformas da isocitrato desidrogenase (IDH1 e IDH2) (IDH, *Isocitrate dehydrogenase*) dependente de NAD⁺ ⁽⁴³⁾. Em um outro estudo foi reportado que mutações em fumarato hidratase levam ao desenvolvimento de leiomioma e

leiomioma⁽⁴⁴⁾. Foi relatado em trabalho similar, que mutações em fumarato hidratase e succinato desidrogenase em certos tipos de câncer são recessivas e levam à redução ou eliminação da função enzimática das referidas enzimas tendo por consequência ao acúmulo de citrato e succinato. O acúmulo destes metabólitos promove à inibição da prolina hidroxilase que suprime a função de HIF-1 o que acelera angiogênese e glicólise nas células tumorais. Este mesmo trabalho ainda reporta que as deficiências em IDH1, IDH2 ou ambos podem também estabilizar HIF-1. Além de oxigênio, prolina hidroxilases que suprimem a HIF-1 requerem α -cetoglutarato como substratos. Recentes evidências genéticas mostram que pacientes com deficiência em isocitrato desidrogenase mitocondrial dependente de NAD^+ (IDH3), mas que possuem IDH1 ou IDH2 funcionais apresentam acúmulo de α -cetoglutarato, indicando que estas enzimas podem ser as principais produtoras deste metabólito. Assim, tecidos apresentando inativação de IDH3 podem promover o acúmulo de HIF-1 como um resultado de níveis mais baixos de α -cetoglutarato citosólico⁽⁴⁵⁾. Outro grupo mostrou que enquanto a IDH1 e 2 selvagens interconvertem α -cetoglutarato a isocitrato, mutações nessas isoformas enzimáticas podem resultar numa atividade neomórfica que catalisa a conversão de α -cetoglutarato em 2-hidroxiglutarato (2-HG, 2-*hidroxiglutarate*), uma molécula descrita como um oncometabólito por sua capacidade de induzir alterações metabólicas semelhantes às que estão associadas com mutações em IDH⁽⁴⁶⁾.

2-HG atua inibindo certas enzimas dependentes de α -cetoglutarato, incluindo o histona demetilase que contém o domínio “*Jumonji-C*” e proteínas da família TET que participam da demetilação do DNA. Glutamina é a principal fonte de α -cetoglutarato usado por IDH mutante para produzir 2-HG. A inibição de glutaminase de fato leva a redução da proliferação em glioblastomas expressando IDH mutante^{(42) (47)}. Um benefício potencial da identificação de mutações em enzimas metabólicas que são patogênicas em certos tipos de câncer podem sugerir potenciais ferramentas terapêuticas menos tóxicas que as existentes⁽⁴⁸⁾.

2.3. GLUTAMINASES

Mamíferos contêm dois genes distintos, mas estruturalmente relacionados, que codificam para pelo menos três diferentes isoenzimas de glutaminases. O gene GLS1 codifica para duas isoformas produzidas por *splicing* alternativo, denominadas KGA e GAC, as quais diferem somente pela região C-terminal (4% idêntico), logo após o domínio catalítico ^{(10) (12)}. KGA apresenta os éxons 1-14/16-19, do gene GLS1, sendo expressa de maneira constitutiva na maioria dos tecidos, com exceção do fígado ^{(49) (9)}. Já GAC, é codificada pelos éxons 1-15, sendo comumente encontrada em coração, pâncreas, rim e pulmão ⁽⁹⁾. O gene GLS2, presente no cromossomo 12, consiste em 18 éxons e codifica para a enzima LGA. Originalmente identificada no fígado, LGA também é encontrada em tecidos cerebrais e no pâncreas ^{(10) (50) (51)} (Figura 5).

Estudos conduzidos em nosso laboratório têm revelado que a isoforma GAC é mais responsiva que a KGA e LGA à ativação por fosfato inorgânico ⁽¹¹⁾. Mais, somente a GAC foi encontrada exclusivamente na mitocôndria de células cultivadas (tumerais e não transformadas) após estudos de fracionamento celular seguido de *imunoblot* com anticorpos específicos, levantando a hipótese de que a KGA possa ter funções diversas nas células ⁽¹¹⁾. O gene GLS2, por sua vez, codifica para a isoenzima LGA ⁽¹²⁾, e está suprimido em tumores com perda de função para o regulador transcricional p53 ^{(13) (14)}. Outro trabalho publicado recentemente por nosso grupo mostra que a atividade enzimática dependente de fosfato da GAC, que a torna a isoforma de glutaminase com a maior eficiência catalítica *in vitro*, está intimamente relacionada à capacidade da GAC em formar um oligômero em formato de dupla hélice e constituído de sete cópias de tetrâmeros por volta interagindo entre si pela região N-terminal. Mais, determinamos que o *loop* L₃₂₁RFNKL₃₂₆ é um dos principais elementos regulatórios da auto-montagem e ativação enzimática. A habilidade de formação destes oligômeros está intrinsecamente relacionada à eficiência catalítica das glutaminases *in vitro*, sendo a GAC a isoforma capaz de formar os filamentos maiores, seguida de KGA e de LGA ⁽⁴⁹⁾.

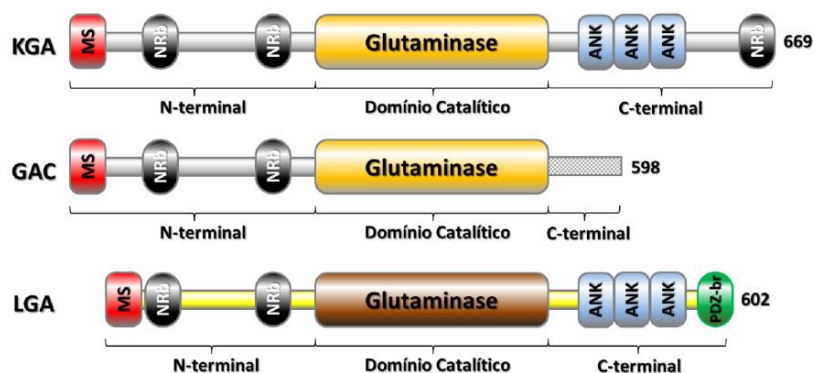


Figura 5 – Representação das isoenzimas LGA e KGA e de sua isoforma, GAC. Em laranja e marrom encontram-se os domínios catalíticos. Em vermelho está representada a região traduzida pelo éxon 1 que é processada após a entrada da enzima na mitocôndria. Em azul, os domínios do tipo *ankyrin repeat* detectados por alinhamento de estrutura secundária (dados não mostrados). **PDZ-br** (PDZ-binding-region), em verde, denota o domínio de interação com proteínas com regiões PDZ. **NRb**, em preto, são regiões com o peptídeo conservado LXXLL (L = leucina; X = aminoácido qualquer), normalmente encontrado em proteínas co-ativadoras de receptores nucleares. Os números 669, 598 e 602 indicam a quantidade de resíduos da KGA, GAC e LGA, respectivamente. **MS**, *mitochondrial signaling sequence*, **ANK**, *ankyrin repeat*.⁽¹⁰⁾

Apesar de serem genes distintos, as principais diferenças entre as sequências de nucleotídeos que codificam para as isoenzimas KGA e LGA encontram-se somente no éxon inicial e nos que procedem ao sítio catalítico, 16 ao 19 em KGA, e 16 ao 18 em LGA. O éxon 1 compartilha 62.5% de identidade entre os dois genes e codifica para 129 resíduos em KGA, enquanto que somente 61 resíduos para LGA. A sequência codificada contém os sinais envolvidos para o direcionamento das proteínas para a mitocôndria. A porção C-terminal, logo após o sítio catalítico apresenta 62% de identidade entre as isoenzimas KGA e LGA. Uma porção desta região na proteína humana da LGA foi recentemente envolvida no reconhecimento de proteínas com domínio PDZ (PSD95/Dlg/ZO1), comumente encontradas no cérebro (Figura 5)⁽³³⁾. Uma proteína em específico, a GIP-1 (*Gutaminase interacting protein 1*), funciona como *scaffold* da LGA e foi proposta ser responsável por direcioná-la para múltiplas localizações subcelulares tais como a membrana, núcleo e mitocôndria⁽⁵²⁾.

Análises de bioinformática detectaram domínios do tipo *ankyrin* (ANK) no C-terminal das sequências da KGA e LGA. Os domínios do tipo ANK possuem tipicamente 33 resíduos formando um *motif* em forma de L, que contém duas hélices α antiparalelas conectadas por um *loop* curto. Estes domínios mediam contatos interprotéicos em várias famílias de proteínas tais como as de membrana e citoesqueleto, reguladores

transcricionais, toxinas e inibidores de CDK (*cyclin-dependent kinase*)⁽⁵³⁾ levantando a possibilidade destas duas isoenzimas estarem envolvidas em contatos proteína-proteína. Outra observação interessante é de que as três proteínas possuem pelo menos duas sequências consenso do tipo LXXLL, também chamada de NRbox (*Nuclear Receptor box*) (Figura 5), o que levanta a hipótese de que estes segmentos possam estar envolvidos na associação das glutaminases com receptores nucleares, uma vez que a isoenzima LGA, assim como a KGA, já foram detectadas no núcleo⁽⁵⁴⁾ e possuem sua expressão aumentada por glucocorticóides (hormônio que ativa o receptor de glucocorticóide – GR – *glucocorticoid receptor*)⁽⁵⁵⁾ ⁽⁵⁶⁾. Estudos recentes do laboratório mostraram, por *western blot* de frações subcelulares, que a KGA está presente também no citoplasma⁽¹¹⁾.

2.4. VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E METABOLISMO

Células normais adultas de mamíferos não proliferam de maneira independente, ao contrário, entram no ciclo celular somente quando são instruídas a fazê-lo através da ação de fatores de crescimento. Os fatores de crescimento, por sua vez, estimulam vias de sinalização intracelulares, impactando na expressão gênica e fisiologia celular. Uma vez que a proliferação celular depende das atividades metabólicas responsáveis por garantir os processos biossintéticos que aumentam a biomassa celular, não é surpreendente que vias de sinalização celular estimuladas por fatores de crescimento tenham impacto também na regulação metabólica. Visões tradicionais do metabolismo de intermediários sustentam que a atividade metabólica é em grande parte regulada através de efeito alostérico de metabólitos sobre enzimas, o que dá à via uma capacidade autoregulatória. Entretanto, mesmo que muito destes mecanismos estejam de fato atuando nas células proliferativas, estudos envolvendo a sinalização celular tem revelado como estas vias afetam os fluxos metabólicos. Como exemplo, durante a proliferação de linfócitos e células tumorais a sinalização por fatores de crescimento suprime a β -oxidação de ácidos graxos, maximizando o acúmulo de lipídeos⁽⁵⁷⁾.

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é altamente conservada e empregada pelas células para a resposta à fatores de crescimento (Figura 6)⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁶⁾. A ligação do fator de crescimento ao seu receptor de superfície leva à ativação da PI3K, resultando na fosforilação dos lipídeos fosfatidilinositol da membrana plasmática. Esta ação leva ao

recrutamento e ativação de efetores que vão atuar na cascata de sinalização, em particular a serina/treonina quinase Akt e mTOR. A ativação desta via suporta a biosíntese através do aumento da expressão de transportadores de nutrientes tais como glicose e aminoácidos ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾. Além disto, através de efeitos na atividade enzimática da hexoquinase e fosfofrutoquinase, Akt aumenta o fluxo glicolítico e a produção de lactato, sendo suficiente pra induzir o efeito Warburg em células não transformadas ou cancerosas ⁽²¹⁾ ⁽²²⁾, além do aumento da síntese de macromoléculas. Já foi extensivamente mostrado que PI3K e Akt estimulam a expressão de genes lipogênicos e glicolíticos ⁽²³⁾ ⁽²⁴⁾. Em células normais a ativação da via PI3K/Akt/mTOR é controlada pela desfosforilação das espécies de fosfatidilinositol pela fosfatase PTEN (Figuras 6 e 7). Mutações que promovem a ativação constitutiva da PI3K, desativam a PTEN ou estimulam/amplificam os receptores de membrana e juntas, constituem uma das mais expressivas classes de mutações em tumores humanos ⁽¹⁾. Recentemente, mostrou-se que camundongos com superexpressão de PTEN apresentavam notável redução no número de células, redução do peso corporal e redução da expressão de c-Myc ⁽⁵⁸⁾. Por trás deste fenômeno estava o controle exercido pela via na estimulação da expressão das enzimas glicolíticas (sabidamente superexpressas em células tumorais) PKM2 (*Piruvate kinase isoform M2*) e PFKFB3 (*6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase isoform 3*) e da isoforma KGA da enzima glutaminase, através de um mecanismo de bloqueio da degradação proteossômica induzido pela proteína *E3 ubiquitin ligase anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1* (APC/Cdh1) ⁽⁵⁸⁾. Esta função de PTEN é dependente de sua habilidade de diretamente promover o agrupamento do complexo APC/C-Cdh1 e independente de sua capacidade de inibir a via da PI3K.

compreende mTOR, Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*Mammalian stress-activated protein kinase-interaction protein*), PRR5 (*Proline rich 5 (renal)*), Deptor, tti1/tel 2 e mLST8 e é responsável pela fosforilação de várias quinases do tipo AGC (*Protein kinase A, G, and C families*), como Akt e SGK1 (*Serum/glucocorticoid kinase 1*) em resposta a fatores de crescimento ⁽⁶²⁾. Ambos os complexos mTOR compartilham a subunidade catalítica mLST8 e Deptor. Em contraste, Raptor e Pras40 são específicas de mTORC1, enquanto Rictor, e PRR5 são específicas de mTORC2 ⁽⁶³⁾ (Figura 7).

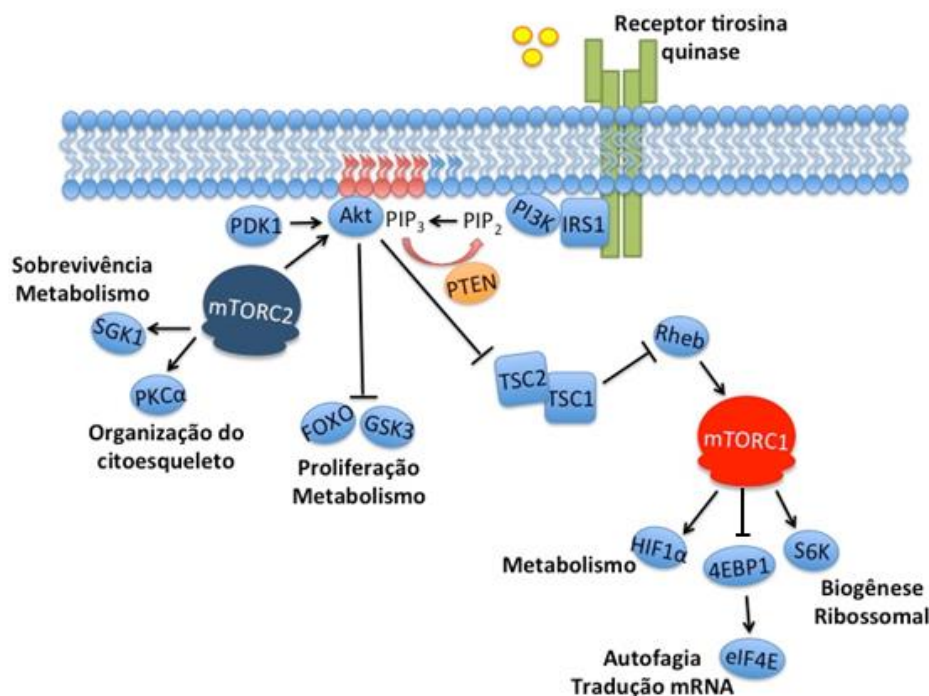


Figura 7 - A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. O estímulo das células com fatores de crescimento inicia a conversão de PIP₂ (azul) no segundo mensageiro lipídico PIP₃ (vermelho) catalizada pela PI3K. PIP₃ recruta a Akt para a superfície interna da membrana plasmática, onde é fosforilada e ativada pela PDK1 e mTORC2. Em oposição à Akt, a fosfatase PTEN converte PIP₃ em PIP₂, desligando o sinal proveniente da PI3K. A Akt fosforila e inativa as proteínas FoxO1/3a e GSK3β. A Akt fosforila e inativa ainda o complexo TSC1/2, uma GAP que controla a GTPase Rheb. Sob ação de TSC1/2 Rheb hidroliza o GTP em GDP e não mais interage e ativa o mTORC1. Quando ativa, o mTORC1 promove a síntese proteica através da fosforilação direta da 4EBP-1, liberando o fator traducional eIF4E, e da S6K. mTORC1 controla o metabolismo e o fluxo glicolítico através da ativação do fator transcricional eIF4E, e da S6K. mTORC1 controla o metabolismo e o fluxo glicolítico através da ativação do fator transcricional eIF4E, e da S6K. mTORC2 é ativado por fatores de crescimento e regula diversas quinases AGC (Akt, SGK1 e PKC), exercendo um papel chave no controle da sobrevivência celular, metabolismo e organização do citoesqueleto. 4EBP-1, *eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1*; FoxO1/3a, *forkhead box O1/3a*; GAP, *GTPase activating protein*; GSK3β, *glycogen synthase kinase 3*; HIF1α, *hypoxia induced factor 1α*; mTORC, *mechanistic target of rapamycin complex*; S6K, *S6 kinase*; PI3K, *phosphoinositide-3-kinase*; PIP₂, *phosphoinositide-4,5-bisphosphate*; PIP₃, *phosphoinositide-3,4,5-triphosphate*; PKC, *kinase protein C*; PTEN, *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*; Rheb, *Ras-homolog enriched in brain*; TSC, *tuberous sclerosis complex*. Figura cedida pela D^{ra} Marília Meira Dias.

O heterodímero TSC1/TSC2 é um regulador chave *upstream* de mTORC1, que funciona como uma GAP (*GTPase activating protein*) para Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) GTPase. Quando Rheb está associada a GTP, ocorre uma interação direta com mTORC1 que fortemente estimula sua atividade de quinase. Como GAP de Rheb, TSC1/2 negativamente regula mTORC1 por converter Rheb em sua forma inativa ligada a GDP ⁽⁶⁴⁾ ⁽⁶⁵⁾. A via da PI3K/Akt é responsável pela ativação indireta de mTORC1 por meio da ação de Akt em TSC1/2, que diretamente fosforila e inativa TSC1/2 ⁽⁶⁶⁾. Akt também é responsável pela ativação de mTORC1 independente de TSC1/2, por fosforilar e causar a dissociação de Pras40 de Raptor (Figura 7).

Rapamicina é um inibidor de mTORC1 que atua formando um complexo com a proteína intracelular FKBP12 (*12kDa – FK 506 Binding protein*). Desta maneira, interage e inibe mTOR quando esta é parte de mTORC1 mas não de mTORC2. A ligação de rapamicina-FKBP12 a mTOR impede estericamente a interação de Rheb, necessária à ativação do complexo e sua função de quinase ⁽⁶⁴⁾.

As Rag GTPases (*Ras-related GTPase*) ativam mTORC1 em resposta a aminoácidos. Rag A ou B interage com Rag C ou D para formar um heterodímero que está ancorado na superfície dos lisossomos ⁽⁶⁷⁾. Na ausência de aminoácidos, Rag A/B está carregada com GDP e Rag C/D com GTP, conformação incapaz de se ligar e ativar mTORC1. A adição de aminoácidos induz a mudança de GDP para GTP em Rag A/B e a conversão de GTP a GDP em Rag C/D permitindo ao heterodímero se ligar e recrutar mTORC1 ao lisossomo. Uma vez no lisossomo, mTORC1 é ativado pela interação direta com Rheb ⁽⁶⁷⁾ ⁽⁶⁸⁾ ⁽⁶⁹⁾ (Figura 8). Recentemente foi demonstrado que a glutaminólise medeia a translocação e ativação de mTORC1. O mesmo trabalho mostrou que a glutaminólise é responsável pelo carregamento de Rag B com GTP e que a ativação de mTORC1 por glutaminólise aumenta o tamanho celular e inibe autofagia, dois processos regulados por mTORC1 ⁽²⁶⁾. Outro trabalho mostrou que mTOR é capaz de sentir o estresse metabólico derivado da privação de glicose e glutamina em um mecanismo independente de Rag, AMPK e TSC2, visualizado pela redução da fosforilação de S6K em Thr389 ⁽²⁷⁾ e dependente do complexo TTT-RUVBL1/2. Tal mecanismo controla a localização lisossomal de mTOR e sua dimerização. Recentemente, foi também mostrado que mTOR

promove a anaplerose glutaminolítica por meio da ativação da Glutamato Desidrogenase (GDH), em um mecanismo que envolve a repressão transcricional de Sirt4, uma sirtuina mitocondrial que inibe GDH. Sirt4 (*Sirtuin 4*) regula negativamente a atividade de GDH controlando seu status de ADP-ribosilação. Mais especificamente nesse trabalho foi mostrado que, mTORC1 medeia a degradação proteossômica de CREB2 (*cAMP response element-binding protein 2*) impedindo que este fator de transcrição aumente os níveis intracelulares de Sirt4; desta maneira mTORC1 eleva a atividade de GDH ⁽²⁸⁾.

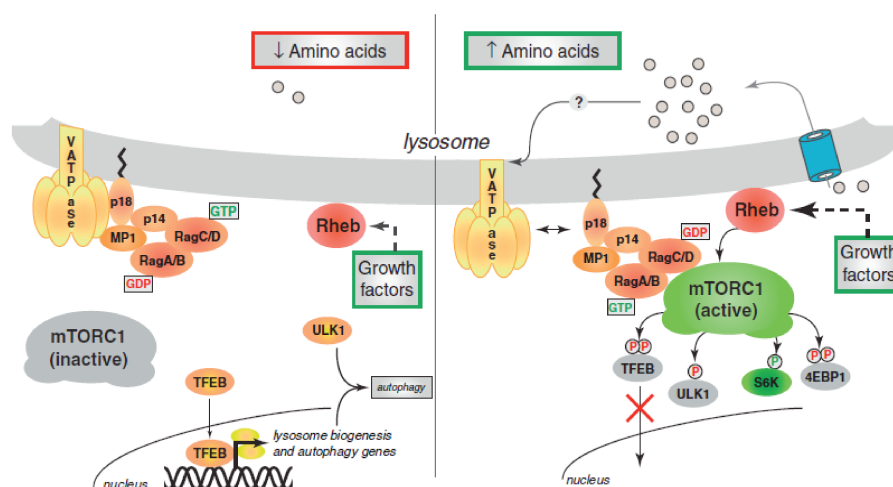


Figura 8 - Ativação lisossomal de mTORC1. Na ausência de aminoácidos, as Rags A/B e C/D encontram-se em sua conformação inativa: Rags A/B carregadas com GDP e Rags C/D carregadas com GTP. Desta maneira, não há o recrutamento e ativação de mTORC1. Na presença de aminoácidos, ocorre o carregamento das Rags A/B com GTP e a hidrólise de GTP a GDP nas Rags C/D, de maneira a levar ao recrutamento de mTOR para a superfície lisossomal. Com a ligação de Rheb ativada (gerada pela ação de fatores de crescimento) há a completa ativação do complexo e sinalização para crescimento e proliferação celular ⁽⁶⁹⁾

A proteína quinase AMP-ativada é uma proteína heterotrimérica altamente conservada que desempenha um papel central na regulação da bioenergética e homeostase celular ⁽²⁶⁾. Em situações de níveis aumentados de AMP:ATP, como a desencadeada pela privação de nutrientes ou hipóxia, AMPK fosforila o complexo TSC1-TSC2, de uma forma LKB1-dependente, para promover a inibição de mTOR e da biossíntese de lipídios pela acetil-Coenzima A carboxilase ⁽²⁷⁾. A inibição da mTOR em situações de hipóxia possui efeito protetor para células tumorais ⁽⁶⁹⁾ ⁽⁵⁸⁾, sendo predito ter impacto na restauração do balanço de energia através da inibição da síntese protéica. Recentemente, foi mostrado que AMPK negativamente regula a glicólise aeróbica (efeito Warburg) em células tumorais e suprime o crescimento do tumor *in vivo*. O mesmo trabalho mostra que o *knockout* da

subunidade α (subunidade catalítica de AMPK) acelera a linfomagenese induzida por Myc e que a inativação de AMPK α em células transformadas e não transformadas promove uma mudança metabólica para a glicólise aeróbica aumentando a alocação do carbono glicolítico em lipídeos e acúmulo de biomassa ⁽⁷⁰⁾. Outra publicação recente mostrou que diversas linhagens dependentes de glutamina (por superexpressão de Myc por exemplo) são mais sensíveis ao tratamento com metformina, um conhecido ativador de AMPK ⁽⁷¹⁾.

A atividade metabólica que diferencia crescimento celular (aumento em biomassa celular) da proliferação é a duplicação do genoma, o qual requer da célula o total compromisso para a síntese de nucleotídeos. Esta via complexa requer a coordenação de vários fluxos diferentes que envolvem glicose, glutamina e vários outros aminoácidos não essenciais. A família de genes *myc* (*c-myc*, *l-myc*, *s-myc* e *n-myc*), os quais estão normalmente amplificados em processos tumorais, são fatores de transcrição que regulam crescimento e entrada no ciclo celular. Em células normais a estimulação por mitógenos é necessária para um aumento da expressão de *c-myc* na fase G1, facilitando a entrada das células na fase S através do estímulo da expressão de ciclinas e CDK4 ⁽⁷²⁾. *C-myc* também controla a expressão de enzimas glicolíticas e LDH-A ^{(31) (32)}, além de estar envolvido no metabolismo de nucleotídeos, extremamente necessário para a duplicação do genoma. Algumas células transformadas por *c-myc* mostraram possuir um forte requerimento por glutamina de maneira a se manterem viáveis, uma vez que a eliminação de glutamina do meio resulta na diminuição dos intermediários do ciclo TCA e leva a diminuição da proliferação celular ⁽³³⁾. Outro trabalho revelou que a presença de *c-myc* promove o aumento dos níveis protéicos da glutaminase, através de um mecanismo que envolve a supressão de miRNAs, os quais são reguladores negativos da expressão desta enzima via interação com região regulatória do mRNA ^{(73) (74)}. O que não fica claro deste trabalho é qual das duas isoformas do gene *GLS1* é controlado por este miRNA. Uma vez que a amplificação de *MYC* é documentada como sendo a responsável pela resistência terapêutica de inibidores da via da PI3K, há indícios de que Myc está *downstream* à via da PI3K/Akt/mTOR em tumorigênese ⁽⁷⁴⁾.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Células proliferativas são ávidas consumidoras de glutamina, um nutriente que além de ser um dos mais versáteis dentro do contexto do metabolismo energético e biossintético, tem sido também descrito como mediador de vias de sinalização em mamíferos ligadas a processos de tradução protéica. O consumo de glutamina é aumentado em células tumorais, estando isto conectado ao aumento da atividade de glutaminase nestas células. A ação desta enzima desempenha um papel chave em vários processos fisiológicos tais como amoniogênese nos rins, ureagênese no fígado e a síntese do neurotransmissor glutamato no cérebro. Além destas funções, conforme discutido acima, a glutaminase inicia o catabolismo da glutamina, um passo importante para o processo bioenergético e biossintético nas células, especialmente as tumorais. Esta gama de ações dentro da célula provavelmente está diretamente ligada à existência de pelo menos três isoenzimas/isoformas de glutaminases conhecidas, a LGA, KGA e GAC. O entendimento mais detalhado da atividade e regulação da enzima glutaminase e de sua relação com o processo maligno tem o potencial de desvendar importantes alvos de interferência e tratamento do câncer, especialmente em células transformadas onde o reabastecimento do ciclo TCA é fundamental para sua viabilidade.

Várias publicações recentes têm relacionado o metabolismo de glutamina com as vias de sinalização celular PI3K/Akt/mTOR, tendo sido extensivamente mostrado que a glutaminólise é um processo importante para a regulação e ativação de mTORC1. Em adição, mTOR é um conhecido regulador de várias vias biossintéticas, processo essencial para manutenção do estado celular proliferativo. Desta maneira nós hipotetizamos que mTOR pudesse regular a atividade das glutaminases. Somado a isso, AMPK já mostrou estar relacionada com o metabolismo de glutamina em células tumorais de próstata mas se AMPK age sobre as glutaminase, e como, não foi definido. **Nosso objetivo foi o de entender se as vias da PI3K/Akt/mTOR e a via da AMPK são reguladores da atividade de glutaminase.**

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Gerar linhagens de células tumorais com *knockdown* estável de PTEN e estudar o impacto da presença deste regulador na atividade, nível protéico e localização celular das isoformas KGA e GAC.
- Avaliar a ação de inibidores/estimuladores do complexo mTORC1 na atividade, nível protéico e localização celular das isoformas KGA e GAC, por meio do uso dos inibidores químicos rapamicina e wortmannin, *knockdown* estável de TSC2 e experimentos de privação de nutrientes e fatores de crescimento.
- Avaliar se a ação de mTOR nas glutaminases é isoforma específica (GAC ou KGA) via *knockdown* de GAC, KGA ou ambas.
- Realizar o *knockdown* de Rictor e avaliar a ação de mTORC2 na atividade e nível protéico das glutaminase.
- Avaliar a ação de AMPK com o uso de ativadores químicos na atividade e nível protéico de GAC e KGA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens de câncer de próstata humano PC-3 e a de câncer de mama MDA-MB231 foram cultivadas em meio RPMI (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Cultilab). As linhagens de câncer de próstata humano DU-145, fibroblastos de pulmão humano IMR90, fibroblastos embrionários de camundongos NIH3T3 e MEF p53 ^{-/-} e p53 ^{-/-} TSC2 ^{-/-} (gentilmente cedidas pelo Dr. David Sabatini, MIT, Massachusetts, EUA), foram cultivadas em meio DMEM/HAM F-12 suplementado com 10% de soro bovino fetal. A linhagem de fibroblasto humano BJ5TA foi cultivada em meio formado por uma parte de meio 199 e quatro partes de meio DMEM/HAM F-12 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,01 mg.mL⁻¹ de higromicina B. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Mutações ou alterações apresentadas pelas células utilizadas no presente trabalho nas proteínas das vias da PI3K/Akt/mTOR ou via da AMPK, estão listadas na tabela 5 (Apêndice 2).

A linhagem MDA-MB 231 foi a linhagem principal escolhida para estudar o efeito de mTOR sobre a atividade das glutaminases dado que essa linhagem de tumor de mama é altamente dependente de glutamina para seu crescimento (dados do laboratório não publicados e verificados por KUANG e colaboradores, 2011)⁽⁸⁸⁾.

4.2. CLONAGEM

A clonagem de sequência codificante para shRNA foi feita em vetor lentiviral pLKO.puro (Addgene). Os oligonucleotídeos para a construção dos shRNAs foram desenhados a partir de sequências depositadas na plataforma TRC (*The RNAi Consortium*) e contém, no sentido 5' – 3', as extremidades coesivas para as enzimas AgeI e EcoRI, região de reconhecimento do alvo, 6 nucleotídeos para a formação do “hairpin” e novamente a região de reconhecimento do alvo, complementar à anterior (Tabela 1). Os

oligonucleotídeos *sense* e *antisense* foram submetidos a uma reação de anelamento onde foram utilizados 1,25 μ moles de cada oligo, tampão NEB 2 (*New English Biolabs*) 1X e água, em um volume final de 50 μ L. A reação foi aquecida em termociclador a 95°C por 5 min e em seguida a 70°C por 10 min. Logo após, a reação foi mantida em recipiente contendo água a 70°C até que se atingisse a temperatura ambiente. Os oligonucleotídeos anelados foram subsequentemente ligados ao vetor pLKO previamente digerido com AgeI e EcoRI. Para a reação de ligação, foram utilizados 1 μ L do oligo anelado, 1 μ L de T4 DNAligase (400000 U.mL⁻¹) (NEB), 1 μ L de T4 polinucleotídeo quinase (10000 U.mL⁻¹) (NEB), 1 μ L do tampão de T4 DNAligase (NEB) 10X, 100 ng de pLKO digerido e água em um volume final de 10 μ L. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora e então utilizada na transformação de *Escherichia coli* termocompetentes previamente preparadas. Após a confirmação dos clones positivos, os mesmos foram submetidos ao empacotamento viral para a formação das partículas lentivirais infectivas, procedimento que foi realizado pelo laboratório LVV (Laboratório de Vetores Virais – LNBio). As partículas virais contendo os shRNAs foram tituladas e utilizadas na transdução de células (item 4.3).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos empregados nos experimentos de *knockdown*

Oligo	Sequência
shTSC2_139_fow	5'CCGGGGAGAAGTTTAAGATTCTGTTCTCGAGAACAGAATCTTAAACTTCTCC TTTTGG3'
shTSC2_139_rev	5'AATTCAAAAAAGGAGAAGTTTAAGATTCTGTTCTCGAGAACAGAATCTTAAACTTCTCC3'
shRictor_1_fow	5'CCGGCAGCCTTGAACCTGTTAACTCGAGTTAAACAGTTCAAGGCTGTTTTGG3'
shRictor_1_rev	5'AATTCAAAAAACAGCCTTGAACCTGTTAACTCGAGTTAAACAGTTCAAGGCTG3'
shGAC_fow	5'CCGGCCTCTGTTCTGTCTGAGAGTTCTCGAGAACTCTGACAGAACAGAGGTTTTGG3'
shGAC_rev	5'AATTCAAAAACTCTGTTCTGTCTGAGAGTTCTCGAGAACTCTGACAGAACAGAGG3'
shKGA_fow	5'CCGGACAGCGGGACTATGATTCTCTCGAGAGAATCATAGTCCCGCTGTTTTGG3'
shKGA_rev	5'AATTCAAAAAACAGCGGGACTATGATTCTCTCGAGAGAATCATAGTCCCGCTGT3'
shGAC/KGA_fow	5'CCGGCAACTGGCCAAATTCAGTCCTCGAGGACTGAATTTGGCCAGTTGTTTTGG3'
shGAC/KGA_rev	5'AATTCAAAAACAACTGGCCAAATTCAGTCCTCGAGGACTGAATTTGGCCAGTTG3'
shGFP_fow	5'CCGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCGAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGTGTTTTGG3'
shGFP_rev	5'AATTCAAAAAACAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCGAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG3'
shLuciferase_fow	5'CCGGCTTACGCTGAGTACTTCGACCTGACCCATCGAAGTACTCAGCGTAAG TTTTGG3'
shLuciferase_rev	5'AATTCAAAAAACTTACGCTGAGTACTTCGATGGGTCAGGTCGAAGTACTCAGCGTAAG3'

4.3. TITULAÇÃO VIRAL E TRANSDUÇÃO CELULAR

Para a titulação viral, 2×10^4 células NIH3T3 foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24 horas, o meio foi retirado e as células foram transduzidas pela adição de 1 mL de DMEM contendo $8\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polibreno (Sigma Aldrich) e 1 μL , 10 μL , 100 μL ou 1 mL de meio de cultura contendo partículas virais. Após 24 horas de transdução, o meio foi retirado e as células receberam meio DMEM contendo o antibiótico específico do plasmídeo utilizado no empacotamento viral. Após sete dias de seleção, ou até a formação de colônias, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (Bioclin). O número de colônias formadas multiplicado pelo fator 10^4 foi considerado o número de unidades formadoras de colônias por mL, ou UFC.mL⁻¹ (título viral).

Para a transdução de células, foram plaqueadas 5×10^5 células em placas de 6 poços e utilizado um MOI (*Multiplicity of infection*) de 0.3 de modo a não termos mais que uma

partícula viral por célula transduzida. Em um volume final de 1 mL de meio de cultura foram adicionados 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polibreno (Sigma Aldrich) e vírus. O meio contendo as partículas virais foi adicionado às células e mantido por 24 horas. Após este período o meio foi trocado e adicionado meio com o antibiótico específico do plasmídeo utilizado no empacotamento viral. Após sete dias de seleção, o *pool* de células transduzidas foi repicado para uma garrafa T75 (BD Falcon).

4.4. *KNOCKDOWN* ESTÁVEL DE PTEN, TSC2 E RICTOR

O *knockdown* de PTEN nas linhagens MDA-MB231, NIH3T3 e DU145 foi realizado pela transfecção das mesmas com um *pool* de plasmídeos contendo 19-25 nucleotídeo (mais região de *hairpin*) codificantes para shRNAs projetados para inativar expressão de PTEN (Santa Cruz Biotechnology), empregando-se Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Após 48 horas de transfecção, as células foram submetidas à seleção de colônias resistentes ao antibiótico puromicina (InvivoGen), utilizando-se 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, durante 7 dias. A concentração de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi estabelecida a partir de uma curva de morte feita com concentrações que variaram de 400ng.mL⁻¹ a 1600ng.mL⁻¹ de puromicina durante 7 dias. A concentração de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de causar a morte de 100% das células ao final de 7 dias. Clones positivos com expressão estável de shRNA contra PTEN foram confirmados por SDS-PAGE e *Western blot*. Clones estáveis expressando shRNA *scramble* A (Santa Cruz Biotechnology) também foram gerados seguindo a mesma metodologia acima descrita, e utilizados como controle negativo.

O *knockdown* de TSC2 nas linhagens MDA-MB-231 e BJ5TA e Rictor em MDA-MB231 foi feito pela transdução viral em procedimentos descritos nos itens 4.2 e 4.3. O *pool* de células positivas expressando os respectivos shRNAs foi confirmado por SDS-PAGE e *Western blot*. Também foi feita a seleção do *pool* celular expressando de maneira estável os controles negativos shRNA contra GFP e Luciferase (Tabela 1).

4.5. EXPERIMENTOS DE PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES E FATORES DE CRESCIMENTO

Para verificar quais os *inputs* eram necessários para a restauração da ativação de mTOR e da atividade de glutaminase, as células foram privadas de soro, glicose e glutamina por 12h. Após este período, dependendo do ensaio, as células foram estimuladas por 30 min com meio completo contendo 10% de soro fetal bovino, meio sem glicose e sem glutamina com 10% de soro fetal bovino, meio sem glicose e sem glutamina com 0,01mg.mL⁻¹ de insulina, meio com glicose, com glutamina e sem soro fetal bovino, meio com glicose, com glutamina e 0,01mg.mL⁻¹ de insulina e, como controle negativo, meio sem glicose, sem glutamina e sem soro fetal bovino. Após este período as células foram lisadas como descrito nos ítem 4.8 e 4.11 e os lisados celulares, após serem quantificados por Bradford (Biorad), foram utilizados em ensaios de dosagem da atividade de glutaminase e de *western blot*.

Para avaliar a dependência do metabolismo glicolítico ou glutaminolítico em células PC-3 e DU145, foram feitos ensaios de proliferação celular (descrito no ítem 4.14) em uma curva de diluição seriada de glicose em que foram usadas as concentrações de 0, 125, 250, 500, 1000 ou 2000 mg.mL⁻¹ e de glutamina nas concentrações de 0, 12,5, 25, 32,5, 75, 150 ou 300 mg.mL⁻¹. A proliferação celular foi avaliada conforme descrito no ítem 4.14.

4.6. EXPERIMENTOS DE TRATAMENTO CELULAR COM INIBIDORES/ATIVADORES QUÍMICOS DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E HORMÔNIOS

Para avaliação da influência de mTOR sobre a atividade de glutaminase, células MDA-MB231, NIH3T3, BJ5TA e IMR90 foram submetidas a ensaios com o inibidor de mTOR, rapamicina (MERCK). Células MDA-MB 231 foram submetidas a uma curva de dose-resposta à rapamicina em que foram utilizadas as concentrações de 12,5, 25, 50 nM por 12 h e à uma curva de tempo-resposta que variou de 0, 4, 8 ou 24hs na dose fixa de 12 nM. Células NIH3T3, BJ5TA e IMR90 foram tratadas com 12 nM de rapamicina por 12h.

Para avaliação da resposta de MDA-MB 231 à insulina foi feita uma curva de tempo-resposta em que células MDA-MB 231 foram privadas de glicose, glutamina e soro fetal bovino por 12h. Após este período as células foram estimuladas com 0,01 mg.mL⁻¹ de insulina em uma curva de tempo-resposta que variou de 0, 10, 15, 20, 30 ou 60 min.

Com o intuito de avaliar a ação de AMPK em linhagens de tumor de próstata, células PC-3 e DU145 foram tratadas com 2,5 mM de Metformina (MERCK) por 12h. Após este período, as células foram lisadas como descrito nos ítem 4.8 e 4.11, e os lisados celulares após serem quantificados por Bradford (Biorad), foram utilizados em ensaios de dosagem da atividade de glutaminase e de *western blot* após o tratamento.

Para avaliar a sensibilidade relativa de células PC-3 e DU145 aos inibidores BPTES ou Metformina, foram feitas curvas de proliferação celular (descritas no ítem 4.14) empregando-se 0, 2,5 ou 10 μ M de BPTES e 0, 0,5, 1,0 ou 2,0 mM de Metformina.

4.7. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE mTOR SOBRE KGA OU GAC

Células MDA-MB 231 expressando estavelmente o shRNAs contra KGA, GAC, ou KGA/GAC foram geradas por uma pós-doutoranda do grupo e encontravam-se disponíveis em nosso laboratório. Foram realizados experimentos de tratamento com rapamicina e dosagem da atividade de glutaminase de lisado total dessas células com o intuito de averiguar qual isoformas de glutaminase era afetada por mTOR. Essas células foram cultivadas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de puomicina (Invitrogen) e 2 mM de 2-metil-oxo-glutarato (Sigma Aldrich). O 2-metil-oxo-glutarato foi retirado do meio somente no momento em que as células foram tratadas com rapamicina 12 nM por 12 h. Após este período, as células foram lisadas como descrito nos ítem 4.8 e 4.11 e os lisados celulares, após serem quantificados por Bradford (Biorad), foram utilizados em ensaios de dosagem da atividade de glutaminase e de *western blot*.

4.8. WESTERN-BLOT

A lise celular foi feita inicialmente por meio da lavagem das células com PBS 1X gelado seguido de raspagem das mesmas após adição de 200 μ L de solução de lise (25 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X) acrescida de inibidores de fosfatase (50 mM β -glicerolfosfato, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM pirofosfato sódico) e proteases (1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina, 1 μM pepstatina, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina) e anti-oxidante (2 mM DTT). Os lisados celulares totais foram congelados com

N₂ líquido, descongelados em gelo e centrifugados a 10.600 x g por 10 minutos a 4°C. As proteínas dos lisados celulares foram quantificadas pelo método de Bradford empregando-se BSA como padrão (BioRad). Entre 10-50 ug de lisado foram separados pela técnica de SDS-PAGE ⁽⁷⁵⁾ utilizando-se 10% de poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF empregando-se transferência molhada em solução 50 mM Tris Base, 380 mM glicina, 10% metanol a 120 V por 40 min. Após essa etapa, a membrana foi bloqueada com solução 5% de leite em pó (Molico) em TBS/0.1% Tween 20 por 1 hora. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 x com TBS/0.1% Tween 20 por 5 minutos cada. Para a detecção das proteínas de interesse, a membrana foi incubada com anticorpo primário por 16 horas a 4°C. Os anticorpos primários foram diluídos em TBS/0.1% Tween 20 acrescido de Azida sódica a 0,02% (MERCK) nas seguintes diluições: anti-PTEN (1:1000 – Cell Signaling), anti-TSC2 (1:1000 – Cell Signaling), anti-KGA (1:1000 – Abnova), S6K (1:1000 – Cell Signaling), pS6K Thr389 (1:1000 – Cell Signaling), mTOR (1:1000 – Cell Signaling), pmTOR Ser2481 (1:1000 – Cell Signaling), pmTOR Ser2448 (1:1000 – Cell Signaling), Akt (1:1000 – Cell Signaling), pAkt Thr308 (1:1000 – Cell Signaling), pAkt Ser473 (1:1000 – Cell Signaling), ACC (1:1000 – Cell Signaling), pACC Ser79 (1:1000 – Cell Signaling) e GAC (1:3300 - Genscript). Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 x com TBS/0.1% Tween 20 por 5 minutos cada, seguida de incubação com anticorpo secundário (GE – anti-*mouse* ou anti-*rabbit* diluídos 1:10000 em TBS/0,1% Tween 20), por 1 hora, à temperatura ambiente. Novamente, após a incubação, as membranas foram lavadas 3 x com TBS/0.1% Tween 20 por 5 minutos cada. A presença da banda protéica foi detectada adicionando-se reagente Luminol (*ECL Detection Reagent* – Pierce) à membrana seguido do contato da mesma com filme autoradiográfico (IBF-médix) pelo tempo julgado necessário.

4.9. PCR QUANTITATIVO

RNA total foi extraído utilizando-se o *kit Rneasy Mini* (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante e a síntese da primeira fita de cDNA feita com o uso do *kit Superscript III cDNA Synthesis* (Invitrogen) e oligonucleotídeos *random hexamers*. A análise da expressão relativa dos mRNA da GAC e KGA foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real (qPCR) empregando-se *SYBR Green PCR Master*

Mix (Applied Biosystem). Um *mix* contendo SYBR Green 1X, 0,3 μ M de *mix* de *primers forward* e *reverse* e cDNA sintetizado equivalente a 40 ng de RNA em água ultrapura em um volume final de 20 μ L, foi acondicionado em placa de 96 poços (MicroAmp 96-Well Plates – Invitrogen) e analisados no termociclador ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), cujo programa seguiu as temperaturas de 95°C - 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C - 15 segundos e 60°C - 60 segundos. As sequências dos oligonucleotídeos utilizadas estão dispostas na tabela 2. Os dados foram normalizados pela expressão do *housekeeping* rRNA 18S. As amostras foram analisadas em três repetições biológicas, sendo que cada amostra foi aplicada em triplicata em cada placa de reação. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (76).

Tabela 2. Oligonucleotídeos empregados nos experimentos de qPCR

Oligo	Sequência
KGAFow_qPCR	5' TGG TGA TCA AAG GGT AAA GTC 3'
KGARev_qPCR	5' TGC TGT TCT AGA ATC ATA GTC C 3'
GACFow_qPCR	5' GAT CAA AGG CAT TCC TTT GG 3'
GACRev_qPCR	5' TAC TAC AGT TGT AGA GAT GTC C 3'
18SFow_qPCR	5' ATT CCG ATA ACG AAC GAG AC 3'
18SRev_qPCR	5' TCA CAG ACC TGT TAT TGC TC 3'

4.10. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

Mitocôndrias foram extraídas de cerca de 2×10^7 células utilizando-se o kit *Qproteome Mitochondria Isolation kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Após isoladas, as mitocôndrias foram rompidas com solução de lise 25 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% Triton-X 100 e o lisado protéico quantificado por Bradford (BioRad).

4.11. PREPARO DE LISADO CELULAR TOTAL PARA DOSAGEM DE ATIVIDADE DE GLUTAMINASE

Para a dosagem de atividade a partir de lisado celular total, 2×10^6 células foram semeadas em placas de 10 cm. Após 24h, as células foram coletadas com 100 μ L de solução de lise 25 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% Triton-X 100

utilizando-se *cell scraper*. O lisado protéico sofreu lise mecânica ao ser aspirado em movimentos *up and down* em seringa de 1 mL e agulha de insulina 29G (12,7 mm x 0,33 mm). O lisado protéico foi quantificado por Bradford (BioRad) e 10 µg de proteína total foram utilizados nos ensaios de atividade enzimática.

4.12. ENSAIO DE ATIVIDADE DE GLUTAMINASE

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 foi realizada através de uma medição indireta. O produto da reação da glutaminase sobre a glutamina, o glutamato, foi transformado em α -cetoglutarato através da enzima Glutamato Desidrogenase (GDH), a qual, então, reduziu neste processo uma Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD^+) em NADH, composto que absorve UV a 340nm (Figura 9).

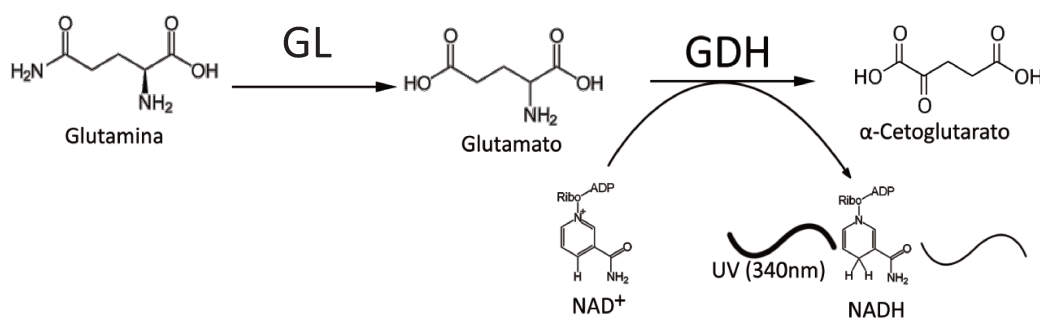


Figura 9 - Esquema de avaliação cinética da atividade de glutaminase.

Cinco a dez microgramas de lisado mitocondrial ou lisado celular total foram incubados em 50 mM Tris-Acetato pH 8,6, 0,20 mM EDTA, 30 mM NAD^+ , 3U GDH (Extração de Fígado Bovino, Sigma Aldrich, EUA), 20 mM KH_2PO_4 e concentrações diversas de glutamina (60 mM, 30 mM, 15 mM, 7,5 mM, 3,75 mM e 1,875 mM). A leitura foi realizada em um leitor de placas Perkin Elmer Enspire 2300 MultiLabel Reader no comprimento de onda de 340 nm. Cada reação foi lida 20 vezes e captada a absorbância de NADH a cada 37,5s, totalizando aproximadamente 12 minutos de reação. O ajuste das curvas de Michaelis-Menten foi feito com o programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, EUA). O estabelecimento da cinética da enzima, ao contrário da opção por um ensaio de V_0 , além de fornecer informações sobre o nível de atividade como V_{max} , o qual se

relaciona à concentração enzimática, pode também informar sobre eventuais alterações no K_M . Foram realizados além de ensaios de cinética enzimática, ensaios do tipo V_0 em que o parâmetro avaliado foi a velocidade inicial da reação. Nestes ensaios, foram utilizadas concentrações de 3,75 mM ou 7,5 mM de glutamina e, salvo a concentração de glutamina, todo o procedimento foi realizado como descrito para os ensaios de cinética enzimática. Como controle negativo, foram realizados ensaios sem a presença do lisado protéico celular e o valor de absorbância medido foi subtraído dos ensaios em presença de lisado protéico celular.

4.13. DOSAGEM DO CONSUMO DE GLICOSE, LACTATO, GLUTAMINA E GLUTAMATO

Células MDA-MB231, NIH3T3, IMR90 e BJ5TA em condições de ativação/inibição das vias da mTOR e PC-3 e DU145 em condições ativação da via da AMPK tiveram cerca de 1 mL do meio de cultura recolhido e dosado para o consumo de glicose e de glutamina e a produção de glutamato e lactato no equipamento *BioProfile Automated Analyzers for Mammalian Cell Culture Basic 4* (Nova Biomedical) seguindo as recomendações do fabricante. Os ensaios foram realizados em triplicata e a dosagem dos referidos metabólitos foi normalizada tanto pela dosagem dos meios utilizados no ensaio quanto pelo número de células (quantificado pelo *Countess Automated Cell Counter* (Life Technologies - Invitrogen)).

4.14. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Foram semeadas 10.000 células em poços de placas de 96 poços (TPP), as quais foram então incubadas por 24, 48, 72 e/ou 96 horas. Após os tempos estipulados de incubação, as células foram fixadas com solução de 3,7% formaldeído em PBS 1x, bloqueadas com solução de 4% BSA, 0,8% Triton X-100 em PBS 1x. Para a detecção do núcleo, foi empregado DAPI (Sigma), o qual foi incubado na concentração de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução de PBS 1x por 5 minutos. Após incubações, as células foram contadas em microscópio (Operetta – Perkin Elmer), utilizando-se o software Harmony.

4.15. ESTATÍSTICA

Foram utilizadas as análises de inferência estatística: desvio padrão, média, e *Student's t test* para estimação do *p-value*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ATUAÇÃO DA VIA DA PI3K/Akt SOBRE AS GLUTAMINASE

Conforme comentado na Revisão Bibliográfica, Garcia-Cao e colaboradores ⁽⁵⁸⁾ mostraram recentemente que PTEN regula negativamente GLS1, mais especificamente KGA, através de um mecanismo de promoção da degradação proteossômica induzido pelo complexo *E3 ubiquitin ligase anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 APC/Cdh1* ⁽⁵⁸⁾. Esta função de PTEN é dependente de sua habilidade de diretamente promover o agrupamento do complexo APC/C-Cdh1 e independente de sua capacidade de inibir a via da PI3K. De maneira a verificar esta observação, geramos células de tumor de mama MDA-MB231, tumor de próstata DU145 e fibroblastos de camundongos embrionários NIH3T3 com *knockdown* estável de PTEN.

Clones positivos com expressão estável de shRNA contra PTEN foram confirmados por SDS-PAGE e *western blot* (Figura 10A). Primeiramente, pôde-se verificar que todos os clones obtidos apresentavam diminuição significativa da banda protéica de PTEN, e, de acordo, a via de sinalização da PI3K/Akt/mTOR apresentava nível de ativação aumentado em relação ao controle, conforme julgado pelo aumento da fosforilação de Akt, mTOR e S6K nos resíduos Ser473 (Akt), Ser2448 (mTOR) e Thr389 (S6K). Curiosamente, nas três linhagens, a fosforilação de mTOR em Ser2441 é também bem intensa no controle. Também conforme o esperado, células MDA-MB231 com *knockdown* de PTEN proliferaram mais após 72 e 96 horas de cultivo (Figura 10B). Segundo, avaliou-se o impacto do *knockdown* de PTEN no nível protéico da GAC e KGA (Figura 10C). Em nenhum dos casos verificamos alteração no nível protéico das isoformas.

Dado que não verificamos alteração no padrão de bandas das glutaminases no *western blot*, decidimos investigar se o *knockdown* de PTEN estaria afetando a localização celular das isoformas. Fracionamento celular seguido de *western blot* não indicou mudança na localização celular das isoformas em MDA-MB 231 (Figura 10D), enquanto que cinética enzimática da fração mitocondrial revelou que o *knockdown* de PTEN levou a uma diminuição do K_M da enzima sem alteração de V_{max} (Figura 10E). O fato de não observarmos alteração em $V_{máx}$ corrobora não termos visto alteração em nível protéico de

KGA ou GAC. Para entendermos se a ação de PTEN se dava via mTOR, que está a *downstream* na via da PI3K, tratamos as células com rapamicina, conhecido inibidor desta proteína. Tratamento com rapamicina elevou o K_M para os níveis detectados nas células controles (Figura 10E).

Tais observações sugeriram uma possível atuação da via da PI3K/Akt/mTOR sobre a atividade das enzimas glutaminase. Em adição, dado que *knockdown* de PTEN levou a redução do K_M de glutaminase mitocondrial (e não alteração no V_{max} , o que seria indicativo de alteração de nível protéico), de uma maneira dependente de mTOR, especulamos que alteração na atividade de glutaminase verificada por nós é em função de algum outro mecanismo não envolvendo a degradação proteossômica induzido pelo complexo APC/Cdh1.

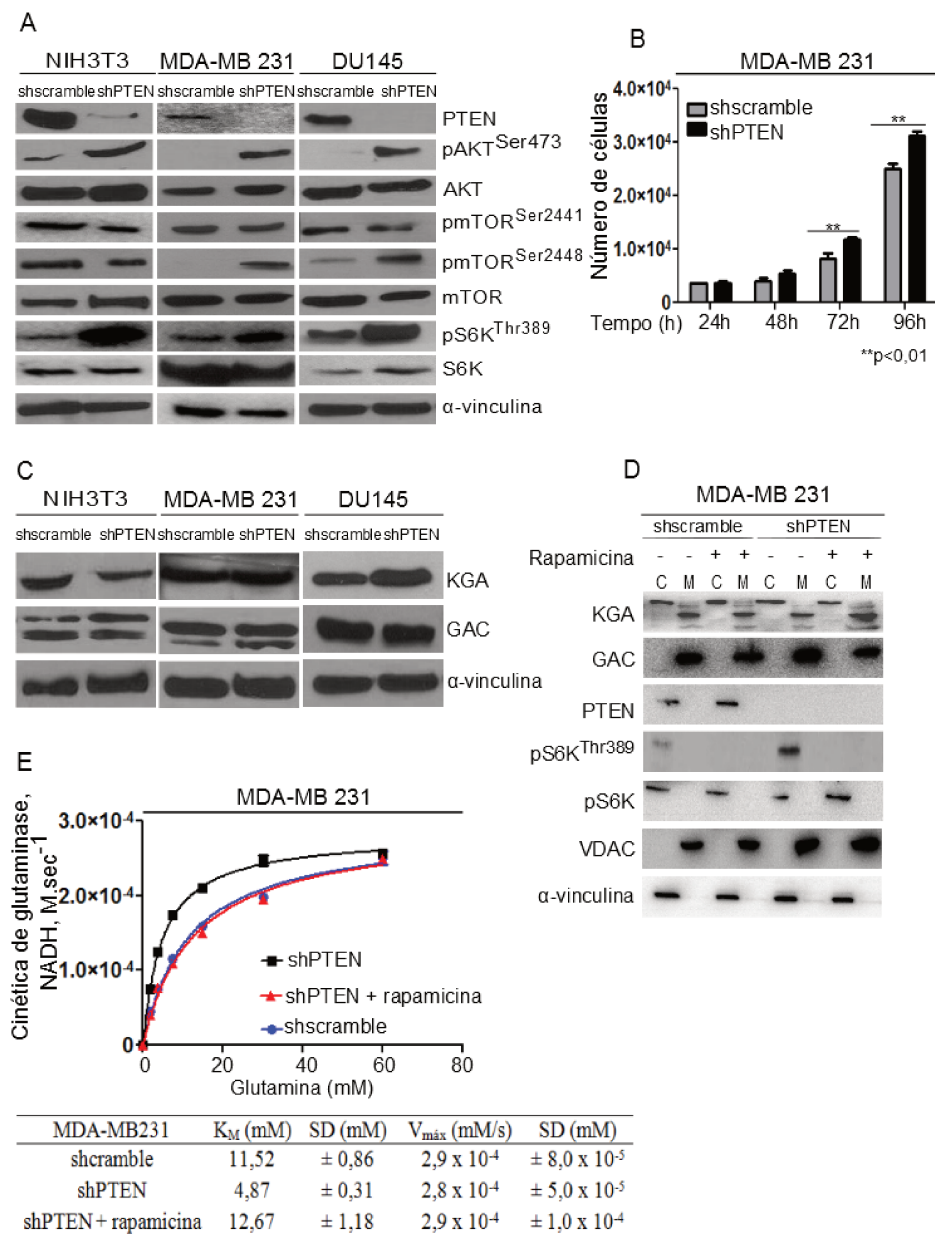


Figura 10 - Atuação de PTEN sobre as glutaminases. *Knockdown* estável de PTEN (shPTEN) em células NIH3T3, MDA-MB231 e DU145 levou a superestimulação da via da PI3K/Akt/mTOR em relação a células controle (shRNA *scramble*), conforme julgado por ativação de mTOR e S6K (A) e aumento de proliferação celular (B). (C) Apesar do acionamento da via, o *knockdown* de PTEN não alterou nível protéico de KGA e GAC. (D) Fracionamento celular seguido de *western blot* de MDA-MB 231 controle ou shPTEN não indicou alteração na localização subcelular de GAC e KGA. (E) Cinética enzimática da fração mitocondrial de MDA-MB 231 indicou que células shPTEN possuíam menor K_M de glutaminase mitocondrial que células controle, porém, sem alteração de V_{máx}. Tratamento de células shPTEN com rapamicina (20 nM por 12 horas) foi capaz de aumentar o K_M de para níveis comparáveis ao da célula shscramble.

De maneira a confirmar que o aumento verificado na atividade de glutaminase devido ao *knockdown* de PTEN era dependente da via da PI3K, inibiu-se PI3K com doses crescentes de wortmannin. De acordo, o tratamento, desde a primeira dose ensaiada (50 nM), levou à diminuição da atividade de mTORC1 (conforme avaliado pela fosforilação de Thr389 em S6K, Figura 11A). Inibição da fosforilação em Akt em Thr308 e Ser473 só foi verificada na maior dose usada, 200 nM (Figura 11A). O tratamento não levou à alteração dos níveis protéicos das isoformas GAC e KGA (Figura 11A). Quando avaliamos a atividade de glutaminase de lisado celular total, verificamos que, desde a primeira concentração utilizada, houve queda significativa da atividade (Figura 11B). Em acordo, consumo de glutamina e secreção de glutamato dessas células foi também reduzido com o aumento da dose do inibidor wortmannin (Figura 11C). Esses dados confirmaram que a atividade de glutaminase é regulada positivamente pela via da PI3K/Akt em células de tumor de mama, em um mecanismo que não envolve alteração dos níveis protéicos das glutaminase.

5.2. ATUAÇÃO DE mTORC1 SOBRE AS GLUTAMINASES

Durán e colaboradores mostraram que a glutaminólise medeia a translocação e ativação de mTORC1 ⁽²⁶⁾. O mesmo trabalho mostrou que a glutaminólise é responsável pelo carregamento de Rag B com GTP e que a ativação de mTORC1 por glutaminólise aumenta o tamanho celular e inibe autofagia, dois processos regulados por mTORC1 ⁽²⁶⁾. Outro trabalho mostrou que mTOR é capaz de sentir o estresse metabólico derivado da privação de glicose e glutamina em um mecanismo independente de Rag, AMPK e TSC2, visualizado pela redução da fosforilação de S6K em Thr389 ⁽²⁷⁾ e dependente do complexo TTT-RUVBL1/2. Recentemente, foi também mostrado que mTOR promove a anaplerose glutaminolítica por meio da ativação da Glutamato Desidrogenase (GDH), num mecanismo que envolve a repressão transcricional de Sirt4, uma sirtuina mitocondrial que inibe GDH ⁽²⁸⁾. Uma vez que tem sido extensivamente mostrado que a glutaminólise regula e ativa mTORC1, hipotetizamos que a mTOR possa contra-regular as glutaminase. De fato, conforme comentado acima, tratamento de células com *knockdown* para PTEN com

rapamicina restaurou o K_M da glutaminase de extrato mitocondrial para os nível observado em células controle (Figura 10E).

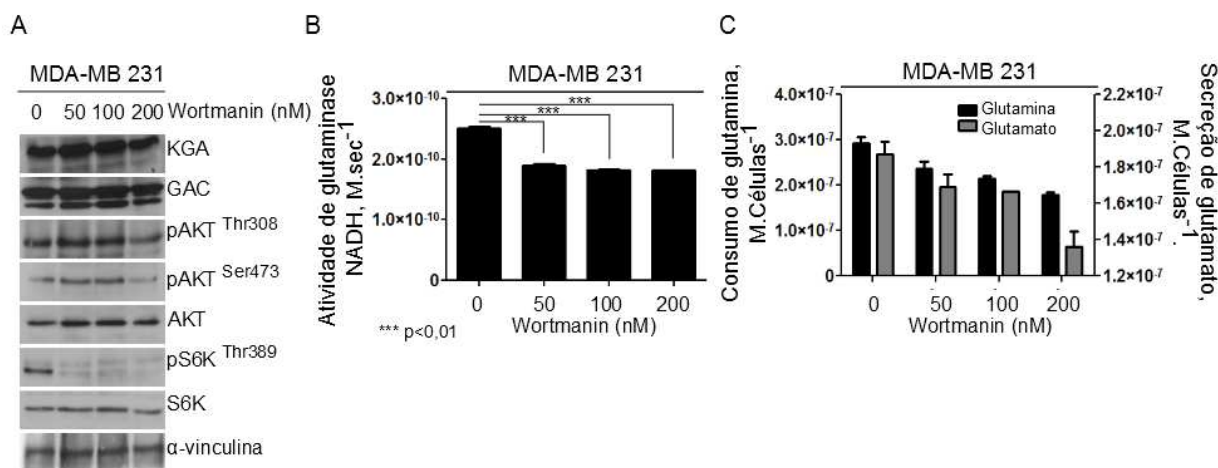


Figura 11 - Inibição de PI3K afeta atividade das glutaminases. A inibição da via da PI3K com o inibidor químico wortmannin por 12 h levou a inibição da fosforilação de Akt em Ser473 e Thr308 e de S6K em Thr389, sem alteração dos níveis protéicos de KGA ou GAC (A). Desde a primeira concentração de wortmannin utilizada, 50nM, foi verificada queda na atividade de glutaminase de lisado celular total (B) e houve também queda no consumo de glutamina e secreção de glutamato com o aumento da dose do inibidor (C).

Para confirmarmos tal achado, realizamos uma curva de dose e tempo resposta com este inibidor sobre a atividade de glutaminase de lisado total de células MDA-MB 231. Primeiramente, verificamos que os tratamentos foram eficientes em suprimir a atividade de mTORC1 conforme julgado pelo nível de fosforilação da S6K em Thr389 (Figura 12A, painéis à direita e no centro). Corroborando, o tratamento também levou a diminuição na atividade de glutaminase de maneira dose e tempo dependente (Figura 12B, gráficos à direita e no centro) além de ter diminuído o consumo e secreção de glutamina e glutamato, respectivamente, de uma maneira dose dependente (Figura 12C).

Dado que a ativação de mTOR requer a presença de nutrientes (como glicose e glutamina), conforme comentado acima, verificamos se a inibição da atividade da mesma pela privação destes elementos afetaria a atividade de glutaminase. A privação de glicose e glutamina em células MDA-MB231, assim como o tratamento com rapamicina, levou à redução da fosforilação de S6K em Thr389 sem que pudessemos notar nenhuma alteração nos níveis protéicos de KGA ou GAC (Figura 12D). A atividade de glutaminase de células

MDA-MB231 privadas de glicose e glutamina foi reduzida em relação ao controle, sendo comparável à atividade verificada em células tratadas com rapamicina (Figura 12E).

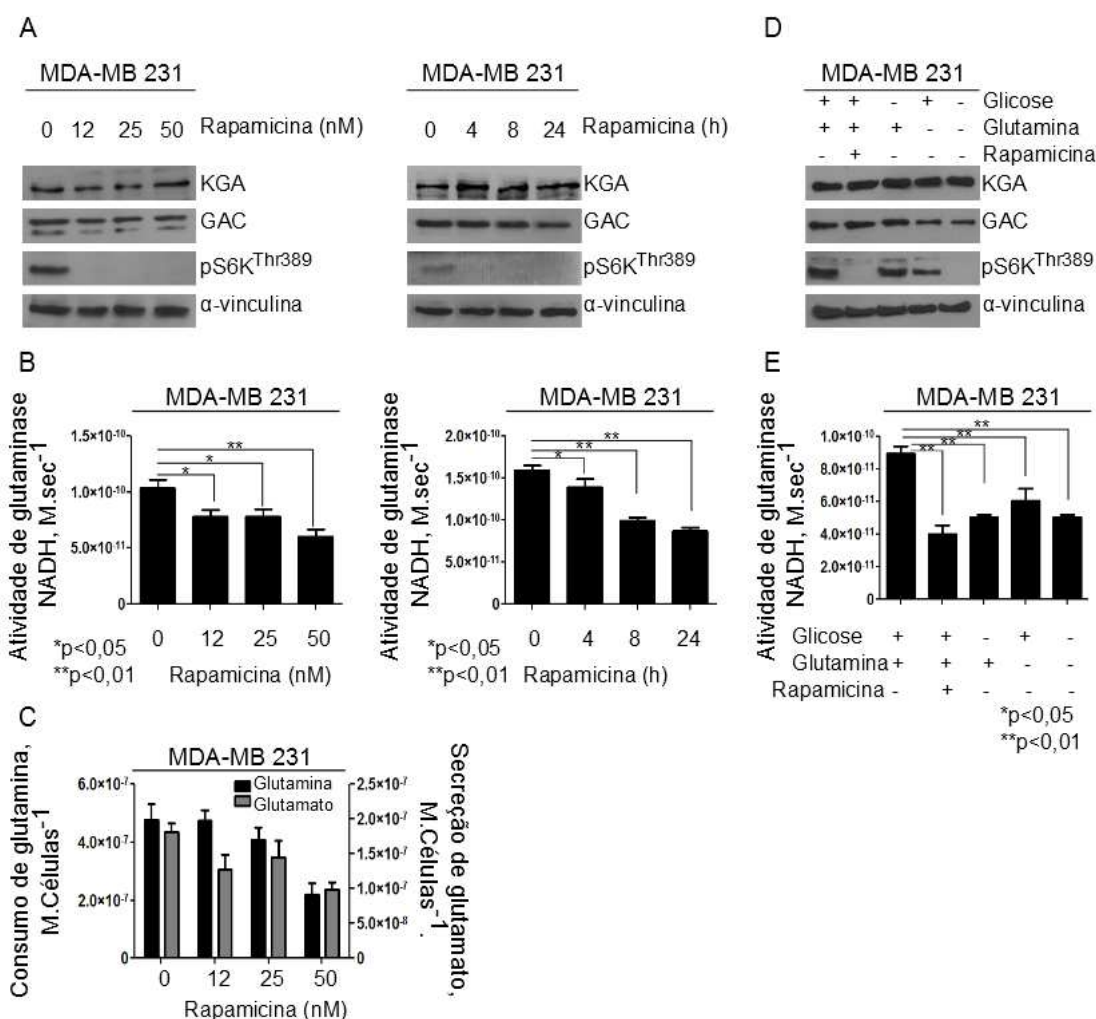
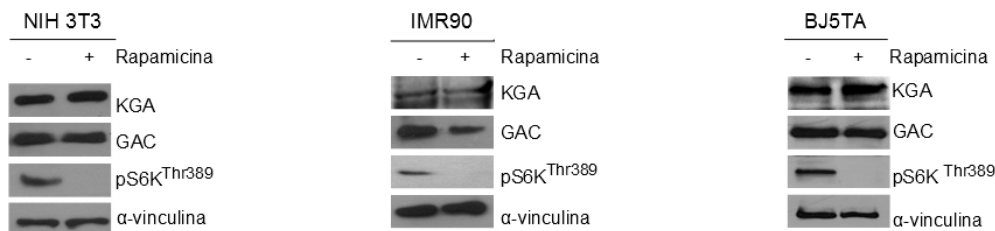


Figura 12 – Inibição de mTOR, via rapamicina e via privação de nutrientes, levou à inibição da atividade de glutaminase em MDA-MB 231. Western blot (A), medida de atividade de glutaminase de lisado celular total (B) e de consumo de glutamina (e secreção de glutamato) (C) de células MDA-MB231 tratadas com rapamicina em curva de dose e de tempo resposta. Western blot (D) e medida de atividade de glutaminase de lisado celular total (E) de células MDA-MB231 privadas de glicose e de glutamina.

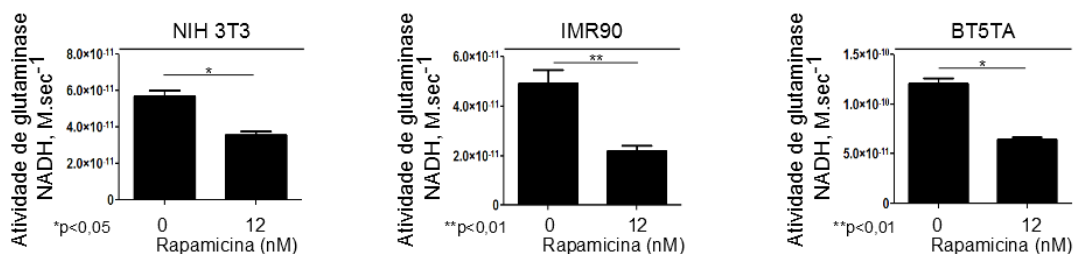
No intuito de verificar se a redução da atividade de glutaminase devido a inibição de mTOR por rapamicina ou por privação de glicose e glutamina era um mecanismo conservado em outros tipos celulares não tumorais, os mesmos ensaios foram feitos em células NIH3T3, IMR90 (fibroblasto de pulmão humano não imortalizado) e BJ5TA (fibroblasto de prepúcio humano imortalizado). Em todas as células avaliadas, o tratamento com rapamicina foi eficiente em reduzir a fosforilação de S6K em Thr389 sem que

podéssemos notar nenhuma alteração nos níveis protéicos de KGA ou GAC (Figura 13A). Em concordância com os experimentos anteriores, verificamos redução da atividade de glutaminase de lisado celular total (Figura 13B) e do consumo de glutamina e secreção de glutamato (Figura 13C) nas mesmas células, após tratamento.

A



B



C

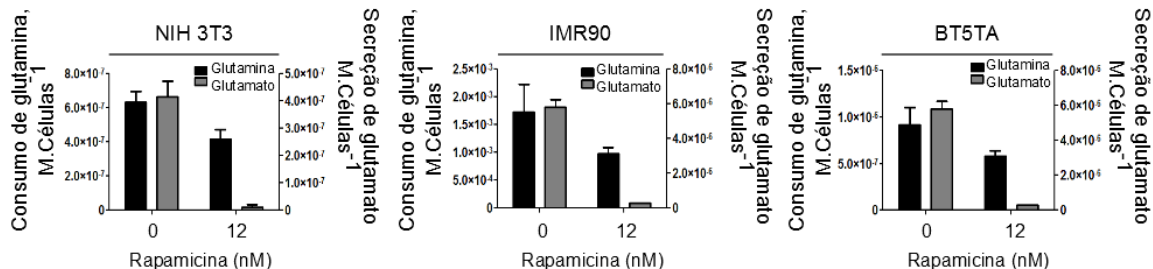


Figura 13 - Inibição de mTOR, via rapamicina levou à inibição da atividade de glutaminase em células não tumorais. Western blot (A), medida de atividade de glutaminase de lisado celular total (B) e dosagem do consumo de glutamina e secreção de glutamato (C) de células NIH3T3, IMR90 e BJ5TA tratadas com rapamicina por 12 horas.

Igualmente, a privação de glicose e glutamina nas linhagens não tumorais NIH 3T3, IMR90 e BJ5TA levou a redução a inativação de mTOR vista pela redução da fosforilação de S6K Thr389 sem alteração nos níveis protéicos de GAC e KGA (Figura 14A). A privação de glicose e glutamina nessas linhagens também levou à redução na atividade de glutaminase de lisado celular total (Figura 14B).

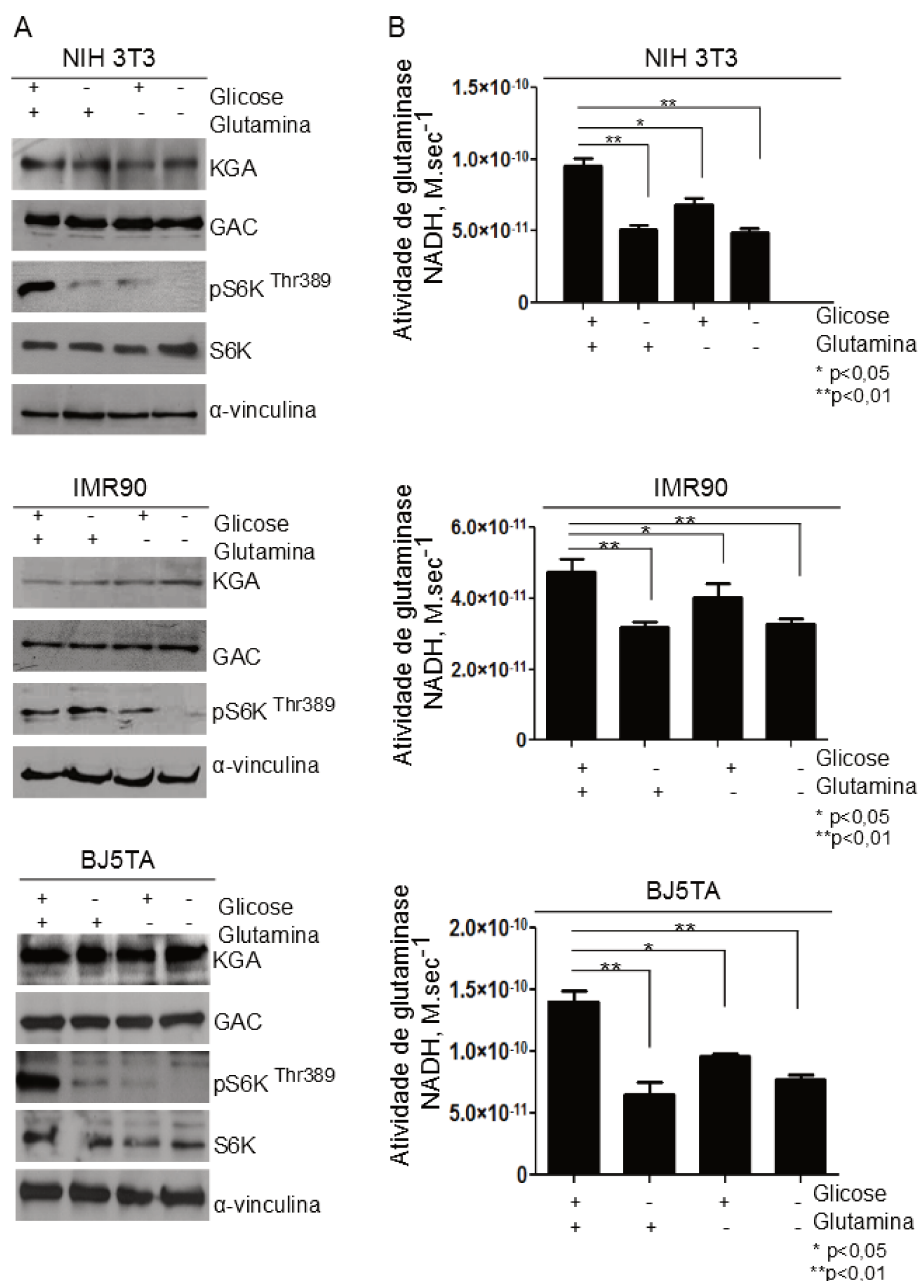


Figura 14 - Inibição de mTOR via privação de nutrientes levou à inibição da atividade de glutaminase em linhagens não tumorais. Western blot (A) e dosagem da atividade de glutaminase de lisado celular total (B) de células NIH3T3, IMR90 e BJ5TA privadas de glicose e glutamina por 12 horas.

O heterodímero TSC1/TSC2 é um regulador chave *upstream* de mTORC1, que funciona como uma GAP para Rheb GTPase. Quando Rheb está associada a GTP, ocorre uma interação direta com mTORC1 que fortemente estimula sua atividade de quinase. Como GAP de Rheb, TSC1/2 negativamente regula mTORC1 por converter Rheb em sua forma inativa ligada a GDP^{(64) (65)}. De modo a testar se a ativação de mTOR via *knockdown*

de TSC2 era capaz de afetar a atividade de glutaminase, foi feito o *knockdown* estável de TSC2 em células de tumor de mama MDA-MB231 e células de epitélio humano BJ5TA.

Na linhagem MDA-MB231, o *knockdown* estável de TSC2 (shTSC2) promoveu aumento da ativação de mTOR como julgado pelo aumento na fosforilação de S6K em Thr389 sem afetar níveis protéicos de KGA ou GAC (Figura 15A). Células MDA-MB231 shTSC2, assim como esperado, proliferavam mais que células controle, com *knockdown* para o gene da Luciferase (shLuc) (Figura 15B). O tratamento com rapamicina promoveu redução da ativação de mTOR conforme julgado pela diminuição da fosforilação de S6K em Thr389, sem afetar níveis protéicos de KGA e GAC, tanto em células shTSC2 quanto em células shLuc (Figura 15C). Por fim, células com *knockdown* de TSC2 apresentaram maior atividade de glutaminase em lisado celular total em relação á controle (Figura 15D), assim como tiveram também maior consumo de glutamina e secreção de glutamato (Figura 15E). Tratamento com rapamicina foi capaz de resgatar tais efeitos (Figura 15D e 15E). Os mesmos resultados foram verificados nas células não tumorais BJ5TA (Figura 16A-D) e células MEF TSC2 *-/-* versus controle (p53 *-/-*) (17A e B).

Para que se obtenha completa ativação de mTOR sabe-se hoje que é necessária vários estímulos ambientais, incluindo nutrientes e fatores de crescimento ^(77, 78). Para avaliar se a combinação de fatores de crescimento com os nutrientes glicose e glutamina eram necessários para aumentar a atividade de glutaminase, células MDA-MB231 foram inicialmente privadas de glicose, glutamina e soro fetal bovino por 12h. Após este período, as células receberam meio completo e insulina (0,01mg.mL⁻¹) por diferentes tempos. Em 15 minutos já verificamos aumento de fosforilação de Akt em Ser473 e em 20 minutos de S6K em Thr389 (Figura 18A). Novamente, não notamos alteração nos níveis protéicos de GAC e KGA. Células MDA-MB231 foram também privadas de glicose, glutamina e soro fetal bovino por 12h e estimuladas por 30 minutos com diferentes combinações de meio com glicose, glutamina, soro fetal bovino e insulina. Akt apresentou fosforilação máxima em Ser473, quando estimulada com glicose, glutamina e soro fetal bovino (ou insulina), fosforilação intermediária quando as células receberam apenas soro ou insulina e fosforilação “basal” nas situações em que as células receberam apenas glicose e glutamina ou meio sem soro (Figura 18B). Tal padrão foi acompanhado pela fosforilação de Thr 389

em S6K (Figura 18 B). As bandas de GAC e KGA, conforme julgado por *western blot*, não se alteraram com o tratamento. Por fim, a dosagem de atividade de glutaminase de lisado celular total revelou que tanto glicose e glutamina, quanto sinalização por fatores de crescimento, são essenciais para que haja resgate na atividade de glutaminase após inibição da mesma por supressão destes estímulos, reinterando a ação de mTOR sobre as glutaminases (Figura 18 C).

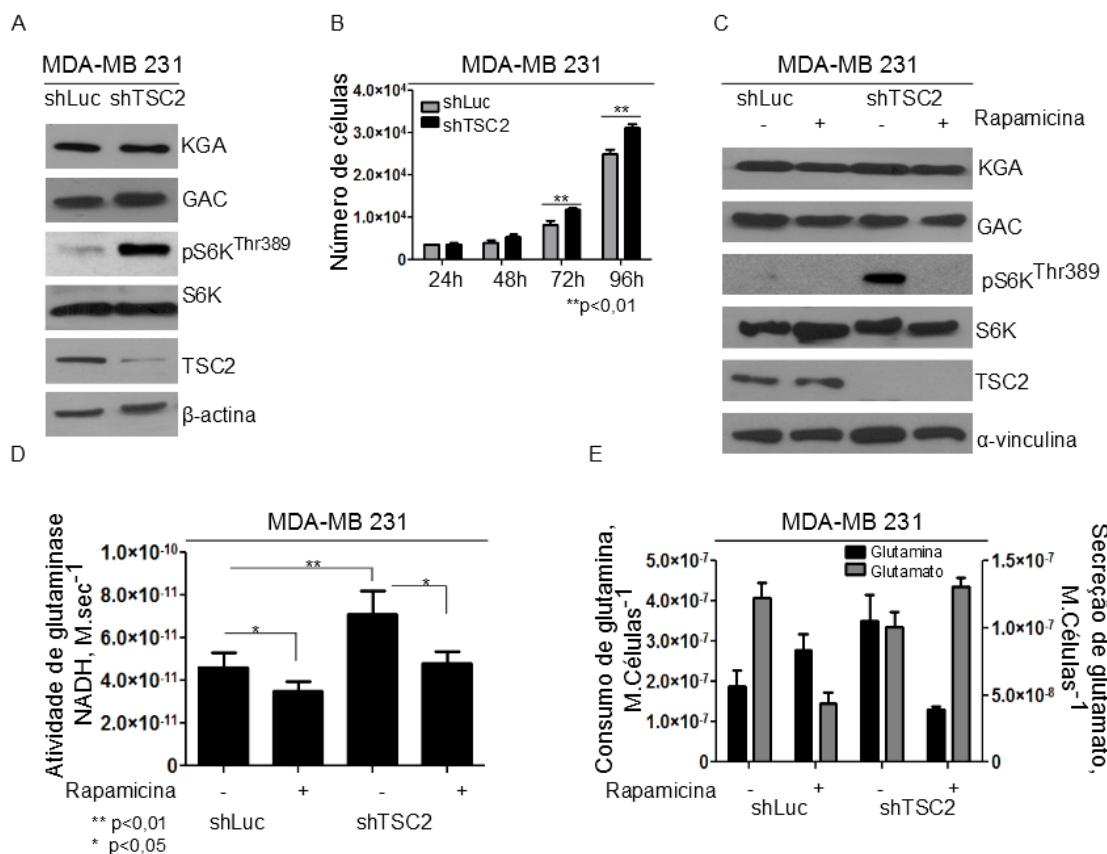


Figura 15 - Ativação de mTOR via knockdown de TSC2 em MDA-MB 231 estimulou atividade de glutaminase. (A) Western blot de células MDA-MB 231 com knockdown de TSC2 (shTSC2) levou ao aumento de ativação da via da mTOR e nenhuma alteração nos níveis protéicos de GAC ou KGA, em relação a células controle com knockdown de luciferase (shLuc). (B) Células shTSC2 proliferam mais que células controle com knockdown de luciferase (shLuc). Western blot (C) e dosagem a atividade de glutaminase (D) de lisado celular total de células shLuc e shTSC2 tratadas com rapamicina. Células shTSC2 apresentam maior atividade de glutaminase em comparação à células shLuc; tratamento com rapamicina restaurou atividade para nível de controle. (E). Células shTSC2 consomem mais glutamina que células shLuc.

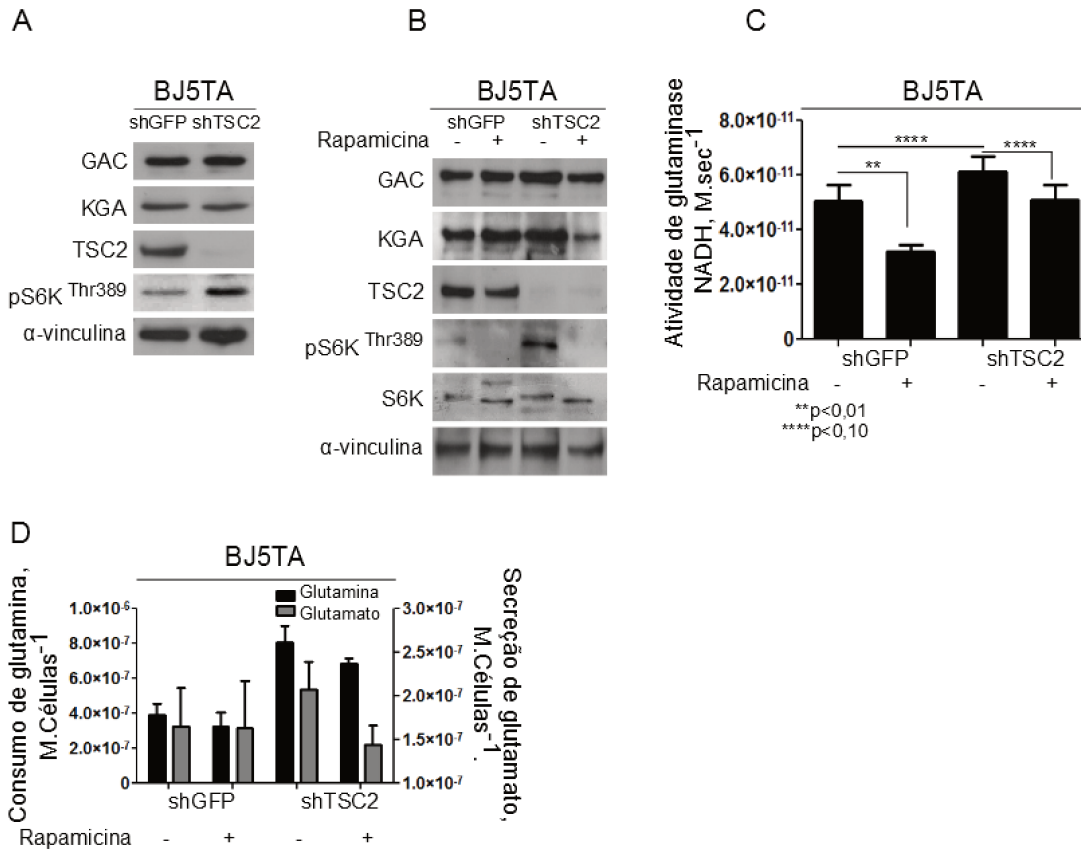


Figura 16 - Ativação de mTOR via *knockdown* de TSC2 em BJ5TA estimulou atividade de glutaminase. (A) Western blot de células BJ5TA com *knockdown* de TSC2 (shTSC2) mostrando aumento de ativação da via da mTOR e nenhuma alteração nos níveis protéicos de GAC ou KGA, em relação a células controle com *knockdown* de GFP. (B) Western blot (C) e dosagem a atividade de glutaminase de lisado celular total de células shGFP e shTSC2 tratadas com rapamicina. Células shTSC2 apresentam maior atividade de glutaminase em comparação à células shGFP; tratamento com rapamicina restaurou atividade para nível de controle. (D). Células shTSC2 consomem mais glutamina que células shGFP.

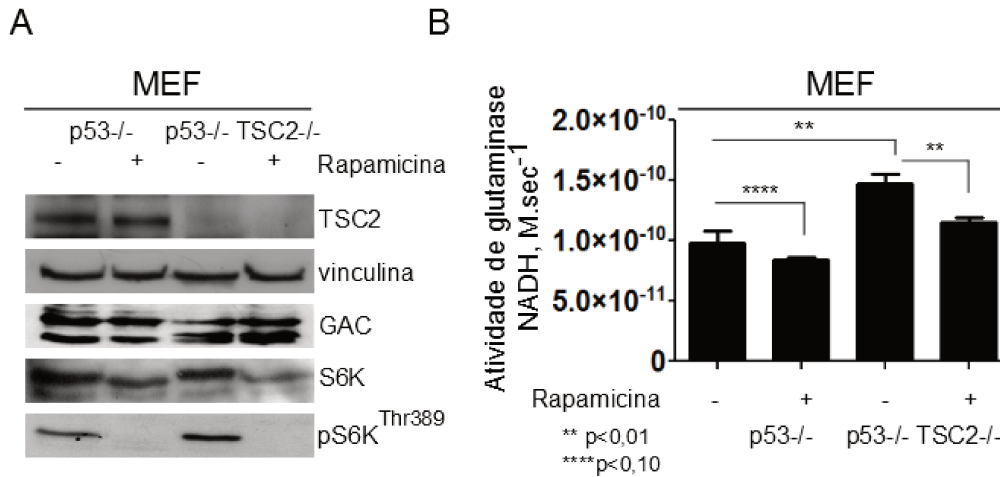


Figura 17 - Ativação de mTOR via *knockout* de TSC2 em MEF estimulou atividade de glutaminase. Western blot (A) e ensaio de atividade (B) de células MEF com *knockout* de TSC2 e p53 (TSC2^{-/-} e p53^{-/-})

mostrando aumento de ativação da via da mTOR e nenhuma alteração nos níveis protéicos de GAC, mas aumento da atividade de glutaminase, em relação a células controle p53 ^{-/-}. Atividade de glutaminase é afetada por rapamicina (12 nM por 12 horas).

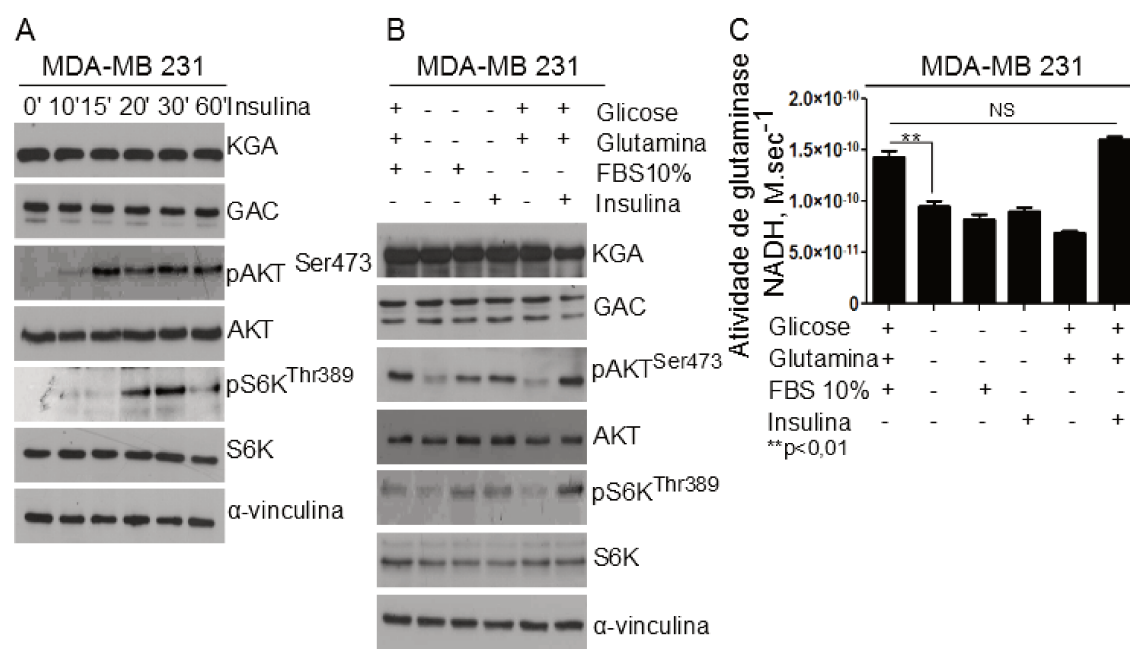


Figura 18 – Inibição/ativação de mTORC1 por nutrientes e fator de crescimento afeta atividade de glutaminase. (A) *Western blot* de células MDA-MB231 suprimida de soro e glicose/glutamina por 12h e estimuladas com insulina por 0,10,15,20,30 ou 60 minutos. *Western blot* (B) e dosagem da atividade de glutaminase de lisado celular total de células MDA-MB 231 (C) suprimida de soro e glicose/glutamina por 12h e estimuladas por 30 minutos com diferentes combinações de meio com glicose, glutamina, soro fetal bovino e insulina

5.3. ATUAÇÃO DE mTORC2 SOBRE AS GLUTAMINASES

Comparado com mTORC1, muito pouco é conhecido sobre a via de mTORC2. Sabe-se que esta via de sinalização é insensível a nutrientes, mas responde a fatores de crescimento e hormônios, como insulina ⁽⁶³⁾. Sabe-se ainda que mTORC2 controla vários membros da subfamília de quinases AGC, tais como Akt, SGK1 e PKC. mTORC2 fosforila Akt em serina 473 e ausência de fosforilação em Akt neste sítio causa diminuição de fosforilação de alguns alvos desta quinase, tais como o complexo mTORC1 ⁽⁶³⁾. Recentemente foi mostrado em um estudo de fosfoproteoma de adipócitos que Akt é capaz de fosforilar a Thr86 da proteína SIN1 do complexo mTORC2 em resposta a fator de crescimento, sugerindo um possível *feedback* para esta via ⁽⁷⁸⁾, contudo, muito pouco é sabido sobre a atuação de mTORC2 no metabolismo tumoral.

Para verificarmos se mTORC2 afeta a atividade de glutaminase, obtivemos a linhagem celular MDA-MB231 com *knockdown* estável de Rictor. Pudemos verificar que mTORC2 não afetou os níveis protéicos de KGA e GAC (Figura 19 A), contudo, a supressão de Rictor levou à diminuição da atividade de glutaminase (Figura 19 B), assim como diminuiu o consumo de glutamina (Figura 19 C) destas células. Inibição de mTORC2 por *knockdown* de Rictor levou à diminuição da fosforilação de Ser473 e Thr308 de Akt com concomitante diminuição de fosforilação de Thr389 de S6K, indicando que a ação de mTORC2 sobre glutaminase provavelmente se deu via Akt/mTORC1.

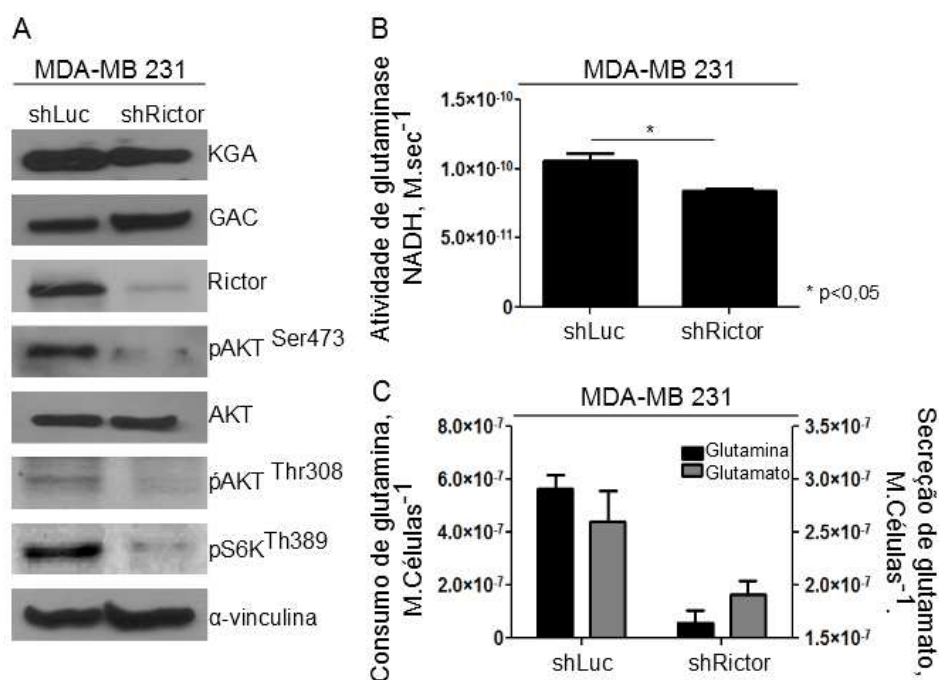


Figura 19 - mTORC2 age sobre as glutaminase provavelmente via mTORC1. (A) Western blot de células MDA-MB 231 com *knockdown* de Rictor (shRictor) mostrando diminuição de atividade de Akt tanto em sua fosforilação em Ser 473 quanto em Thr 308 e de S6K em Thr 389 em relação à controle (shLuc). Células shRictor tem menor atividade de glutaminase (B) e consomem menos glutamina (e secretam menos glutamato) que células controle (C).

5.4. ATUAÇÃO DE mTORC1 SOBRE AS ISOFORMAS DE GLUTAMINASE KGA E GAC

Para averiguar se mTORC1 estava agindo sobre alguma isoforma de glutaminase em específico, células MDA-MB231 controle (com *knockdown* de GFP, shGFP), com *knockdown* de GAC (shGAC), *knockdown* de KGA (shKGA) ou *knockdown* de KGA e

GAC (shGAC/KGA) foram submetidas a tratamento com rapamicina por 12h. O tratamento com rapamicina foi eficaz em inibir mTOR como julgado pela redução da fosforilação de S6K Thr 389 (Figura 20 A), enquanto que o *knockdown* de GAC, KGA ou GAC/KGA foi efetivo em reduzir os níveis protéicos e de mRNA das respectivas glutaminases (Figuras 20 A e B). KGA foi avaliada somente por qPCR dado a problemas de inespecificidade que tivemos com o anticorpo na época dos experimentos. Os mesmos precisam ser repetidos. Fato curioso observado foi a redução da fosforilação de S6K em Thr389 em células com supressão de GAC ou GAC e KGA, indicando uma possível regulação de GAC sobre mTOR (diretamente ou via glutaminólise). Rapamicina foi capaz de reduzir a atividade de glutaminase de células controle ou com *knockdown* de KGA ou GAC (*knockdown* duplo eliminou atividade de glutaminase do lisado), indicando que mTOR atua sobre ambas as isoformas de glutaminase (Figura 20 C). Mesmo efeito foi verificado no consumo de glutamina e secreção de glutamato (Figura 20 D)

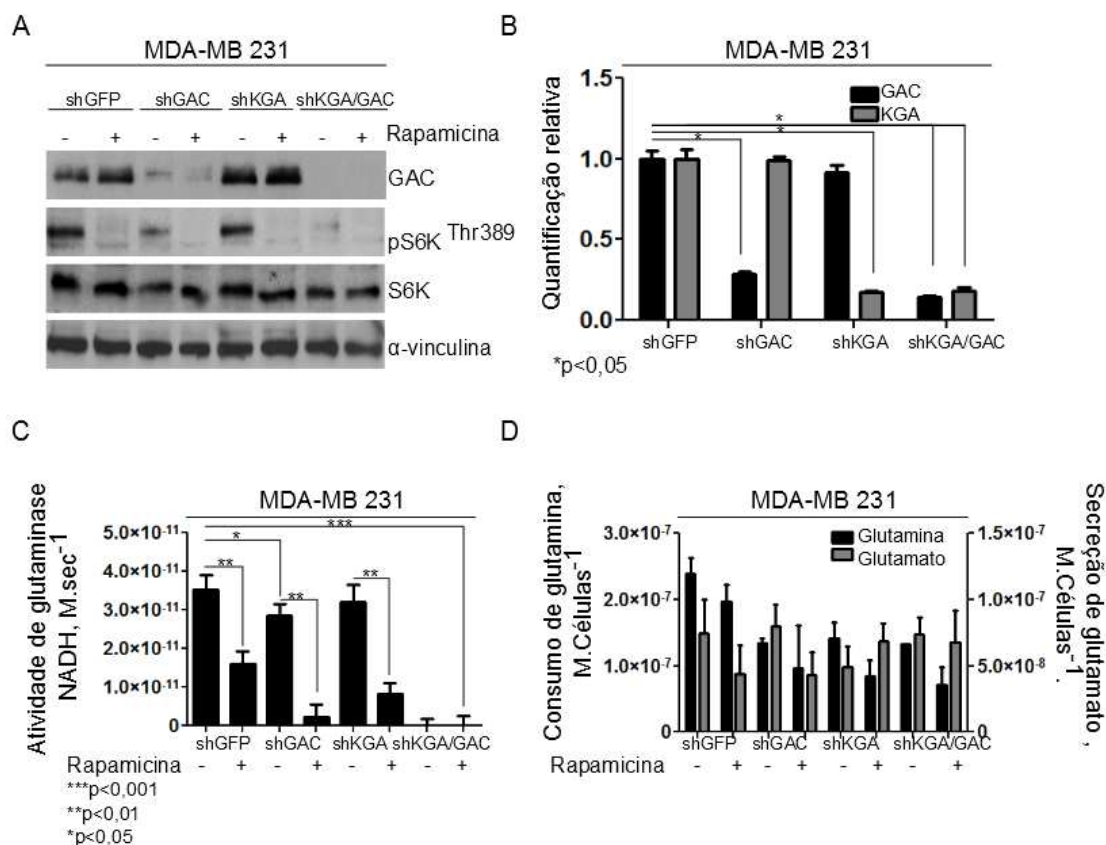


Figura 20 - mTOR age sobre as duas isoformas de glutaminase. Western blot (A), qPCR (B), dosagem da atividade de glutaminase (C) e dosagem do consumo de glutamina e secreção de glutamato (D) de células MDA-MB 231 shGFP, shGAC, shKGA e shGAC/KGA em face ao tratamento com rapamicina.

5.5. AÇÃO DA VIA DA AMPK SOBRE AS GLUTAMINASES

A proteína quinase AMP-ativada (AMPK-*AMP-activated Kinase*) é uma proteína heterotrimérica altamente conservada que desempenha um papel central na regulação da bioenergética e homeostase celular ⁽²⁶⁾. Recentemente, foi mostrado que AMPK regula negativamente a glicólise aeróbica (efeito Warburg) em células tumorais e suprime o crescimento do tumor *in vivo* ⁽⁷⁰⁾. Outra publicação recente mostrou que diversas linhagens dependentes de glutamina (por superexpressão de Myc por exemplo) são mais sensíveis ao tratamento com metformina, um conhecido ativador de AMPK ⁽⁷¹⁾.

Fendt e colaboradores ⁽⁷⁹⁾ mostraram que a droga metformina, um inibidor do complexo I da cadeia de transporte de elétrons, é capaz de alterar o metabolismo glicolítico oxidativo para glutaminolítico redutivo em células tumorais. No trabalho acima citado, foram comparadas três linhagens de câncer de próstata, PC-3, LNCap e DU145. Verificou-se que a sensibilidade à metformina estava diretamente ligada ao *switch* metabólico destas células que passavam a ter menor contribuição do carbono glicolítico e maior contribuição do carbono glutaminolítico na formação de citrato, além de que a maior sensibilidade à metformina estava diretamente ligada ao maior consumo de glicose e secreção de lactato. Na comparação entre PC-3, LNCap e DU145 foi mostrado que células PC-3 proliferam mais, seguido de DU145 e LNCap. A sensibilidade à metformina, avaliada pela curva de proliferação, foi maior em células LNCap, seguida de células PC-3 e DU145. O tratamento com metformina aumentou o consumo de glicose e secreção de lactato sendo novamente o efeito mais pronunciado em LNCap, seguida de células PC-3 e DU145. Com relação à contribuição da glicose para a síntese de α -cetoglutarato e citrato, frente ao tratamento com metformina, foi observada menor contribuição do carbono glicolítico, seguida de aumento na contribuição do carbono glutaminolítico nas três linhagens, sendo que o fenômeno era mais notável em LNCap seguida de DU145 e PC-3. O aumento na contribuição de carbono glutaminolítico para a síntese de citrato, com o tratamento com metformina, nos levou a crer que tal tratamento estaria afetando a atividade de glutaminase nestas células.

Curiosamente, no trabalho de Fauber e colaboradores ⁽⁷⁰⁾ o *knockout* da subunidade catalítica α de AMPK induziu um *switch* metabólico para glicólise aeróbica o que vai de encontro com os resultados apresentados por Fendt e colaboradores ⁽⁷⁹⁾. Nestes,

metformina, conhecido ativador de AMPK, foi mostrado aumentar o consumo de glicose e secreção de lactato. Vale ressaltar que Fendt e colaboradores ⁽⁷⁹⁾ não mencionam AMPK em seu trabalho, apenas o efeito de metformina sobre o metabolismo das células tumorais avaliadas.

Dado que metformina pode agir indiretamente sobre AMPK, ativando-o, decidimos averiguar se este composto era capaz de regular a atividade de glutaminase em células de tumor de próstata PC-3 e DU145. Inicialmente, medimos a sensibilidade destas linhagens à glicose e glutamina (tais dados foram gerados pelas pós-doutorandas do grupo Dra. Kaliandra Gonçalves e Dra. Marília Meira Dias). Na comparação das curvas de crescimento de PC-3 e DU145 foi possível verificar que PC-3 apresentou um crescimento mais dependente do metabolismo glicolítico que DU145, uma vez que PC-3 cresceu cerca de 4 vezes mais na maior concentração máxima de glicose utilizada (2000 mg.mL^{-1}) (em relação ao crescimento observado na ausência de glicose), enquanto que DU145 cresceu somente cerca de 2 vezes mais (Figura 21 A). Em contrapartida, PC-3 se mostrou menos dependente de glutamina que DU145 uma vez que, na maior concentração de glutamina utilizada neste ensaio (300 mg.mL^{-1}), PC-3 cresceu 1,3 vezes em relação ao crescimento observado na ausência de glutamina, enquanto que DU145 cresceu cerca de 3 vezes mais nesta comparação (Figura 21 B). DU145 também mostrou-se ser a célula mais dependente de glutamina, quando Fendt e colegas ⁽⁷⁹⁾ compararam o crescimento de LNCap, PC-3 e DU145.

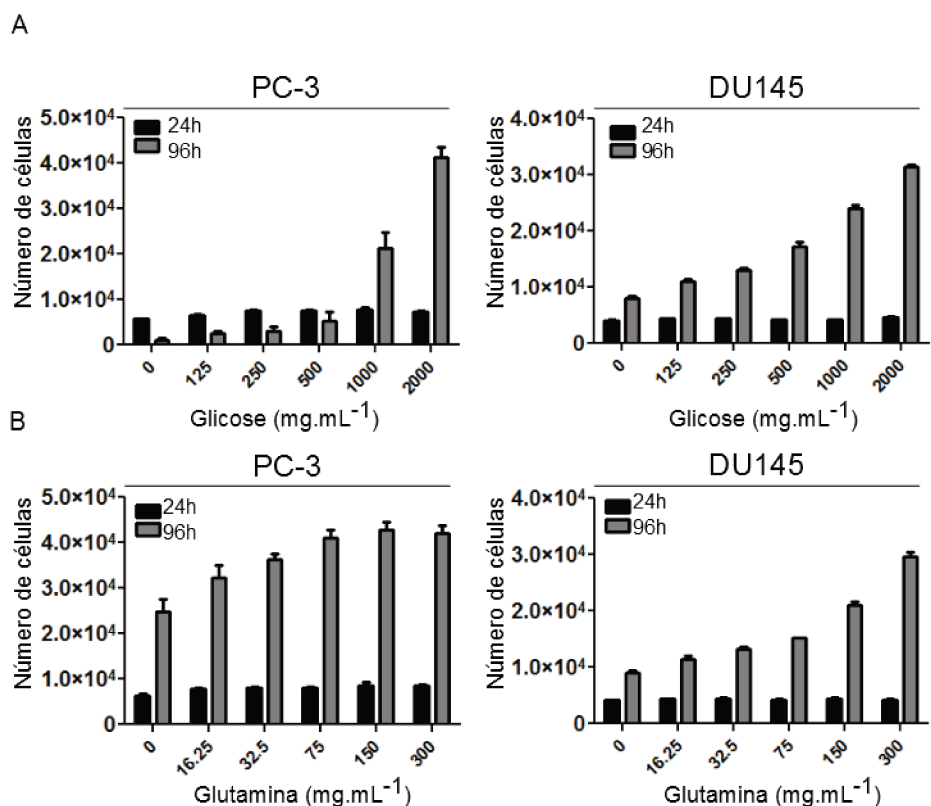


Figura 21 - Dependência relativa do metabolismo glicolítico e glutaminolítico de PC-3 e DU145. Curvas de crescimento de PC-3 e DU145 em uma diluição seriada de glicose (**A**) e glutamina (**B**) mostrando maior dependência de PC-3 do metabolismo glicolítico e de DU145 do metabolismo glutaminolítico.

Foi também comparada a sensibilidade do crescimento das células PC-3 e DU145 ao inibidor de glutaminase, BPTES. Células DU145 apresentam maior sensibilidade ao BPTES (IC_{50} de 1.71 μ M) que células PC-3 (IC_{50} de 50.17 μ M) corroborando os dados anteriores que mostram que DU145 é mais dependente de glutamina para seu crescimento que PC-3 (Figura 22).

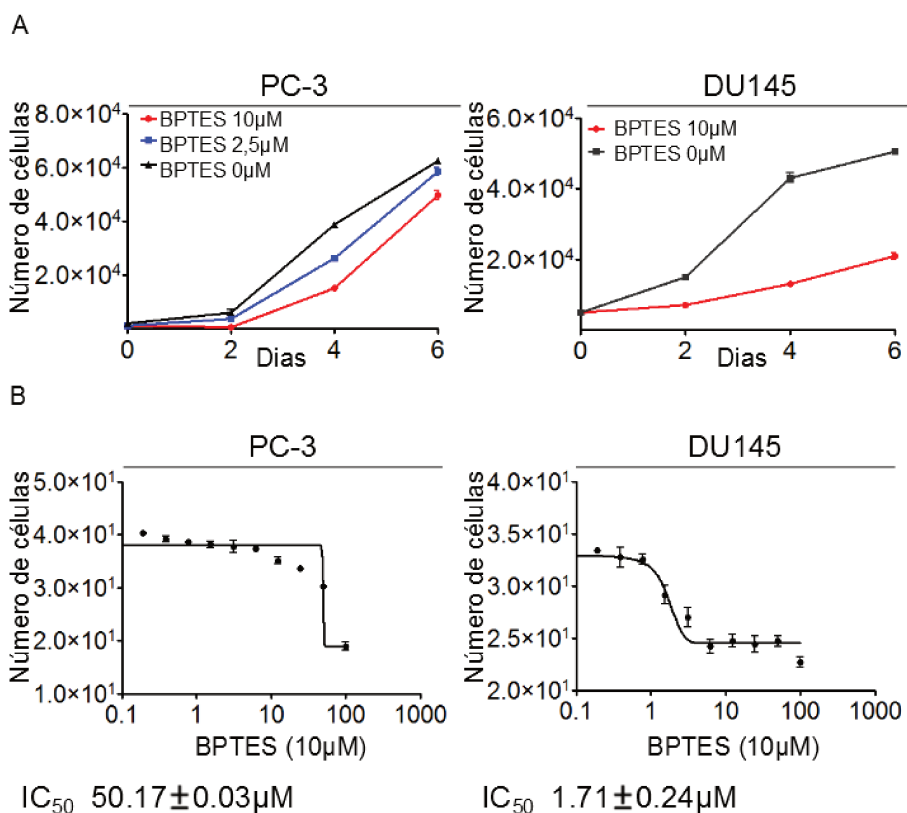


Figura 22 - Sensibilidades relativas ao inibidor de glutaminase, BPTES, de PC-3 e DU145. Curvas de crescimento de PC-3 e DU145 em diferentes doses do inibidor BPTES (A) e curva dose-resposta ao BPTES em relação ao crescimento de PC-3 e DU145 (B) mostrando maior sensibilidade de DU145 ao inibidor de glutaminase BPTES.

Visto que células PC3 e DU145 apresentam dependências diferentes em relação ao metabolismo glutaminolítico procurou-se averiguar se esta diferença metabólica estava relacionado à AMPK. Células PC-3 e DU145 foram tratadas com 2,5 mM de Metformina por 12 h. Verificamos inicialmente que o tratamento levou à ativação de AMPK em DU145 como julgado pelo aumento da fosforilação de seus substrato ACC em Ser79 (Figura 23 A). PC3, curiosamente, apresentou níveis basais de ativação de AMPK já elevados. Não houve alteração dos níveis protéicos de GAC e KGA em DU145 mas a atividade de glutaminase foi afetada nesta célula com o tratamento pontual (Figura 23 B), assim como a sua proliferação foi afetada por doses crescentes de metformina após 48h (Figura 23 C). PC3 não respondeu ao tratamento. Notadamente, DU145 apresentou maior nível protéico de GAC, maior atividade de glutaminase, teve seu crescimento mais afetado por metformina e apresentou maior consumo de glutamina (com maior secreção de glutamato), o qual também foi afetado pelo tratamento com metformina (Figura 23 D). Tais resultados

sugerem que metformina, talvez via AMPK, possa regular negativamente a atividade de glutaminase de DU145 e que isto poderia se dar, em última instância, via mTOR (AMPK, quando ativada, inibe mTOR). Estes dados vão de encontro aos publicados por Fendt e colegas ⁽⁷⁹⁾ os quais mostraram que metformina aumentava a contribuição dos carbonos glutaminolíticos para a síntese de citrato, o que sugere promoção da atividade da enzima por esta droga. O mecanismo exato de ação de metformina não é claro, sendo que Kalender e colaboradores ⁽⁸⁰⁾ mostraram que em dois estudos pré-clínicos de câncer e diabetes metformina atuou inibindo mTOR em uma maneira independente de AMPK e dependente da ação de biguanídeos (metformina é um análogo de biguanídeos) sobre as Rag-GTPases. Refutando as observações de Kalender e colaboradores ⁽⁸⁰⁾, Sinnet-Smith e colegas ⁽⁸¹⁾ mostraram que metformina levou à ativação de AMPK em células de adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) crescidas em concentrações fisiológicas de glicose, 5mM, e que nas mesmas condições de cultivo, metformina inibiu a ação de mTORC1, a síntese de DNA e a proliferação de células PDAC. Nossos resultados aqui apresentados são a primeira evidência de que a ação de metformina no metabolismo tumoral possa envolver a redução da atividade de glutaminase em células de próstata altamente dependentes de glutamina em seu crescimento. Mais, ação de metformina sobre a atividade de glutaminase pode se dar via inibição de mTOR (por ativação de AMPK). Além, curiosamente, seu efeito foi mais pronunciado em células com maior expressão de GAC. Novos ensaios com *knockdown* de AMPK α e uso de ativadores e inibidores específicos de AMPK precisam ser realizados para melhor se estabelecer o *link* entre AMPK e glutaminases.

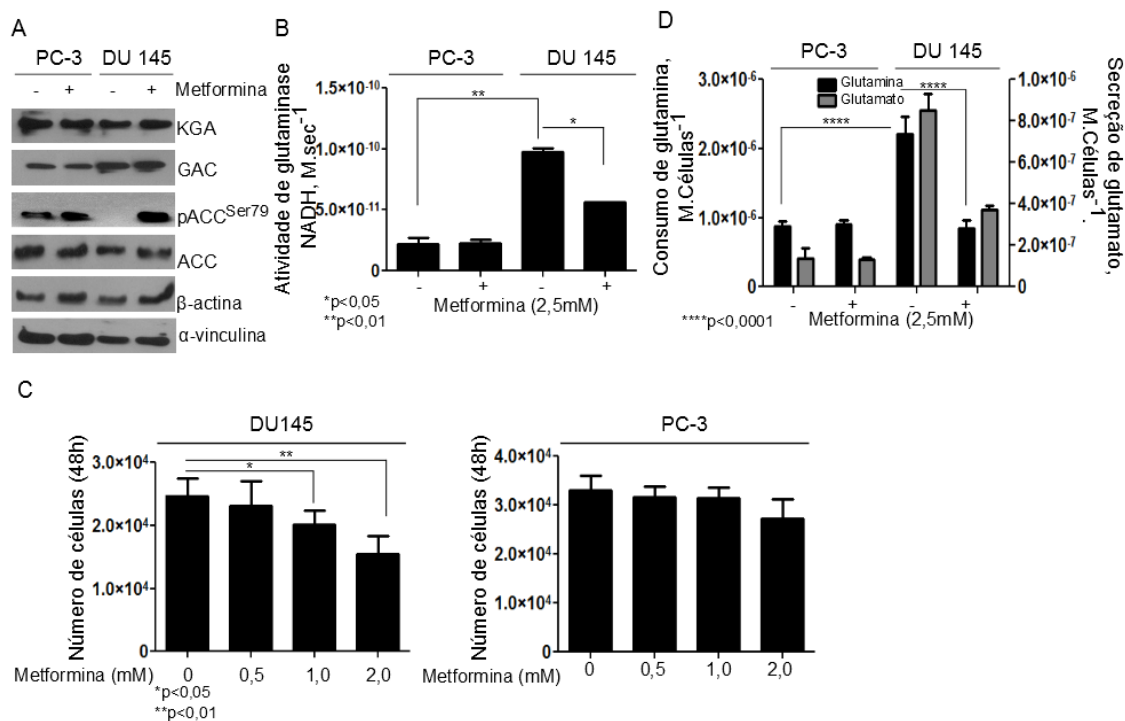


Figura 23 - Ativação de AMPK, via metformina, levou à redução do metabolismo glutaminolítico em DU145. *Western blot* (A), medida da atividade de glutaminase de lisado celular total (B), curva de crescimento (C) e dosagem do consumo de glutamina e secreção de glutamato de PC-3 e DU145 em face ao tratamento com metformina (D).

6. CONCLUSÕES

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é altamente conservada e empregada pelas células para a resposta à fatores de crescimento. A ligação de fatores de crescimento ao seu receptor de superfície leva à ativação da PI3K, resultando na fosforilação dos lipídeos fosfatidilinositol da membrana plasmática. Esta ação leva ao recrutamento e ativação de efetores que vão atuar na cascata de sinalização, em particular a serina/treonina quinase Akt e mTOR. A ativação desta via suporta a biosíntese através do aumento da expressão de transportadores de nutrientes tais como glicose e aminoácidos. No epicentro do metabolismo celular está TOR (*target of rapamycin*), uma serina/treonina quinase altamente conservada de leveduras a humanos. Em células de mamíferos, mTOR integra vários estímulos para regular o crescimento celular, metabolismo e envelhecimento. mTOR existe em dois complexos funcional e estruturalmente relacionados, mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC1 compreende as proteínas mTOR, Raptor, Deptor, Pras40, tti1/tel 2 e mLST8 e possui como funções principais a regulação da síntese protéica, biogênese ribossomal, biogênese lisossomal, captação de nutrientes e autofagia em resposta a fatores de crescimento, aminoácidos e energética celular.

Atualmente, sabe-se que para se obter completa ativação do complexo mTORC1, uma congregação de *inputs*, tais como glicose, glutamina, aminoácidos e fatores de crescimento são necessários. As Rag GTPases ativam mTORC1 em resposta a aminoácidos, direcionando-o para a superfície dos lisossomos. Na ausência de aminoácidos, Rag A/B está carregada com GDP e Rag C/D com GTP, conformação incapaz de se ligar e ativar mTORC1. A adição de aminoácidos induz a mudança de GDP para GTP em Rag A/B e a conversão de GTP a GDP em Rag C/D permitindo ao heterodímero se ligar e recrutar mTORC1 ao lisossomo. Uma vez no lisossomo, mTORC1 é ativado pela interação direta com Rheb, a GTPase responsável pela transdução do sinal emitido externamente pelos fatores de crescimento. Recentemente foi demonstrado que a glutaminólise medeia a translocação para lisossomos e ativação de mTORC1 dado que este processo é responsável pelo carregamento de Rag B com GTP. Outro trabalho mostrou que mTOR é capaz de sentir o estresse metabólico derivado da privação de glicose e glutamina em um mecanismo independente de Rag, AMPK e TSC2, e dependente do complexo TTT-RUVBL1/2. Tal mecanismo controla a localização lisossomal de mTOR e sua dimerização.

Recentemente, foi também mostrado que mTOR promove a anaplerose glutaminolítica por meio da ativação da Glutamato Desidrogenase (GDH), em um mecanismo que envolve a repressão transcricional de Sirt4, uma sirtuina mitocondrial que regula negativamente a atividade de GDH controlando seu status de ADP-ribosilação. Dado o papel central de mTOR em controlar os processos de crescimento e proliferação celular e sua já demonstrada sensibilidade ao *status* glutaminolítico celular, nós hipotetizamos que esta quinase poderia controlar a atividade da enzima glutaminase, primeira na via de degradação da glutamina.

Para verificar tal hipótese, interferimos com a via da PI3K/Akt/mTOR em três pontos críticos: com o *knockdown* de seu regulador negativo mais *upstream*, PTEN; com a inibição química de PI3K; com a inibição química de mTOR e sua estimulação constituída através do *knockdown* estável ou *knockout* de seu regulador negativo TSC2, assim como pela inibição de mTOR pela supressão de glicose, glutamina e fatores de crescimento. Com todos os tratamentos pudemos verificar uma relação positiva entre ativação de mTOR e ativação de glutaminase de lisado total de células de tumor de mama MDA-MB 231, assim como de células normais de diferentes origens, implicando fortemente este complexo na regulação da atividade desta enzima (Figura 24). Em adição, verificamos que mTOR afeta ambas as isoformas GAC e KGA. Nenhum dos tratamentos afetou as mesmas em seus níveis protéicos, sugerindo que a alteração da atividade se dá em nível pós-traducional ou algum outro tipo de interação proteína-proteína que envolva um ligante regulado por mTOR (Apêndice 1, tabelas 3 e 4 – predições de modificações pós-traducionais em KGA e GAC feitas com o uso do algoritmo *ExPASy Proteomic Server* (<http://www.expasy.org/tools/>)).

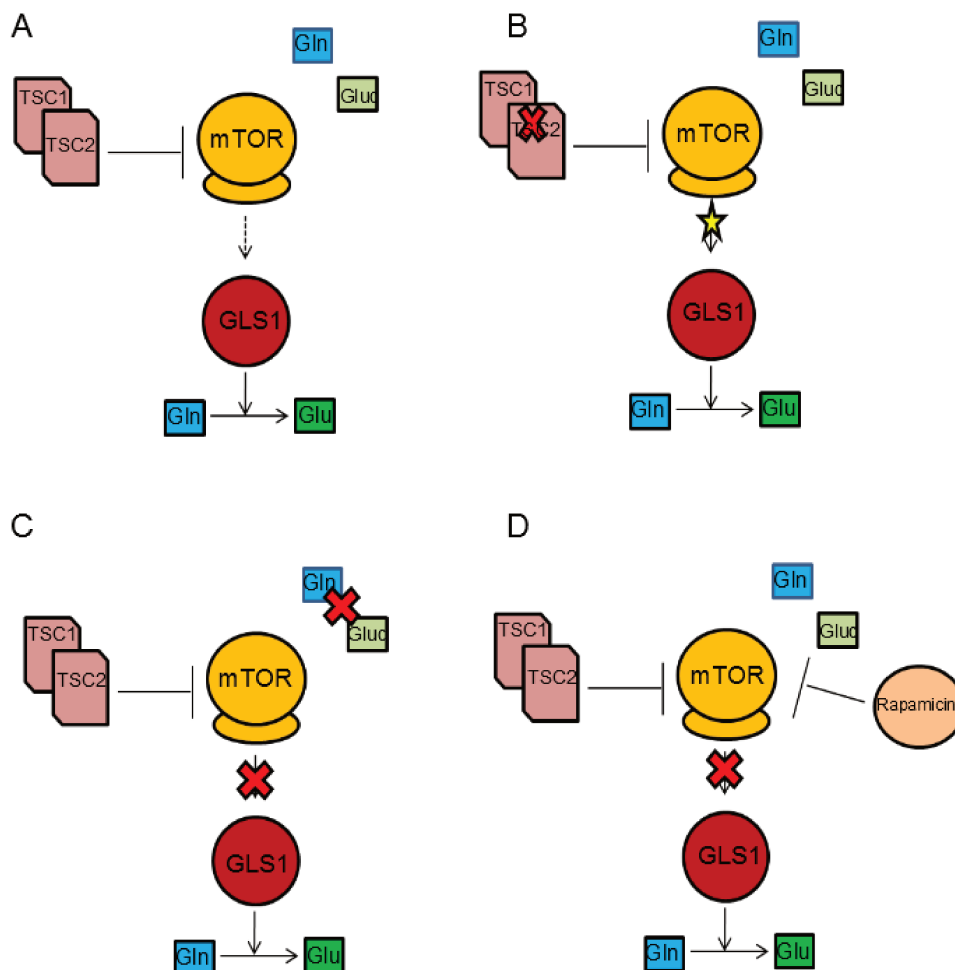


Figura 24 – mTOR regula positivamente a atividade de glutaminase. (A) Regulação da atividade de glutaminase via mTOR. (B) *Knockdown* de TSC2 levou a aumento da atividade de glutaminase. Privação de glicose e glutamina (C) ou tratamento com rapamicina (D), levaram a redução da atividade de glutaminase. mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; TSC, *tuberous sclerosis*; GLS1, *glutaminase 1*; Gln, *glutamine*; Glu, *glutamate*; Gluc, *Glucose*. X em vermelho = inibição/privação/inativação. Estrela em amarelo = ativação.

A proteína quinase AMP-ativada (AMPK-*AMP-activated Kinase*) é uma proteína heterotrimérica altamente conservada que desempenha um papel central na regulação da bioenergética e homeostase celular. Em situações de níveis aumentados de AMP:ATP, como a desencadeada pela privação de nutrientes ou hipóxia, AMPK fosforila o complexo TSC1-TSC2, de uma forma LKB1-dependente, para promover a inibição de mTOR e da biossíntese de lipídios pela acetil-Coenzima A carboxilase. Recentemente, foi mostrado que AMPK negativamente regula a glicólise aeróbica (efeito Warburg) em células tumorais e suprime o crescimento do tumor *in vivo*. O mesmo trabalho mostra que o *knockout* da subunidade α (subunidade catalítica de AMPK) acelera a linfomagenese induzida por Myc

e que a inativação de AMPK α em células transformadas e não transformadas promove uma mudança metabólica para a glicólise aeróbica aumentando a alocação do carbono glicolítico em lipídeos e acúmulo de biomassa. Outra publicação recente mostrou que diversas linhagens dependentes de glutamina (por superexpressão de Myc por exemplo) são mais sensíveis ao tratamento com metformina. Outro grupo mostrou que a droga metformina, um inibidor do complexo I da cadeia de transporte de elétrons, e desta maneira, ativador indireto de AMPK, é capaz de alterar o metabolismo glicolítico oxidativo para glutaminolítico redutivo em células tumorais. Neste trabalho, foram comparadas três linhagens de câncer de próstata, PC-3, LNCap e DU145. Verificou-se que a sensibilidade à metformina estava diretamente ligada ao *switch* metabólico destas células que passavam a ter menor contribuição do carbono glicolítico e maior contribuição do carbono glutaminolítico na formação de citrato, além de que a maior sensibilidade à metformina estava diretamente ligada ao maior consumo de glicose e secreção de lactato. Estes últimos trabalhos nos levaram a especular que tais alterações metabólicas (assim como o efeito de metformina) poderiam estar relacionadas com a atividade de glutaminase destas células e que a mesma pudesse também estar sendo regida por AMPK.

Para avaliar tais hipóteses, primeiramente, confirmamos que PC3 e DU145 possuem diferentes requerimentos nutricionais, com a primeira sendo mais dependente de glicose e a segunda de glutamina para seu crescimento. Curiosamente, DU145 apresentou maior nível protéico de GAC do que PC3, além de maior sensibilidade ao inibidor de glutaminase BPTES, e à metformina. Mais, verificamos que metformina não afetou o nível protéico das isoformas, mas levou à diminuição da atividade de glutaminase (enquanto que, conforme esperado, ativou o efector *downstream* de AMPK, ACC). Estes dados sugerem que AMPK possa afetar a atividade de glutaminase de maneira negativa, o que poderia se dar via inibição de mTOR. Tais dados precisam ser explorados em maiores detalhes com inibidores específicos de AMPK assim como através da geração de células com *knockdown* de AMPK α .

7. PERSPECTIVAS

Nossos resultados mostram que mTORC1 é um regulador positivo da atividade de KGA e GAC. Sua ação, entretanto, não envolve alterações nos níveis protéicos das glutaminases. Para investigar se o mecanismo dessa ativação envolve modificações pós traducionais, diretas ou indiretas, pretendemos realizar ensaios de imunoprecipitação de GAC e KGA em condições de ativação/inibição de mTOR seguida de *western blot* com anticorpos anti-acetil lisina, anti-Tirosina/Serina/Threonina fosforilada, anti-sumoilação ou anti-ubiquitina. Os imunoprecipitados também serão avaliados por espectrometria de massas para a busca de alterações pós-traducionais. Além disso pretendemos também realizar ensaios de dosagem de atividade de glutaminase de lisado celular total previamente tratado com fosfatase alcalina com o intuito de verificarmos se o tratamento leva à redução da atividade de glutaminase o que seria um indicativo de dependência de fosforilação para atividade. Ainda nesse sentido, pretendemos também avaliar em ensaios de dosagem de atividade de glutaminase de células tratadas com rapamicina por períodos curtos, como 15 minutos por exemplo, dado que modificações pós-traducionais do tipo fosforilação por exemplo, deveria ser evidenciada em tempos curtos de estímulo/tratamento.

Para reforçar o papel de mTOR sobre a atividade de glutaminase, vamos gerar linhagens celulares com *knockdown* estável das *small* GTPases Rheb, RagA e RagB, ou com superexpressão de RagB e seu mutante constitutivamente ativo RagBQ99L, incapaz de hidrolisar de GTP, e avaliar a atividade de glutaminase destas células. Ainda com o intuito de averiguar o mecanismo de ação de mTOR sobre a atividade das glutaminases, pretendemos realizar ensaios de imunofluorescência em condições de ativação/inibição de mTOR, com marcadores de lisossomo e mitocôndria para verificar se existe co-localização de mTOR com GAC ou KGA. Por fim, a ação de mTOR sobre as glutaminase será avaliada por métodos de metabolômica (RMN e GC-MS) após tratamento das células com inibidores e ativadores da via. O objetivo será avaliar o nível de glutamina e de derivados do seu metabolismo tais como glutamato, α -ceto-glutarato, glutationa, etc.

Uma vez que já têm sido reportada a ação de Myc sobre os níveis protéicos de GLS1, e é sabido que este fator de transcrição encontra-se *down stream* da via da PI3K, é de nossos interesse avaliar se a ação de mTOR sobre a atividade das glutaminases é via Myc.

Trabalhos recentes publicados sobre linhagens celulares de câncer de próstata indicam que sensibilidade das mesmas à droga metformina parece estar ligado ao metabolismo glutaminolítico das mesmas. Confirmamos tais achados e verificamos que este metabolismo está aparentemente diretamente ligado à enzima glutaminase, mais especificamente à isoforma GAC. Mais, o mecanismo aparenta envolver AMPK. Estudos diretos sobre esta quinase (com inibidores químicos específicos e *knockdown*) precisam ser realizados para se estabelecer a conectividade.

8. REFERÊNCIAS

1. KIM, J.W.; DANG, C.V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res*; **66**: 8927-8930, 2006.
2. WARBURG, O. Uber den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klin Wochenschr Berl*; **4**: 534-536, 1925.
3. WARBURG, O. On the origin of cancer cells. *Science*; **123**: 309-314, 1956.
4. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; **144**(5): 646-674, 2011.
5. DE BERARDINIS, R.J.; SAYED, N.; DITSWORTH, D.; THOMPSON, C.B. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev*; **18** (1): 54-61, 2008.
6. DE BERARDINIS, R.J.; CHENG, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*; **29**: 313-324, 2010.
7. VANDER HEIDEN, M.G.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*; **324** 1024-33, 2009.
8. DE BERARDINIS, R.J.; MANCUSO, A.; DAIKHIN, E.; NISSIM, I.; YUDKOFF, M.; WEHRLI, S.; THOMPSON, C. B. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci*; **104**: 19345-19350, 2007.
9. ELGADI, K.M.; MEGUID, R.A.; QIAN, M.; SOUBA, W.W.; ABCOUWER, S.F. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol. Genomics*; **1**: 51-62, 1999.
10. PORTER, L.D.; IBRAHIM, H.; TAYLOR, L.; CURTHOYS, N.P. Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiol. Genomics*; **9**: 57-66, 2002.
11. 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.; AMBROSIO, A.L. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism *Proc Natl Acad Sci*; **109**(4): 1092-1097, 2012.
12. PÉREZ-GÓMEZ, C.; MATÉS, J.M.; GÓMEZ-FABRE, P.M.; DEL CASTILLO-OLIVARES, A.; ALONSO, F.J.; MÁRQUEZ, J. Genomic organization and

- transcriptional analysis of the human L-glutaminase gene. *Biochem. J.*; **370**: 771–784, 2003.
13. TIAN, K.; WANG, Y. AND XU H. *WTH3* is a direct target of the p53 protein *British Journal of Cancer.*; **96**:1579–1586, 2007.
 14. HU W., ZHANG C., WU RUI., SUN Y., LEVINE A., FENG Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci.* **107**(16):7455-60 2010.
 15. FRANKE, T.F.; HORNIK, C.P.; SEGEV, L.; SHOSTAK, G.A.; SUGIMOTO, C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*; **22**: 8983–8998, 2003.
 16. DEBERARDINIS, R.J.; LUM, J.J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C.B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*; **7** (1): 11-20, 2008.
 17. BARATA, J.T.; SILVA, A.; BRANDAO, J.G.; NADLER, L.M.; CARDOSO, A.A.; BOUSSIOTIS, V.A. Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.*; **200**: 659–669, 2004.
 18. EDINGER, A.L. & THOMPSON, C.B. Akt maintains cell size and survival by increasing mtor-dependent nutrient uptake. *Mol. Biol. Cell*; **13**: 2276–2288, 2002.
 19. WIEMAN, H.L.; WOFFORD, J.A.; RATHMELL, J.C. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol. Biol. Cell*; **18**: 1437–1446, 2007.
 20. XU, R.H.; PELICANO, H.; ZHANG, H.; GILES, F.J.; KEATING, M.J.; HUANG, P. Synergistic effect of targeting mtor by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells. *Leukemia*; **19**: 2153–2158, 2005.
 21. PLAS, D.R.; TALAPATRA, S.; EDINGER, A.L.; RATHMELL, J.C.; THOMPSON, C.B. Akt and Bcl-xl promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *J. Biol. Chem.*; **276**: 12041–12048, 2001.
 22. RATHMELL, J.C.; FOX, C.J.; PLAS, D.R.; HAMMERMAN, P.S.; CINALLI, R.M.; THOMPSON, C.B. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol. Cell. Biol.*; **23**: 7315–7328, 2003.
 23. ELSTROM, R.L.; BAUER, D.E.; BUZZAI, M.; KARNAUSKAS, R.; HARRIS, M.H.; PLAS, D.R.; ZHUANG, H.; CINALLI, R.M.; ALAVI, A.; RUDIN, C.M.;

- THOMPSON, C.B. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.*; **64**: 3892–3899, 2004.
24. BAUER, D.E., HATZIVASSILIOU, G., AO, F., ANDREADIS, C., AND THOMPSON, C.B. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*; **24**: 6314–6322, 2005.
 25. CHANG, Y.; WANG, J.; LU, X.; THEWKE, D.P.; MASON, R.J. J. KGF induces lipogenic genes through a PI3K and JNK/SREBP-1 pathway in H292 cells. *Lipid Res.*; **46**: 2624–2635, 2005.
 26. DURÁN, R.V.; OPPLIGER, W.; ROBITAILLE, A.M.; HEISERICH, L.; SKENDAL, R.; GOTTLIEB, E.; HALL, M.N. Glutaminolysis activates Rag-mtorc1 signaling. *Mol Cell*; **47**(3): 349–358, 2012.
 27. KIM, S.G.; HOFFMAN, G.R.; POULOGIANNIS, G.; BUEL, G.R. JANG, Y.J.; LEE, K.W.; KIM, B.Y.; ERIKSON, R.L.; CANTLEY, L.C.; CHOO, A.Y.; BLENIS. Metabolic stress controls mtorc1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. *J. Mol. Cell*; **48**(1): 172–185, 2013.
 28. CSIBI, A.; FENDT, S.M.; LI, C.; POULOGIANNIS, G.; CHOO, A.Y.; CHAPSKI, D.J.; JEONG, S.M.; DEMPSEY, J.M.; PARKHITKO, A.; MORRISON, T.; HENSKE, E.P.; HAIGIS, M.C.; CANTLEY, L.C.; STEPHANOPOULOS, G.; YU, J.; BLENIS. The mTORC1 Pathway Stimulates Glutamine Metabolism and Cell Proliferation by Repressing SIRT4. *J. Cell*; **153**(4): 840–854; 2013.
 29. GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mtor. *Genes Dev.*; **15**: 807–826, 2001.
 30. HAWLEY, S.A., BOUDEAU, J., REID, J.L., MUSTARD, K.J., UDD, L., MAKELA, T.P., ALESSI, D.R., AND HARDIE, D.G. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* **2**: 28.2003.
 31. PAPANDREOU, I.; CAIRNS, R.A.; FONTANA, L.; LIM, A.L.; DENKO, N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.*; **3** (3): 187–197, 2006.
 32. ADHIKARY, S. & EILERS, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*; **6**: 635–645, 2005.

33. MARQUEZ, J.; OLIVA, A.R.L.; MATE'S, J.M.; SEGURA, J.A.; ALONSO, F.J. Glutaminase: A multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochemistry International*, **48**: 465–471; 2006.
34. MARQUEZ SHIM, H.; DOLDE, C.; LEWIS, B.C.; WU, C.S.; DANG, G.; JUNGSMANN, R.A.; DALLA-FAVERA, R.; DANG, C.V. C-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **94**: 6658–6663, 1997.
35. HARDIE, D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 774–785, 2007.
36. VIZÁN, P. ET AL. Characterization of the metabolic changes underlying growth factor angiogenic activation: identification of new potential therapeutic targets. *Carcinogenesis* **30**, 946–52 (2009).
37. BUZZAI, M.; BAUER, D.E.; JONES, R.G.; DEBERARDINIS, R.J.; HATZIVASSILIOU, G.; ELSTROM, R.L.; THOMPSON, C.B. The glucose dependence of Akt transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene*; **24**: 4165–4173, 2005.
38. GORDAN, J.D. & SIMON, M.C. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr. Opin. Genet. Dev.*; **17**: 71–77, 2007.
39. KIM J.W, DANG C.V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*; **30**: 142–50, 2005.
40. WISE, D.R.; DEBERARDINIS, R.J. MANCUSO, A.; SAYED, N.; ZHANG, X.Y.; PFEIFFER, H.K.; NISSIM, I.; DAIKHIN, E.; YUDKOFF, M.; MCMAHON, S.B.; THOMPSON, C.B. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **105**: 18782–18987, 2008.
41. SELTZER, M.J.; BENNETT, B.D.; JOSHI, A.D.; GAO, P.; THOMAS, A.G.; FERRARIS, D.V.; TSUKAMOTO, T.; ROJAS, C.J.; SLUCHER, B.S.; RABINOWITZ, J.D.; DANG, C.V.; RIGGINS, G.J.; Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res.*; **70**: 8981–8787, 2010.
42. SHANWARE, N.P.; MULLEN, A.R.; DEBERARDINIS, R.J.; ABRAHAM, R.T. Glutamine: pleiotropic roles in tumor growth and stress resistance. *J. Mol. Med.*; **89**(3): 229–236, 2011.
43. YAN H, PARSONS D.W, JIN G, ET AL. *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N Engl J Med*; **360**: 765–73, 2009.

44. KING A, SELAK M.A, GOTTLIEB E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*; **25**:4675-82, 2006.
45. HARTONG D.T, DANGE M, MCGEE T.L, BERSON E.L, DRYJA T.P, COLMAN R.F. Insights from retinitis pigmentosa into the roles of isocitrate dehydrogenases in the Krebs cycle. *Nat Genet*; **40**:1230-4, 2008.
46. DANG L, WHITE D.W, GROSS S, BENNETT B.D, BITTINGER M.A, DRIGGERS EM, ET AL. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*; **462**:739–44, 2009.
47. WARD P.S, PATEL J, WISE D.R, ABDEL-WAHAB O, BENNETT B.D, COLLER H.A, ET AL. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer cell*; **17**:225–34, 2010.
48. CRAIG B. THOMPSON. Metabolic Enzymes as Oncogenes or Tumor Suppressors. *N. Engl. J. Med.* **360**(8):813-5, 2009.
49. FERREIRA A.P, CASSAGO A, GONÇALVES K. DE A, DIAS ., ADAMOSKI D, ASCENÇÃO C.F, HONORATO R.V, DE OLIVEIRA J.F, FERREIRA I.M, FORNEZARI C, BETTINI J, OLIVEIRA P.S, PAES LEME A.F, PORTUGAL R.V, AMBROSIO A.L, DIAS S.M. Active glutaminase C self assemble into a super tetrameric oligomer wich can be disrupted by an allosteric inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. **288**(39):28009-20, 2013.
50. CURTHOYS, N. P. & WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual review of nutrition*. **15**, 133–59, 1995.
51. GÓMEZ-FABRE, P. M. ET AL. Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *The Biochemical journal*; **345**: 365–75, 2000.
52. LABOW, B. I., SOUBA, W. W. & ABCOUWER, S. F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. *The Journal of nutrition*; **131**: 2467S–74, 2001.
53. MOSAVI, L. K., CAMMETT, T. J., DESROSIERS, D. C. & PENG, Z.-Y. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**:1435–48, 2004.
54. MULVEY, C. M. ET AL. Subcellular proteomics reveals a role for nucleo-cytoplasmic trafficking at the DNA replication origin activation checkpoint. *Journal of proteome research* **12**:1436–53, 2013.

55. OLALLA, L. *ET AL.* Expression of the scaffolding PDZ protein glutaminase-interacting protein in mammalian brain. *Journal of neuroscience research*, **86**:281–92, 2008.
56. GOWDA, B., SAR, M., MU, X., CIDLOWSKI, J. & WELBOURNE, T. Coordinate modulation of glucocorticoid receptor and glutaminase gene expression in LLC-PK1-F+ cells. *The American journal of physiology*, **270**:C825–31, 1996.
57. DEBERARDINIS, R.J.; LUM, J.J.; THOMPSON, C.B. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth *J Biol Chem*; **281**: 37372–37380, 2006.
58. GARCIA-CAO, I.; SONG, M.S.; HOBBS, R.M.; LAURENT, G.; GIORGI, C.; DE BOER, V.C.; ANASTASIOU, D.; ITO, K.; SASAKI, A.T.; RAMEH, L.; CARRACEDO, A.; VANDER HEIDEN, M.G.; CANTLEY, L.C. ; PINTON, P.; HAIGIS, M.C.; PANDOLFI, P.P. Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell*; **149**(1): 49-62, 2012.
59. SOULARD, A.; COHEN, A.; HALL, M.N. TOR signaling in invertebrates. *Curr. Opin. Cell*; **21**(6): 826-836; 2009.
60. HARA, K.; MARUKI, Y.; LONG, X.; YOSHINO, K.; OSHIRO, N.; HIDAYAT, S.; TOKUNAGA, C.; AVRUCH, J.; YONEZAWA, K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*; **110**(2): 177-189; 2002.
61. INOKI, K.; KIM, J.; GUAN, K.L. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol*; **52**: 381-400; 2012.
62. ZINZALLA, V.; STACKA, D.; OPPLIGER, W.; HALL, M.N. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*; **144**(5): 757-768; 2011.
63. LAPLANTE, M.; SABATINI, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*; **149**(2): 274-293; 2012.
64. YIP, C.K.; MURATA, K.; WALZ, T.; SABATINI, D.M.; KANG, S.A. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell*; **38**(5): 768-774; 2010.
65. INOKI, K.; LI, Y.; XU, T.; GUAN, K.L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*; **17**(15): 1829-1834; 2003.
66. INOKI, K.; LI, Y.; ZHU, T.; WU, J.; GUAN, K.L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*; **4**(9): 648-657; 2002.

67. GONG, R.; LI, L.; LIU, Y.; WANG, P.; YANG, H.; WANG, L.; CHENG, J.; GUAN, K.L.; XU, Y. Crystal structure of the Gtr1p-Gtr2p complex reveals new insights into the amino acid-induced TORC1 activation. *Genes Dev.*; **25** (16): 1668-1673; 2011.
68. SANCAK, Y.; PETERSON, T.R.; SHAUL, Y.D.; LINDQUIST, R.A.; THOREEN, C.C.; BAR-PELED, L.; SABATINI, D.M. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*; **320**(5882): 1496-1501; 2008.
69. EFEYAN A, ZONCU R, CHANG S, GUMPER I, SNITKIN H, WOLFSON R.L, KIRAK O, SABATINI D. Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature*, **493**(7434):679-83, 2013.
70. FAUBER, B.; BOILY, G.; IZREIG, S.; GRISS, T.; SAMBORSKA, B.; DONG, Z.; DUPUY, F.; CHAMBERS, C.; FUERTH, B.J.; VIOLLET, B.; MAMER, O.A.; AVIZONIS, D.; DEBERARDINIS, R.J.; SIEGEL, P.M.; JONES, R.G. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab.*; **17** (1): 113-124, 2013.
71. JAVESHGHANI, S.; ZAKIKHANI, M.; AUSTIN, S.; BAZILE, M.; BLOUIN, M.; TOPISIROVIC, I.; ST-PIERRE, J.; POLLAK, M. Carbon source and myc expression influence the antiproliferative actions of metformin. *Cancer Res.*; **72**(23): 6257-6267; 2012.
72. KIM, J.W.; TCHERNYSHYOV, I.; SEMENZA, G.L.; DANG, C.V. *Cell Metab.*; **3**: 177–185, 2006. KIM, J.W.; TCHERNYSHYOV, I.; SEMENZA, G.L.; DANG, C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.*; **3**: 177–185, 2006.
73. OSTHUS, R.C.; SHIM, H.; KIM, S.; LI, Q.; REDDY, R.; MUKHERJEE, M.; XU, Y.; WONSEY, D.; LEE, L.A.; DANG, C.V. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.*; **275**: 21797–21800, 2000.
74. ILIC, N.; UTERMARK, T.; WIDLUND, H.R.; ROBERTS, T.M. PI3K-targeted therapy can be evaded by gene amplification along the MYC-eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) axis. *Proc Natl Acad Sci.*; **108**(37):E699-708; 2011.
75. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; **227**: 680-685, 1970.

76. LIVAK, K. J. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta C_t}$. *Methods*; **25**: 402-408, 2001.
77. EFEYAN, A. AND SABATINI, D.M. Nutrients and growth factors in mTORC1 activation. *Biochemical Society Transactions*, **41(4)**:902-5, 2013.
78. HUMPHREY, S.J.; YANG, G.; YANG, P.; FAZAKERLEY, D.J.; STÖCKLI, J.; YANG, J.Y.; JAMES, D.E. Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metab.*; **17(6)**: 1009-1020; 2013.
79. FENDT, S.; BELL, E.; KEIBLER, M.; ET AL. Metformin decreases glucose oxidation and increases the dependency of prostate cancer cells on reductive glutamine metabolism. *Cancer Res.*; **73(14)**:4429-38; 2013.
80. CHOUDHARY, C.; KUMAR, C.; GNAD, F.; NIELSEN, M.L.; REHMAN, M.; WALTHER, T.; OLSEN, J.V.; MANN, M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science Express.*; **325(5942)**:834-40; 2009.
81. KALENDER, A.; SELVARAJ, A.; KIM, S.Y.; GULATI, P.; BRÛLÉ, S. VIOLLET, B. KEMP, B.E.; BARDEESY, N.; DENNIS, P.; SCHLAGER, J.J.; MARETTE, A.; KOZMA, S.C.; THOMAS, G. Metformin, Independent of AMPK, Inhibits mTORC1 in a Rad GTPase-Dependent Manner. *Cell Metabolism*; **11**:390-401; 2010.
82. SINNETT-SMITH, J. KISFALVI, K.; KUI, R.; ROZENGURT, E. Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: dependence on glucose concentration and role of AMPK. *Biochem Biophys Res Commun.*; **430(1)**:352-357; 2013.
83. NAKATANI, K.; THOMPSON, D.A.; BARTHEL, A.; SAKAUE, H.; LIU, W.; WEIGEL, R.J.; ROTH, R.A. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *Journal of Biological Chemistry*; **274**:21528-21532; 1999.
84. FRASER, M.; ZHAO, H.; LUOTO, K.R.; LUNDIN, C.; COACKLEY, C.; CHAN, N.; JOSHUA, A.M.; BISMAR, T.A.; EVANS, A.; HELLEDAY, T.; BRISTOW, R.G. PTEN Deletion in Prostate Cancer Cells Does Not Associate with Loss of RD51 Function: Implications for Radiotherapy and Chemotherapy. *Clin. Cancer Res*; **18(4)**: 2720; 2012.

85. ATCC® - The Essentials of Life Science Research. Cell Lines By Gene Mutation. 2014.
86. HOLLESTELLE, A.; ELSTRODT, F.; NAGEL, J.H.A.; KALLEMEIJN, W.W.; SCHUTTE, M. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase or RAS Pathway Mutations in Human Breast Cancer Cell Lines. *Mol Cancer*; **5**:195-201; 2007.
87. WARD, T.M.; OLSON, R.; PEGRAM, M.D.; GEYER C.E. PI3K in Breast Cancer. *Breast Cancer Symposium*; 2012.
88. KUANG, H.N; MARKS, J.R; CHI, J.T. Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type–Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia. *Plos Genetics*; **7(8)**; 2011.

APÊNDICE 1

PREDIÇÃO DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS EM KGA E GAC.

Tendo em vista os resultados apresentados, a atuação da via da PI3K/AKT/mTOR sobre as glutaminase parece ser em nível de modificação pós-traducional uma vez que nenhuma perturbação feita nesta via resultou em alteração dos níveis protéicos de KGA ou GAC, somente em atividade das mesmas. Já é descrito que KGA sofre degradação proteossômica induzido pela proteína *E3 ubiquitin ligase anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 APC/Cdh1* ⁽⁵⁸⁾ e que GAC possui um sítio de reconhecimento para acetilação ⁽⁸⁰⁾. Com o intuito de investigar possíveis sítios de sumoilação, acetilação, ubiquitinação e fosforilação em KGA e GAC, o algoritmo *Expasy Proteomic Server* (<http://www.expasy.org/tools/>) foi utilizado. Especificamente foram utilizadas as ferramentas: *NetAcet 1.0 Server* (para predição de sítios acetilados); *SUMOplot™ Analysis Program* (para predição de sítios sumoilados) e *NetPhos 2.0 Server, NetPhosK 1.0 Server e GPS – Group-Based Prediction System/phosphorilation* (para predição de sítios fosforilados). O critério de escolha dos possíveis sítios de fosforilação e as respectivas quinases foi o de *Score* maior que 4.0. As Tabelas 3 e 4 resumem as principais modificações pós-traducionais preditas.

Em KGA não foram preditos sítios de sumoilação, ubiquitinação ou acetilação. Quarenta e dois sítios de fosforilação por serina-treonina quinases da família AGC foram preditos. As quinases AGC que aparecem mais repetitivamente nesta análise são Akt e p70, quinases da via da PI3K/AKT/mTOR e SGK e PKC, quinases substrato de mTORC2. Já para GAC, foi predito um único sítio acetilado, na serina 2, e 13 sítios de fosforilação. As fosforilações preditas, novamente são, em sua maioria, sítios de reconhecimento de Akt, p70, SGK e PKC. Tais inferências corroboram nossa hipótese de que a via da PI3K/AKT/mTOR e mTORC2 possa atuar sobre as glutaminases.

Tabela 3. Predição de modificações pós traducionais em KGA.

Glutaminase	Modificação				
	Sumoilação	Ubiquitinação	Acetilação	Fosforilação	
				Quinase	Sítio
KGA	-----	-----	-----	PKC	T-53
				AGC/PKB	T-33
				AGC/PKG	S-73
				AGC/PKG	S-242
				AGC/PKG	S-274
				AGC/SGK	S-73
				AGC/SGK	S-428
				AGC/SGK	S-553
				AGC/AKT/AKT2	S-126
				AGC/AKT/AKT2	S-449
				AGC/AKT/AKT2	S-553
				AGC/PKB/PDK1	T-33
				AGC/PKC/Alpha	T-24
				AGC/PKC/Alpha	S-384
				AGC/PKC/Eta	T-24
				AGC/PKC/Eta	S-428
				AGC/PKC/Eta	S-511
				AGC/PKC/Iota	T-161
				AGC/PKC/Iota	S-237
				AGC/PKC/Iota	S-380
				AGC/PKG/PKG1	S-242
				AGC/RSK/p70	S-73
				AGC/RSK/p70	S-190
				AGC/RSK/p70	S-449
				AGC/GRK/BARK/GRK-3	T-433
				AGC/GRK/BARK/GRK-3	S-458
				AGC/GRK/GRK/GRK-4	T-456
				AGC/PKC/Alpha/PKCa	T-24
				AGC/PKC/Alpha/PKCb	S-380
				AGC/PKC/Eta/PKCe	T-24
				AGC/PKC/Eta/PKCe	S-73
				AGC/PKC/Eta/PKCh	T-228
				AGC/PKC/Eta/PKCh	S-242
				AGC/PKC/Iota/PKCz	T-161
				AGC/PKC/Iota/PKCz	S-237
				AGC/PKC/Iota/PKCz	S-380
				AGC/RSK/MSK/RSK5	S-77
				AGC/RSK/MSK/RSK5	S-171
				AGC/RSK/MSK/RSK5	S-274
				AGC/RSK/MSK/RSK5	S-314
				AGC/RSK/MSK/RSK5	S-384
				AGC/RSK/RSK/RSK1	S-87

Tabela 4. Predição de modificações pós traducionais em GAC.

Glutaminase	Modificação				
	Sumoilação	Ubiquitinação	Acetilação	Fosforilação	
				Quinase	Sítio
GAC	-----	-----	S-2	PKC	S-440
				AGC/PKC/Alpha/PKCb	S-309
				AGC/SGK	S-357
				AGC/SGK	S-522
				AGC/AKT/AKT2	S-55
				AGC/AKT/AKT2	S-378
				AGC/AKT/AKT2	S-481
				AGC/PKC/Alpha	S-313
				AGC/RSK/p70	S-2
				AGC/RSK/p70	S-119
				AGC/RSK/p70	S-378
				AGC/RSK/p70	S-522
				AGC/PKC/Alpha/PKCg	S-527

APÊNDICE 2

ALTERAÇÕES EM PROTEÍNAS DA VIA DA PI3K/AKT/MTOR E VIA DA AMPK NAS LINHAGENS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.

Tabela 5 – Alterações em proteínas das vias PI3K/Akt/mTOR e via da AMPK nas linhagens MDA-MB231, BJ5TA, NIH3T3, MEF, PC-3 e DU-145.

Célula	Proteína	Tipo de mutação/alteração	Referência
MDA-MB 231	PI3K	Não há	-NAKATANI, et.al; 1999 ⁽⁸³⁾ . -ATCC® - The Essentials of Life Science Research. Cell Lines By Gene Mutation, 2014 ⁽⁸⁵⁾ . -HOLLESTELLE, et. al; 2007 ⁽⁸⁶⁾ . -WARD, et. al; 2012 ⁽⁸⁷⁾ .
	PTEN	Não há	
	Akt	Elevada expressão de Akt3. <i>Wild type</i> para Akt1/2.	
	Mtor	Não há	
	S6K	Não há	
	AMPK	Não há	
BJ5TA	PI3K	Não há	-ATCC® - The Essentials of Life Science Research. Cell Lines By Gene Mutation, 2014 ⁽⁸⁵⁾ .
	PTEN	Não há	
	Akt	Não há	
	mTOR	Não há	
	S6K	Não há	
	AMPK	Não há	
NIH3T3	PI3K	Não há	-ATCC® - The Essentials of Life Science Research. Cell Lines By Gene Mutation, 2014 ⁽⁸⁵⁾ .
	PTEN	Não há	
	Akt	Não há	
	mTOR	Não há	
	S6K	Não há	
	AMPK	Não há	
MEF	PI3K	Não há	-ATCC® - The Essentials of Life Science Research. Cell Lines By Gene Mutation, 2014 ⁽⁸⁵⁾ .
	PTEN	Não há	
	Akt	Não há	
	mTOR	Não há	
	S6K	Não há	
	AMPK	Não há	

PC-3	PI3K	Não há	-FRASER, et. al; 2012 ⁽⁸⁴⁾ . -ATCC® - The Essentials of Life Science Research. Cell Lines By Gene Mutation, 2014 ⁽⁸⁵⁾ .
	PTEN	Nulo	
	Akt	Não há	
	mTOR	Não há	
	S6K	Não há	
	AMPK	Não há	
DU145	PI3K	Não há	-FRASER, et. al; 2012 ⁽⁸⁴⁾ . -ATCC® - The Essentials of Life Science Research. Cell Lines By Gene Mutation, 2014 ⁽⁸⁵⁾ .
	PTEN	Heterozigoto (apenas uma cópia de PTEN)	
	Akt	Não há	
	mTOR	Não há	
	S6K	Não há	
	AMPK	Não há	

ANEXO 1

DECLARAÇÃO CIBIO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Estudo das vias de sinalização celular que impactam na atividade da enzima glutaminase"

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(x) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. SMGD12,

Instituição: CNPEM/LNBio Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – Laboratório nacional de Biociências.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição:

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Cauelline Fernanda Rodrigues Pereira
Aluno: (nome completo)

Sandra Aulher
Orientador: (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança do CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Título do projeto: Estudos das vias de sinalização celular que impactam na atividade da enzima glutaminase

Pesquisador responsável: Sandra Martha Gomes Dias

Experimentador: Carolline Fernanda Rodrigues Ascensão

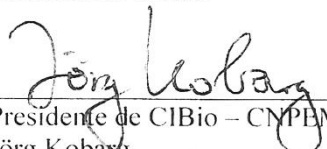
Nível do treinamento do experimentador: ☐ -Iniciação científica, ☒ -mestrado, ☐ -doutorado, ☐ -doutorado direto, ☐ -pós-doutorado, ☐ -nível técnico, ☐ -outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

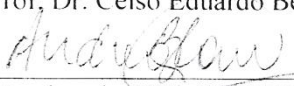
A proliferação celular comanda os processos de embriogênese e de crescimento do organismo, sendo essencial para a correta função de vários tecidos adultos. Apesar de ser importante para a homeostase do organismo, a sua desregulação compõe a força motriz do desenvolvimento tumoral. Somente nos últimos dez anos começou a ser evidenciada a relação entre as vias de tradução de sinais estimuladas por fatores de crescimento e a reorganização da atividade metabólica, a qual precisa priorizar a biossíntese e o aumento da biomassa, processos essenciais para a divisão celular. Em células tumorais, o consumo de glutamina é aumentando concomitante com o aumento da atividade de glutaminase nestas células. Três isoenzimas de glutaminase são expressas na maioria dos tecidos (*liver-type* glutaminase, *kidney-type* glutaminase e glutaminase C), todavia pouco se sabe sobre a necessidade específica de cada uma delas para o metabolismo tumoral. Resultados obtidos no laboratório onde esta proposta se insere indicam que glutaminase C é a isoforma mitocondrial, sendo esta, dentre as três isoformas, a mais responsiva ao ativador fosfato inorgânico. Mais, seus níveis de mRNA e protéicos são aumentados por soro fetal bovino e inibidos por um inibidor de NF-κB. Na utilização de um anticorpo específico para a GAC, especialmente formulado para este projeto, um padrão interessante revela o aparecimento de uma terceira banda mais pesada na linhagem de câncer de mama mais agressiva MDA-MB 231 em comparação com SKBR3 e epitélio normal HMEC. Esta banda também está presente na linhagem de câncer de próstata DU145 e ausente na linhagem PC-3. PC-3, diferente das outras, é PTEN-, possuindo a via da PI3K superestimulada. O objetivo deste projeto é o entendimento de quais vias de sinalização impactam na atividade de glutaminase de células proliferativas. De especial interesse para nós é a regulação dos níveis de mRNA, protéicos e da atividade da glutaminase C por elementos da via do NFκB, da PI3K e também da AMPK, um regulador dos níveis de energia celular.

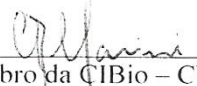
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 22/10/12.

Parecer final: ☒ -projeto aprovado, ☐ -projeto recusado, ☐ -projeto com deficiências, favor comentários anexo.


Presidente de CIBio – CNPEM-LNBio
Jörg Kobarg

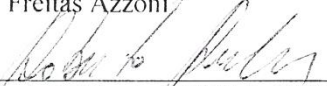

Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
Andrea Balan


Membro da CIBio – CNPEM -SGT
Carolina Barbosa Marini


Membro da CIBio da CNPEM -CTBE
Fabio Squina


Membro da CIBio da CNPEM -CTBE
Sindelia Freitas Azzoni


Membro da CIBio da CNPEM -CTBE
Roberto Ruller

ANEXO 2

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO



Ata da sessão pública de defesa de DISSERTAÇÃO para obtenção do título de MESTRA em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução, a que se submeteu a aluna CAROLLINE FERNANDA RODRIGUES ASCENÇÃO, RA 133540, orientada pela DRA. SANDRA MARTHA GOMES DIAS e coorientada pela DRA. MARILIA MEIRA DIAS.

Aos dezesseis dias de fevereiro do ano de dois mil e quatorze, às 14h00 horas, na Sala de Defesa, prédio da pós-graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pela Senhora Diretora do Instituto de Biologia, composta pelos Doutores: SANDRA MARTHA GOMES DIAS (Presidente e Orientador), Pesquisadora do Laboratório Nacional de Biociências, ADRIANA FRANCO PAES LEME, Pesquisadora do Laboratório Nacional de Biociências e JOSÉ ANDRÉS YUNES, Pesquisador do Centro Bolchini de Campinas, para analisar o trabalho da candidata CAROLLINE FERNANDA RODRIGUES ASCENÇÃO, apresentado sob o título: “Estudo das vias de sinalização celular que impactam na atividade da enzima glutaminase”. A Presidente declarou abertos os trabalhos, a seguir a candidata dissertou sobre o seu trabalho e foi arguida pela Comissão Julgadora. Terminada a exposição e a arguição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

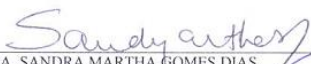
☒ APROVADA

☐ APROVADA CONDICIONALMENTE (ao atendimento das alterações sugeridas pela Comissão Julgadora especificadas no parecer anexo).

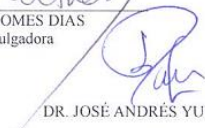
☐ REPROVADA (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora).

Para fazer jus ao título de MESTRA em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução, a versão final da DISSERTAÇÃO, considerada Aprovada ou Aprovada Condicionalmente devidamente conferida pela CPG da Unidade, deverá ser entregue à CPG dentro do prazo de 60 dias, a partir da data da defesa. De acordo com o previsto na Deliberação CONSU-A8/08, Artigo 35, parágrafo 1º, inciso II e parágrafo 2º, o aluno Aprovado Condicionalmente que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Comissão Central de Pós-Graduação da UNICAMP, conferindo título de validade nacional aos aprovados.

Nada mais havendo a tratar, a Sra. Presidente declara a sessão encerrada, sendo a ata lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pela Coordenadora da Comissão de Pós-graduação, com ciência da aluna.


DRA. SANDRA MARTHA GOMES DIAS
Presidente da Comissão Julgadora

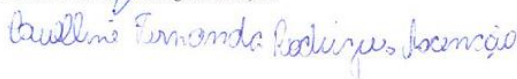

DRA. ADRIANA FRANCO PAES LEME


DR. JOSÉ ANDRÉS YUNES


Prof. Dr. MARCELO MENOSSI TEIXEIRA
Coordenador da CPPG-GBM


MARIA DE LOURDES FAGUNDES
Secretária de Pós-Graduação

Ciência da aluna Carolline Fernanda Rodrigues Ascenção:




Prof. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro
Coordenadora de Pós-Graduação/IB/UNICAMP
Matrícula 27165-3