



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALLINY CRISTINY DA SILVA BASTOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CELULAR
DA INTERAÇÃO DA ENZIMA GLUTAMINASE
COM A ENZIMA GLICOLÍTICA PIRUVATO
QUINASE M2**

**BIOCHEMICAL AND CELLULAR
CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION
OF THE ENZYME GLUTAMINASE AND THE
GLYCOLYTIC ENZYME PYRUVATE KINASE M2**

CAMPINAS
2021

ALLINY CRISTINY DA SILVA BASTOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CELULAR DA INTERAÇÃO DA ENZIMA
GLUTAMINASE COM A ENZIMA GLICOLÍTICA PIRUVATO QUINASE M2**

**BIOCHEMICAL AND CELLULAR CHARACTERIZATION OF THE
INTERACTION OF THE ENZYME GLUTAMINASE AND THE GLYCOLYTIC
ENZYME PIRUVATE KINASE M2**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na
Área de Genética Animal e Evolução.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of
the University of Campinas in partial fulfillment
of the requirements for the degree of Doctor in
Genetics and Molecular Biology, in the Area of
Animal Genetics and Evolution.*

Orientadora: Dra. Sandra Martha Gomes Dias

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ALLINY
CRISTINY DA SILVA BASTOS E
ORIENTADA PELA DRA. SANDRA
MARTHA GOMES DIAS.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

Bastos, Alliny Cristiny da Silva, 1991-
B297c Caracterização bioquímica e celular da interação da enzima glutaminase com a enzima glicolítica piruvato quinase M2 / Alliny Cristiny da Silva Bastos. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Sandra Martha Gomes Dias.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glutaminase. 2. Piruvato quinase. 3. Metabolismo. 4. Câncer. I. Dias, Sandra Martha Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biochemical and cellular characterization of the interaction of the enzyme glutaminase and the glycolytic enzyme pyruvate kinase M2

Palavras-chave em inglês:

Glutaminase

Pyruvate kinase

Metabolism

Cancer

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Sandra Martha Gomes Dias [Orientador]

Andre Luis Berteli Ambrosio

Gustavo Fernando Mercaldi

Juliana Helena Costa Smetana

Rafael Victório Carvalho Guido

Data de defesa: 28-05-2021

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0675-7250>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0442815918999450>

Campinas, 28 de maio de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Sandra Martha Gomes Dias

Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio

Dr. Gustavo Fernando Mercaldi

Dra. Juliana Helena Costa Smetana

Dr. Rafael Victório Carvalho Guido

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia.

Aos meus pais, Ernandes e Sonia, ao meu irmão Gabriel e ao meu companheiro da vida Fady. Tudo que sou e conquistei foi graças ao amor e incentivo de vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Ernades, Sonia e Gabriel, por sempre terem me motivado a ser uma pessoa melhor e por me apoiarem incondicionalmente.

Ao Fady, não existem palavras que possam expressar toda minha gratidão. Obrigada por ser meu porto seguro e maior incentivador quando eu duvidei que seria possível.

A Deus e Nossa Senhora, por toda proteção e força.

À minha orientadora, Dra. Sandra Dias, agradeço pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pelo conhecimento compartilhado, por ter aberto as portas para o LNBio/CNPEM, pela confiança, paciência e todo apoio na condução do meu doutorado.

Ao Dr. André Ambrósio e ao IFSC-USP, muito obrigada por toda colaboração e boa vontade em ajudar na realização deste trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Metabolismo Tumoral (PMT), por toda ajuda durante estes anos. Em especial agradeço a Dra. Alessandra Girasole pelo suporte técnico e Dra. Marília Dias pelo auxílio científico e amizade.

Ao grupo de Microscopia Eletrônica do LNNano, em especial ao Dr. Rodrigo Portugal e Dr. Antônio Borges, obrigada por toda colaboração.

À minha colega de trabalho e amiga Ana Carolina Mafra, por sempre ouvir meus questionamentos, pelas discussões ora intelectuais, ora descontraídas e por todo o companheirismo que seguirá pelas novas jornadas.

Ao Dr. Matheus Pinto, agradeço por compartilhar comigo sua experiência, por me motivar a seguir em frente e buscar novos desafios, por sempre estar disposto a ajudar, pela amizade e tantas histórias que levarei para a vida.

Aos meus amigos de longa data e aos amigos que fiz em Campinas, obrigada pelo carinho e por trazerem leveza para os meus dias.

Ao LNBio e CNPEM como um todo, pelo acesso a excelente infraestrutura e *facilities*.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço as agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Projeto: 870370/1997-9 - e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Projeto: 15/25832-4.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia.

“One of the lessons that I have learned in the different stages of my career is that science is not done alone. It is through talking with others and sharing that progress is made. (...) The ideas generated are not always the result of one person’s thoughts but of the interaction between people; new ideas quickly become part of collective consciousness. This is how science moves forward and we generate knowledge. ”

Dr Carol Greider, Nobel Prize in Physiology or Medicine.

RESUMO

Células neoplásicas compartilham características adquiridas durante o desenvolvimento tumoral essenciais para a progressão do câncer. Particularmente, a reprogramação do metabolismo tumoral é de suma importância para suprir a alta demanda energética e biossintética dessas células. As enzimas glutaminases (GLS) são peça-chave nesse processo. As GLS convertem a glutamina (GLN) em glutamato, que por sua vez, serve de substrato para formação de α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA). Assim, a GLN é usada como uma fonte anaplerótica de precursores metabólicos do TCA, permitindo a síntese acelerada de biomoléculas e ganho de agressividade tumoral. Dois genes (*GLS* e *GLS2*) expressam quatro isoformas de GLS. Neste trabalho estudamos as variantes de GLS, KGA e GAC, devido a sua importância na progressão de diversos tipos de cânceres. Essas isoformas apresentam estrutura molecular divididas em 3 domínios: domínio glutaminolítico central, domínio N-terminal e C-terminal. No domínio C-terminal da isoforma KGA são encontradas sequências de interação proteína-proteína do tipo *ankirin repeats* (ANK) e sequências do tipo LXXLL (*nuclear receptor box*, NRbox), normalmente encontradas em reguladores de fatores de transcrição do tipo receptores nucleares. O domínio C-terminal de GAC, em contrapartida, é menor e desestruturado. Tal estrutura molecular nos leva a crer que as isoformas de GLS interajam com outras proteínas e participem de vias bioquímicas distintas do metabolismo de GLN e potencialmente importantes para o fenótipo tumoral. Estudos de duplo-híbrido em levedura realizados previamente no laboratório identificaram a enzima glicolítica piruvato kinase M2 (PKM2) como um potencial parceiro destas isoformas. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de explorar a interação de GAC/KGA com PKM2 e aprofundar na descrição bioquímica dos achados, bem como em linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo. Expressamos PKM2 em sistema heterólogo, a purificamos e mostramos por anisotropia de fluorescência que a mesma interage diretamente com GAC com maior afinidade do que com KGA. A formação de filamentos de GAC induzidos pela incubação com fosfato inorgânico leva a perda da interação. Além disso, GAC em excesso molar leva a inibição da atividade de PKM2. A formação de um perfil diferencial de partículas de GAC+PKM2 foi observada por Microscopia Eletrônica, sendo um indicativo da formação do complexo. GAC e PKM2 endógenas e expressas ectopicamente em células de mamíferos co-precipitaram (Co-IP) e mostraram sinais de co-localização, como revelado por ensaio de Duolink PLA. A remoção de GLN levou a alteração no sinal de fluorescência de GAC para uma marcação filamentosa, ocasionando a perda de seu perfil disperso no citoplasma coerente com marcação mitocondrial na presença de GLN. Apesar dos resultados não mostrarem diretamente a filamentação vista em *in vitro*, os mesmos são compatíveis com estas estruturas. Verificamos que, como visto *in vitro*, a retirada de GLN do meio de cultivo celular levou a perda de sinal do Duolink e de Co-IP, indicativos de interação. Nossos resultados mostram que PKM2 é parceiro de interação de GAC *in vitro* e em células e que a interação não é favorecida pela filamentação induzida pela privação de GLN. Além disto, GAC diminui a atividade de PKM2 *in vitro*, implicando um papel de GAC na regulação da via glicolítica.

Palavras-chave: Glutaminase; PKM2; KGA; GAC; Metabolismo tumoral.

ABSTRACT

Neoplastic cells share characteristics acquired during tumor development that are essential for cancer progression. In particular, the reprogramming of tumor metabolism is extremely important to meet the high energy and biosynthetic demand of these cells. Glutaminase enzymes (GLS) are key in this process. GLS convert glutamine (GLN) into glutamate, which in turn serves as a substrate for the formation of α -ketoglutarate, an intermediate in the Tricarboxylic Acid (TCA) cycle. Thus, GLN is used as an anaplerotic source of TCA metabolic precursors, allowing the accelerated synthesis of biomolecules and tumor aggressiveness gain. Two genes (*GLS* and *GLS2*) express four GLS isoforms. In this work, we focus in the variants of GLS, KGA and GAC, due to their importance in the progression of several types of cancers. These isoforms have a molecular structure divided into 3 domains: central glutaminolytic domain, N-terminal and C-terminal domain. In the C-terminal domain of KGA are found protein-protein interaction sequences such as ankirin repeats (ANK) and sequences of the LXXLL type (nuclear receptor box, NRbox), normally found in regulators of transcription factors such as nuclear receptors. The C-terminal domain of GAC, by contrast, is smaller and unstructured. Such molecular structure leads us to believe that GLS isoforms interact with other proteins and participate in biochemical pathways distinct from GLN metabolism and potentially important for the tumor phenotype. Yeast double-hybrid studies previously performed in the laboratory identified the glycolytic enzyme pyruvate kinase M2 (PKM2) as a potential partner of these isoforms. Thus, the aim of this work was to explore the interaction of GAC/KGA with PKM2 and deepen the biochemical description of the findings, as well as in triple negative breast cancer cell lines. We express PKM2 in a heterologous system, purify it, and show by fluorescence anisotropy that it interacts directly with GAC with greater affinity than with KGA, and that the formation of GAC filaments larger than tetramers induced by incubation with inorganic phosphate, leads to loss of interaction. Furthermore, molar excess GAC leads to inhibition of PKM2 activity. The formation of a differential profile of GAC+PKM2 particles was observed by Electron Microscopy, being a possible indication of the formation of the complex. Endogenous and ectopically expressed GAC and PKM2 in mammalian cells co-immunoprecipitated (Co-IP) and showed signs of colocalization, as revealed by Duolink PLA assay. Removal of GLN led to a change in the GAC fluorescence signal to a filamentous signal, with a shift in a scattered cytoplasmic profile consistent with mitochondrial signal in the presence of GLN. Although the results do not directly show the filamentation seen *in vitro*, they are compatible with these structures. We verified that, as seen *in vitro*, the removal of GLN from the cell culture medium led to loss of Duolink and Co-IP signal, indicative of interaction. Our results show that PKM2 is an interaction partner of GAC *in vitro* and in cells and the interaction is not favored by filamentation induced by GLN deprivation. Furthermore, GAC decreases PKM2 activity *in vitro*, implying a role for GAC in regulating the glycolytic pathway.

Keywords: Glutaminase; PKM2, KGA; GAC; Tumor metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Participação da glicólise e glutaminólise no metabolismo tumoral.	20
Figura 2. Análise de microscopia eletrônica da polimerização de GAC na presença de K_2HPO_4	22
Figura 3. Esquema da organização estrutural das isoformas de glutaminase KGA e GAC. .	24
Figura 4. Formação de estruturas filamentosas intramitocondriais de GLS na ausência de glutamina.	26
Figura 5. Esquema do ensaio de duplo híbrido em levedura (Y2H).	28
Figura 6. Dados prévios sobre a interação de KGA/GAC com PKM2.	29
Figura 7. A enzima piruvato quinase atua no último passo da via glicolítica.	30
Figura 8. Esquema representativo dos domínios de PKM2.	32
Figura 9. Modulação alostérica do tetrâmero inativo (estado T) e ativo (estado R) de PKM2.	34
Figura 10. Domínios de hKGA e mGAC utilizados no estudo.	41
Figura 11. Ensaio de anisotropia de fluorescência.	46
Figura 12. Ensaio de atividade enzimática de glutaminase.	49
Figura 13. Ensaio de atividade enzimática de Piruvato Kinase.	50
Figura 14. Ensaio de Duolink-PLA.	59
Figura 15. Purificação das proteínas GAC, KGA e PKM2.	62
Figura 16 Purificação das construções de glutaminase.	63
Figura 17. Obtenção dos complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA.	64
Figura 18. SDS PAGE do ensaio de Pull Down.	65
Figura 19 Anisotropia de fluorescência de GAC marcada com FITC (aa128-598) titulada com PKM2.	67
Figura 20. Anisotropia de fluorescência de KGA (aa124-669) titulada com PKM2.	68
Figura 21. Anisotropia de fluorescência das construções de GLS-FITC tituladas com PKM2.	69
Figura 22. Anisotropia de fluorescência de Domínio Catalítico (aa221-550) titulada com PKM2.	70
Figura 23. Ensaio de DLS do Domínio Catalítico de GLS.	71
Figura 24. Ensaio de SEC-MALS de PKM2, GAC e KGA.	73
Figura 25. Ensaio de DLS das proteínas individuais e dos complexos PKM2 + GAC e PKM2 + KGA.	75
Figura 26. Ensaio de DLS de PKM2+GAC na presença dos aditivos F-1,6-BP e Pi.	77
Figura 27. Atividade enzimática de GAC na presença de PKM2.	78
Figura 28. Taxa de ativação (%) da atividade de GAC por PKM2.	79
Figura 29. Atividade enzimática de PKM2.	79
Figura 30. Eletroforese do <i>crosslinking</i> químico das proteínas com DSS para espectrometria de massas.	80
Figura 31. Cristais obtidos da condição PKM2+GAC nas diferentes condições avaliadas. ..	83
Figura 32. Microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo e frequência de distribuição de PKM2.	85
Figura 33. Microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo e frequência de distribuição de GAC.	86
Figura 34. Microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo e frequência de distribuição do complexo PKM2+GAC.	87
Figura 35. Partículas visualizadas por microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo quando amostras do complexo PKM2+GAC foram avaliadas.	88
Figura 36. Microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo e frequência de distribuição do complexo PKM2+GAC na presença de F-1,6-BP.	89
Figura 37. Perfil em tamanho (nm) das populações de partículas encontradas nas grids de Microscopia Eletrônica.	90

Figura 38. Modelo representativo proposto com base no perfil diferencial encontrado do complexo PKM2+GAC e na estrutura cristalográfica das proteínas.	91
Figura 39. Análise da expressão endógena de GAC, KGA e PKM2 em linhagens celulares de câncer de mama.	92
Figura 40. Ensaio de co-imunoprecipitação endógena e com co-expressão das proteínas fusionadas a cauda imunogênica.	94
Figura 41. Imunofluorescência de PKM2-Flag (vermelho) e KGA e GAC-V5 (verde).	96
Figura 42. Fracionamento celular na linhagem MDA-MB-231.	97
Figura 43. Duolink-PLA expressando PKM2-Flag e GAC-V5 e expressão endógena das proteínas.	98
Figura 44. A filamentação de glutaminase leva a perda da interação com PKM2.	104
Figura 45. Interação de PKM2 com GAC leva a perda de sua atividade piruvato quinase.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das proteínas hKGA, mGAC e hPKM2 expressas no vetor pET-28a(+).	40
Tabela 2. Compostos moduladores de GLS e PKM2 avaliados para a formação do complexo.	48
Tabela 3. Primers utilizados para a análise de expressão gênica.	54
Tabela 4 Diluição dos anticorpos primários utilizados no ensaio de <i>Western Blot</i>	56
Tabela 5 Diluição dos anticorpos utilizados no ensaio de Imunofluorescência.	57
Tabela 6. Valores de Kd obtidos nos ensaios de anisotropia de fluorescência entre ensaios independentes.	72
Tabela 7. Principais resultados obtidos no ensaio de SEC-MALS.	74
Tabela 8. Principais resultados obtidos no ensaio de DLS.	76
Tabela 9. Condições de cristalização do <i>screening</i> do complexo PKM2+GAC.	82
Tabela 10. Condições de cristalização do <i>screening</i> do complexo PKM2+KGA.	82
Tabela 11. Dados obtidos da difração do cristal.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
ATP	Adenosina trifosfato
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
GLS	Glutaminase
GLC	Glicose
G-6-P	Glicose-6-fosfato
F-6-P	Frutose-6-fosfato
3-P-G	3-fosfofenolpiruvato
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pir	Piruvato
Lac	Lactato
PPP	via das pentoses fosfato
Cit	Citrato
OAA	Oxaloacetato
Alpha-KG	Alpha-cetoglutarato
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
GAC	Glutaminase C
GAM	Glutaminase M
KGA	<i>Kidney type</i> glutminase
GAB	Glutaminase B
LGA	<i>Liver type</i> glutaminase
MS	Sequência de localização mitocondrial
NRB	<i>nuclear receptor box</i>
KEN-box	Região para degradação mediada por ubiquitina
ANK	Domínio de anquirina
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i>
CCAT2	<i>Colon Cancer Associated Transcript 2</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>
Y2H	<i>Two Yeast Hybrid Assay</i>
DBD	Domínio de ligação ao DNA
AD	Domínio de ativação
UAS	Sequência ativadora a montante
ACS	Sítio ativo catalítico
ISCD	Domínio de contato entre unidades
NLS	Sequência de localização nuclear
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
F-1,6-BP	Frutose-1,6-Bifosfato
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
HDAC3	Histona desacetilase 3
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
β -ME	β - mercaptoetanol
Pi	Fosfato inorgânico
FITC	Fluoresceína isotiocianato
kDa	Quilodaltons
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
μ g	Micrograma

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C-terminal	Carboxi -terminal
N-terminal	Amino-terminal
ng	Nanograma
mg	Miligrama
L	Litro
mL	Mililitro
LB	Meio Luria Bertani
CV	Volume de Coluna
nm	nanômetro
mM	milimolar
PHE	fenilalanina
T3	Triiodotironina
DSS	Disuccinimidyl Suberate
PVDF	Polivinilideno difluorido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
PDB	<i>Protein Data Ban</i>

Sumário

1 Introdução	17
1.1 Metabolismo Tumoral	17
1.2 Glutaminases.....	21
1.2.1 <i>Kidney type</i> glutaminase e Glutaminase C	23
1.2.2 Busca por parceiros de interação de glutaminases	27
1.3 Piruvato Quinase M2.....	30
1.3.1 Estrutura e regulação de PKM2.....	32
2 Objetivos.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3 Materiais e Métodos	39
3.1 Construções dos domínios das proteínas	39
3.2 Ensaio Bioquímicos para Avaliação da Interação	42
3.2.1 Expressão heteróloga das proteínas	42
3.2.2 Purificação	42
3.2.2.1 Cromatografia de Afinidade.....	42
3.2.2.2 Cromatografia de Troca Iônica.....	43
3.2.2.3 Cromatografia de Filtração em Gel	43
3.2.2.4 Co-purificação das proteínas	44
3.2.3 <i>Pull-Down</i>	44
3.2.4 Anisotropia de Fluorescência	45
3.2.5 Cromatografia de exclusão molecular analítica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos.....	47
3.2.6 <i>Dynamic Light Scattering</i>	48
3.2.7 Atividade Enzimática	49
3.2.7.1 Ensaio de Atividade Enzimática de Glutaminase	49
3.2.7.2 Ensaio de Atividade Enzimática de Piruvato Quinase	50
3.2.8 Espectrometria de Massas	50
3.2.9 Ensaio de cristalização e difração de raios-X.....	51
3.2.10 Microscopia Eletrônica de Partículas Únicas com Contraste Negativo	52
3.3 Ensaio Celulares	53
3.3.1 Cultura de Células.....	53
3.3.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	53
3.3.3 Transfecção das Células	54
3.3.4 Co-Imunoprecipitação	55
3.3.5 Fracionamento Celular	55
3.3.6 <i>Western Blot</i>	55
3.3.7 Imunofluorescência	57

3.3.8 Duolink- Proximity Ligation Assay (PLA).....	58
4 Resultados	61
4.1 Caracterização Bioquímica da Interação	61
4.1.1 Expressão e Purificação das Proteínas	61
4.1.2 Obtenção dos complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA.....	64
4.1.3 Pull-Down	65
4.1.4 Anisotropia de Fluorescência	66
4.1.5 SEC-MALS	72
4.1.6 Dynamic Light Scattering.....	74
4.1.7 Atividade Enzimática	77
4.1.8 Espectrometria de Massas	80
4.1.9 Ensaios de cristalização e difração de raios-X.....	81
4.1.10 Microscopia Eletrônica de Partículas Únicas com Contraste Negativo	84
4.2 Caracterização Celular da Interação.....	91
4.2.1 Análise da expressão de GLS e PKM2	91
4.2.2 Co-Imunoprecipitação	93
4.2.3 Co-Localização e Duolink PLA	95
5 Discussão e Perspectivas	99
6 Conclusão	108
7 Referências Bibliográficas	109
8 Anexos.....	116
Anexo I. Mapa dos vetores utilizados.	116
Anexo II. Artigo Científico	119
Anexo III. Artigo Científico	135
Anexo IV. Artigo Científico.....	149
Anexo V. Formulário CIBio-CNPq.	159
Anexo VI. Declaração de direitos autorais.....	162

1 Introdução

1.1 Metabolismo Tumoral

Células neoplásicas compartilham características adquiridas durante o desenvolvimento tumoral fundamentais para a progressão do câncer¹. Hanahan e Weinberg propuseram que as células transformadas manifestavam alterações essenciais em sua fisiologia, conhecidas como Marcas Registradas do Câncer, sendo elas a indução da própria proliferação, ausência de resposta aos sinais de inibição da proliferação celular, potencial replicativo ilimitado, evasão da apoptose, angiogênese sustentada e capacidade de invasão tecidual e metástase². Mais recentemente foi incluído a este conjunto de manifestações as alterações no metabolismo energético tumoral e a capacidade de evitar a detecção do sistema imune³.

A reprogramação metabólica é uma importante característica apresentada pelas células para a aquisição e manutenção do processo neoplásico³. Essas alterações são possíveis graças a mutações em genes que codificam para proteínas de regulação do ciclo celular, oncogenes e proteínas de reparo de DNA⁴. Entender a forma como o metabolismo torna-se reprogramado em células tumorais é essencial para explorar novos alvos que possam ser utilizados para benefício terapêutico^{5,6}.

Uma função chave para a reprogramação metabólica das células tumorais é prover intermediários biossintéticos para dar suporte a alta taxa de proliferação celular⁵, visto que o elevado índice mitótico dessas células exige um alto consumo energético, assim como uma grande quantidade de biomoléculas para síntese de nucleotídeos, proteínas e lipídeos⁴.

A glicólise e o Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) são fontes importantes de intermediários da síntese de biomoléculas e adenosina trifosfato (ATP), agentes redutores e oxidantes tanto para células normais quanto para as células tumorais⁷. Evidências têm mostrado que a reprogramação do metabolismo tumoral é controlada pela ativação de vários sinais oncogênicos juntamente com a perda de supressores de tumores. Estas alterações regulam a atividade de proteínas que atuam em vias metabólicas alterando o metabolismo e permitindo

que as células transformadas sobrevivam e proliferem no microambiente tumoral⁸.

Além das vantagens de suprir as demandas bioenergéticas das células neoplásicas, as consequências do metabolismo alterado têm sido relacionadas a funções não canônicas de enzimas metabólicas e metabólitos que contribuem para a progressão tumoral. A compreensão dessas novas vias pode auxiliar a traçar alvos específicos que contribuam para o desenvolvimento de terapias inovadoras da doença⁹.

A reprogramação do metabolismo celular foi uma das primeiras mudanças descritas sobre as células neoplásicas. Na década de 1920, Otto Warburg observou que as células tumorais dependem principalmente da glicólise aeróbica para gerar ATP, em vez de da fosforilação oxidativa mitocondrial, resultando no aumento da taxa de captação de glicose e produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio^{7,10,11}. Assim, o metabolismo alterado de glicose nos cânceres é denominado Efeito Warburg¹².

A primeira proposição para explicar o Efeito Warburg foi que células tumorais teriam mitocôndrias defeituosas, inibindo a fosforilação oxidativa e que o metabolismo alterado fosse a causa do surgimento de um câncer. No entanto hoje sabe-se que esta alteração é uma consequência da transformação conduzida por mecanismos da própria tumorigênese^{7,13} e que a adaptação para o metabolismo glicolítico na presença de oxigênio está relacionada ao controle de sinais celulares e não a um defeito mitocondrial por si próprio^{14,15}.

Vias de sinalização oncogênicas e fatores transcricionais favorecem a super-expressão de enzimas da via glicolítica, a tradução de determinadas isoformas e mudanças pós-traducionais que sustentam o Efeito Warburg¹⁵⁻¹⁷. Uma peça fundamental nesse processo é a expressão da isoforma Piruvato Quinase M2 (PKM2), que redireciona os intermediários glicolíticos para os processos anabólicos nas células tumorais¹⁷.

O Efeito Warburg é um ponto chave na adaptação metabólica e da progressão tumoral¹¹. Além de suprir a alta demanda energética e de blocos biossintéticos das células neoplásicas¹⁶, o acúmulo de lactato no microambiente tumoral resultante da glicólise aeróbica tem sido relacionado à evasão ao sistema imune e estímulo do potencial migratório das células tumorais, levando a maior incidência de metástases¹⁸.

Ter um maior fluxo de intermediários da glicólise permite à célula

transformada alimentar ciclos importantes como o das pentoses (importante para a síntese de purinas e pirimidinas), além, é claro, da síntese de 2 mol de ATP/mol de glicose¹⁹. Ademais, células tumorais possuem uma maior expressão de enzimas glicolíticas em relação às células normais, o que intensifica a via e supre a demanda energética dessas células, mesmo na ausência de oxigênio^{20–22}.

Apesar da conversão de piruvato em lactato ter subprodutos importantes como a produção de NAD⁺, coenzima necessária em diversas etapas da glicólise, a menor disponibilidade desse metabólito para a síntese de intermediários do TCA apresenta implicações negativas para a célula²³. Para suprir a menor entrada de carbono derivado da glicólise, fontes anapleróticas de insumos de carbono passam a ser utilizadas pelas células, incluindo a glutamina, aspartato, adenilssucinato e ácidos graxos¹³.

Um mecanismo importante que as células dispõem para superar este problema envolve as glutaminases (GLS), as quais são responsáveis pela desaminação da glutamina em glutamato que dentre outras funções e destinos celulares, pode ser convertido em intermediários que passam a suprir o TCA^{23,24}.

A glutamina é o aminoácido mais abundante na corrente sanguínea, e, ao ser transportada para a matriz mitocondrial, é uma importante fonte de carbono para a síntese de aminoácidos e lipídeos²⁰. A glutaminólise permite a síntese de NADPH e citrato, que são requeridos para a lipogênese e, ao suprir as necessidades anapleróticas do TCA, esta via também propicia concentrações de oxaloacetato necessárias para a síntese de aminoácidos e lipídeos, além de fornecer nitrogênio para a biossíntese de purinas e pirimidinas (Figura 1)^{20,25}.

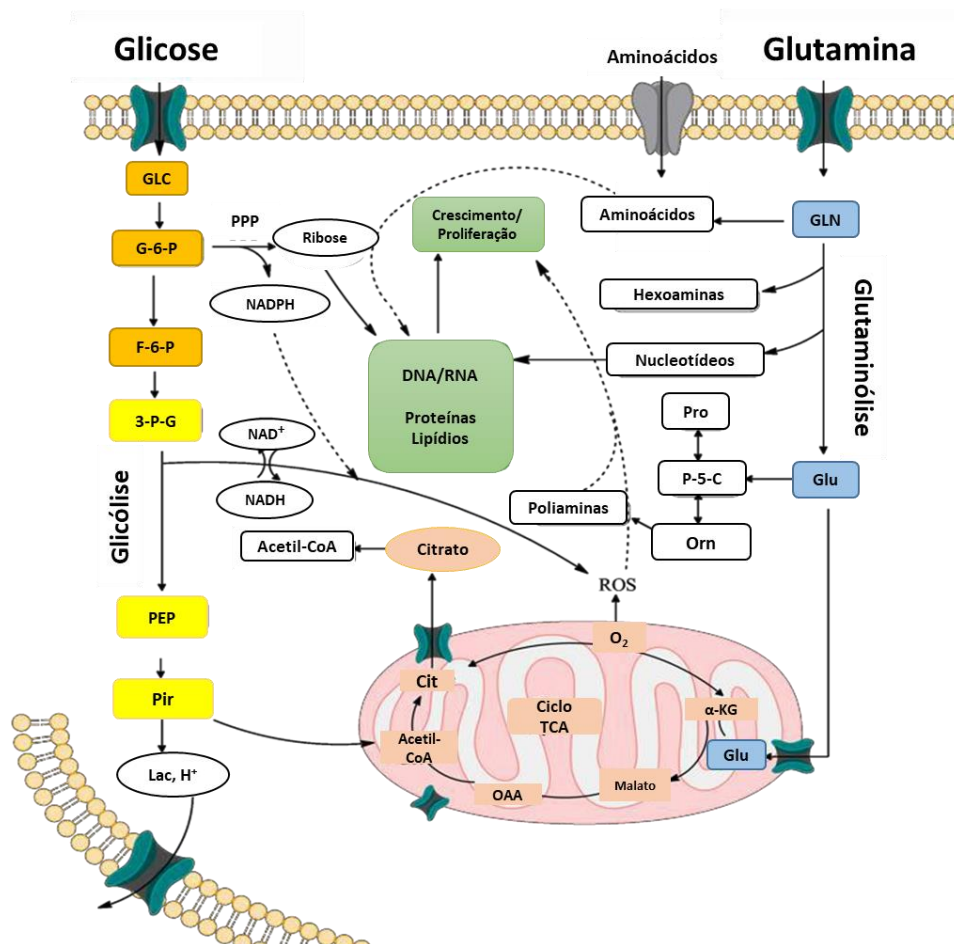


Figura 1. Participação da glicólise e glutaminólise no metabolismo tumoral.

A glicólise é uma fonte de intermediários envolvidos em vias que atuam na síntese *de novo* de nucleotídeos, ATP e piruvato. A glutaminólise abastece o ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA), que por sua vez gera intermediários que participam de vias biossintéticas como a dos ácidos graxos e das purinas e pirimidinas. Além disso, o metabolismo da glutamina é fonte de outros aminoácidos para síntese proteica. Glc (glicose); G-6-P (glicose-6-fosfato); F-6-P (frutose-6-fosfato); 3-P-G (3- fosfoenolglicerato); PEP (fosfoenolpiruvato); Pir (piruvato); Lac (lactato); PPP (via pentose fosfato); Cit (citrato); OAA (oxaloacetato); TCA cycle (Ciclo do Ácido Tricarboxílico); alpha-KG (alpha- cetoglutarato); ROS (espécie reativa de oxigênio); Gln (glutamina); Glu (glutamato). Adaptado de Deberardinis, R. J. & Cheng, T, 2010²⁰.

A dependência da glutamina é considerada uma característica marcante do metabolismo celular do câncer, no entanto, o papel da glutaminólise nas neoplasias não está completamente elucidado²⁵. Há diversas evidências do papel essencial para a glutamina em tumores e que uma variedade de fatores, incluindo o tipo de tecido, a genética do câncer subjacente, o microambiente tumoral e outras variáveis, influenciam coletivamente sobre a atuação da glutamina no câncer. Assim, os requisitos para a glutamina no câncer são altamente heterogêneos e compreendê-los abre novas perspectivas sobre seu papel na manutenção do fenótipo tumoral²⁶.

1.2 Glutaminases

As Glutaminases (GLS) são enzimas chave no metabolismo da glutamina, um aminoácido não essencial que tem como principal função armazenar nitrogênio nos músculos e realizar seu transporte entre os órgãos junto a alanina²⁰. A glutamina atua em funções como o balanço redox celular através da formação de glutathione, na captação de aminoácidos e é fonte bioenergética e de intermediários biossintéticos. Outro papel da glutamina é a estimulação da via mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) a qual age na regulação de diversos eventos celulares, na transcrição e síntese de proteínas mediando vias de sinalização²⁷.

Em mamíferos, as GLS são codificadas pelos genes *GLS* e *GLS2*, e seus produtos se diferem pelas propriedades cinéticas, estrutura e distribuição nos tecidos²⁸. O gene *GLS* possui 19 éxons e está localizado no cromossomo 2, codificando para as enzimas *kidney type glutaminase* (KGA) e glutaminase C (GAC) através de *splicing* alternativo. Estas isoformas são expressas em diversos tecidos e em uma grande variedade de células neoplásicas²⁹.

O gene *GLS* é regulado positivamente em células com taxas aumentadas de proliferação, e seus produtos correspondem a maior parte da atividade das GLS^{29,30}. Há ainda uma terceira variante de *splicing* associada a este gene, a glutaminase M (GAM), que não possui atividade catalítica mensurável e tem tamanho consideravelmente menor que a KGA e GAC¹³.

Na década de 70, Curthoys e colaboradores propuseram que as GLS de mamíferos estão associadas à membrana mitocondrial em um estado de transição oligomérico induzido pela presença de íons fosfato, de dímero inativo para tetrâmero ativo³¹. Foi adicionado a este fato pelo grupo PMT (Grupo de Pesquisa em Metabolismo Tumoral), que na presença de fosfato inorgânico (K_2HPO_4) ocorre aumento na atividade de GAC pela filamentação da mesma em estruturas supra-tetraméricas, levando a diminuição do K_m com aumento do K_{cat} ³² (Figura 2).

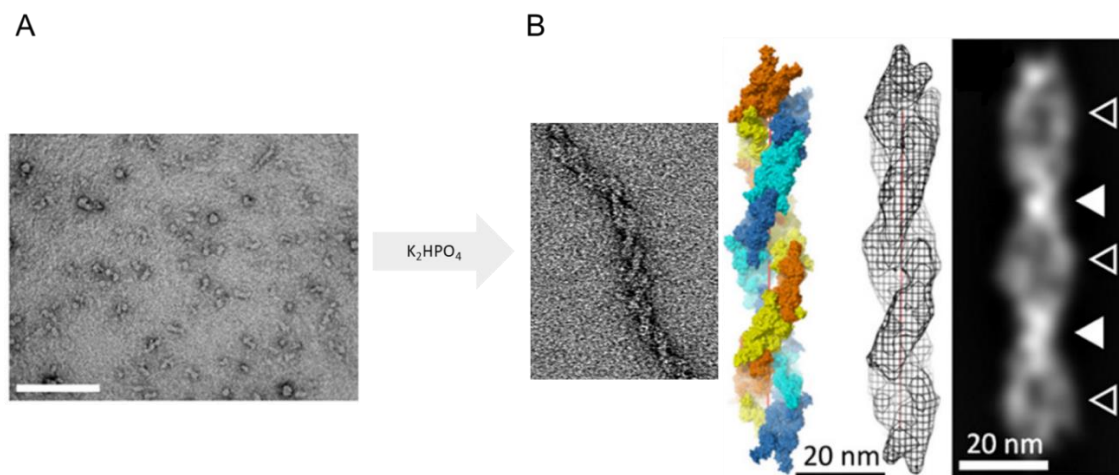


Figura 2. Análise de microscopia eletrônica da polimerização de GAC na presença de K_2HPO_4 .

(A) Na ausência de K_2HPO_4 GAC apresenta perfil de partículas menores sem filamentação. (B) A adição de 20 mM de K_2HPO_4 leva ao rearranjo da proteína para um perfil filamentar associado a maior atividade catalítica da enzima. Adaptado de Ferreira et al., 2013³².

O gene *GLS2*, encontrado no cromossomo 12 é constituído por 18 éxons, codifica para as isoformas glutaminase B (GAB) e *liver type glutaminase* (LGA), altamente expressas no fígado e com atividade associada a estados de células em repouso ou quiescentes^{30,33}. A LGA é independente de ativação por fosfato e não é inibida pelo acúmulo de glutamato, produto final de catálise, diferenciando-se das demais isoformas (KGA e GAC) que são ativadas por fosfato e inibidas por glutamato³⁴.

As isoformas de GLS, KGA e GAC, são alvo de diversos estudos na busca de novos agentes terapêuticos antitumorais, uma vez que têm sido associadas à progressão de uma série de cânceres e de relatos da sua super-expressão em tumores da mama, cérebro, pulmão e cervix.

Diversos mecanismos envolvendo supressores tumorais e oncogenes regulam a atividade de GLS através do controle da expressão gênica. O oncogene c-MYC, relacionado ao consumo celular de glutamina em tumores, atua em um processo de regulação pós-transcricional do gene *GLS* pela inibição do miR-23, o qual é responsável pela degradação do mRNA de *GLS*^{12,30}. Similarmente a c-MYC, o fator de transcrição NF- κ B inibe a expressão do miR-23a e por conseguinte eleva o nível proteico de GLS^{35,36}. Por sua vez, o complexo Rho-GTPases promove a regulação positiva de GLS levando ao aumento de sua atividade³⁷.

Os produtos do gene *GLS2* têm sido relacionados com a supressão

tumoral, e sua regulação está associada à proteína de regulação do ciclo celular p53^{13,38}. Em contrapartida, recentemente foi evidenciado pelo grupo PMT o papel pró-tumoral de GLS2 em cânceres de mama triplo negativo, abrindo novas perspectivas sobre esta enzima e dando nova luz sobre a complexidade do metabolismo de glutamina na carcinogênese³⁹.

Devido a seu papel no balanço energético e biossintético, e sua importância para o crescimento de uma variedade de cânceres, compreender o papel das GLS na tumorigênese é uma valiosa estratégia terapêutica¹³. Deste modo, as isoformas de GLS, KGA e GAC, são o alvo de estudo deste trabalho e seu papel será descrito com maior profundidade a seguir.

1.2.1 *Kidney type* glutaminase e Glutaminase C

Conforme mencionado, o gene homônimo *GLS* codifica para duas isoformas de GLS, KGA e GAC²⁸. A KGA é expressa de maneira constitutiva no cérebro, rins, intestino, em células do sistema imune e em quase todos os tipos de tecido nos mamíferos, com exceção apenas do fígado³⁰. Já a GAC é encontrada nos músculos cardíacos, pâncreas, pulmões e em células com altas taxas proliferativas^{33,40}. Tanto KGA e GAC têm expressão aumentada em diversos tipos de cânceres, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da doença através do metabolismo da glutamina^{18,41,42}.

A isoenzima KGA é formada pelos éxons 1-14 acrescido dos éxons 16-19³⁰, compartilhando completa identidade sequencial desde o N-terminal até o fim do domínio glutaminase com a GAC, e, devido à ocorrência de *splicing* após a sequência codificante para estas regiões, seu domínio C-terminal possui pouca similaridade com o da GAC⁴¹ (Figura 3). Além disso, de acordo com Cassago et al.,⁴¹, KGA apresenta menor capacidade glutaminolítica em relação a GAC na presença de fosfato inorgânico, sendo a última considerada a isoforma mais ativa das GLS.

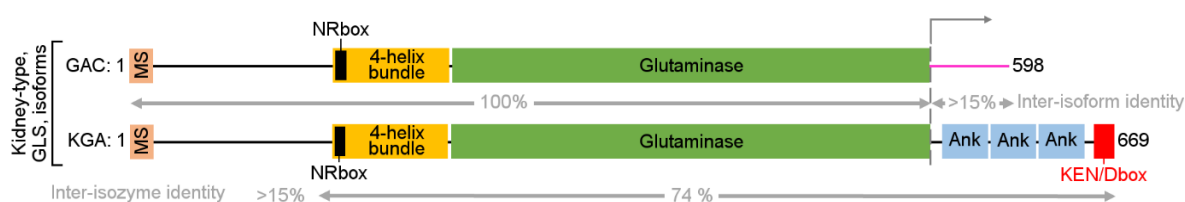


Figura 3. Esquema da organização estrutural das isoformas de glutaminase KGA e GAC.

GAC e KGA possuem identidade estrutural, diferindo-se entre si apenas em seu domínio C-terminal. MS = sequência consenso de trânsito de peptídeos que direciona a enzima para a mitocôndria. NRB (domínio NR box, geralmente encontrados em proteínas que interagem com receptores nucleares). KEN-box (importante para ubiquitinação e degradação). ANK (domínio de anquirina, relacionados a interação proteína-proteína). Os números indicam a posição em relação ao número de aminoácidos.

O domínio N-terminal da KGA e GAC se estende desde o aminoácido 1 até o 220, e contém uma sequência de localização mitocondrial (MS), que as direciona para a organela, e duas sequências consenso LXXLL, também chamada de NRbox (*Nuclear Receptor box*), que geralmente são encontrados em proteínas que regulam o funcionamento de receptores nucleares^{28,43,44}. Tal observação levanta a hipótese de que estes segmentos estejam envolvidos na associação das glutaminases com receptores nucleares.

O domínio catalítico de GLS vai do aminoácido 220 ao 550. Posteriormente, a porção C-terminal de KGA (a partir do aminoácido 550 até 669) onde se encontra o domínio de anquirina (ANK)⁴⁵. 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 medeiam contatos interprotéicos em várias famílias de proteínas tais como as de membrana e citoesqueleto, reguladores transcricionais, toxinas e inibidores de CDK (*cyclin-dependent kinase*) levantando a possibilidade desta isoenzima estar envolvida em contatos proteína-proteína via estas regiões⁴⁶.

A isoforma GAC é formada pela sequência dos éxons 1-15, omitindo os éxons 16-19. Estruturalmente é idêntica à KGA, exceto pela porção C-terminal, que é uma pequena região mais curta e não estruturada, não apresentando os domínios de ANK e KEN-box⁴⁷ (Figura 2) e sua localização mitocondrial se deve de fato à presença do MS^{30,33,41}.

Corroborando a hipótese de parceiros de interação das GLS, estudos do grupo PMT mostraram que KGA e GAC interagem e regulam a função de ativação

transcricional do receptor nuclear *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma* (PPAR γ)⁴⁸. Além disso, um outro estudo revelou que a proteína BNIP-H, expressa exclusivamente em tecidos neuronais, é um parceiro de interação da isoforma KGA, levando a inibição da atividade de glutaminase da mesma e redução dos níveis do neurotransmissor glutamato⁴⁹.

Apesar da MS da KGA, essa enzima é encontrada também no citosol, o que reforça a hipótese de que os domínios N-terminal dessas enzimas não são os únicos responsáveis por sua localização celular¹³. Em um estudo publicado por Cassago et al.,⁴¹ corrobora esta afirmação, uma vez que a KGA foi observada na mitocôndria mas também no citoplasma de células de diferentes tipos tumorais, enquanto a isoforma GAC, por outro lado, foi detectada somente na mitocôndria.

GAC é a isoforma de GLS que apresenta maior eficiência catalítica na presença de fosfato inorgânico⁴¹. Em sua forma dimérica a enzima apresenta-se menos ativa, tornando-se altamente ativada quando se reorganiza em tetrâmeros e filamentos supratetraméricos promovendo maior acessibilidade do substrato ao seu sítio ativo^{50,51}. Esse recurso deve-se a região C-terminal mais curta de GAC e da ausência das repetições ANK, o que permite a formação dessas superestruturas filamentosas que aumentam seu potencial catalítico⁴⁷.

Recentemente determinamos por *Cryo-electron microscopy* (Cryo-EM) a estrutura do filamento e os determinantes para o aumento de atividade dirigido por fosfato e filamentação (dados não publicados). De forma similar, na ausência de glutamina em meio de cultivo celular, nosso grupo observou que ocorre o rearranjo de GLS adotando um perfil com marcação filamentar, e perdendo sua marcação difusa no citoplasma associada com sua localização mitocondrial (Figura 4) (dados não publicados).

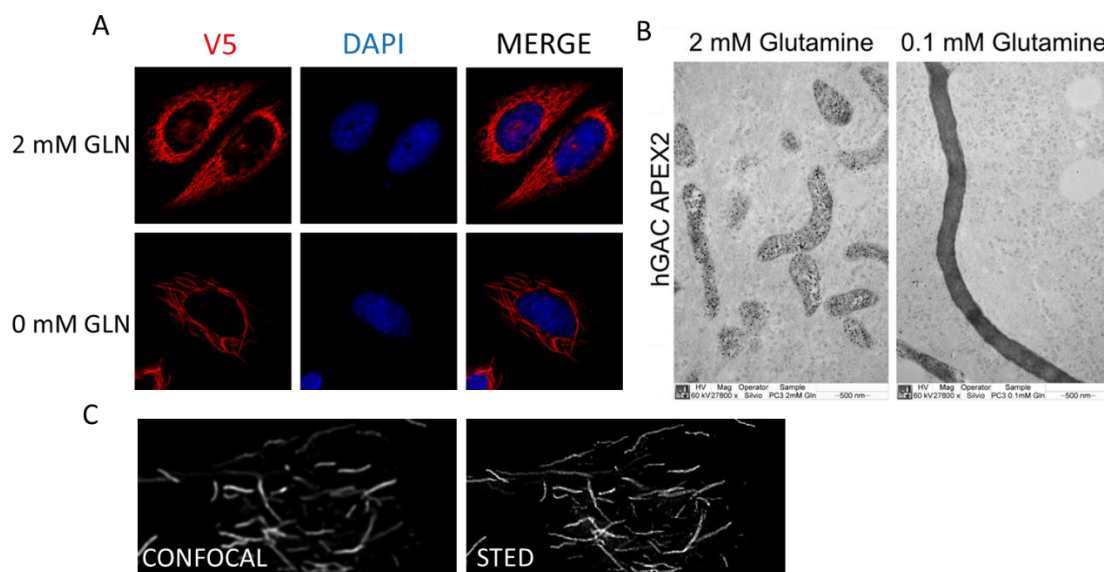


Figura 4. Formação de estruturas filamentosas intramitocondriais de GLS na ausência de glutamina.

(A) Microscopia de imunofluorescência confocal mostrando que, em privação de glutamina, GAC se organiza em longas estruturas de nano a micrométricas que cruzam o citoplasma. Em vermelho, GAC e, em azul, núcleo corado com DAPI. (B) Microscopia eletrônica de transmissão de células com 2 mM ou 0.1 mM de glutamina. GAC foi identificado por anticorpo primário e secundário com HRP, sendo detectado por contraste baseado em precipitação de DAB (cores mais escuras, próximo de preto). A esquerda, 2 mM de glutamina, observa-se uma marcação difusa na célula, enquanto que a direita (0.1 mM glutamina), as marcações assumem um formato mais alongado. (C) Microscopia de imunofluorescência confocal comparado a STED em situação de glutamina plena (em cima) ou privado de glutamina (em baixo). Ao lado, STED mostrado em escala de cinza. Imagens obtidas pela colaboradora do grupo PMT Dra. Marília Dias (dados não publicados).

Diversos estudos têm indicado que a atividade da GAC está intimamente relacionada ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, uma vez que estimula o metabolismo da glutamina pelas células neoplásicas e sua expressão apresenta maior regulação positiva em células tumorais do que a KGA^{52,53}.

Redis e colaboradores⁵⁴ mostraram que o RNA longo não codificante *Colon Cancer Associated Transcript 2* (CCAT2), desempenha um papel no aumento da expressão da GAC no câncer de cólon. O CCAT2 existe sob a forma de dois alelos: a forma G, associada a predisposição desta neoplasia, e a forma T. Segundo os autores, o alelo G se liga fortemente a um fator de clivagem, e o complexo se associa ao sítio poli-A no íntron 14 do mRNA precursor das GLS, o que resulta no *splicing* preferencial da isoforma GAC, ocasionando aumento do metabolismo da glutamina, metástase e proliferação celular, sendo um forte indicio da importância do papel da GAC na tumorigênese⁵⁴.

Cânceres de mama triplo negativo, um subtipo da doença relacionado a

fenótipos mais agressivos e com pior prognóstico em relação aos subtipos luminais e HER2 amplificado⁵⁵, são altamente dependentes de glutamina para sua manutenção²⁸. O aumento do nível proteico e de mRNA GLS, especialmente de GAC, tem sido observado em células de câncer de mama e relacionado ao maior consumo de glutamina, secreção de glutamato e malignidade do tumor^{17,41,55,56}.

Devido ao “vício em glutamina” das células tumorais, a inibição da glutaminólise em cânceres tem sido extensivamente explorada em modelos pré-clínicos²⁵ e validados como inibidores da atividade de GLS e GLS2³⁷. Atualmente o mais promissor inibidor da atividade de GLS é o composto CB-839, sendo o único que se encontra em ensaios clínicos em pacientes com câncer^{52,57}. O composto CB-839 regula a atividade enzimática de GAC e KGA ligando-se no sítio alostérico de GLS estabilizando a enzima em um estado tetramérico inativo^{25,37,57}. Os ensaios clínicos utilizando este composto têm sido promissores em diversos tipos de tumores, incluindo o câncer de mama triplo negativo²⁸.

Em conjunto, esses estudos demonstram a íntima relação das GLS com o câncer, evidenciando a necessidade da compressão de sua atividade no desenvolvimento e progressão tumoral.

1.2.2 Busca por parceiros de interação de glutaminases

Conforme mencionado, as isoformas de GLS possuem domínios em sua estrutura que são associados com contatos interprotéicos, bem como domínios que medeiam sua localização celular e de regulação de fatores nucleares⁴⁸. Ademais, apesar dos avanços no entendimento das GLS no câncer, ainda há diversos aspectos que necessitam ser elucidados sobre o papel destas enzimas no processo tumoral³⁷. De fato, a interação de GAC e KGA com o PPAR γ foi comprovada e mostra que a atividade de GLS no câncer vai muito além do seu papel no metabolismo de glutamina⁴⁸.

O estudo da interação de GLS com outras proteínas foi iniciado pelo ex-membro do grupo PMT, Dr Marcel Nakahira, através do ensaio de duplo híbrido de levedura (Y2H, do inglês *Two Yeast Hybrid Assay*). Este experimento é desenhado de forma que a proteína alvo, chamada proteína “isca”, é inserida em um vetor associada com um domínio de ligação de um fator de transcrição⁵⁸

(Figura 5). Por outro lado, a proteína “presa”, que representa os potenciais parceiros de interação advindos de uma biblioteca de genes, é associada a outro domínio do fator de transcrição, responsável pela interação com proteínas envolvidas na transcrição de um gene repórter.

A interação das proteínas “isca” e “presa” favorece formação de um fator de transcrição completo capaz de iniciar a transcrição de um gene repórter. Esse gene codifica para a enzima β -galactosidase, que, em presença do substrato X-gal, produz um substrato de coloração azul. Além disto, também há a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de nutrientes⁵⁸. Após identificação das colônias positivas para a interação das proteínas “isca” e “presa”, é realizada a extração do DNA plasmidial que codifica as proteínas “presa” e seu sequenciamento, permitindo a identificação de prováveis parceiros de interação da proteína “isca”⁵⁸.

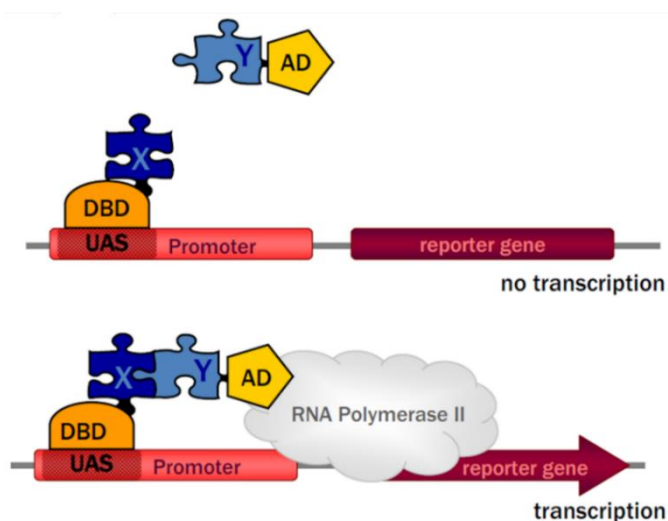


Figura 5. Esquema do ensaio de duplo híbrido em levedura (Y2H).

A) A proteína de interesse X é fundida com o domínio de ligação ao DNA (DBD), uma construção chamada “isca”. A proteína (potencial parceiro de interação) Y é fundida ao domínio de ativação (AD) e é chamada “presa”. (B) A isca, DBD-X, liga-se à sequência ativadora a montante (UAS) do promotor. A interação da isca com a presa, ou seja, a proteína de fusão AD-Y, recruta a DA e, assim, reconstitui um fator de transcrição funcional, levando ao recrutamento adicional da RNA polimerase II e subsequente transcrição de um gene repórter. Adaptado de Bruckner et al., 2009⁵⁸.

Para identificação dos parceiros de interação, o ensaio de Y2H utilizando h(human) GAC e hKGA como “iscas” identificou, entre outras, a proteína “presa” a enzima glicolítica piruvato quinase M2 (PKM2), a qual está associada a progressão de diversos tipos de tumores, manutenção do Efeito Warburg, bem como tem sido associada como um ponto central da regulação metabólica tumoral, como será discutido a seguir^{59–62}. De posse dos resultados de Y2H, a caracterização da interação foi iniciada pelo ex-Bolsista de Verão, Vinnycius Pereira, e pelos membros do grupo PMT, Dra. Marília Dias e Dr. Matheus Pinheiro.

PKM2 foi expressa de forma solúvel em *E. coli* e foi purificada até a homegeneidade por técnicas cromatográficas (Figura 6A). PKM2 purificada mostrou interagir com GAC e KGA segundo avaliado em ensaio de *pull-down* (Figura 6B), apresentando K_d de baixo micromolar que diminuiu com o tempo de incubação, como avaliado por anisotropia de fluorescência (Figura 6C).

As proteínas foram expressas em células de mamífero (Figura 6D) e estudos de microscopia de fluorescência confocal mostraram que PKM2 têm expressão difusa celular, enquanto que GAC e KGA ectópicas tem presença mitocondrial marcante. Os sinais de fluorescência indicam potencial co-localização mitocondrial quando sobrepostos (Figura 6E). Por fim, verificamos co-imunoprecipitação de PKM2 com GAC ectópica quando o lisado celular total foi avaliado (Figura 6F).

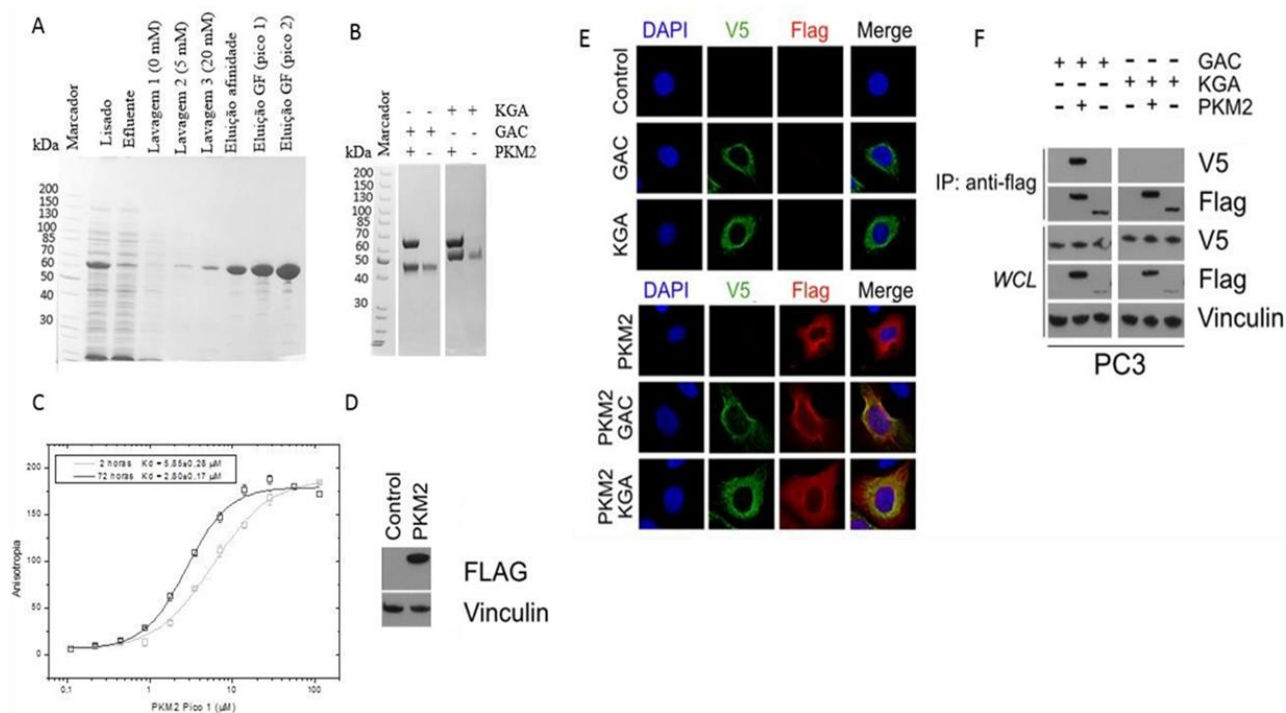


Figura 6. Dados prévios sobre a interação de KGA/GAC com PKM2.

(A) SDS-PAGE de frações de lavagem e eluição do processo de cromatografia de afinidade por metais (PKM2 expressa com cauda de histidinas) e de filtração em gel (GF). (B) PKM2-His foi imobilizada em resina de afinidade por metais, depois incubada com GAC/KGA sem cauda de histidinas. (C) Anisotropia de fluorescência de GAC-FITC titulada com PKM2. Dados avaliados em 2 e 72 horas de incubação. (D) PKM2 expressa em PC3 (tumor de próstata). (E) Microscopia de fluorescência confocal de PKM2-Flag co-expressa com GAC-V5 ou KGA-V5 em PC3. (F) Co-Imunoprecipitação de GAC e KGA-V5 com PKM2-flag comprovando a interação celular das enzimas.

1.3 Piruvato Quinase M2

Para suprir e controlar as demandas energéticas e biossintéticas, as enzimas envolvidas na glicólise existem sob múltiplas isoformas⁶³. Este é o caso da enzima Piruvato Quinase (PK), que apresenta quatro isoenzimas referidas como L, R e M (PKR, PKL, PKM1 e PKM2)^{63,64}.

As PK são enzimas citosólicas e sua atividade clássica piruvato quinase se dá sob a conformação tetramérica, promovendo a transferência direta de fosfato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) para ADP, tendo como produto dessa reação irreversível piruvato e ATP na última etapa da via glicolítica^{19,65} (Figura 7).

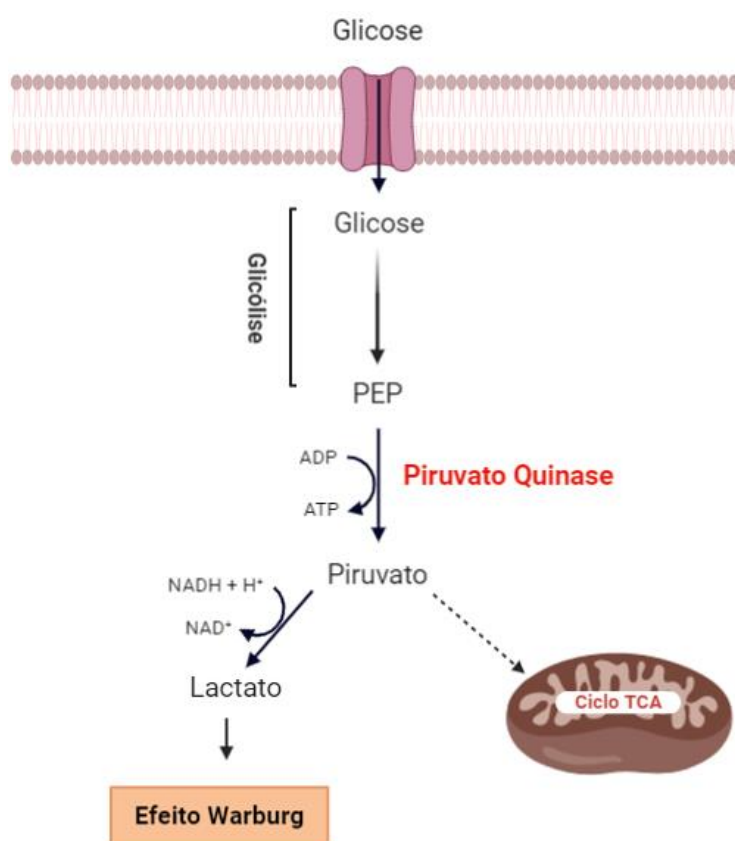


Figura 7. A enzima piruvato quinase atua no último passo da via glicolítica.

A enzima piruvato quinase promove a transferência direta de fosfato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) para ADP, gerando os produtos finais da reação piruvato e ATP. O piruvato gerado pode ser convertido a acetil-CoA e suprir o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou a lactato promovendo o Efeito Warburg.

As isoenzimas PK são codificadas por dois genes distintos, *PKLR* e *PKM*⁶⁶. O gene *PKLR*, através de promotores alternativos, codificada para a isoforma PKR, que é restrita a células vermelhas sanguíneas, e a isoforma PKL, que é expressa em altos níveis no fígado e em menor parcela nos rins^{64,67}.

O gene *PKM* codifica as isoformas PKM1 e PKM2 por meio de *splicing* alternativo dos éxons 9 e 10, mutuamente exclusivos⁶⁸. Dos 12 éxons do pré-

mRNA de *PKM*, o transcrito que inclui o éxon 9 e exclui o éxon 10 leva a expressão de PKM1. Por sua vez, a inclusão do éxon 10 e exclusão do éxon 9 promove a expressão de PKM2^{69,70}.

O *splicing* do gene *PKM* é controlado pelas hnRNP I, A1 e A2, as quais se ligam a sequências que flanqueiam o éxon 9 inibindo o *splicing* do mRNA de PKM1, e facilitando de forma indireta a inclusão do éxon 10. Neste processo a oncoproteína c-Myc é essencial, dado que ativa a transcrição destas hnRNPs, resultando na expressão de PKM2^{68,71–73}.

Os produtos do gene *PKM* possuem 531 aminoácidos. No entanto, dos 56 aminoácidos que são codificados pelos éxon 9 e 10, 22 aminoácidos diferem entre si⁷⁴. Como resultado ocorre a distinta atividade das isoformas, uma vez que PKM1 é constitutivamente ativa, PKM2 é alostericamente regulada⁶³.

A expressão da isoforma PKM1 constitutivamente ativa é ideal para tecidos com alta demanda de ATP, como cérebro, músculos e coração. Enquanto que a expressão de PKM2 é observada nos rins, pulmões, em células normais proliferativas (linfócitos e células do epitélio intestinal) e no tecido adiposo branco^{62,67,69,70}. Ademais, PKM2 é altamente expressa em células com alta taxa proliferativa durante a fase embrionária e em células neoplásicas^{63,75}.

A expressão de PKM2 é influenciada por um vasto espectro de vias de sinalização estimuladas pelo microambiente tumoral (tais como hipóxia e disponibilidade de nutrientes), mutações em oncogenes, fatores de crescimento e hormônios⁷⁰. Além disso, fatores de transcrição que se ligam diretamente ao gene *PKM* como HIF-1 α , NF- κ B e PPAR γ , levam a ativação de vias de sinalização regulando a expressão de PKM2 nas células tumorais^{67,70,76,77}.

Em condições hipóxicas, o fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1) promove a translocação nuclear de PKM2 através da interação direta com a subunidade HIF-1 α . O complexo PKM2-HIF-1 α promove a transativação do gene *PKM* levando ao aumento da expressão de PKM2 em um mecanismo de *feedback* positivo e ainda ocasiona a expressão de diversos genes envolvidos em vias metabólicas⁷².

Como mencionado, vias de sinalização mediadas por oncogenes e hormônios ocasionam o aumento da expressão de PKM2. A estimulação da via PI3K/AKT/mTOR por insulina, por exemplo, estabiliza HIF-1 e estimula a expressão de c-Myc, levando a ativação transcrricional de diversas enzimas glicolíticas, incluindo PKM2, e promovendo o metabolismo tumoral⁷⁸.

1.3.1 Estrutura e regulação de PKM2

PKM2 é uma enzima tetramérica de subunidades idênticas organizadas na configuração dímero-dímero⁷⁹. Cada monômero contém um sítio ativo composto por três domínios principais designados como A, B e C, acrescido de um pequeno domínio N-terminal (Figura 8)⁸⁰.

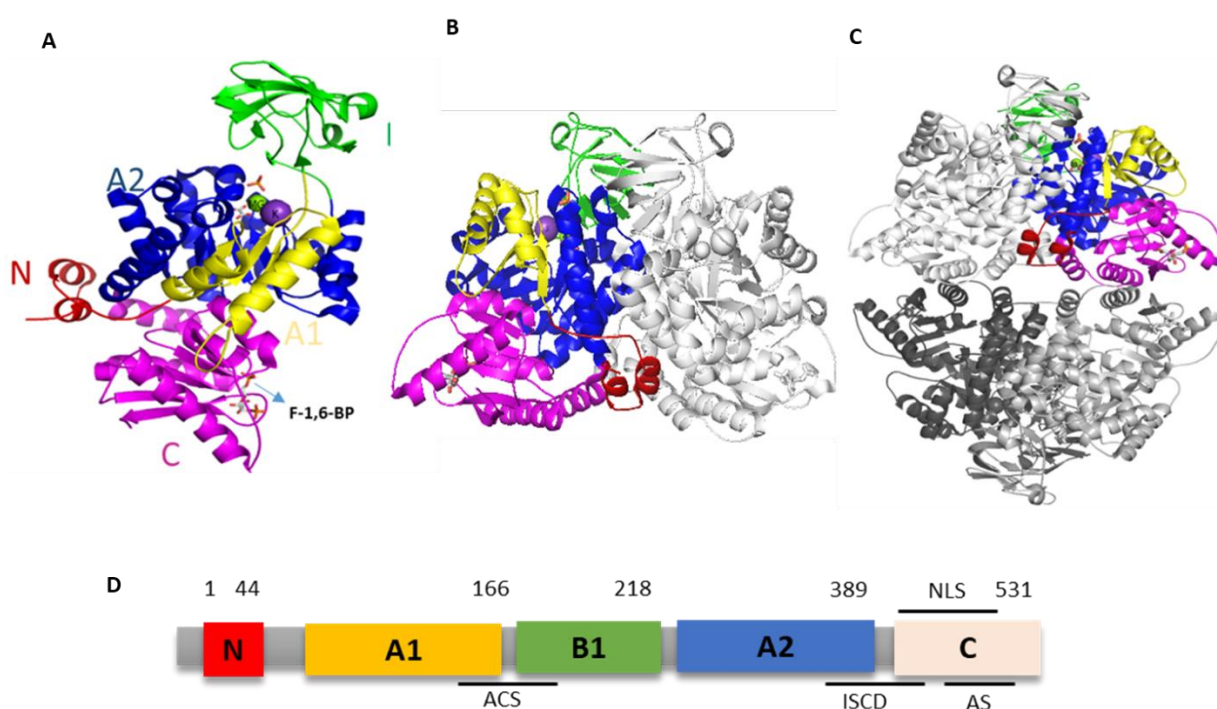


Figura 8. Esquema representativo dos domínios de PKM2.
(A) Monômero, (B) dímero e (C) tetrâmero de PKM2 (PDB 1T5A)⁸¹. (D) A interface entre os domínios A1 e B1 de PKM2 formam o sítio ativo catalítico (ACS); a região de flanco entre os domínios A2 e C forma domínio de contato entre unidades (ISCD) que permite a formação de oligômeros tetraméricos; o domínio C acomoda o sítio de ligação do ativador alostérico (AS) de PKM2 F-1,6-BP e uma sequência de localização nuclear (NLS).

O sítio ativo de PKM2 se localiza em uma fenda entre o domínio A1 e o domínio B1, que é móvel. O domínio C encontra-se no lado oposto do domínio A2 e contém o *pocket* de ligação do ativador alostérico desta enzima, frutose-1,6-bisfosfato (F-1,6-BP), e o domínio de contanto entre unidades se encontra no flanco entre estas duas regiões ^{70,79,82}.

O domínio C é o local onde se forma a interface dímero-dímero do tetrâmero de PKM2 e as diferenças dos aminoácidos localizados nesta região são responsáveis pelas disparidades na ligação F-1,6-BP e na regulação alostérica das isoformas PKM1 e PKM2 ⁸².

PKM2 é ativada por metabólitos como F-1,6-BP, pelo aminoácido serina, pela interação com proteínas fosforiladas tais como a tirosina e serina quinase, e por vias de sinalização celular^{63,83}. Esses metabólitos elevam o nível da forma ativa tetramérica de PKM2 pela ligação direta em seu sítio ativo, modulando o metabolismo de glicose de acordo com as necessidades celulares^{19,84}.

Por outro lado, para regular a via glicolítica e a construção de blocos biossintéticos, a atividade de PKM2 pode ser inibida pelos aminoácidos alanina e fenilalanina e por ATP, fazendo com que a enzima se estabilize em sua conformação dimérica inativa^{61,63,76}. Mudanças pós-traducionais como fosforilação e acetilação, e ação de oncogenes são outros determinantes do estado oligomérico de PKM2, bem como sua localização celular^{70,85,86}.

Como resultado dos mecanismos regulatórios, PKM2 pode ser estabilizada em quatro estados biológicos relevantes: monômero, dímero e tetrâmero tenso (T) inativos e tetrâmetro relaxado (R) ativo^{74,85}.

Na presença de fenilalanina, ocorre a estabilização do estado T inativo. Este aminoácido se liga a um *pocket* que estabiliza a interface dímero-dímero, fazendo com que a rotação da Lys421 bloqueie a entrada de PEP no sítio ativo e prótons adjacentes enrijeçam a estrutura do tetrâmero (Figura 9). O hormônio T3 atua similarmente na regulação alostérica de PKM2 no estado T^{74,81,85}. Por outro lado, F-1,6-BP permite a rotação de PKM2 rompendo as ligações de hidrogênio na interface dímero-dímero que forçam o estado T, permitindo que a enzima adote o estado tetramérico R tornando livre a entrada de PEP ao sítio ativo. O aminoácido serina também atua neste mecanismo de modulação alostérica, ligando-se a cada monômero de PKM2 levando à formação do tetrâmero ativo^{74,81,85}.

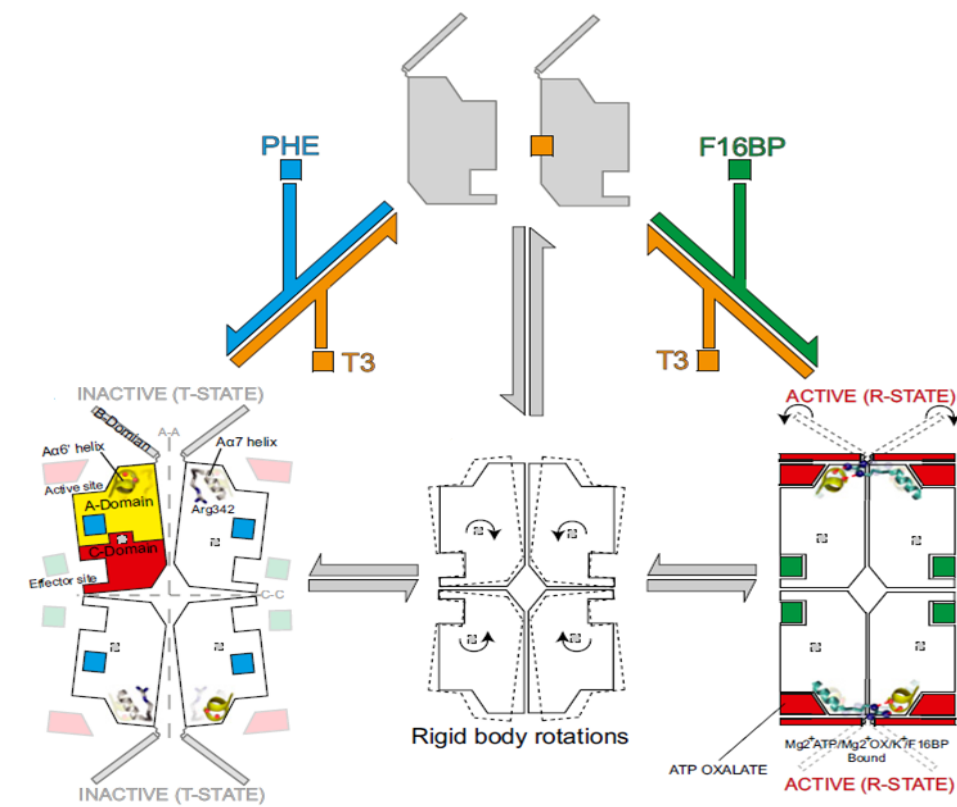


Figura 9. Modulação alostérica do tetrâmero inativo (estado T) e ativo (estado R) de PKM2.

Fenilalanina (PHE) e o hormônio T3 atuam como inibidores alostéricos e impedem que o tetrâmero adote o estado ativo R. A presença de F-1,6-BP e serina permitem a ativação da enzima no estado R tornando livre a entrada do substrato ao sítio ativo. Adaptado de Morgan e colaboradores, 2013⁸⁵.

Como uma enzima glicolítica, PKM2 é predominante localizada no citosol. Neste compartimento celular, PKM2 em conformação tetramérica associa-se com outras enzimas glicolíticas como hexoquinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicomutase e enolase, formando o complexo enzimático glicolítico⁸⁷. A alta afinidade da forma ativa da PKM2 por PEP, juntamente com a proximidade espacial das outras enzimas glicolíticas dentro do complexo enzimático glicolítico, permite uma conversão altamente eficaz de glicose em lactato com geração de energia para a célula, contribuindo para o Efeito Warburg e para a manutenção tumoral^{63,88}.

Quando em conformação dimérica, estado o qual é comumente encontrada em células tumorais⁸⁷, PKM2 migra do complexo enzimático glicolítico e diminui a conversão de glicose em lactato, aumentando a disponibilidade de metabólitos para biossíntese de macromoléculas para as células com alta taxa proliferativa⁸⁷. As mudanças pós-traducionais, oncogenes e a interação com outras proteínas são fatores que interferem na estrutura e atividade de PKM2 e

também em sua localização celular^{23,63,67,74,89,90}. Além de sua atividade bem estabelecida na via glicolítica que ocorre no citosol, PKM2 dimérica pode ser translocada para o núcleo para promover a proliferação celular⁶⁴ e para a mitocôndria sob condições de estresse oxidativo⁶⁶.

A fosforilação da Tyr105 induzida pelas oncoproteínas ErbB2 e por EGFR, por exemplo, impede a formação do tetrâmero ativo e promovem a translocação nuclear de dímeros de PKM2, onde passa a regular o ciclo celular modulando a expressão de ciclina D1⁹¹. Já a fosforilação da Ser37 de PKM2 é aumentada por estrógeno e está associada com a ativação de ERK em meio celular rico em glicose⁹². Nestas condições, PKM2 é estabilizada em dímeros e translocada para o núcleo afetando a regulação de genes envolvidos na glicólise⁹².

Wu e colaboradores⁹³ mostraram que a super-expressão de PKM2 na sua forma inativa dimérica diminui a expressão da proteína supressora tumoral p53. Além disso, PKM2 pode ligar-se diretamente à p53, promovendo sua ubiquitinação por intermédio do seu principal regulador, o MDM2, ocasionando sua degradação⁹³.

A translocação de PKM2 para o núcleo permite ainda que esta enzima forme complexos com TG1F2, um repressor do fator de crescimento *transforming growth factor*- β (TGF- β) e com a histona desacetilase 3 (HDAC3), levando à repressão da expressão da E-caderina e contribuindo para o processo de transição epitélio mesenquima, que é crucial para o processo metastático de tumores⁹⁴.

A interação de PKM2 com CD44, uma molécula de adesão celular importante em processos metastáticos, leva ao aumento do perfil glicolítico e resistência a tratamento quimioterápicos em células tumorais deficientes em p53 e expostas a situações de hipóxia comumente observadas no microambiente tumoral⁹⁵.

Sob estresse oxidativo, PKM2 transloca para a mitocôndria, onde interage e fosforila Bcl2⁶⁶. Como consequência, Bcl2 fosforilada torna-se protegida de mecanismos de degradação, acarretando a inibição do apoptose das células neoplásicas. Assim, a atividade não canônica proteína quinase de PKM2 na mitocôndria sob Bcl2 auxilia na adaptação a condições de estresse oxidativo no microambiente tumoral⁶⁶.

A translocação mitocondrial de PKM2 também pode ocorrer através da

succinilação de resíduos de lisina desta proteína em condições de privação de glicose⁹⁶. Neste processo, PKM2 interage e estabiliza VDAC3 impedindo sua degradação, o que ocasiona o aumento da permeabilidade mitocondrial e permite o maior fluxo de ATP e nutrientes promovendo a proliferação e sobrevivência celular⁹⁶.

A capacidade da atividade da PKM2 ser controlada fornece um mecanismo vantajoso para as células neoplásicas, pois permite a adaptação a condições que requerem diferentes conjuntos de metabólitos para os processos biossintéticos durante a tumorigênese, bem como pode exercer funções não canônicas que favorecem a manutenção do fenótipo tumoral^{19,83,97–99}. Deste modo, estudos têm sugerido que o aumento da expressão da PKM2 contribui para surgimento e manutenção de diversos tipos de cânceres, como por exemplo o câncer de próstata¹⁰⁰, cervical⁹³ e da mama¹⁰¹. Em neoplasias, majoritariamente encontra-se dímeros inativos de PKM2⁸⁷.

PKM2 tem sido proposta como um promissor alvo na terapia do câncer e, portanto, compreender como esta enzima é regulada é de suma importância para o desenvolvimento de medicamentos que mimetizem ou neutralizam sua ação nas células^{90,102}. Visto que a forma dimérica inativa de PKM2 no câncer é preferencialmente expressa por permitir o acúmulo de intermediários biossintéticos⁸⁷, a busca por drogas que mantenham PKM2 ativa diante de sinais inibitórios pode ser uma potente maneira de cessar o crescimento de células tumorais⁹⁰.

Com a menor atividade piruvato quinase de PKM2 em células tumorais devido a sua conformação dimérica, as GLS são cruciais para suprir a demanda energética através do metabolismo de glutamina²⁰. O metabolismo simultâneo de glicose e glutamina dá suporte aos tumores, uma vez que a glutamina alimenta o TCA compensando a exportação dos intermediários biossintéticos provenientes da glicose⁸⁷.

Em estudo publicado por Lu et al.,¹⁰³, o *knockdown* da expressão de PKM2/GLS em modelos xenográficos inibiu significativamente o crescimento tumoral, aumentou o potencial de apoptose das células neoplásicas e reverteu a resistência oxaliplatina. Similarmente, Kitayama e colaboradores¹⁰⁴ mostraram que o *knockdown* concomitante de PKM2 e GLS reduz a proliferação de células resistentes a hipóxia em modelo de câncer gástrico.

Em conjunto, estes dados mostram que ter GLS e PKM2 como alvo terapêutico mútuo é uma valiosa estratégia no tratamento do câncer e investigar como esta interação exerce influência sobre estas enzimas traz nova luz sobre a complexa rede que regula metabolismo tumoral. Deste modo, compreender como a interação entre GLS e PKM2 ocorre e suas consequências para o metabolismo tumoral, fornece novas perspectivas sobre o papel destas enzimas durante a tumorigênese e sobre como a comunicação entre a via glicolítica e glutaminolítica dá suporte às células neoplásicas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Confirmar e caracterizar a interação das isoformas de GLS, KGA e GAC, com a enzima PKM2 bioquimicamente e em linhagens celulares tumorais, elucidar cenários que possam mediar a interação das proteínas e compostos que possam interferir na afinidade das mesmas.

2.2 Objetivos Específicos

Estudos bioquímicos

- Obter as proteínas PKM2, GAC e KGA a partir da expressão heteróloga em *E.coli*.
- Avaliar regiões importantes para a interação através da expressão e purificação de domínios das proteínas.
- Realizar ensaios para confirmar e caracterizar as interações.
- Formar os complexos em quantidades, estabilidade e pureza adequadas para estudos estruturais da interação.
- Verificar se as interações impactam na atividade *in vitro* de glutaminase e de PKM2.
- Testar compostos que possam modular a estabilidade do complexo.

Estudos celulares

- Avaliar o nível de expressão gênica e proteica de PKM2 e GLS em linhagens celulares de tumor de mama.
- Comprovar a interação das proteínas em células.
- Avaliar a interação das proteínas por co-imunoprecipitação.
- Avaliar se ocorre a co-localização das proteínas.
- Caracterizar condições de cultivo celular importantes para interação em células.

3 Materiais e Métodos

3.1 Construções dos domínios das proteínas

No início deste trabalho, os genes de *human* PKM2 (hPKM2), *human* KGA (hKGA) e *mouse* GAC (mGAC) já se encontravam clonados nos vetores de expressão. As clonagens foram realizadas pelos colaboradores do grupo PMT em trabalhos prévios. O mapa dos vetores utilizados encontra-se no anexo I.

Para expressão em célula de mamíferos, os genes de KGA e GAC foram previamente clonados em pcDNA3.1 fusionados com cauda V5 no C-terminal. A partir destes clones foi realizada a subclonagem em vetor pET-28a para expressão heteróloga em sistema bacteriano. A construção de hKGA engloba os domínios N-terminal, Domínio Catalítico e C-terminal com deleção dos primeiros 123 aminoácidos da porção N-terminal (Val124-Leu669) e a de mGAC os 128 primeiros aminoácidos (Met128-Ser598) também contendo os três domínios citados. A exclusão dos primeiros aminoácidos se faz necessária por envolverem uma porção N-terminal desordenada suscetível a proteólise¹⁰⁵.

Para expressão proteica em células de mamífero, o gene de PKM2 foi amplificado da biblioteca de cDNA de MDA-MB-231 utilizando os primers PKM2_BamHI *forward* 5'-gtaggatccatgtcgaagcccat-3' e PKM2_BamHI *reverse* 5'-gtaggatcctcacggcacaggaac-3'. A clonagem foi realizada no vetor pcDNA5_FRT_TO_Flag em fusão N-terminal com o epítipo Flag. Para expressão heteróloga em *E. coli*, cepa Rosetta, o cDNA de PKM2 foi subclonado em pET-28a (+) fusionado a uma cauda contendo his-tag na região N-terminal, extraíndo-se o inserto do clone pcDNA5_PKM2.

A tabela 1 resume as principais características e propriedades das proteínas codificadas pelos insertos clonados em pET- 28a(+) em fusão com his-tag.

Tabela 1. Características das proteínas hKGA, mGAC e hPKM2 expressas no vetor pET-28a(+).

Parâmetros	hKGA Val124-Leu669	mGAC Met128-Ser598	hPKM2 Met1-Pro531
Massa Molecular (kDa)	60,1	53,3	59,6
Ponto isoelétrico	6,78	6,83	8,23
Coeficiente de Extinção Molar ($M^{-1}cm^{-1}$)	41830	38850	30535

As construções de hKGA e mGAC previamente clonadas em vetor pET-28a(+) e C-terminal de mGAC em pET-SUMO foram utilizados neste trabalho para avaliar regiões importantes para a interação. As regiões clonadas a partir da construção de KGA envolvem o Domínio N-terminal + Domínio Catalítico (exclusão do C-terminal; aa124-550) e N-terminal (exclusão C-terminal e Domínio Catalítico aa124-220), as quais são em comum para as duas isoformas. Além disso, as construções exclusivas de GAC Domínio Catalítico + C-terminal (226-598) e C-terminal (530-598) também foram avaliadas. As sequências dos clones gerados foram confirmadas por sequenciamento. As construções e domínios das GLS são ilustradas na figura 10.

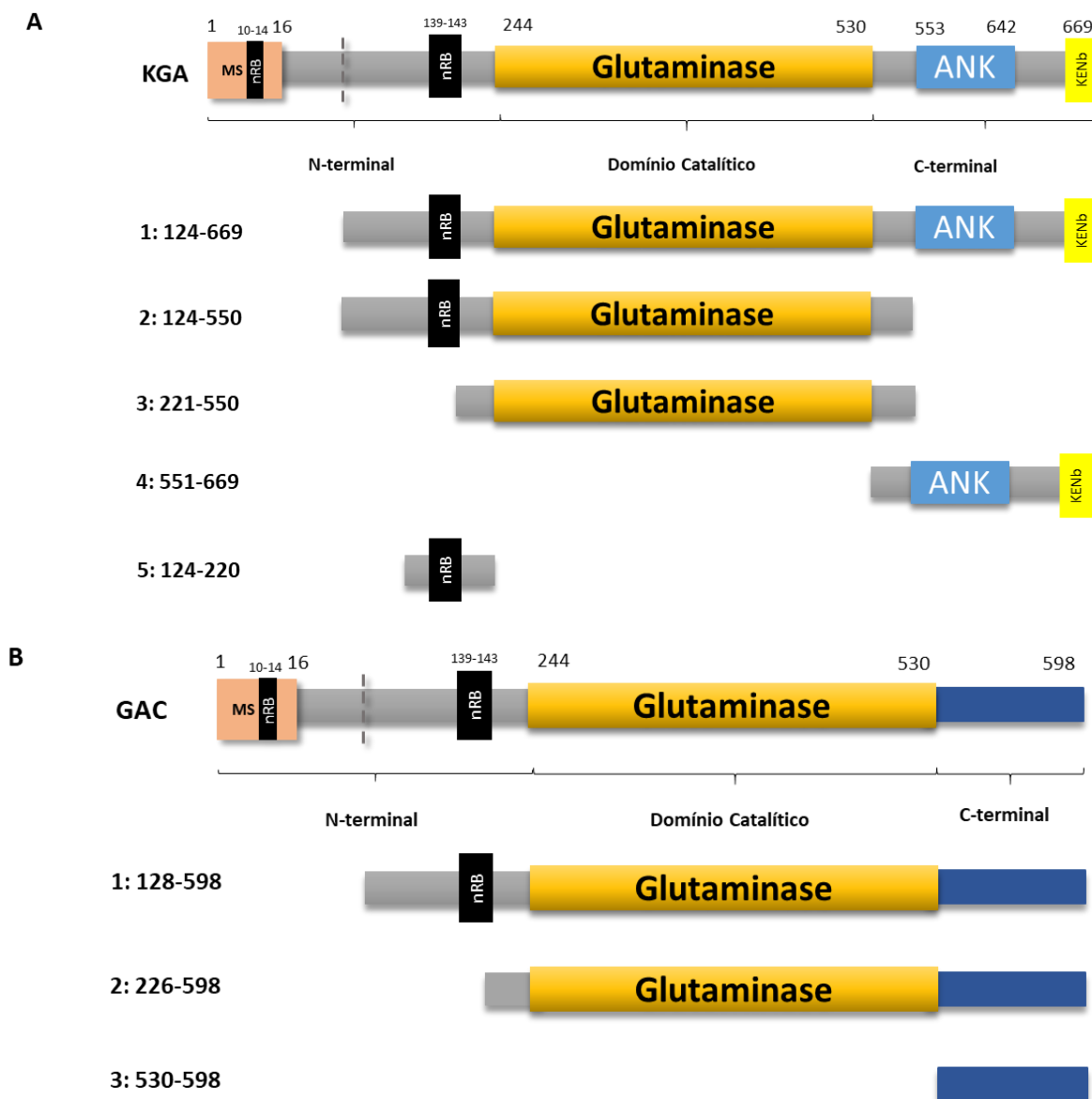


Figura 10. Domínios de hKGA e mGAC utilizados no estudo.

As construções de (A) hKGA (124-669) e (B) mGAC (128-598) já se encontravam previamente clonadas em vetor pET-28a(+) fusionadas a his-tag. A partir destas clonagens, foram realizadas subclonagens para avaliar domínios importantes para a interação das proteínas. MS = sequência consenso de trânsito de peptídeos que direciona a enzima para a mitocôndria. NRB (domínio NR box, geralmente encontrados em proteínas que interagem com receptores nucleares). KEN-box (importante para ubiquitinização e degradação). ANK (domínio de anquirina, relacionados a interação proteína-proteína). A linha tracejada indica a região contendo os aminoácidos excluídos.

3.2 Ensaios Bioquímicos para Avaliação da Interação

3.2.1 Expressão heteróloga das proteínas

A expressão de hKGA, mGAC e hPKM2, bem como das construções de glutaminase, foi realizada em *E. coli Rosetta*. Bactérias competentes foram transformadas com 50 ng de DNA plasmidial por meio de choque térmico, e plaqueadas em meio LB sólido (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 10 g/L extrato de levedura, 15 g/L ágar) contendo os antibióticos kanamicina e cloranfenicol a uma concentração final de 50 µg/mL cada, e mantidas em estufa 37°C *overnight*.

Para cada proteína, uma colônia foi utilizada para inocular 500 µL de meio LB líquido (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 10 g/L extrato de levedura) mantido em agitação constante a 37°C por 1 hora. Posteriormente, o volume do microtubo foi transferido para um *Erlenmeyer* contendo 100 mL de meio LB acrescido de kanamicina e clorafenicol sob as mesmas condições *overnight*.

Um volume de 10 mL do pré-inóculo foi utilizado para inocular 1L de meio de cultura LB contendo os antibióticos mencionados. O inóculo permaneceu sob as condições prévias até atingir a fase log (Densidade Ótica (DO) 600 nm = 0,6), com posterior indução da expressão das proteínas recombinantes com 0,5 mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Após a indução com IPTG, a temperatura do shaker foi reduzida para 18°C mantendo-se os inóculos sob agitação constante por 16 horas. Decorrido o período, o inóculo foi centrifugado a 10000 x g, 4°C por 15 minutos e o *pellet* proveniente foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

3.2.2 Purificação

3.2.2.1 Cromatografia de Afinidade

Os *pellets* provenientes da cultura de cada proteína foram ressuspensos em 100 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 5% glicerol; 2 mM β-ME; 1 mM PMSF) acrescido de lizosima a 20 mg/L, incubados por 30 minutos a 4°C e sonificados por 1 hora em gelo (SONICS VCX 500, pulsos 3 segundos *on*/ 9 segundos *off*, amplitude 40%). A fração insolúvel e solúvel (contendo a proteína de interesse) foi separada por centrifugação a 19400 x g por 1h a 4°C.

Para a purificação por afinidade, utilizou-se resina complexada com íons cobalto (TALON Metal Affinity Resin Clontech Laboratories #635504.). 15 mL da resina foram lavados com água e equilibrados com tampão de afinidade (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM NaCl).

A amostra solúvel dos lisados foi inserida na coluna e o efluente coletado. A resina foi lavada com um gradiente crescente de imidazol, utilizando-se o tampão de afinidade sem imidazol (Lavagem 1) e 20 mM imidazol (Lavagem 2). As proteínas foram eluídas com o tampão de afinidade acrescido de 250 mM de imidazol. Quando necessário, a remoção da his-tag foi realizada com adição de 150 μ L de trombina (1U/ μ L). Amostras foram analisadas por SDS-PAGE gradiente 3-15%.

3.2.2.2 Cromatografia de Troca Iônica

Para a purificação de mGAC e hKGA, bem como as construções de domínios específicos, foi realizada a cromatografia de troca aniônica com a coluna HiTrapQ™ de 1mL em equipamento AKTA FPLC (GE Healthcare), sob fluxo constante de 1 mL/min⁻¹. Foram utilizados os tampões de purificação A (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM NaCl) para equilibrar a coluna e um tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 1 M NaCl; 2 mM B-ME) para promover um gradiente de concentração de NaCl para eluição da proteína em 40 CV.

3.2.2.3 Cromatografia de Filtração em Gel

Como último passo de purificação as proteínas foram concentradas em concentrador Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit 30.000 NMWL (Fisher Scientific) até um volume de 5 mL para injeção na cromatografia de filtração em gel HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg ou 75 pg (GE Healthcare), dependendo do peso molecular da proteína, acoplada ao equipamento AKTA FPLC com fluxo constante de 1 mL/min. A corrida foi realizada com tampão contendo 30 mM HEPES pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,5 mM TCEP, previamente filtrado e deaerado.

A concentração final das proteínas foi estimada em um equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) pelo método de absorção em comprimento de onda de 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar teórico calculado para cada proteína.

3.2.2.4 Co-purificação das proteínas

Na tentativa de se obter complexos de maneira homogênea (livre de formas oligoméricas alternativas e/ou homoligômeros), as proteínas após purificadas foram combinadas na razão estequiométrica 1:1 e re-purificadas por filtração em gel em coluna HiLoad™ 10/300 Superdex™ 200 pg (GE Healthcare) acoplada ao equipamento AKTA FPLC, com fluxo constante de 0.5 mL/min. A corrida foi realizada com tampão contendo 30 mM HEPES pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,5 mM TCEP.

A formação do complexo foi avaliada por presença de pico de UV280 de eluição diferencial entre os picos obtidos na aplicação das amostras individualmente. Para cálculo da massa dos complexos eluídos a coluna foi calibrada com proteínas de peso molecular conhecido. A presença das proteínas no pico eluído foi confirmada através da aplicação das amostras em gel SDS-PAGE 10% posteriormente corado com corante *Comassie Blue*.

3.2.3 Pull-Down

PKM2 fusionada com his-tag em concentrações finais de 0.5 mg/mL, 1 mg/mL e 2.5 mg/mL foram adicionadas em microtubos independentes contendo 200 µL de resina de afinidade TALON (Clontech Laboratories) e incubados por 1 hora. Posteriormente a resina foi lavada 3 vezes com tampão de *Pull-Down* (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 2 mM β-ME) a 5000 x g por 1 minuto a 4°C. Em seguida, foi adicionado 0,5 mg de GAC, sem cauda de histidina, em cada microtubo independentemente com incubação de 1 hora. A adição do ativador de PKM2 F-1,6-BP a uma concentração final de 500 µM e de 20 mM do ativador de GLS fosfato inorgânico (K₂HPO₄, Pi) também foram avaliadas como variáveis que poderiam influenciar na interação das proteínas. As reações foram incubadas sob leve agitação a 4°C por 16 horas.

A resina foi separada da solução por centrifugação a 5000 x g por 5 min e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foi realizada a lavagem da resina com tampão de afinidade, descartando-se a fração líquida. Após as lavagens, as proteínas ligadas na resina foram eluídas com adição de 250 mM de imidazol. Como controle de *background* e de afinidade inespecífica, a resina foi incubada apenas com GAC sem his-tag. As amostras resultantes foram analisadas em gel

SDS-PAGE 10% corado com Comassie *Blue*.

3.2.4 Anisotropia de Fluorescência

Para este ensaio, GAC e KGA *full-length*, bem como as construções de GLS foram marcadas com fluoresceína isotiocianato (FITC, Thermo Scientific) e tituladas com PKM2.

A marcação das proteínas com FITC foi realizada através da diluição das proteínas a 1 mg/mL em 50 mM de tampão de borato de sódio ($\text{N}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$) pH 8,5, com posterior incubação com o fluoróforo por 1h a temperatura ambiente, protegido de luz. Para remoção do excesso de FITC, fez-se uma cromatografia de gel-filtração em coluna HiLoad 10/300 GL 200 pg (ou 75 pg, de acordo com o peso da construção) em tampão 30 mM Hepes pH 8,0, 500 mM NaCl e 0,5 mM TCEP. Ao final da corrida, as concentrações das proteínas foram mensuradas a 280 nm. Como o FITC também absorve a 280 nm, empregou-se um fator de correção para avaliar a concentração final proteica como mostrado na equação 1.

$$\text{Concentração de proteína (M)} = A_{280} - \frac{(A_{\max} - CF)}{\epsilon} \times \text{fator de diluição} \quad (1)$$

Em que, $A_{\max}$ = absorvância (A) de uma solução de fluoróforo medida no comprimento de onda em que ocorre a sua máxima absorção ($\lambda_{\max}$). Para FITC, $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$ e $CF_{\text{FITC}} = 0,3$; ϵ = coeficiente de extinção molar da proteína.

Para cálculo da taxa de incorporação da sonda na proteína empregou-se a equação 2.

$$\text{Mols de FITC por mols de proteína} \times \frac{(A_{\max} \text{ da proteína marcada})}{\epsilon' \times \text{concentração da proteína (M)}} \times \text{fator de diluição} \quad (2)$$

Onde, ϵ' = coeficiente de extinção molar FITC ($\epsilon_{\text{FITC}} = 68.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

As proteínas marcadas foram aliqotadas e armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios de anisotropia.

O ensaio de anisotropia se baseia no fato de quando uma molécula pequena fluorescente (neste caso GLS marcada com FITC livre em solução) é

excitada com uma luz plana polarizada, a luz emitida é despolarizada substancialmente sendo emitida em sentido horizontal e vertical, uma vez que as moléculas rotacionam rapidamente numa solução durante a emissão de fluorescência. No entanto, se a molécula marcada é ligada (formação do complexo de GLS-FITC com PKM2), seu volume molecular aumenta. Assim, as medidas de polarização da luz determinam o deslocamento angular médio que ocorre entre a absorção e a subsequente emissão do fóton pelo fluoróforo¹⁰⁶ (Figura 11).

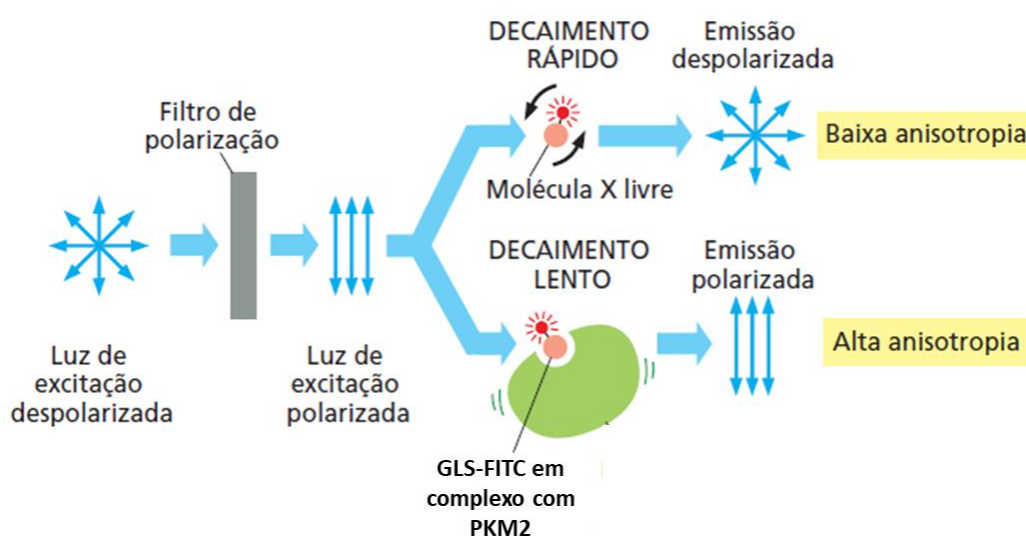


Figura 11. Ensaio de anisotropia de fluorescência.

Esquema representativo do ensaio de anisotropia de fluorescência, envolvendo glutaminases marcadas com o fluoróforo FITC para caracterização de sua interação com PKM2. Após excitação com luz polarizada, as moléculas de GLS-FITC em complexo com PKM2 sofrem difusão rotacional mais lenta do que as moléculas de KGA-FITC livres em solução, resultando em maior polarização da luz emitida. A anisotropia é calculada a partir das intensidades polarizadas vertical e horizontal medidas pelo equipamento. Adaptado do livro *Biologia Molecular da Célula*, Alberts et al., 2010¹⁰⁷.

Para o ensaio, PKM2 previamente purificada e concentrada até 740 μM foi diluída em série 1:2 em 15 poços contendo tampão 30 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,5 mM TCEP. As diferentes diluições da proteína foram acrescidas com as respectivas proteínas marcadas com FITC mantidas a uma concentração final fixa de 10 nM. O *mix* de reação foi aplicado em uma microplaca preta de 384 poços (Greiner Bio-one) em replicatas de 25 μL cada.

Os ensaios também foram realizados na presença do ativador alostérico de PKM2, F-1,6-BP, em concentração final de 500 μM e do ativador de GLS, Pi, em 20 mM acrescidos ao *mix* reacional, para avaliar o impacto destes moduladores

na interação das proteínas.

Após 1 e 24 horas de incubação foram realizadas as medidas de anisotropia em leitor CLARIOstar (BMG Labtech) com excitação e emissão nos comprimentos de onda 480 nm e 520 nm, respectivamente.

Os valores de anisotropia obtidos foram plotados *versus* o log da concentração de PKM2 (em escala logarítmica na base 10) e os valores da constante de dissociação (K_d) foram obtidos através da regressão não-linear da curva sigmoidal resultante. Os dados resultantes foram avaliados no programa GraphPad Prism v5.0.

3.2.5 Cromatografia de exclusão molecular analítica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos

Para elucidar os complexos de interação entre as proteínas KAG e GAC com PKM2, utilizou-se a cromatografia de exclusão molecular analítica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (*size exclusion chromatography – multi angle light scattering*, SEC-MALS, MiniDAWN TREOS®, Wyatt QELS®, Wyatt Technology Corporation) do IFSC-USP.

A técnica de SEC-MALS é empregada para mensurar de forma absoluta a massa de macromoléculas. A cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) separa moléculas com base no volume hidrodinâmico e baseia-se em padrões de referência para calibrar o tempo de eluição da coluna em função da massa molar^{108,109}. O MALS usa a intensidade e a dependência angular da luz dispersa para medir a massa molar absoluta e o tamanho das moléculas em solução. Combinando SEC e MALS é possível realizar medições de massa mais precisas do que pelos métodos individualmente.

A técnica fornece a massa molar e tamanho de moléculas, permite estudar a interação proteína-proteína, estados de oligomerização, associação e dissociação. Ao comparar a massa molar de uma amostra com a sua concentração, pode-se determinar a afinidade de ligação e a estequiometria de moléculas interagindo¹⁰⁹.

Para realização do ensaio, as amostras proteicas a 50 μ M cada, foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e posteriormente aplicadas em uma coluna Superdex 200 5/150 GL previamente equilibrada com tampão 30 mM

Hepes pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,5mM TCEP acoplada a um detector MALS e a um detector de índice de refração.

Foram introduzidos aditivos nas análises conhecidos por modularem a atividade das proteínas, a fim de elucidar condições que poderiam interferir nos complexos, conforme mostrado na tabela 2. Os dados obtidos das corridas foram processados e analisados no *software* ASTRA 7.

Tabela 2. Compostos moduladores de GLS e PKM2 avaliados para a formação do complexo.

Composto	Concentração
BPTES	10 μ M
DMSO	1%
K ₂ HPO ₄	20 mM
F-1,6-BP	500 μ M
Piruvato	2 mM
Fosfoenolpiruvato	2 mM
ADP	2 mM
ATP	2 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	10 mM

3.2.6 *Dynamic Light Scattering*

A técnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS) também foi utilizada para obter informações dos complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA.

Com o espalhamento de luz dinâmico pode-se inferir o tamanho das partículas e seu tamanho molecular a partir do movimento browniano em solução. Para realizar o ensaio, foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical) do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (Grupo LEC) do

LNBio.

Para as medidas, foram adicionados 30 μL de amostra das proteínas mantidas a 1 mg/mL na cubeta. Foram avaliadas as proteínas sozinhas bem como a solução dos complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA, na presença ou ausência dos aditivos 500 μM de F-1,6-BP e 20 mM de Pi. Os resultados obtidos foram avaliados no *software* do equipamento.

3.2.7 Atividade Enzimática

3.2.7.1 Ensaio de Atividade Enzimática de Glutaminase

O ensaio de atividade de glutaminase foi realizado de acordo com protocolo estabelecido pelo grupo PMT⁴¹, conforme ilustrado na figura 12.

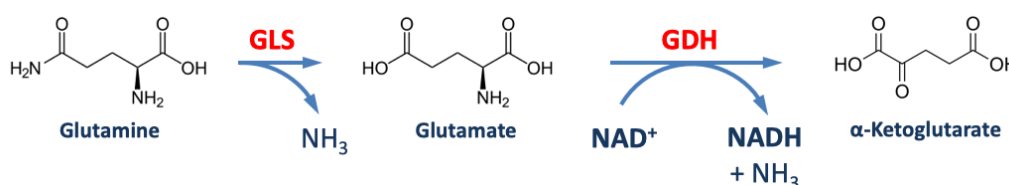


Figura 12. Ensaio de atividade enzimática de glutaminase.

Glutaminase converte glutamina em glutamato que é convertido em α-cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase, de maneira dependente de NAD⁺. A velocidade de reação é medida pela formação de NADH detectada por absorbância a 340 nm. GLS: Glutaminase; GDH: Glutamato desidrogenase.

Nesse ensaio, os parâmetros cinéticos são obtidos de forma indireta, ou seja, o produto da reação catalisada pela GLS, glutamato, é usado como substrato da glutamato desidrogenase (GDH), que o converte em α-cetoglutarato. Neste processo, o NAD⁺ é reduzido a NADH, este sendo identificado pela absorbância em 340 nm.

Para este experimento, 5 nM de glutaminase purificada foi incubada em 50 mM de Tris-Acetato pH 8,6; 0,2 mM EDTA; 30 mM NAD⁺ (Sigma Aldrich), 3 unidades de GDH (Sigma Aldrich). O composto K₂HPO₄ foi utilizado como fonte de Pi para a reação, para ativação da enzima em concentração final na reação de 20 mM.

Para avaliar a influência de PKM2 na atividade de GLS, o ensaio foi realizado em concentrações crescentes de PKM2 de 10, 25, 50, 100 e 200 nM e na presença ou ausência de 500 μM de seu ativador F-1,6-BP.

Um volume final de 100 μL de reação foi adicionado em cada poço em placas de 96 poços. A reação foi incubada 1 hora a temperatura ambiente previamente à leitura. No momento da leitura, foi adicionado 100 μL de solução de glutamina a 12,5 mM. A medida de absorbância foi realizada em um leitor de placa Enspire 2300 MultiLaber Reader (PerkinElmer) no comprimento de onda de 340 nm para monitorar a formação de NADH. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism v5.0.

3.2.7.2 Ensaio de Atividade Enzimática de Piruvato Quinase

O ensaio de atividade de PKM2 foi realizado com o kit comercial Pyruvate Kinase Assay (Sigma Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante.

De forma sucinta, realizamos as leituras na presença fixa de 600 nM de PKM2 incubada com o substrato da reação, o mix enzimático e substrato de peroxidase fluorescente, ambos fornecidos pelo kit. Para as leituras com GAC, foram adicionados no mix reacional 100, 300, 600, 1200 e 2400 nM da enzima. Como controle realizamos leituras somente de PKM2 e GAC a 600 nM. As leituras foram realizadas a cada 5 minutos a 570 nm no leitor de placas ClarioStar (Promega) a 25°C. Para calcular o resultado da reação, os valores obtidos nas leituras foram subtraídos ($\Delta 570 = (A_{570})_{\text{final}} - (A_{570})_{\text{inicial}}$) da curva padrão. O mecanismo reacional é sumarizado na figura 13.

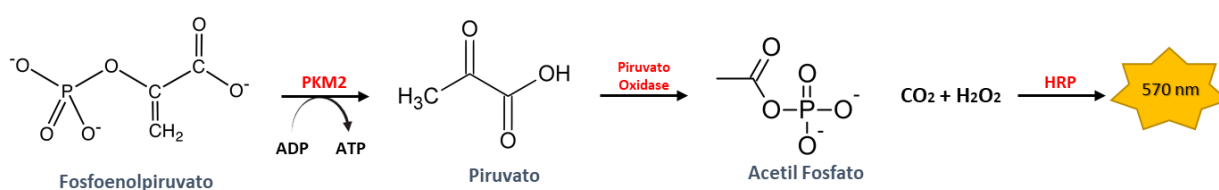


Figura 13. Ensaio de atividade enzimática de Piruvato Kinase.

PKM2 converte fosfoenolpiruvato em piruvato que é convertido em acetil fosfato pela enzima piruvato oxidase, liberando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$. A concentração de piruvato é determinada por um ensaio colorimétrico (570 nm) proporcional ao piruvato presente. Uma unidade irá transferir um grupo fosfato de PEP para ADP para gerar 1,0 mmole de piruvato por minuto.

3.2.8 Espectrometria de Massas

Com intuito de avaliar aminoácidos e regiões importantes para interação de GAC e PKM2, foi empregada a técnica de espectrometria de massas com auxílio

do Grupo MAS do LNBio.

Para tanto, fez-se o *crosslinking* químico de GAC com PKM2 usando o agente *disuccinimidyl suberate* (DSS). A padronização da reação de *crosslinking* ocorreu fixando-se a quantidade das proteínas em 17 μ M e variando a concentração final de DSS (0,2; 0,25; 0,50; 1,0; 1,25; 1,5 mM), diluído em dimetilsulfóxido (DMSO).

Nove microlitros das proteínas foram incubados com o 1 μ L DSS nas concentrações citadas por 20 minutos a temperatura ambiente (25°C). A reação foi inativada com adição de 20 mM de Tris pH 8,5. Como controle, fez-se o *crosslinking* individual de GAC e de PKM2.

Uma fração de 10 μ L das amostras provenientes do *crosslinking* foi aplicada em gel de poliacrilamida 10%, seguido de corrida a 100V por 3h. O gel foi corado com solução de *Coomassie Blue* 0,1%, a região do gel contendo a canaleta da banda de análise (acima de 100 kDa) foi cortada e em seguida descorada com solução descorante em três etapas de 1 hora cada.

Em seguida, a amostra passou por etapas de desidratação com acetonitrila 100%, redução com Ditioneitol (DTT) 10 mM, alquilação com iodoacetoamida 50 mM e lavagem com bicarbonato de amônio a 100 mM. Posteriormente foram feitas duas etapas alternadas de hidratação e desidratação do gel, até que a amostra fosse totalmente extraída e evaporada. Tripsina *High Sequencing* Grade (Promega) a 20 ng/ μ l em 50mM de bicarbonato de amônio foi adicionada à amostra, que foi então digerida por um período de 16 horas a 37°C. No dia seguinte, a amostra foi extraída da solução de tripsina com soluções de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila, evaporada e armazenada a – 20°C.

As amostras foram filtradas em coluna C18 (3M), eluídas com solução de acetonitrila 80% e ácido fórmico 0,1%, evaporadas e armazenadas a –20°C.

As amostras foram aplicadas no equipamento Thermo LTQ Orbitrap Velos e analisadas no *software* MaxQuant pelos técnicos do grupo MAS do LNBio.

3.2.9 Ensaios de cristalização e difração de raios-X

Os complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA previamente purificados em tampão contendo 30 mM Tris-HCl pH 8,5, 500 mM NaCl e 0,5 mM TCEP e em concentração final de 4 mg/mL, foram submetidos a varreduras de condições de

cristalização no Robolab do LNBio através do sistema robotizado HoneyBee (Genomic Solutions) e em parceria com o Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP).

As triagens iniciais foram realizadas utilizando-se os kits comerciais Index HT (Hampton Research), Morpheus HT-96 MD1-47, SG1-Screen HT-96/ FX-96, JCSG+ HT-96, The BCS Screen HT-96 MD1-105 (ambos da Molecular Dimensions).

As placas de cristalização foram montadas com 1.5 µl das proteínas purificadas com 1.5 µl das respectivas soluções de cristalização em condição de difusão de vapor e mantidas a 18°C até o surgimento dos cristais.

Os cristais obtidos foram então congelados e enviados para análise no Laboratório SOLEIL (França). Os dados foram processados no programa Xia2 disponível na linha e escalonados no programa AIMLESS.

3.2.10 Microscopia Eletrônica de Partículas Únicas com Contraste Negativo

O complexo PKM2+GAC previamente purificado por exclusão de massa molecular e as proteínas individuais GAC e PKM2, foram diluídas para concentrações de 0,35 µM e depositadas em uma grade ultrafina de filme de carbono (TED PELLA), previamente ionizada a 0,38 mBar com exposição de UV por 25 segundos (Pelco EasiGlow).

Para a deposição e fixação da proteína na grade de carbono, 3 µL de proteína foram colocados sobre a grade de carbono por 1 minuto, seguido por secagem com papel filtro. Após este passo, houve a lavagem da grade com 3 µL tampão L (30 mM Tris pH8,5; 100 mM NaCl; 0,5 mM TCEP) seguida por secagem com papel filtro, a qual foi repetida três vezes. Por fim, houve a adição de 3 µL de acetato de uranila (2%) por 30 segundos, seguida por secagem com papel filtro por duas vezes.

Após secagem, as imagens foram coletadas no microscópio TEM JEOL1400plus pelos técnicos do Grupo de Microscopia Eletrônica do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano). As imagens obtidas foram analisadas e mensuradas no *software* ImageJ.

3.3 Ensaios Celulares

3.3.1 Cultura de Células

As linhagens de células tumorais de mama provenientes do repositório ATCC, MDA-MB157, MDA-MB231, MDA-MB436, MDA-MB-468, MDA-MB-453, MCF7, MCF10A, SKBR3, T47D, ZR-75-30, BR-549, Hs578T, DU4475, HCC38, HCC70, HCC1143, HCC1599, HCC1806, HCC1937 e linhagem tumoral de próstata PC3 foram empregadas no trabalho.

Com exceção da MDA-MB-231, MDA-MB436, MDA-MB468, MCF7 e PC3, todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As demais linhagens foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB com 4,5 g glicose na presença de 2 mM de glutamina ou ausência deste aminoácido nas mesmas condições de estufa.

3.3.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Para avaliar o painel de células quanto a expressão de KGA, GAC e PKM2 realizou-se o ensaio reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

Linhagens de células foram utilizadas para extração de RNA total, utilizando kit RNeasy Mini (Qiagen), seguindo protocolo do fabricante. A síntese de biblioteca de cDNA a partir do RNA obtido foi realizada utilizando-se o kit Super-Script III – First strand (Invitrogen). *Primers* específicos para os genes da KGA, GAC e PKM2 foram desenhados (Tabela 3) e utilizados no ensaio.

A análise da expressão relativa dos mRNA foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR quantitativo (qPCR) empregando-se 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne). Nesta metodologia, monta-se uma reação com o cDNA das amostras, os primers dos genes de interesse e o composto fluorescente intercalante de DNA EvaGreen.

As amostras foram aplicadas em triplicatas técnicas, e a reação se deu pelas condições de 95°C por 10 minutos; e 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 60 segundos, 40 vezes.

Os dados foram normalizados pela expressão do normalizador 18S e para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct110}$.

Tabela 3. Primers utilizados para a análise de expressão gênica.

Gene		Primers
rRNA 18S	Fow	5'-ATTCCGATAACGAACGAGAC-3'
	Rev	5'-TCACAGACCTGTTATTGCTC-3'
GAC	Fow	5'-GATCAAAGGCATTCTTTGG-3'
	Rev	5'-TACTACAGTTGTAGAGATGTCC-3'
KGA	Fow	5'-TGGTGATCAAAGGGTAAAGTC-3'
	Rev	5'-TGCTGTTCTAGAATCATAGTCC-3'
PKM2	Fow	5'-CCACTTGCAATTATTTGAGGAA-3'
	Rev	5'-GTGAGCAGACCTGCCAGACT-3'

3.3.3 Transfecção das Células

Para a expressão dos cDNAs para os ensaios de *Western Blot* e co-imunoprecipitação, 4 µg de plasmídeos totais (2 µg de vetor para expressão de pQC-IP-hKGA-V5 ou pQC-IP-hGAC-V5 e 2 µg de vetor de expressão de pcDNA-hPKM2-Flag) em 150 µL de solução salina 0,9% foram adicionados a 12 µg de Polietilenimina (PEI) (Polysciences), e incubados com as células por 6 horas para a transfecção, com posterior troca do meio.

Após 48h de transfecção, as células para os ensaios de *Western Blot* e co-imunoprecipitação foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise (25 mM Tris- HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF em isopropanol, 2 mM β-Me; 10 µM leupeptina, 1 µM pepstatina) e o lisado centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo ensaio de Bradford.

A transfecção para imunofluorescência e Duolink-PLA foi realizada utilizando-se 50 ng de cada um dos plasmídeos descritos acima de interesse com 0,2 µl de Lipofectamine 2000 (Life Technologies), conforme instruções do fabricante. Após 6 horas o meio de cultura foi trocado e as células permaneceram em cultura por mais 48 horas. Posteriormente as células foram fixadas por 20 minutos com paraformaldeído 4% para realização dos ensaios.

3.3.4 Co-Imunoprecipitação

Para o ensaio de co-imunoprecipitação (Co-IP), 2×10^6 células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placa de 100 mm e cultivadas conforme descrito acima.

Para análises em que houve a expressão de PKM2-flag e GAC-V5 ou KGA-V5, a proteína A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology) foi previamente *cross-linked* com 1,4 μ g do anticorpo anti-Flag *tag mouse* (Sigma-Aldrich #F1804) e anti-V5 *tag rabbit* (EMD #AB3792), seguindo instruções do fabricante do Pierce Crosslinking IP KIT (ThermoFisher Scientific, #26147). Para análises de Co-IP endógeno das proteínas, a proteína A/G agarose foi *cross-linked* com 1,4 μ g anticorpo anti-GLS rabbit (Abcam #ab156876) seguindo as mesmas condições.

A proteína A/G agarose *cross-linked* com os respectivos anticorpos foi incubada com 3000 μ g de lisado celular total por 16 horas a 4°C sob agitação constante. Decorrido o período, a proteína A/G agarose foi lavada duas vezes com PBS após centrifugações a 1000 x g por 60 segundos. O sobrenadante foi descartado e as *beads* foram ressuspensas em tampão de lise descrito acima seguido de adição de tampão Laemmli ao *pellet*. As amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos, aplicadas em SDS-PAGE 3- 15% e analisadas por *Western Blot*.

3.3.5 Fracionamento Celular

Para o ensaio, células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio DMEM completo, na ausência de glutamina ou de glicose até a confluência das células (aproximadamente 1×10^7 células) em placa de 150 mm.

Posteriormente, as células foram removidas e fracionadas utilizando-se o kit comercial Qproteome Mitochondria Isolation Kit (Qiagen, #37612) seguindo as instruções do fabricante. As porções obtidas correspondentes a mitocôndria e citoplasma foram separadas e quantificadas pelo método de Bradford e analisadas por *Western Blot*.

3.3.6 Western Blot

Com a obtenção do lisado total celular e sua concentração de proteínas

total estimada, adicionou-se *Laemmli Buffer* a mesma seguido de homogeneização e aquecimento para desnaturação das proteínas. Para corrida, utilizou-se gel gradiente 3-15% de poliacrilamida em solução de Tris-glicina (25 mM Tris base; 192 mM Glicina; 0,1% SDS).

A transferência semi-seca das proteínas para uma membrana de transferência de Polivinilideno difluorido (PVDF) (GE Life Sciences) ativada em metanol e incubada em tampão de transferência (62,5 mM Tris base; 48 mM Glicina). Para o bloqueio da membrana com proteínas inespecíficas, a membrana foi incubada em 0,3% leite desnatado diluído em TBS-T (0,5% Tween 20; 137 mM NaCl; KCl 2,7 mM; 19 mM Tris base) por 1 hora, em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas em triplicata com TBS-T a cada 5 minutos sob agitação. Posteriormente as membranas foram incubadas com os seus respectivos anticorpos primários por 12-16 horas, a 4°C, sob agitação. Os anticorpos primários utilizados no ensaio, bem com suas respectivas diluições são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 4 Diluição dos anticorpos primários utilizados no ensaio de *Western Blot*.

Anticorpo	Hospedeiro	Diluição
V5	<i>Rabbit</i>	1:2000
Flag	<i>Mouse</i>	1:2000
GLS	<i>Rabbit</i>	1:2000
PKM2	<i>Mouse</i>	1:1000
Vinculina	<i>Mouse</i>	1:5000

Após remoção do anticorpo primário, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 3 vezes, em intervalos de 10 minutos, com posterior adição dos anticorpos secundário HRP (*Horseradish peroxidase*) específicos diluídos 1:1000 em TBS-T, e incubados por 2h, sob constante agitação, à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas ao término da incubação e reveladas com solução de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce).

3.3.7 Imunofluorescência

Oito mil células das linhagens PC3 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placa de 96 poços (Cell Carrier, Perkin Elmer) e incubadas *overnight* em estufa de 5% CO₂, à 37°C, para adesão das células e posterior transfecção com os respectivos plasmídeos como já mencionado. As células para análise de expressão endógena das proteínas foram mantidas em cultura sob as mesmas condições por 48h.

Decorrido o tempo de cultivo, as células foram fixadas com 4% paraformaldeído (Sigma-Aldrich), por 10 minutos, em temperatura ambiente. As células foram então permeabilizadas com 0,2% Triton X-100 em PBS, bloqueadas com Image-IT FX (Life Technologies, R37107) e incubadas com os respectivos anticorpos primários anti-Flag F1804 mouse (Sigma-Aldrich), anti-V5 *rabbit* (Life Technologies); anti-PKM2 *mouse* (Proteintech Group) e anti-GLS *rabbit* (Abcam) segundo recomendação do fabricante por 16 horas, a 4°C, sob agitação. Transcorrido o período, as células foram lavadas em triplicata com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Alexa fluor 633 anti-mouse (Life Technologies) e Dylight 488 anti-rabbit (Life Technologies) por 2 horas, em temperatura ambiente, sob agitação. Após lavagem em triplicata com PBS, os núcleos foram corados com 300 nM DAPI (D9542, Sigma), por 5 minutos. As imagens foram adquiridas Operetta High-Content Imaging System (Perkin-Elmer) e analisadas no *software* Columbus™ (Perkin-Elmer). Os anticorpos utilizados com suas respectivas diluições são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 Diluição dos anticorpos utilizados no ensaio de Imunofluorescência.

Anticorpo	Hospedeiro	Diluição
V5	<i>Rabbit</i>	1:2000
Flag	<i>Mouse</i>	1:2000
Alexa fluor-633	<i>Mouse</i>	1:500
Alexa fluor-488	<i>Rabbit</i>	1:500
GLS	<i>Rabbit</i>	1:1000
PKM2	<i>Mouse</i>	1:1000

3.3.8 Duolink- Proximity Ligation Assay (PLA)

Todos os passos de cultivo celular, transfecção, tratamento das células e marcação com os anticorpos primários para realização do ensaio de Duolink-PLA (Sigma Aldrich) foram realizados da mesma forma que para a imunofluorescência e posteriormente deu-se continuidade no experimento.

O ensaio de Duolink-PLA permite a detecção da interação de proteínas em distância menor que 30 nm nas células. Os reagentes de imunoensaio Duolink são baseados em ensaios de ligação dependentes de proximidade in situ (PLA), identificando proteínas ou complexos de proteínas como sinais fluorescentes¹¹¹⁻¹¹³.

Para a técnica, utilizam-se anticorpos primários de hospedeiros distintos para cada uma das proteínas de interesse. Sondas que atuam como anticorpos secundários (Probes Minus e Plus), contendo cadeias de DNA únicas são usadas como moldes para a hibridação de oligonucleotídeos ligados pela ação de uma enzima ligase para formar um molde circular dependente da proximidade das proteínas. Este molde, ainda ancorado ao anticorpo, é amplificado e detectado usando sondas de oligonucleotídeos complementares marcados. A detecção do sinal é realizada com um marcador fluorescente seguido de microscopia de fluorescência ¹¹¹⁻¹¹³ (figura 14).

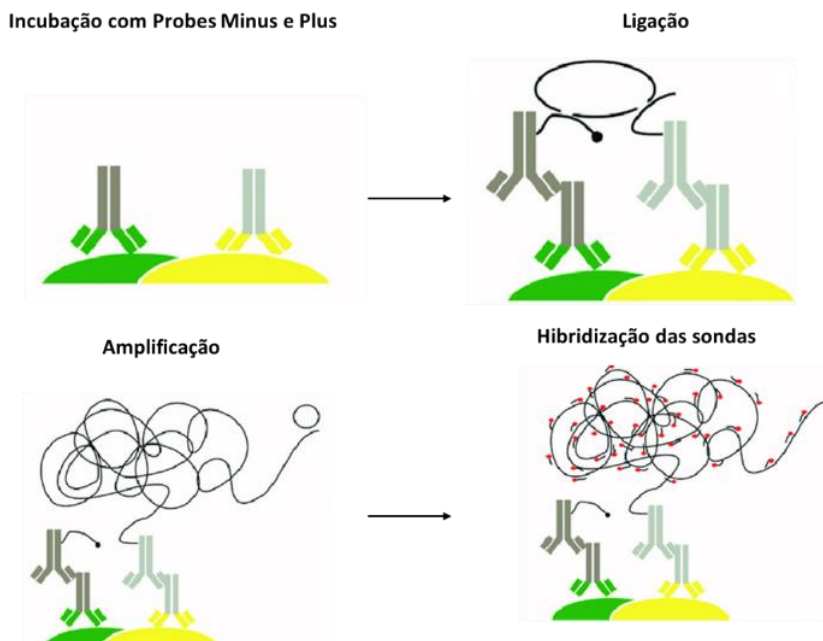


Figura 14. Ensaio de Duolink-PLA

Dois anticorpos primários de espécies diferentes são usados para detectar as proteínas de interesse. Cada anticorpo secundário específico da espécie (cinza escuro e cinza claro, respectivamente) fornecido no kit Duolink-PLA possui uma fita de DNA curta exclusiva (linha preta). Quando os anticorpos secundários estão próximos, as cadeias de DNA podem interagir através de uma adição subsequente de dois outros oligonucleotídeos de DNA circular. Após a ligação enzimática, os dois oligonucleotídeos adicionados são amplificados usando uma polimerase. Após a reação de amplificação, sondas oligonucleotídicas complementares marcadas são adicionadas para destacar o produto formado (círculos vermelhos). Adaptado de Trifilieff e colaboradores, 2011¹¹³.

As células previamente fixadas foram marcadas com os anticorpos primários por 16 horas a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas em triplicatas de 5 minutos com o Tampão de lavagem A.

A placa foi então pré-aquecida por 30 minutos a 37°C e em seguida incubada com 40µL de mix das sondas Probe Anti-Mouse PLUS e Probe Anti-Rabbit MINUS por 1 hora a 37°C. Decorrido o tempo, o mix foi removido, as células foram lavadas novamente Tampão de lavagem A e aos poços foram adicionados 40µL de mix de ligação das sondas contendo a enzima ligase por 30 minutos a 37°C.

A solução de ligação foi então removida, os poços foram lavados três vezes com Tampão de lavagem A e incubados por 1h e 40 minutos a 37°C com 40µL de solução de amplificação contendo enzima polimerase. A partir desta etapa, os passos seguintes foram realizados protegidos da luz.

A solução de amplificação foi removida, os poços foram lavados em duplicata com Tampão de lavagem B e posteriormente incubados com 40µL de

Staining Buffer 1X por 30 minutos a 37°C. Os poços foram lavados duas vezes com Tampão de lavagem A com seguinte adição de 40µL de solução anti-*fade* para aquisição das imagens.

As imagens foram obtidas utilizando o módulo confocal Leica TSC SP8 do microscópio Leica DMI 6000.

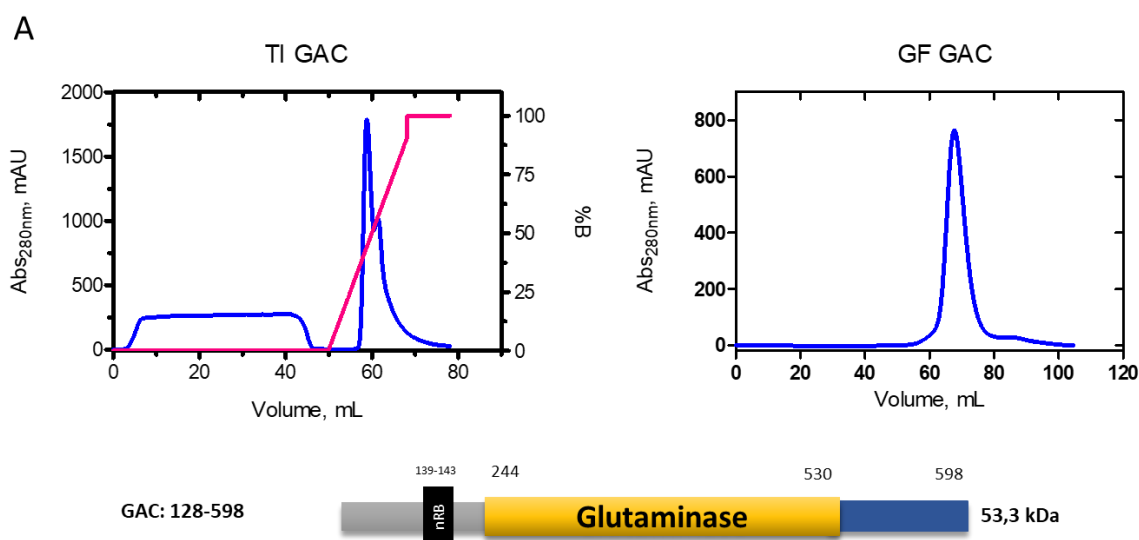
4 Resultados

4.1 Caracterização Bioquímica da Interação

4.1.1 Expressão e Purificação das Proteínas

As proteínas hKGA, mGAC, hPKM2 e as construções de GLS foram expressas de forma solúvel em *E. coli*, cepa Rosetta, em meio LB induzidas com 0,5 μ M de IPTG por 16 horas a 18°C.

A purificação das isoformas GAC (Figura 15 A) e KGA (Figura 15 B) foi realizada por meio da cromatografia de afinidade a metais quelados, seguida de cromatografia de troca aniônica e cromatografia de filtração em gel. Para a purificação de PKM2 foi realizada apenas a cromatografia de afinidade com posterior filtração em gel (Figura 15 C). O peso molecular esperado das construções de GAC (aa128-598) é 53,3 kDa, KGA (aa124-669) 60,1 kDa e PKM2 (aa1-531) 59,6 kDa. O grau de pureza obtidos após as etapas de purificação é mostrado no gel SDS-PAGE 3-15% (Figura 15 D).



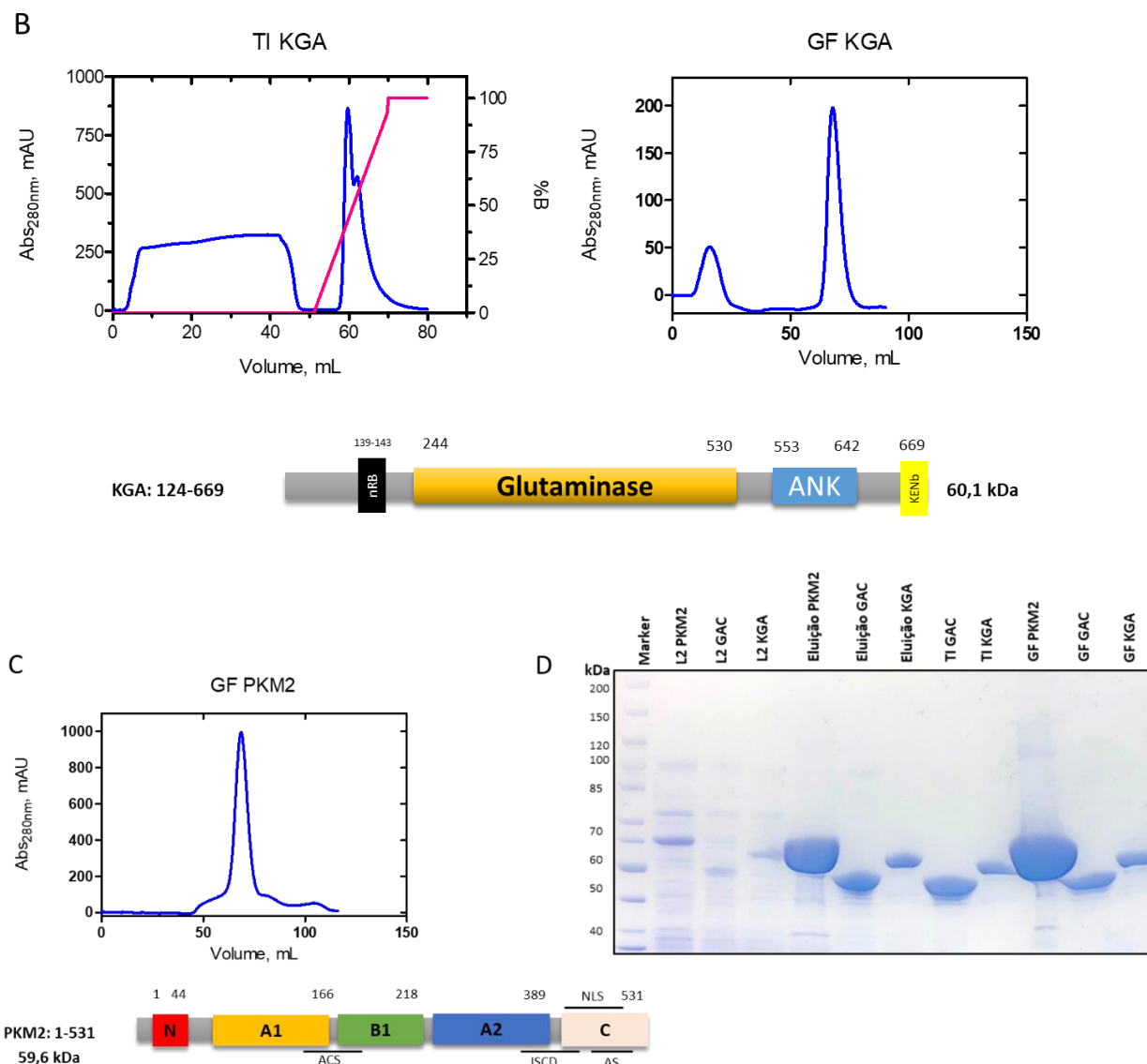


Figura 15. Purificação das proteínas GAC, KGA e PKM2.

A expressão das proteínas foi realizada em *E. coli*, cepa Rosetta e purificadas de 5 L de cultura. Cromatograma da purificação de GAC (A) e KGA (B) por troca iônica e filtração em gel. (C) Cromatograma da purificação de PKM2 por filtração em gel. (D) Gel SDS-PAGE 3-15% resumindo as etapas de purificação. Peso molecular estimado das proteínas: GAC= 53,3 kDa; KGA= 60,1 kDa; PKM2= 59,6 kDa. GF= Filtração em gel; L2= Lavagem com 20 mM de Imidazol; Eluição 250 mM Imidazol; 2; TI= troca iônica; ACS= Sítio ativo catalítico; ISCD= Domínio de contato entre unidades; AS= Sítio de ligação do ativador alostérico; NLS= Sequência de localização nuclear.

As construções de glutaminase N-terminal + Domínio Catalítico (aa124-550, 47.8 kDa); Domínio Catalítico + C-terminal (aa226-598, 30 kDa); N-terminal (aa124-220, 11 kDa); e C-terminal de GAC (aa530-598, 5.9 kDa) foram purificadas a partir de 3 L de cultura de *E. coli*, cepa Rosetta. Os cromatogramas são apresentados na figura 16.

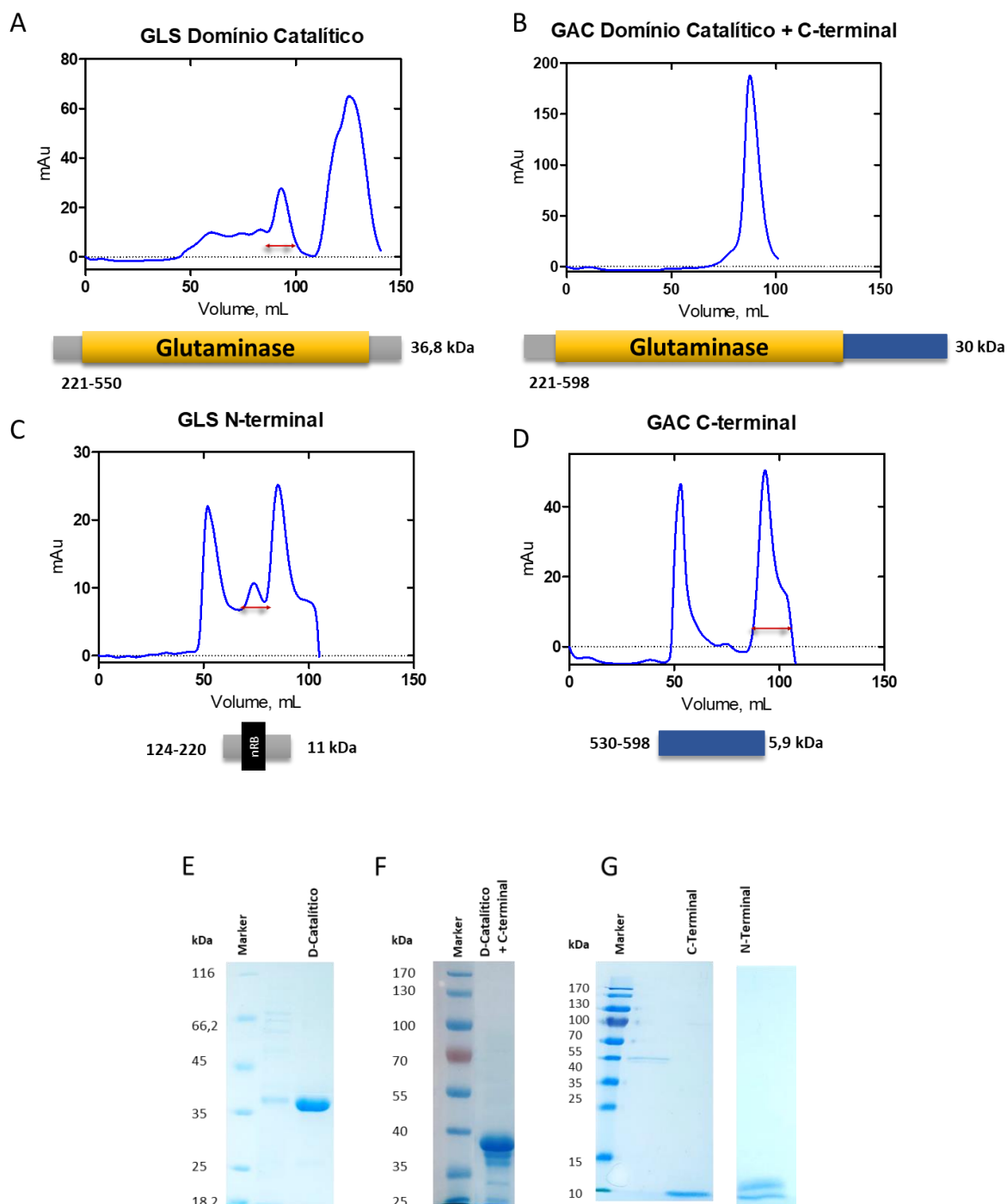


Figura 16 Purificação das construções de glutaminase.

A expressão das proteínas foi realizada em *E. coli*, cepa Rosetta e purificadas de 3 L de cultura. Cromatograma da purificação por filtração em gel de (A) Domínio Catalítico (aa221-550, 37,8 kDa); (B) GAC Domínio Catalítico + C-Terminal (aa226-598, 30 kDa); (C) GLS N-terminal (aa124-220, 11 kDa); (D) GLS C-terminal (aa530-598, 5,9 kDa); (E) Gel SDS-PAGE 3-15% da purificação da construção Domínio Catalítico, (F) D-catalítico+C-Terminal e (G) Domínio C-terminal e N-terminal. As setas em vermelho indiciam a fração coletada correspondente à proteína de interesse.

4.1.2 Obtenção dos complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA

Para obtenção dos complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA, após as etapas de purificação das proteínas de forma individual, as mesmas foram concentradas a 3 mg/mL cada e incubadas *overnight* a 4°C. Posteriormente foi realizada a cromatografia de filtração em gel para retirada de quaisquer resquícios de impurezas presentes nas amostras (Figura 17).

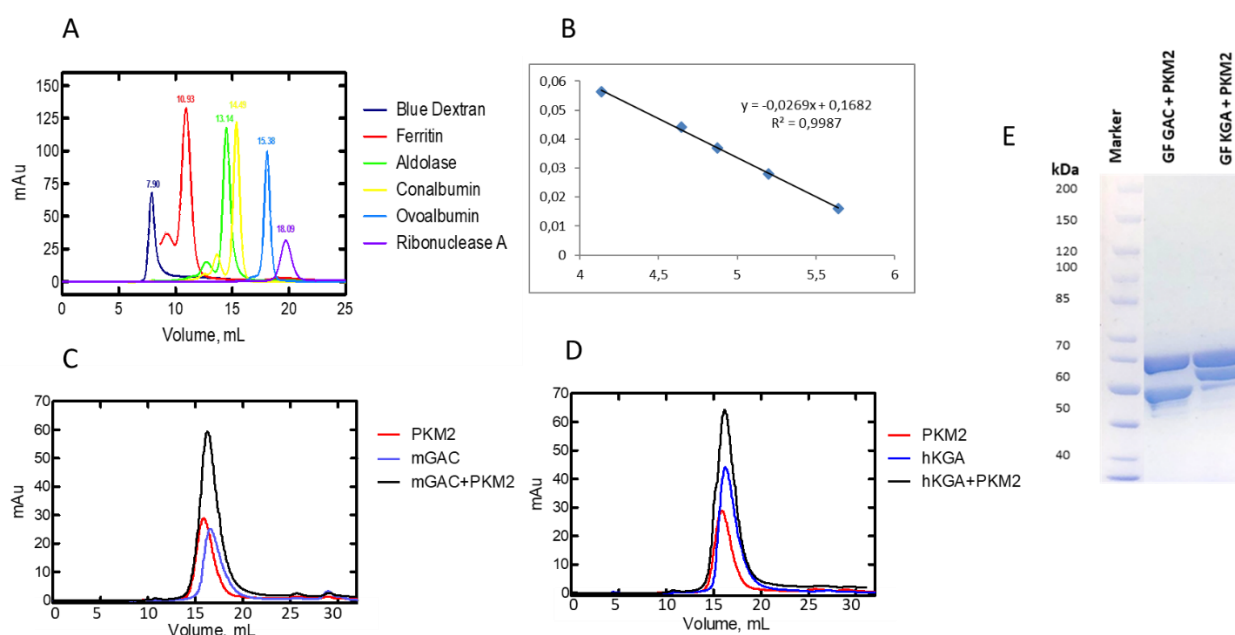


Figura 17. Obtenção dos complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA.

(A) Calibração da coluna com proteínas com pesos moleculares conhecidos. (B) Perfil de eluição de PKM2, GAC e PKM2+GAC e (C) perfil de eluição de PKM2, KGA e PKM2+KGA; (D) Curva de ajuste da calibração da coluna para cálculo da massa das proteínas; (E) Gel SDS-PAGE 3-15% da co-purificação de PKM2+GAC e PKM2+KGA. Massa (kDa) calculada a partir da curva de calibração da coluna: PKM2 263 kDa; GAC 203 kDa; KGA 235,9 kDa; PKM2+GAC 227,5 kDa; PKM2+KGA 235kDa; $R^2=0,9987$.

Os pesos moleculares dos monômeros de PKM2, GAC e KGA são 59.6 kDa, 53.3 kDa e 60.1 kDa, respectivamente. De acordo com o perfil de eluição e o cálculo da massa pela curva de calibração da coluna ($R^2= 0,9987$) utilizando proteínas com peso molecular conhecidos (figura 17 A), o peso molecular calculado de PKM2 foi de 263 kDa, de GAC 203 kDa, KGA 235.9 kDa indicando que as proteínas estavam em conformação tetramérica. Por sua vez os complexos apresentaram um perfil de eluição bastante similar ao das proteínas purificadas individualmente bem como sua massa, onde PKM2+GAC apresentou peso de

227,5 kDa (figura 17 A) e PKM2+KGA de 235 kDa (figura 17 B). Na figura 17 C pode ser observado que as proteínas eluíram em porções equivalentes, dado o perfil das bandas no gel. Há duas potenciais explicações para o fenômeno: ou os complexos formados foram desfeitos pela diluição das proteínas durante a passagem pela coluna, ou é possível que tenhamos heterotetrâmeros formados por dímeros de cada enzima. As massas esperadas para os heterotetrâmeros é de 225,8 kDa (PKM2+GAC) e 239,4 kDa (PKM2+KGA).

4.1.3 Pull-Down

Para a realização do *pull-down*, após a purificação de GAC foi realizada a clivagem da his-tag com trombina, enquanto PKM2 permaneceu fusionada com his-tag. No ensaio, foram utilizadas concentrações fixas de GAC e PKM2 em excesso molar de 1x, 2x e 5x. As variáveis 500 μ M de F-1,6-BP, 20 mM Pi também foram introduzidas no ensaio (Figura 18).

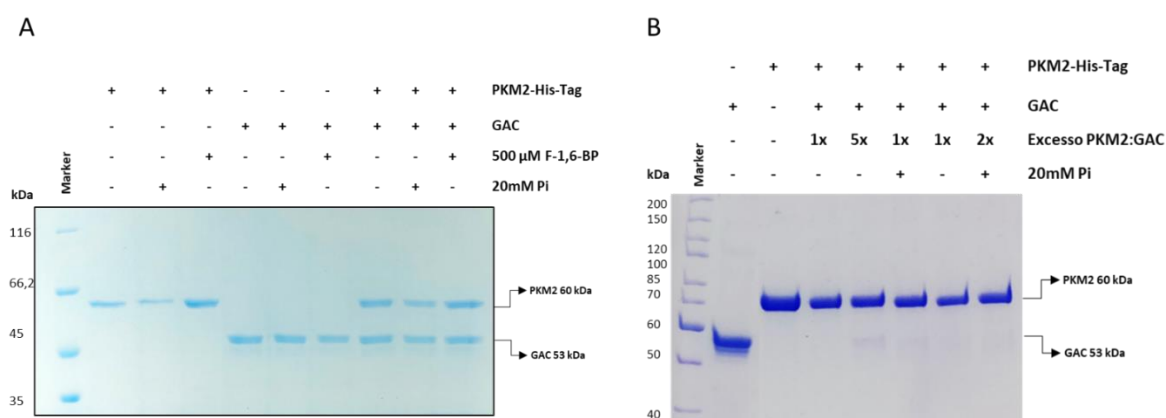


Figura 18. SDS PAGE do ensaio de Pull Down.

Ensaio realizado com as proteínas PKM2 fusionada com cauda de histidina e GAC com his-tag clivada. Proteínas foram incubadas em resina TALON por 16 horas e eluídas com 250mM de imidazol. Os aditivos 500 μ M de F-1,6-BP, 20mM Pi e foram introduzidos no ensaio para avaliar condições que poderiam alterar a interação das proteínas.

Conforme observado na Figura 18 A, GAC interage de forma inespecífica com a resina visto que uma banda inespecífica está presente no controle de incubação da mesma sem cauda de his-tag com a resina. O excesso molar de PKM2 de 5x, parece dar indícios de uma banda de interação fraca entre PKM2+GAC (figura 18B). Na presença dos aditivos F-1,6-BP e Pi, não verificamos melhora no sinal de interação.

Apesar dos esforços empregados, não conseguimos reproduzir os

resultados de *pull-down* obtidos nos experimentos prévios deste projeto. Uma potencial explicação é de que, nos ensaios anteriores, era utilizada uma fração de PKM2 eluída no *void* da coluna de gel filtração, não correspondente a espécies oligoméricas conhecidas da proteína. Esta população inespecífica também demonstrou ter maior afinidade por GAC nos ensaios de anisotropia de fluorescência. No entanto, esta fração de PKM2 não foi mais observada nas purificações realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho, além de não haver relatos na literatura desta espécie oligomérica de PKM2 maior que um tetrâmero. Portanto, as condições iniciais que deram indício da interação por *pull-down* não puderam ser re-testadas e não pudemos concluir de forma clara através deste ensaio sobre como se dá a interação das proteínas.

4.1.4 Anisotropia de Fluorescência

Para confirmar a interação direta entre as proteínas e definir a constante de dissociação (K_d), bem como explorar condições que poderiam afetar a afinidade entre as mesmas, realizamos ensaios de anisotropia de fluorescência.

Previamente à realização do ensaio, as construções GAC (aa128-598) e KGA (aa124-669) englobando os domínios N-terminal, Domínio Catalítico e C-terminal, foram expressas de forma recombinante em *E. coli* Rosetta, purificadas e marcadas com FITC. A deleção dos primeiros aminoácidos na região N-terminal das enzimas se faz necessária por questões de estabilidade em condições de expressão em *E. coli*¹⁰⁵.

As proteínas previamente marcadas com FITC foram tituladas individualmente com PKM2 (aa1-531) concentrada até 740 μ M. A reação foi incubada protegida da luz, em temperatura ambiente, seguida de leituras de anisotropia de fluorescência após 1 e 24 horas. O ensaio foi realizado na ausência e ou presença de 20 mM de Pi e 500 μ M de F-1,6-BP para avaliar o possível efeito da ativação das enzimas na interação.

Observamos que a afinidade de GAC por PKM2 é significamente influenciada pelo tempo de incubação das proteínas (K_d _{1h} = 19.8 (17.6- 22.2) μ M e K_d _{24h} = 9.4 μ M (8.4-10.7 μ M) ($p < 0,001$), bem como pela presença do ativador alostérico de PKM2, F-1,6-BP ($p < 0,0001$), que também parece melhorar a interação das proteínas de maneira dependente do tempo (K_d _{1h} = 32.4 (24.2-44.1)

μM e $K_{d\ 24h} = 5.8$ (4.3-7.7 μM)) ($p < 0,0001$). Por sua vez, a adição de Pi , ativador de GLS, leva à perda da interação das proteínas, dado a formação de estruturas filamentosas de GAC. ($K_{d\ 1h} = 1.4 \times 10^{19} \mu\text{M}$ e $K_{d\ 24h} = 3.1 \times 10^{17} \mu\text{M}$). Os resultados são sumarizados na Figura 19.

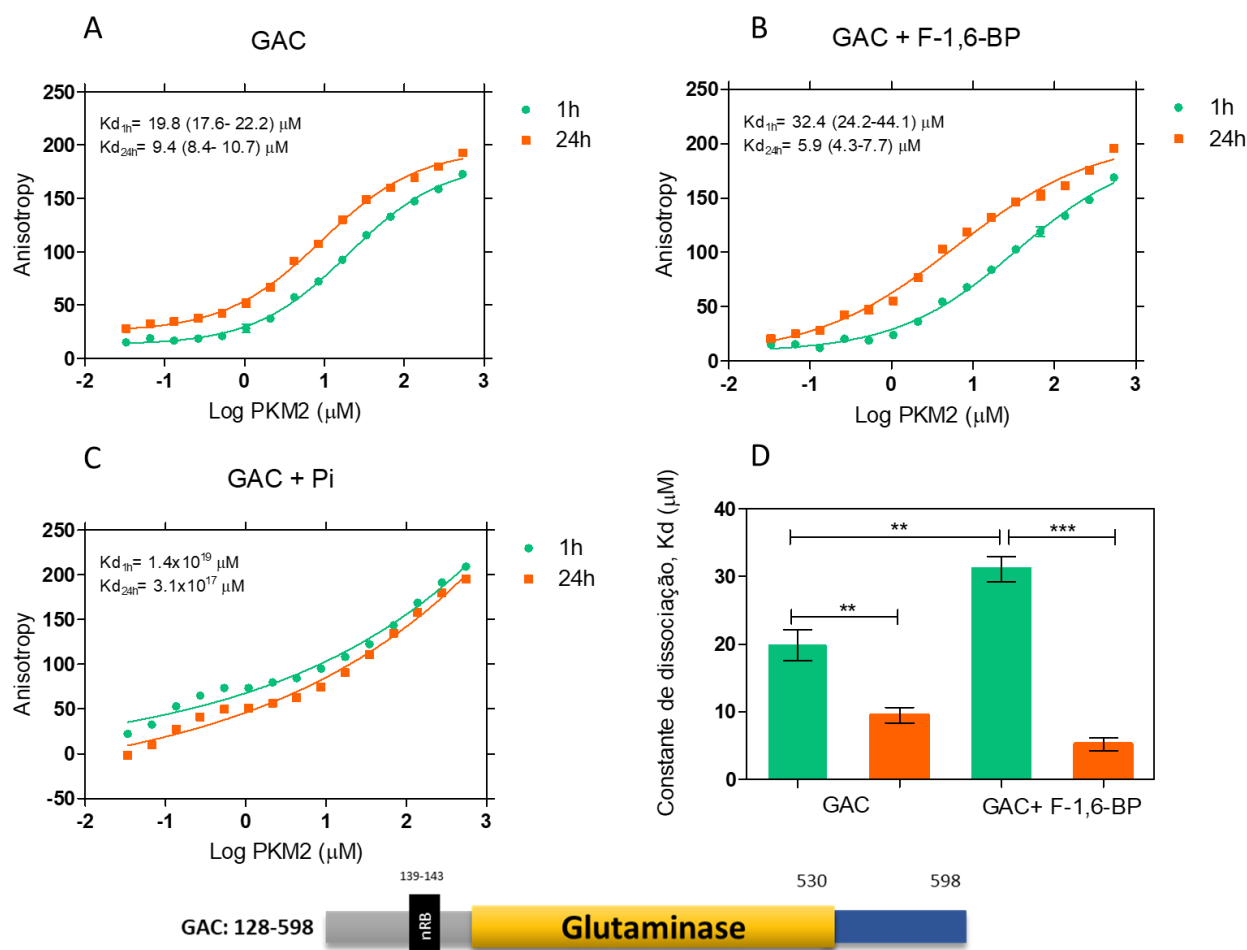


Figura 19 Anisotropia de fluorescência de GAC marcada com FITC (aa128-598) titulada com PKM2.

Ensaio realizado com 10 nM de GAC-FITC titulado com PKM2 concentrada a 740 μM na ausência ou presença de 500 μM de F-1,6-BP e 20 nM de Pi . As leituras de anisotropia de fluorescência foram realizadas após 1 e 24 horas de incubação a temperatura ambiente. Os valores de anisotropia foram plotados em função da concentração de PKM2 (escala logarítmica). (A) GAC na ausência dos aditivos, (B) na presença de 500 μM de F-1,6-BP e (C) 20 nM de Pi . (D) Valores de K_d representados no gráfico de barras mostram que há um aumento significativo na interação das proteínas de maneira dependente do tempo e da presença de F-1,6-BP. Análises estatísticas de ANOVA de uma via com post-teste de Tukey realizado no *software* GraphPad Prism 5. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Valores de $p < 0,001$ (**) e $p < 0,0001$ (***).

A titulação de PKM2 sobre KGA por outro lado, revelou altos valores de K_d tanto em 1h quanto após 24 hs de incubação ($K_{d\ 1h} = 7.6 \times 10^7$ e $K_{d\ 24h} = 1.4 \times 10^{10}$),

o qual não foi melhorado com a co-incubação de F-1,6-BP (Figura 20). Tendo em vista estes resultados, não realizamos a mensuração da anisotropia de KGA e PKM2 com adição de Pi.

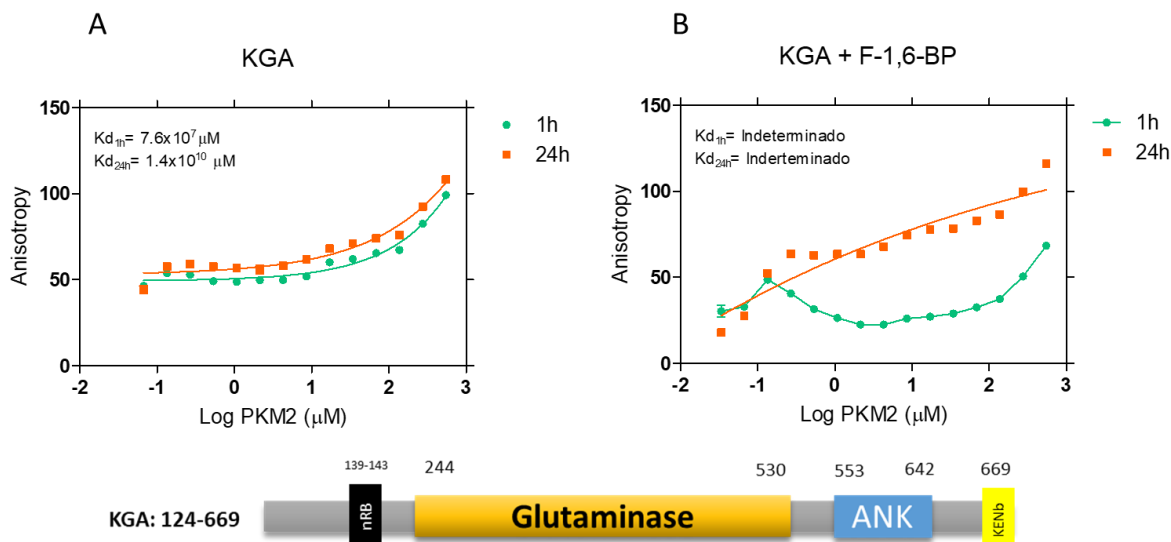


Figura 20. Anisotropia de fluorescência de KGA (aa124-669) titulada com PKM2.

Ensaio realizado com 10 nM de KGA-FITC titulada com PKM2 concentrada a 740 μM na ausência ou presença de 500 μM de F-1,6-BP. As leituras de anisotropia de fluorescência foram realizadas após 1 e 24 horas de incubação a temperatura ambiente. Os valores de anisotropia foram plotados em função da concentração de PKM2 (escala logarítmica) (A) na ausência e (B) na presença de 500 μM de F-1,6-BP. Dado os valores de K_d a interação de KGA e PKM2 não ocorre nas condições avaliadas.

De posse dos resultados, realizamos a expressão, purificação e marcação com FITC das construções de GAC para elucidarmos regiões importantes para a interação com PKM2. As construções utilizadas foram: Domínio N-terminal + Domínio Catalítico (aa124-550), Domínio Catalítico (aa221-550) e N-terminal (aa124-220), bem como as regiões exclusivas Domínio Catalítico + C-terminal (aa226-598) e C-terminal de GAC (aa530-598) foram avaliadas (Figura 21).

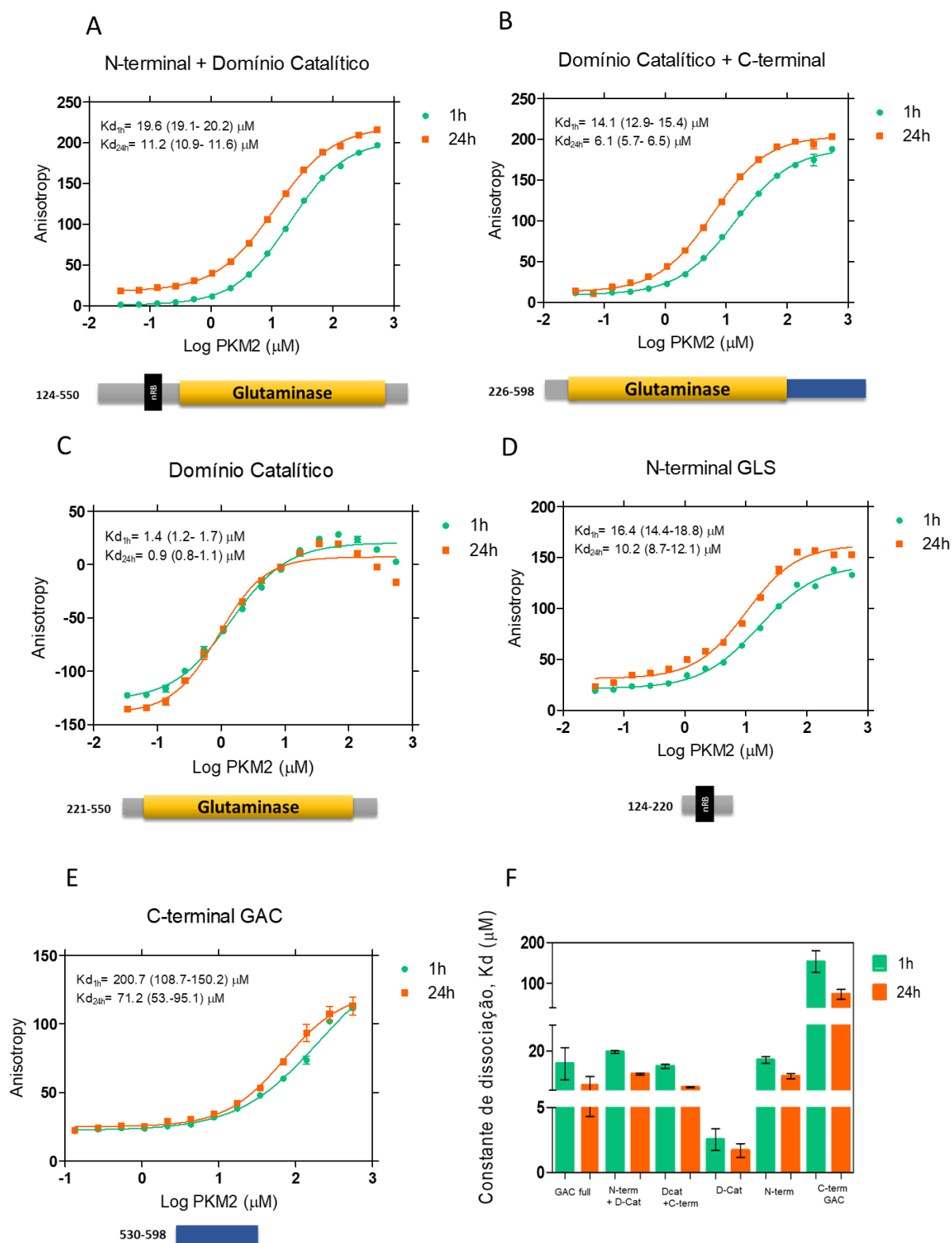


Figura 21. Anisotropia de fluorescência das construções de GLS-FITC tituladas com PKM2.

Ensaio realizado com 10 nM de cada construção titulada com PKM2 concentrada a 740 μM . As leituras de anisotropia de fluorescência foram realizadas após 1 e 24 horas de incubação a temperatura ambiente. Os valores de anisotropia foram plotados em função da concentração de PKM2 (escala logarítmica). (A) N-terminal + Domínio Catalítico (aa124-550); (B) Domínio Catalítico + C-terminal; (C) Domínio Catalítico (aa221-550); (D) N-terminal; (E) C-terminal GAC; (F) Compilado das construções analisadas. Em todos os casos houve diminuição dos valores de

K_d após 24 horas de incubação da reação. Os menores valores de K_d obtidos correspondem a construção Domínio Catalítico com $p < 0,0001$ (***) em relação as demais construções avaliadas. Análises estatísticas de ANOVA de uma via com post-teste de Tukey realizado no *software* GraphPad Prism 5. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

Todas as construções apresentaram diminuição significativa de K_d após 24 horas de incubação da reação. Dentre as análises realizadas, a construção englobando apenas o Domínio Catalítico de GLS (aa221-550) apresentou os menores valores de K_d (K_d 1h = 1.4 (1.2-1.7 μ M) e K_d 24h= 0.9 (0.8-1.1 μ M)) ($p < 0,0001$), revelando que a interação com PKM2 ocorre nesta região e é desfavorecida pela presença dos domínios N e C-terminal de GLS.

A adição de 20 mM de Pi não levou a alterações na interação do D-Catalítico com PKM2 (figura 22 A), o que provavelmente está relacionado ao fato de que apenas o D-Catalítico de GLS não formar espécies oligoméricas maiores filamentosas na presença deste composto⁵⁰. A presença de F-1,6-BP também não alterou os valores de K_d nos ensaios realizados (Figura 22 B).

Para comprovarmos se a oligomerização do D-Catalítico não era influenciada por Pi, realizamos leituras de DLS desta construção na presença de 20 mM deste composto. Conforme esperado, não obtivemos a formação das estruturas filamentosas que são observadas quando adicionamos este ativador com GAC (figura 23).

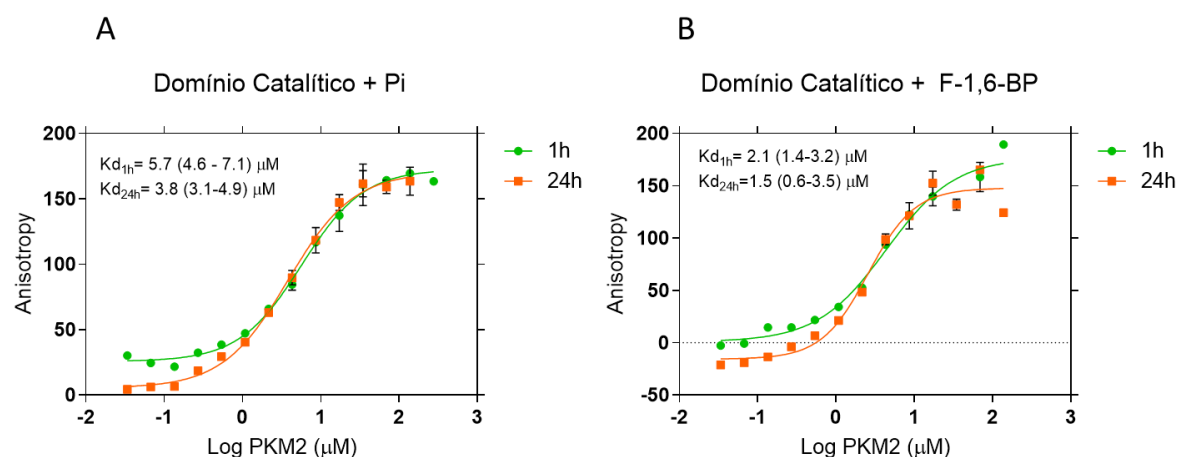


Figura 22. Anisotropia de fluorescência de Domínio Catalítico (aa221-550) titulada com PKM2.

Ensaio realizado com 10 nM de D-Catalítico-FITC titulado com PKM2 concentrada a 740 μ M na presença de (A) 20 mM Pi e (B) 500 μ M de F-1,6-BP. As leituras de anisotropia de fluorescência foram realizadas após 1 e 24 horas de incubação a temperatura ambiente.

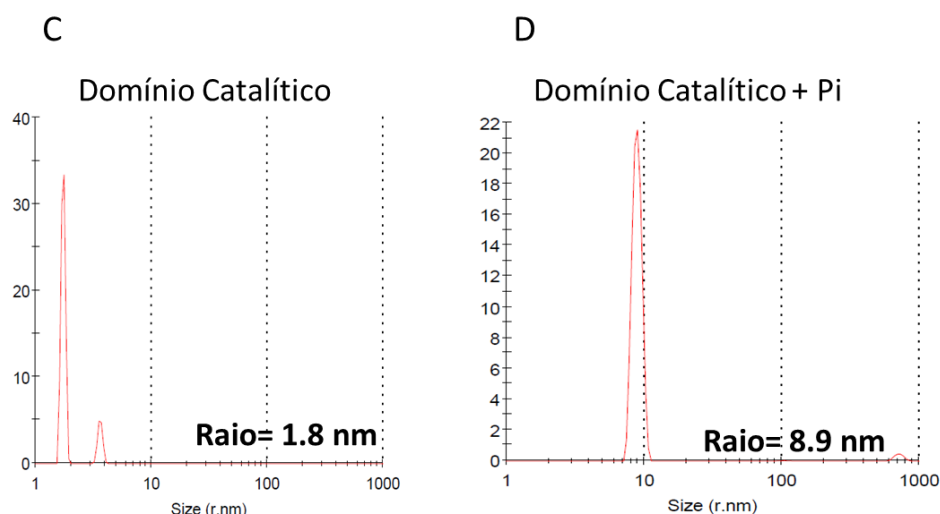


Figura 23. Ensaio de DLS do Domínio Catalítico de GLS.

(A) Domínio Catalítico sem Pi (Raio= 1.8 nm) e (B) Domínio Catalítico (raio= 8.9 nm) com adição de 20 mM de Pi. O ensaio mostra que na presença de 20 mM de Pi não leva a formação de estruturas filamentosas

As construções N-terminal + D-catalítico, C-terminal + D-catalítico e domínio N-terminal apresentaram valores de K_d similares a construção mais completa compreendendo todos os domínios de GAC. Curiosamente ao avaliarmos somente o domínio C-terminal de GAC, os valores de K_d foram consideravelmente maiores em relação as demais construções analisadas, indicando que esta região por si não é capaz de promover a interação com PKM2. Os valores de K_d obtidos entre ensaios independentes (apresentados com média e desvio padrão (SD)) estão sumarizados na tabela 6.

Tabela 6. Valores de Kd obtidos nos ensaios de anisotropia de fluorescência entre ensaios independentes.

Construção	Valores de Kd (μM)	
	1h (Média $\pm$ SD)	24 h (Média $\pm$ SD)
GAC (aa128-603)	15,2 $\pm$ 6,16	7,2 $\pm$ 2,9
N-term + DCat (aa124-550)	19,6 $\pm$ 0,55	11,23 $\pm$ 0,35
DCat + C-term (aa226-598)	14,13 $\pm$ 1,25	6,1 $\pm$ 0,4
Dcat (aa221-550)	2,5 $\pm$ 1,45	1,7 $\pm$ 2,2
N-term (aa124-220)	16,5 $\pm$ 2,2	10,3 $\pm$ 1,7
C-term GAC (aa530-598)	153,2 $\pm$ 46	73,1 $\pm$ 21,11

4.1.5 SEC-MALS

Com o objetivo de avaliar o estado de oligomerização e estequiometria do complexo GAC/KGA + PKM2, e aditivos que poderiam influenciar neste fenômeno, empregamos a técnica de SEC-MALS. As proteínas foram injetadas na coluna em concentração de 50 μM após 1 hora de incubação na presença ou ausência de compostos conhecidos por modularem seu estado oligomérico e atividade.

Através do ensaio observamos que PKM2 (figura 24 A) apresentava um perfil com massa correspondente a tetrâmeros da proteína em solução (235 kDa), enquanto que GAC e KGA (figura 24 A) mostraram uma massa molar intermediária entre dímeros e tetrâmeros das proteínas.

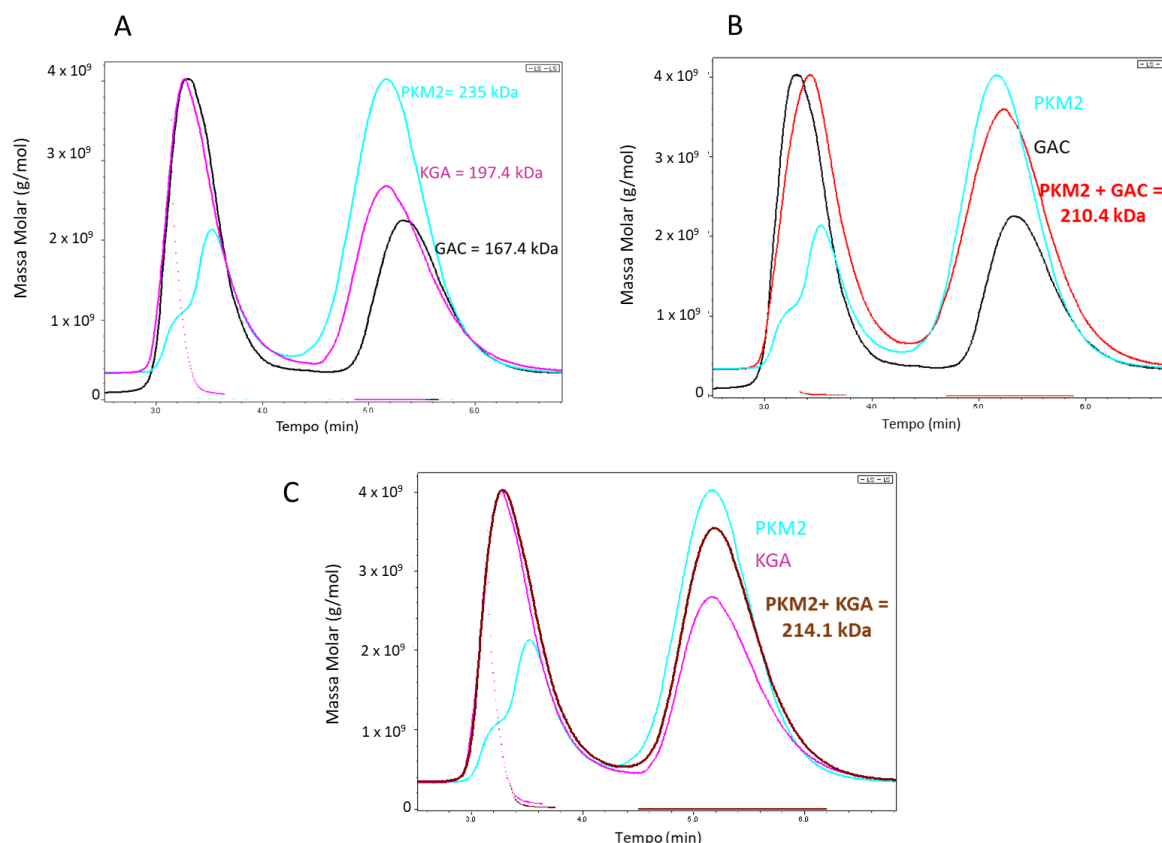


Figura 24. Ensaio de SEC-MALS de PKM2, GAC e KGA.

(A) SEC-MALS das proteínas individuais mostrou que GAC e KGA eluíram em massas intermediárias entre dímeros e tetrâmeros (167 kDa e 197 kDa, respectivamente), enquanto que PKM2 apresentou perfil correspondente a população tetramérica (235 kDa). (B) A incubação de PKM2+GAC levou a formação de um perfil intermediário entre as duas proteínas (210 kDa), assim como a incubação de (C) PKM2+ KGA (214 kDa). Não observamos o perfil claro de uma população diferencial que desses indícios da formação do complexo com o ensaio.

A incubação de PKM2 com GAC ou KGA (figura 24 B e 24 C, respectivamente) levou a tamanhos intermediários de massa que podem significar tanto uma mistura de homotetrâmeros das proteínas ou até a formação de heterotetrâmeros, não sendo possível, assim, concluir se houve interação e qual seria a massa do complexo.

Como já colocado, as proteínas possuem massa molecular semelhante, o que neste caso, pode ter inviabilizado a técnica. Além disto, fatores limitantes como a sensibilidade técnica, bem como a resolução da coluna, podem ter impedido a visualização da formação de um perfil diferencial claro correspondente a formação do complexo das proteínas.

A incubação das proteínas com aditivos que pudessem estabilizar o complexo também mostrou um perfil intermediário de massa entre as populações

das respectivas proteínas. Os principais resultados obtidos são sumarizados na tabela 7.

Tabela 7. Principais resultados obtidos no ensaio de SEC-MALS.

Aditivos	Concentração	Amostras (kDa)				
		PKM2	GAC	KGA	PKM2+GAC	PKM2+KGA
Controle	-	234.9	167.4	197.4	210.4	214.1
BPTES	10 μ M	-	182.0	223.7	228.3	235.1
DMSO	1%	-	171.8	204.4	206.8	222.9
F-1,6-BP	500 μ M	241.9	-	-	207.9	209.5
Piruvato	2 mM	228.0	-	-	212.8	223.5
PEP	5 mM	250.4	-	-	232.8	242.7
ADP	2 mM	232.9	-	-	252.7	289.6
ATP	2 mM	234.1	-	-	211.1	225.6
MgCl ₂	10 mM	232.9	-	-	210.9	223.7
KCl	10 mM	230.4	-	-	209.6	224
Pi	20mM	-	181.4	229.2	188.1	234.1

Mesmo na presença de Pi não obtivemos a formação dos polímeros de GAC e KGA (dado a baixa massa observada nas análises), o que pode estar atrelado ao fato de que as mesmas estavam purificadas e armazenadas em tampão em alta concentração de NaCl, o que observamos ser um inibidor da formação das estruturas filamentosas de GLS.

4.1.6 Dynamic Light Scattering

Com a técnica de DLS esperávamos inferir sobre a formação e tamanho dos complexos. Para tanto, foram realizadas leituras das proteínas em solução de forma individual e dos complexos PKM2+GAC e PKM2+KGA, como esquematizado na figura 25.

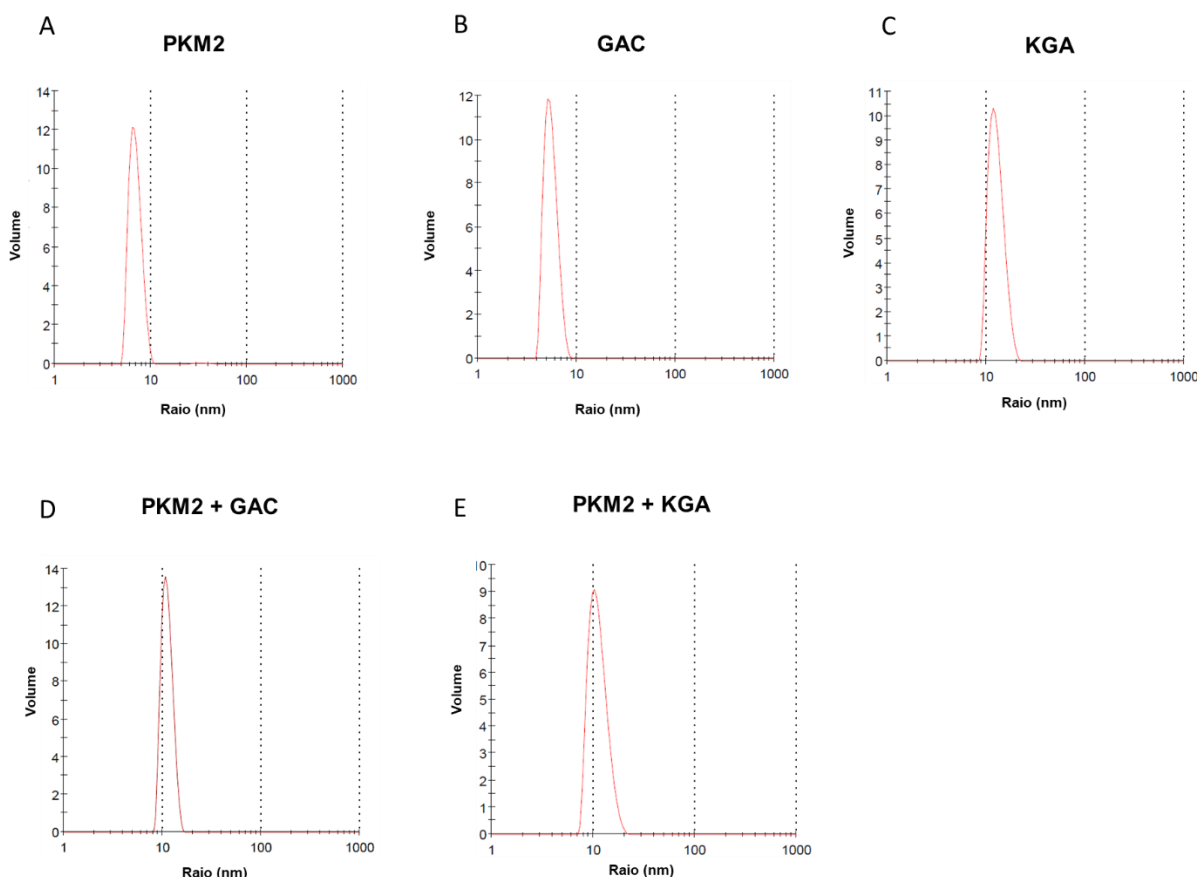


Figura 25. Ensaio de DLS das proteínas individuais e dos complexos PKM2 + GAC e PKM2 + KGA.

Ensaio realizado com 1 mg/mL de cada proteína (A) PKM2; (B) GAC; (C) KGA; (D) PKM2 + GAC; (E) PKM2 + KGA.

Os resultados obtidos mostram que os complexos possuem tamanho (raio em nm) semelhantes ao das proteínas de forma isolada, as quais são compatíveis a tetrâmero, onde PKM2 apresenta raio de 5.6 nm; GAC = 5.4 nm; KGA = 6.7 nm; PKM2 + GAC = 4.9 nm; e PKM2 + KGA = 6.2 nm; não sendo possível concluir através deste ensaio se houve formação do complexo. Os resultados são sumarizados na tabela 8 e apresentados como média e desvio padrão das leituras realizadas.

Tabela 8. Principais resultados obtidos no ensaio de DLS.

Amostra	Raio $\pm$ SD (nm)
GAC	5.8 ± 0.3
KGA	6.7 ± 0.2
PKM2	6.30 ± 0.5
GAC + Pi	125.4 ± 40.8
PKM2 + Pi	8.33 ± 2.9
GAC+ F-1,6-BP	5.6 ± 0.01
PKM2 + F-1,6-BP	5.9 ± 0.4
GAC + PKM2	6.5 ± 0.6
KGA + PKM2	6.1 ± 0.2
GAC + PKM2 + Pi	157.6 ± 54.5
PKM2 + GAC + F-1,6-BP	6.4 ± 0.9

Para avaliarmos se a presença do ativador de GLS, Pi, e de PKM2, F-1,6-BP, afetam na estabilidade dos complexos, realizamos o ensaio na presença destes compostos, com incubação prévia de 1 hora a temperatura ambiente antes das leituras.

Como mostrado na figura 26, a presença de Pi leva a formação de estruturas oligoméricas de GAC maiores com aumento do tamanho do raio para 65 nm. No entanto, este composto não afeta PKM2, mantendo raio similar ao da proteína isolada (6.4 nm). Quanto ao complexo, não a houve formação de um pico diferencial que evidencie a interação das proteínas, o que era esperado, uma vez que mostramos que Pi aumenta o Kd da interação. Da mesma forma, a incubação com F-1,6-BP também não deu indícios que salientassem a formação do complexo PKM2+GAC (Tabela 8).

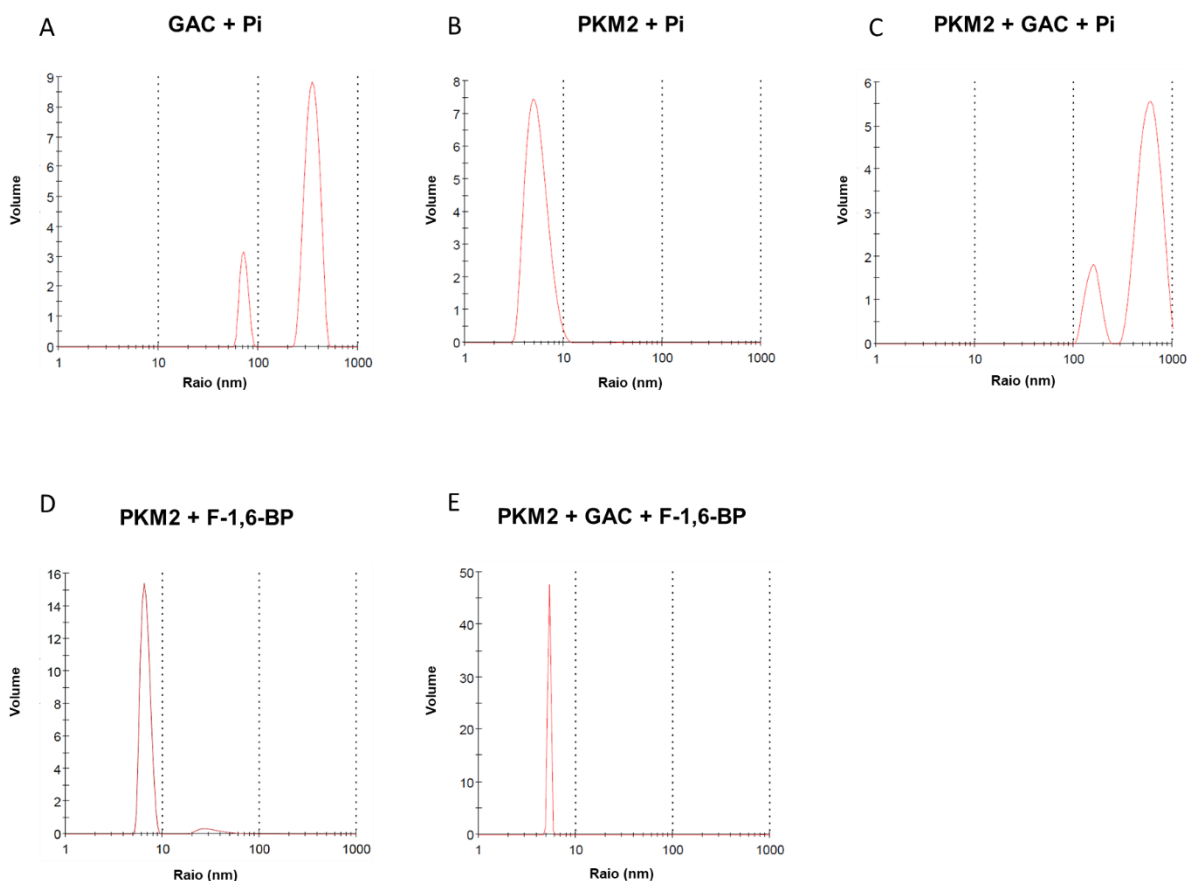


Figura 26. Ensaio de DLS de PKM2+GAC na presença dos aditivos F-1,6-BP e Pi.

Ensaio realizado com 1 mg/mL incubados por 1 hora a temperatura ambiente na presença de 20 mM de Pi e 500 μ M de F-1,6-BP. (A) GAC + Pi; (B) PKM2 + Pi; (C) PKM2 + GAC + Pi; (D) PKM2 + F-1,6-BP; (E) PKM2 + GAC + F-1,6-BP.

4.1.7 Atividade Enzimática

Realizamos ensaio de atividade enzimática de GAC na presença ou ausência de PKM2 em excesso molar crescente, a fim de inferirmos se esta proteína exerce influência na atividade glutaminolítica de GLS visto os ensaios de anisotropia de fluorescência que dão indícios de a interação ocorrer neste domínio.

Avaliamos ainda se PKM2 + GAC na presença de 500 μ M F-1,6-BP leva a alterações na atividade GLS. O ensaio foi determinado pelo ensaio de atividade mensurada de forma indireta pela redução de NAD⁺ a NADH, através da leitura de absorbância em 340 nm, conforme protocolo já estabelecido por nosso grupo⁴¹. Os valores de velocidade inicial da reação (NADH, pmol x s⁻¹) são apresentados na Figura 27.

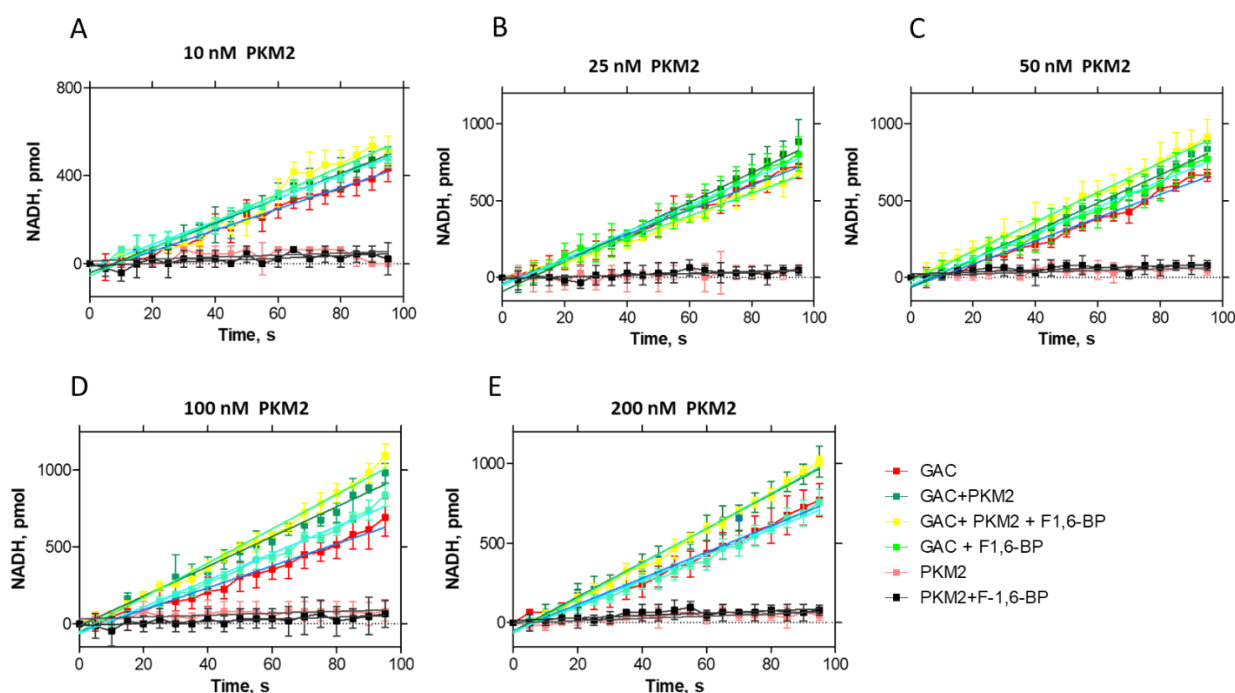


Figura 27. Atividade enzimática de GAC na presença de PKM2

Atividade de GAC definida por ensaio acoplado a GDH mensurada de forma indireta pela redução de NAD⁺ a NADH conforme estabelecido pelo grupo. Os valores de velocidade máxima da reação (NADH, pmol x s⁻¹). Ensaio realizado em concentrações crescentes de PKM2 de 10, 25, 50, 100 e 200 nM na ausência ou presença de 500 μM de F-1,6-BP. Não houve aumento significativo na atividade de GAC em presença de PKM2 ($p > 0.05$). Análises estatísticas de ANOVA de uma via com post-teste de Tukey realizado no *software* GraphPad Prism 5. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

Com o aumento da concentração de PKM2 há um ligeiro, porém, não significativo aumento da atividade enzimática de GAC, como pode ser observado pela formação do subproduto da reação NADH (pmol). A adição de F-1,6-BP também não demonstrou exercer ação sobre o perfil de atividade GLS.

Os resultados obtidos foram plotados considerando-se GAC sozinha (PKM2 0 nM) como 100% de atividade, o perfil de ativação da mesma na presença de PKM2 com ou sem F-1,6-BP foi traçado a partir do *slope* da curva de formação de NADH (pmol) para melhor visualização dos dados (figura 27).

Não houve aumento significativo ($p > 0.05$) em todos os cenários avaliados. Uma vez que a presença do ativador de GLS, Pi, leva a perda da interação entre GAC e PKM2, a elucidação do papel de PKM2 na atividade de GLS fica prejudicada.

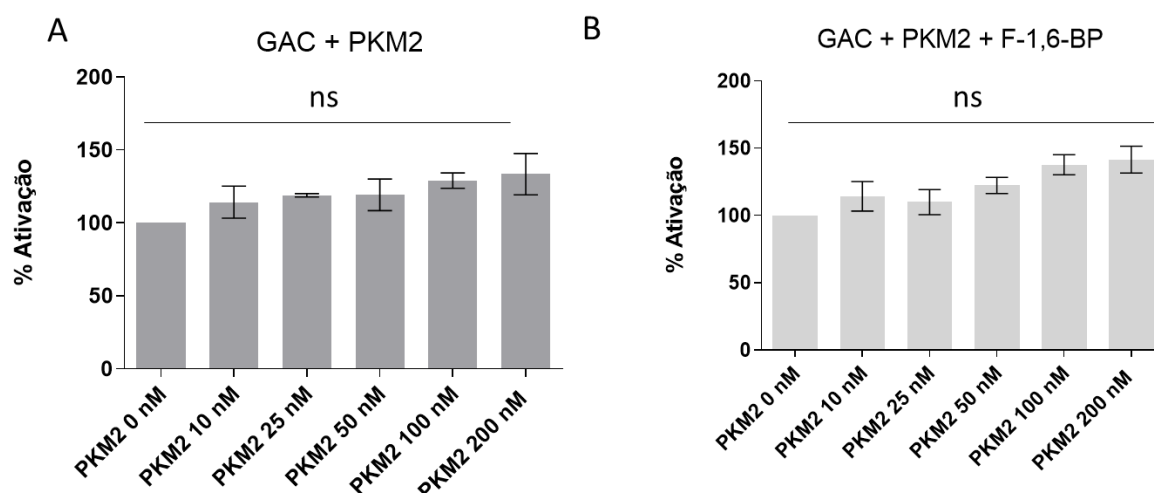


Figura 28. Taxa de ativação (%) da atividade de GAC por PKM2.

Atividade de GAC definida por ensaio acoplado a GDH mensurada de forma indireta pela redução de NAD^+ a NADH conforme estabelecido pelo grupo. Ensaio realizado em concentrações crescentes de PKM2 de 10, 25, 50, 100 e 200 nM na ausência (A) ou presença de 500 μM de F-1,6-BP (B). Análises estatísticas de ANOVA de uma via com post-teste de Tukey realizado no *software* GraphPad Prism 5. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. ns: não significante.

Para compreendermos o papel da interação na atividade das enzimas, realizamos ainda o ensaio de atividade de PKM2 através do kit comercial *Pyruvate Kinase Assay* (Sigma Aldrich). Neste ensaio mantivemos fixa a concentração de PKM2 em 0,6 μM e variamos a concentração de GAC em 0,1 μM , 0,3 μM , 0,6 μM , 1,2 μM e 2,4 μM . Os principais resultados obtidos estão sumarizados na figura 29.

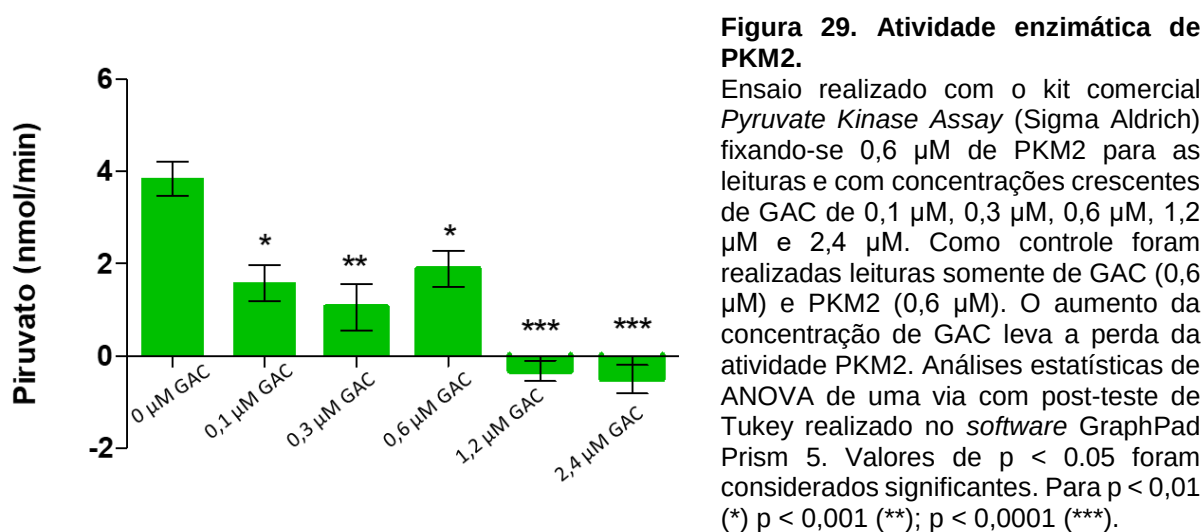


Figura 29. Atividade enzimática de PKM2.

Ensaio realizado com o kit comercial *Pyruvate Kinase Assay* (Sigma Aldrich) fixando-se 0,6 μM de PKM2 para as leituras e com concentrações crescentes de GAC de 0,1 μM , 0,3 μM , 0,6 μM , 1,2 μM e 2,4 μM . Como controle foram realizadas leituras somente de GAC (0,6 μM) e PKM2 (0,6 μM). O aumento da concentração de GAC leva a perda da atividade PKM2. Análises estatísticas de ANOVA de uma via com post-teste de Tukey realizado no *software* GraphPad Prism 5. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Para $p < 0,01$ (*); $p < 0,001$ (**); $p < 0,0001$ (***).

Enquanto que concentrações sub- e estequiométricas de GAC sobre PKM2 levam a diminuição da atividade de PKM2, a incubação de GAC em excesso molar

de 2-4X levou a perda da atividade de PKM2, dado o perfil na formação de piruvato. Apesar de promissores e mostrarem um papel inédito de GAC na regulação na via glicolítica pela inativação de PKM2, os ensaios cinéticos precisam ser realizados com maior profundidade para compreendermos como GAC modula a atividade de PKM2.

4.1.8 Espectrometria de Massas

A fim de elucidar regiões importantes para a interação das proteínas, realizamos um estudo de *crosslinking* pelo agente DSS, seguido de tripsinização e análise por espectrometria de massas.

As proteínas, GAC e PKM2 previamente purificadas foram submetidas a *crosslinking* químico (isoladamente ou em combinação) em diferentes concentrações de DSS e posteriormente aplicadas em gel de acrilamida 10% para avaliarmos bandas a serem submetidas ao experimento (Figura 30).

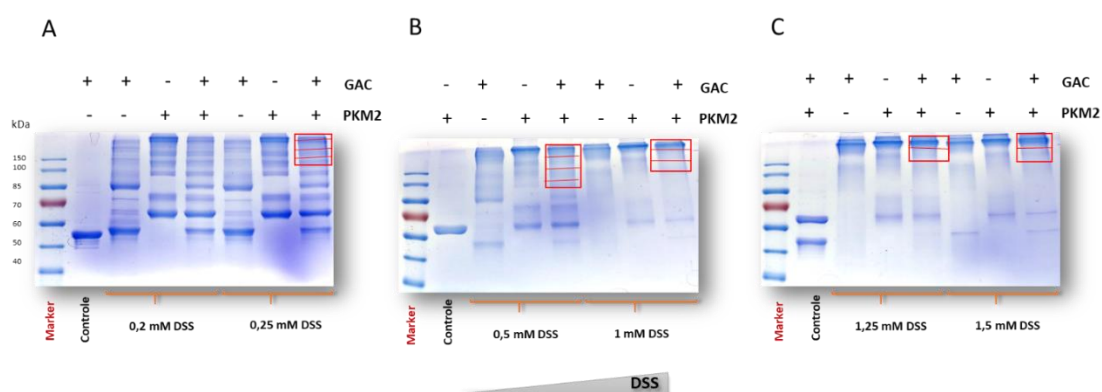


Figura 30. Eletroforese do *crosslinking* químico das proteínas com DSS para espectrometria de massas.

Gel desnaturante de poli(acrilamida) (10%) da reação de *crosslinking* de GAC com o parceiro de interação PKM2. Em vermelho estão destacadas as bandas enviadas para análises de espectrometria de massas. (A) Gel com mGAC controle (17 μ M) amostras com DSS entre 0,2 e 0,25 mM; (B) Gel com PKM2 controle (17 μ M) amostras com DSS entre 0,5 e 1 mM; e (C) Gel com mGAC controle mGAC+PKM2 controle (17 μ M cada) amostras com DSS entre 1,25 e 1,5 mM. MW: GAC sem his-tag 52,9 kDa; PKM2 + his-tag: 61,5 kDa; PKM2 his-tag + GAC sem his-tag: 114,4 kDa. Concentração de DSS crescente.

Apesar de não termos identificado nenhuma banda evidentemente diferencial entre as condições PKM2 e GAC passadas por *crosslinking* sozinhas ou em complexo, recortamos quatro porções do gel na condição GAC + PKM2 0,25 mM e 0,5 mM de DSS, três frações em 1 mM de DSS e duas 1,25 mM e 1,5 mM de DSS. Todas as frações removidas apresentavam tamanho acima de 100

kDa. As proteínas das bandas foram extraídas e analisadas por espectrometria de massas conforme descrito na metodologia.

Como pode ser observado no gel, a incubação PKM2 e GAC tanto individuais, quanto em conjunto com DSS leva ao aumento da massa molecular das moléculas. Após as análises por massas, foi observado que os espectros com boa anotação indicavam o *crosslinking* intra-cadeias, podendo ser cadeias da mesma proteína ou na mesma proteína, compreendendo a maior parte das identificações obtidas.

As anotações para o *crosslinking* intercadeia de possíveis complexos entre PKM2 e GAC apresentou espectros de qualidade insatisfatória e nenhum peptídeo que indicasse o *crosslinking* entre lisinas de GAC com as de PKM2 (heteropeptídeo) foi identificado, tendo sido somente homopeptídeos identificados (dados não mostrados). Limitações associadas a capacidade do DSS de unir as lisinas inter-cadeia dessas proteínas podem estar associadas aos resultados obtidos, e mais experimentos exploratórios utilizando aditivos que possam auxiliar na interação das proteínas são necessários.

4.1.9 Ensaios de cristalização e difração de raios-X

Conforme mencionado na metodologia, diversas condições e kits foram testados no ensaio de cristalização das proteínas, e após diversas tentativas, obtivemos cristais em diferentes parâmetros avaliados.

Como critério de exclusão, eliminamos os cristais das condições de cristalização já estabelecidas de GAC (3SS3⁴¹), KGA (5JYP¹¹⁴) e PKM2 (1T5A⁸¹) de forma individual, conforme encontrado em busca no *Protein Data Bank* (PDB). Os cristais obtidos nas condições exclusivas para PKM2+GAC ou PKM2+KGA foram considerados como promissores. Na Tabela 9 e 10 são apresentadas as condições de cristalização dos *screenings* do complexo PKM2+GAC e PKM2+KGA, respectivamente.

Tabela 9. Condições de cristalização do *screening* do complexo PKM2+GAC.

Kit	Posição	Composição
Morpheus® HT-96 MD1-47	B6	0.09 M de Halogênios (0.3 M Fluoreto de sódio; 0.3M Brometo de sódio; 0.3M Iodeto de sódio); 0.1 M <i>Buffer System</i> 2 pH 7.5 (1.0 M HEPES; MOPS) 50 % v/v Mix Precipitante 2 (40% v/v Etilenoglicol; 20 % w/v PEG 8000)
	D10	0.12 M Álcoois (0.2M 1,6-Hexanediol; 0.2M 1-Butanol; 0.2M 1,2-Propanediol; 0.2M 2-Propanol; 0.2M 1,4-Butanediol; 0.2M 1,3-Propanediol) 0.1 M <i>Buffer System</i> 3 pH 8.5 (1.0 M Tris-base; BICINE) 50 % v/v Mix Precipitante 2 (40% v/v Etilenoglicol; 20 % w/v PEG 8000)
	H3	0,1 M aminoácidos (0.2M DL- Ácido glutâmico monohidratado; 0.2M DL-Alanina; 0.2M Glicina; 0.2M DL-Lisina monohidroclorido; 0.2M DL-Serina); 0,1 M <i>Buffer System</i> 1 pH 6,5 (Imidazol, MES ácido monohidratado); 30% v/v Mix precipitante 3 (40% v/v glicerol; 20% w/v PEG 4000)
INDEX HT	D6	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v PEG 3350
	D7	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v PEG 3350
	G1	0.2 M NaCl, 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v PEG 3350
	H11	0.1 M Tiocianato de potássio, 30% w/v PEG 2000
JCSG+ HT-96	B4	0.1 M HEPES pH 7.5 10 % w/v PEG 8000
	B6	0.1 M Fosfato-Citrato pH 4.2 40 % v/v Etanol
The BCS Screen HT-96 MD1–105	A12	0.1 M MES pH 6.5 22 % v/v PEG <i>Smear Broad</i>
	C6	0.15 M Acetato de amônio; 0.1 M Citrato de sódio pH 5.0 15 % v/v PEG <i>Smear High</i>

Tabela 10. Condições de cristalização do *screening* do complexo PKM2+KGA.

Kit	Posição	Composição
Morpheus® HT-96 MD1-47	B5	0.09 M Halogênios (0.3 M Nitrato de sódio, 0.3 M Fosfato dissódico, 0.3M Sulfato de amônio); 0.1 M <i>Buffer System</i> 2 pH 7.5 (1 M HEPES; MOPS); 50 % v/v Mix Precipitante 1 (40% v/v PEG 500* MME; 20 % w/v PEG 2000)

INDEX HT	B9	0.09 M de Halogênios (0.3 M Fluoreto de sódio; 0.3M Brometo de sódio; 0.3M Iodeto de sódio); 0.1 M <i>Buffer System 3</i> pH 8.5 (1.0M pH 8.5 Tris-base; BICINE); 50 % v/v Mix Precipitante 1 (40% v/v PEG 500* MME; 20 % w/v PEG 2000)
	F5	0.12 M Monossacarídeo (0.2M D-Glicose; 0.2M D-Manose; 0.2M D-Galactose; 0.2M L-Fucose; 0.2M D-Xilose; 0.2M N-Acetilglicosamina) 0.1 M <i>Buffer System 2</i> pH 7.5 (1 M HEPES; MOPS); 50 % v/v Mix Precipitante 1 (40% v/v PEG 500* MME; 20 % w/v PEG 2000)
	G3	0.2 M Sulfato de Lítio, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v PEG 3350
	G5	0.2 M Sulfato de Lítio, 0.1 M BIS-TRIS pH 8.5, 25% w/v PEG 3350

Um dos cristais do complexo PKM2+GAC (Figura 31), obtido na condição H3 do kit de cristalização Morpheus® HT-96 MD1-47 (Tabela 8) em parceria com o Laboratório Multiusuário de Cristalografia Estrutural, IFSC-USP, foi enviado para o Síncrotron de SOLEIL, França, para coleta de dados, em colaboração com o Dr. Humberto Pereira, IFSC-USP. Os dados foram processados no programa Xia2 disponível na linha e escalonados no programa AIMLESS.

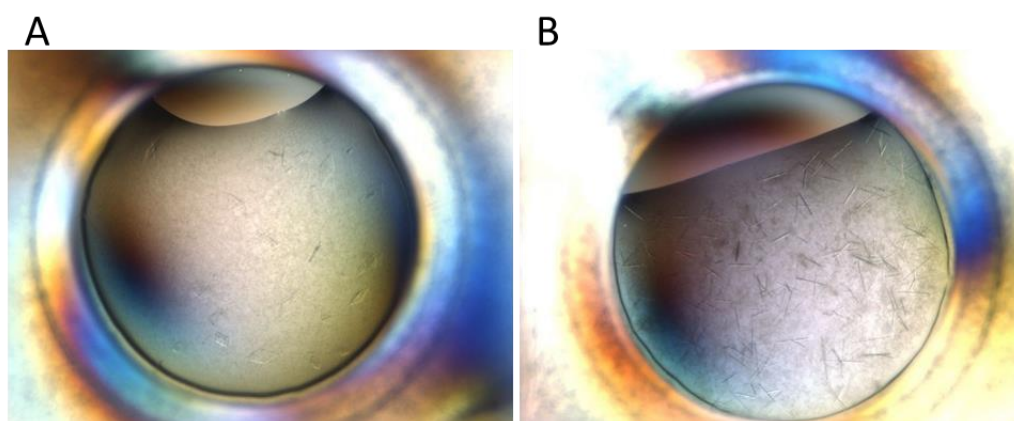


Figura 31. Cristais obtidos da condição PKM2+GAC nas diferentes condições avaliadas.

(A) Cristais bidimensionais (‘placas’); (B) Cristais unidimensionais (‘agulhas’). Dentre os cristais obtidos, apenas um apresentou padrão de difração, e após processamento dos dados, confirmamos que haviam sido formados apenas cristais de GAC em uma condição até então não reportada dimérica.

O cristal difratou até ~ 3.8 Å em novo processamento a resolução foi

estendida para 3.1 Å; a estrutura foi resolvida em colaboração com o Dr. André Ambrosio, e mostrou conter somente GAC, em uma organização cristalina inédita de dímeros. Desta forma, levantamos a hipótese de que a presença de PKM2 possa ter levado a dimerização de GAC nas condições avaliadas para formação dos cristais. Novos *screenings* das condições de cristalização em que obtivemos este cristal e maior refinamento dos dados são necessários para inferirmos sobre a estrutura de GAC obtida no ensaio.

Apesar de ambas proteínas já terem sua estrutura resolvida e depositada PDB e dos esforços empregados, não obtivemos sucesso na obtenção de uma condição em que houvesse a formação de cristais do complexo PKM2+GAC. Os principais dados obtidos conforme processamentos realizados estão sumarizados na tabela 11.

Tabela 11. Dados obtidos da difração do cristal.

Grupo Espacial	P 2 2 21
Dimensões das células unitárias	A= 149.2260 b= 107.8275 c= 146.7319
Resolução	150-3.8 Å (3.9- 3.8)
Intensidade I/ Sigma (I)	4.2 (2.0)
CC1/2	0.99 (0.93)
Completeza	97 (97)
Multiplicidade	2.4 (2.4)

4.1.10 Microscopia Eletrônica de Partículas Únicas com Contraste Negativo

Investimos ainda em microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo (NS-TEM) para detectar e caracterizar o complexo entre as proteínas PKM2 e GAC. Para tanto, as enzimas purificadas individualmente, (Figura 32 e 33, respectivamente) ou em complexo, (Figura 34) foram contrastadas com 2% de acetato de uranila e analisadas. O perfil populacional representativo de cada amostra, bem como a distribuição de frequência de tamanho das partículas foram avaliados no *software* Image J manualmente (devido ao *background* das *grids*) e são apresentados nas imagens a seguir.

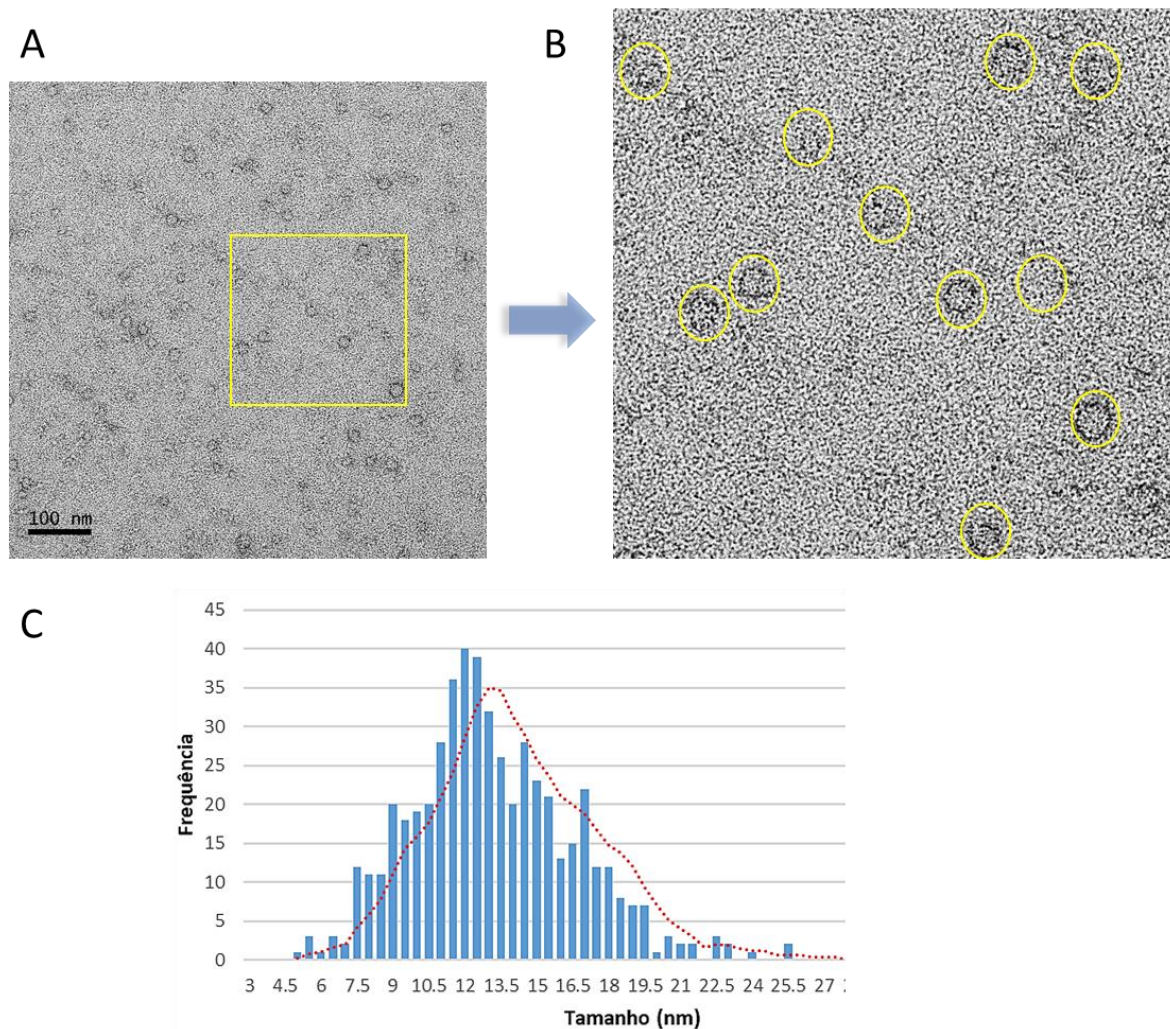


Figura 32. Microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo e frequência de distribuição de PKM2.

Partículas de PKM2 (A) com destaque para área com população representativa do perfil observado (B) e (C) gráfico de distribuição das populações analisadas. Diâmetro médio de 12.9 nm (SD $\pm$ 3.4 nm) de 526 partículas analisadas. Imagens em escala de 100 nm. Imagens coletadas com 2% de acetato de uranila e avaliadas no *software* Image J.

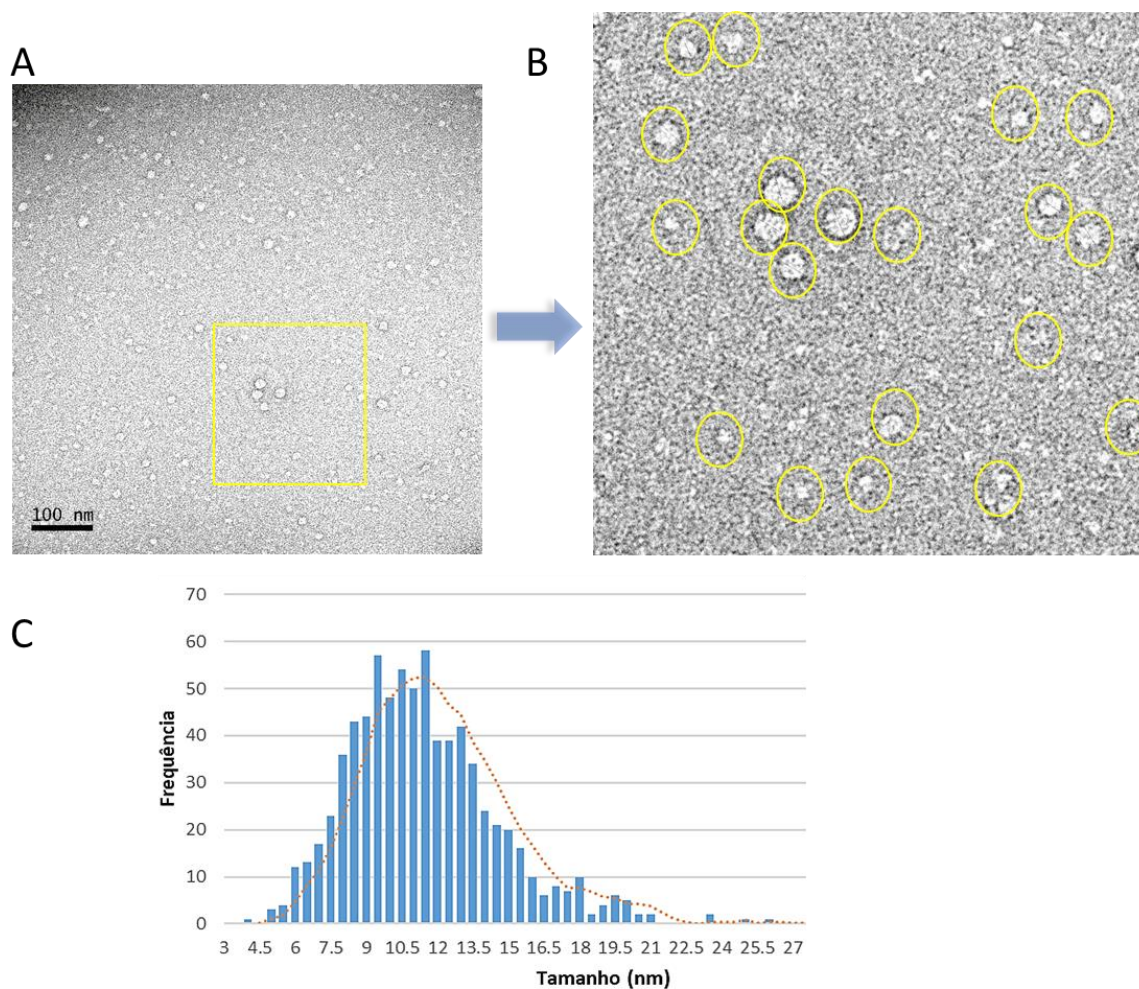


Figura 33. Microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo e frequência de distribuição de GAC.

Partículas de GAC (A) com destaque para área com população representativa do perfil observado (B) e (C) gráfico de distribuição das populações analisadas. Diâmetro médio de 11.1 nm (SD $\pm$ 3.1 nm) de 764 partículas analisadas. Imagens em escala de 100 nm. Imagens coletas com 2% de acetato de uranila e avaliadas no *software* Image J.

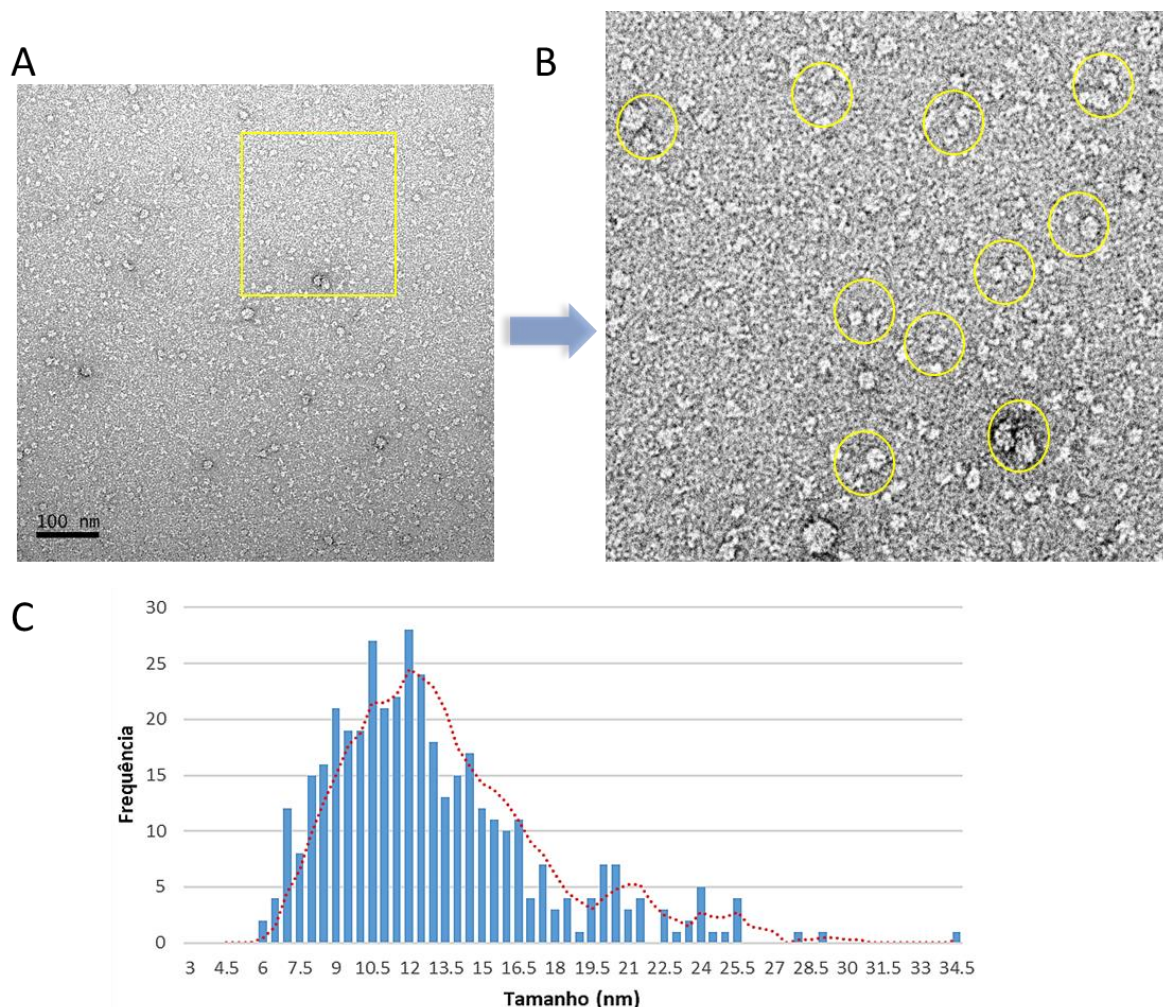


Figura 34. Microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo e frequência de distribuição do complexo PKM2+GAC.

Partículas de PKM2+GAC (A) com destaque para área com população representativa do perfil observado (B) e (C) gráfico de distribuição das populações analisadas. Diâmetro médio de 13.2 nm ($SD \pm 4.4$ nm) de 409 partículas analisadas. Imagens em escala de 100 nm. Para montagem das *grids* e aquisição das imagens, as proteínas purificadas foram incubadas em concentração equimolares por 24 horas e posteriormente submetidas a nova etapa de filtração em gel no dia da coleta. Foi observado uma população diferencial de partículas que dão indícios da formação do complexo (Partículas sinalizadas em círculos em amarelo). Imagens coletas com 2% de acetato de uranila e avaliadas no *software* Image J.

Dado as estruturas cristalográficas conhecidas das proteínas (PDB Ids 3SS3 para GAC⁴¹ e 1T5A para PKM2⁸¹), mensuramos manualmente o diâmetro máximo dos dímeros e tetrâmeros usando o programa Pymol, obtendo os valores de 8,31 nm e 15,34 nm para GAC e 10,54nm e 12,61 nm para PKM2, respectivamente.

Com as imagens obtidas por microscopia eletrônica, avaliamos 526 partículas de PKM2 (Figura 32) que apresentaram diâmetro médio de 12.9nm (desvio padrão de 3.4), correspondendo ao tamanho esperado de um tetrâmero

desta proteína, apesar de não termos inserido nenhum aditivo que levasse a estabilização deste estado oligomérico⁶⁹. Em relação a GAC, analisamos cerca de 764 partículas (Figura 33) com um diâmetro médio de 11.1 nm (desvio padrão de 3.1), o que nos leva a crer que havia a presença de populações diméricas e tetraméricas desta proteína nas *grids*.

Como mostrado nos gráficos de distribuição (Figura 32 C e 33 C), em ambos os casos há a presença de partículas de diferentes tamanhos nas *grids*, o que se deve a transição dímero/tetrâmero de GAC e PKM2 em solução, a qual é factível e já reportada por outros autores^{51,85}.

Ao explorarmos as imagens da combinação PKM2+GAC (Figura 34), encontramos cerca 402 partículas, as quais apresentaram um tamanho médio de 13.2 nm (desvio padrão de 4.4 nm). Além do aumento da área das partículas, como mostrado no gráfico de frequência (Figura 34 C), notamos ainda que havia a formação de uma estrutura diferencial (Figura 35), com cerca de 23.7 nm (desvio padrão de 3.9 nm) até então não observada nas amostras das proteínas individuais, as quais atribuímos ao complexo.

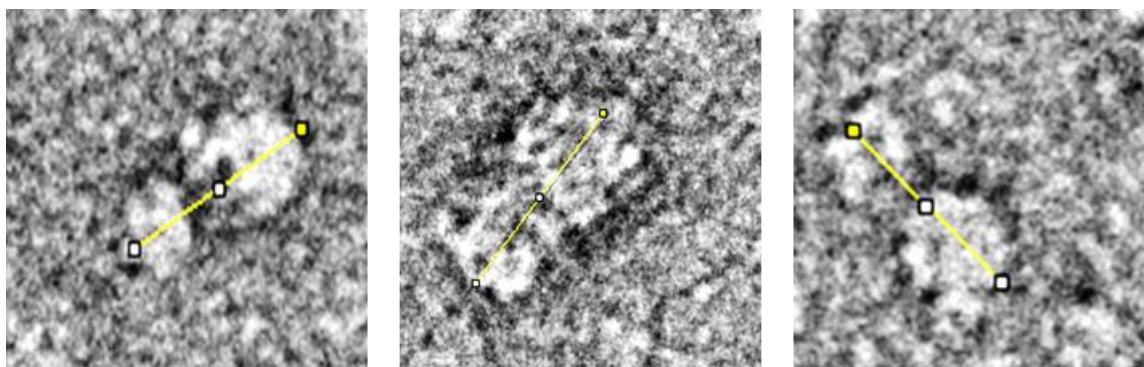


Figura 35. Partículas visualizadas por microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo quando amostras do complexo PKM2+GAC foram avaliadas. População diferencial de PKM2+GAC com tamanho médio de 23.7 nm (SD $\pm$ 3.9 nm) com perfil conservado da junção de uma partícula menor com cerca de 9 nm a uma estrutura maior com 13 nm. Imagens em escala de 100nm. Imagens coletas com 2% de acetato de uranila e avaliadas no *software* Image J.

O perfil desta partícula diferencial mostrou-se conservado, sendo formado pela junção de uma unidade menor de cerca de 9 nm a outra maior de 13 nm. Apesar do entusiasmo desta descoberta, a frequência em que observamos esta população foi baixa, compreendendo apenas cerca de 5,7% da população total encontrada.

Por conseguinte, para tentarmos aumentar a taxa desta partícula diferencial atribuída ao complexo de PKM2+GAC, realizamos novas análises na presença de 500 μM de F-1,6-BP (Figura 36), pautados nos experimentos de anisotropia de fluorescência que deu indícios de que este agente contribui para a interação das proteínas.

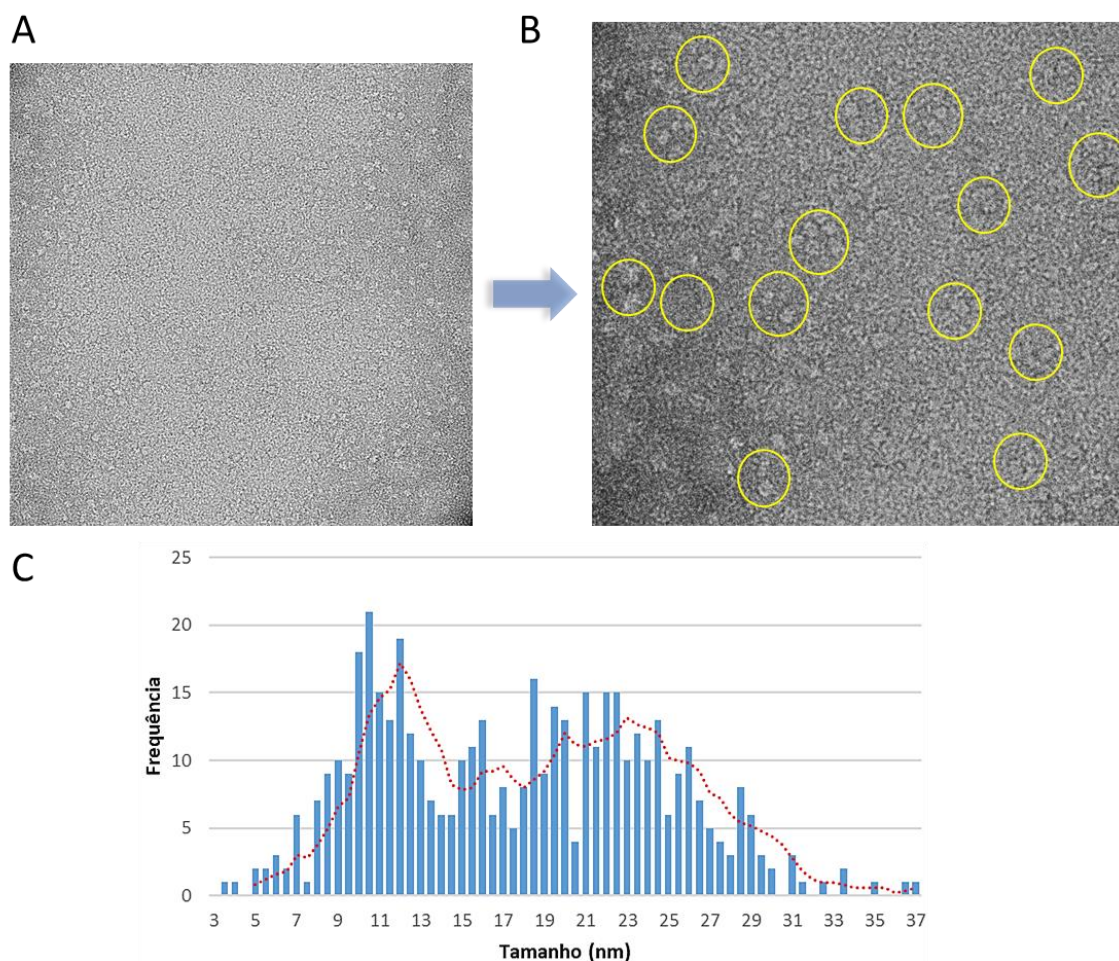


Figura 36. Microscopia eletrônica de partículas únicas com contraste negativo e frequência de distribuição do complexo PKM2+GAC na presença de F-1,6-BP.

Partículas de PKM2+GAC+F-1,6-BP (A) com destaque para área com população representativa do perfil observado (B) e (C) gráfico de distribuição das populações analisadas. Diâmetro médio de 17.4 nm (SD $\pm$ 6.7 nm) de 474 partículas analisadas. Imagens em escala de 100nm. Análises realizadas com 2% de acetato de uranila e processadas no software Image J. Para montagem das *grids* e aquisição das imagens, as proteínas purificadas foram incubadas em concentração equimolares na presença de 500 μM de F-1,6-BP por 24 horas e posteriormente submetidas a nova etapa de filtração em gel no dia da coleta. Foi observado um aumento da população diferencial de partículas que dão indícios da formação do complexo ser favorecida pela presença de F-1,6-BP.

Nas análises de PKM2+GAC na presença de F-1,6-BP foram encontradas 474 partículas variadas com tamanho médio de 17.4 nm (desvio padrão de 6.4

nm). Destas, 262 apresentaram comportamento semelhante ao observado previamente nas *grids* de PKM2+GAC sem aditivos, compreendendo 55,3% do perfil populacional. Novamente, esta estrutura apresentou um padrão onde uma unidade menor de aproximadamente 9.5 nm (desvio padrão de 2.1 nm) estava associada a uma outra maior com 12.5 nm (desvio padrão de 2.7 nm).

Na Figura 37 são sumarizados os perfis de tamanho das partículas de todas as *grids* e condições avaliadas. As populações foram categorizadas em relação ao perfil esperado para monômero, dímero e tetrâmero com base nas estruturas cristalográficas das proteínas e perfil não esperado, atribuído a formação do complexo PKM2+GAC.

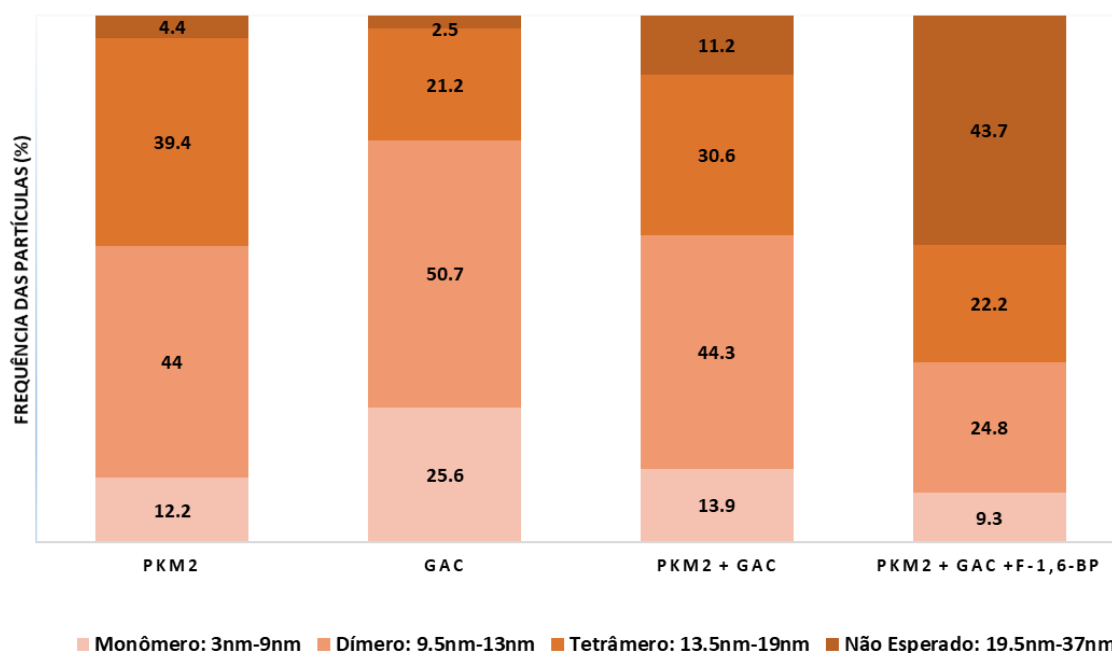


Figura 37. Perfil em tamanho (nm) das populações de partículas encontradas nas grids de Microscopia Eletrônica.

Nas *grids* PKM2 e GAC foram observados a presença majoritária de partículas com tamanho esperado para dímeros e tetrâmeros com uma pequena fração de partículas em tamanho superior ao esperado. A incubação das proteínas levou a formação de um perfil diferencial em tamanho (nm) que foi aumentado com a adição de F-,16-BP dando indícios da formação do complexo PKM2+GAC. Amostras categorizadas em tamanho baseado na estrutura cristalográfica de PKM2 (1T5A) e GAC (3SS3) depositadas no PDB.

De posse das informações obtidas do perfil diferencial encontrado que dá indícios da interação entre PKM2+GAC e com base nas estruturas cristalográficas das respectivas proteínas, propomos um modelo representativo do possível

complexo realizado no *software* Pymol (Figura 38). O modelo proposto é apenas ilustrativo, sendo necessários aprofundarmos os achados das estruturas diferenciais através dos ensaios de *Cryo-EM*.

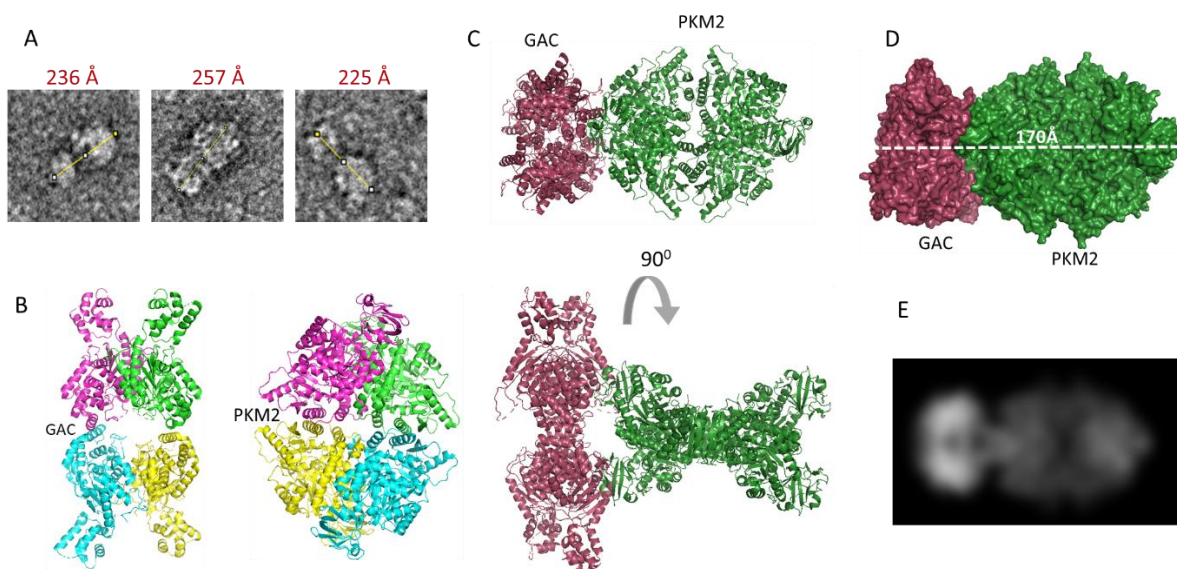


Figura 38. Modelo representativo proposto com base no perfil diferencial encontrado do complexo PKM2+GAC e na estrutura cristalográfica das proteínas.

(A) Perfil populacional de partículas diferenciais encontradas nas *grids* de PKM2+GAC. (B) Estrutura tridimensional do modelo cristalográfico do tetrâmero de GAC (PDB 3SS3) e PKM2 (PDB 1T5A). (C) Proposição de arranjo aleatório de superfície entre tetrâmeros de GAC e PKM2 (representados por *ribbons*), feito de maneira visual, utilizando o *software* Pymol. (D) Representação da associação entre as proteínas em superfície (acima) e (E) projeção 2D do modelo proposto do complexo realizada no *software* CryoSPARC. A rotação das moléculas e seu arranjo espacial aleatório nas *grids* podem contribuir para a formação do perfil observado.

4.2 Caracterização Celular da Interação

4.2.1 Análise da expressão de GLS e PKM2

Com o objetivo de estabelecer um modelo celular de estudo da interação, avaliamos a expressão de PKM2, GAC e KGA em linhagens de câncer de mama por qPCR e *Western Blot*.

Para o ensaio de qPCR, avaliamos a expressão relativa do mRNA de PKM2, GAC e KGA e PKM2 (Figura 39 A, B e C, respectivamente) em MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC1806, Hs578T, ZR-75-1 e MDA-MB-157. Utilizamos a linhagem MCF7 como calibrador, dado que esta é conhecida por ter alta expressão de PKM2¹¹⁵. Para *Western Blot* foram usadas as linhagens MCF10A, MCF7, SKBR3, T47D, ZR-75-30, BT-549, Hs578T, MDA-MB-157, MDA-

MB-231, MDA-MB-436, e MDA-MB-453, DU4475, HCC38, HCC70, HCC1143, HCC1599, HCC1806, HCC1937, MDA-MB-468 (Figura 39 D).

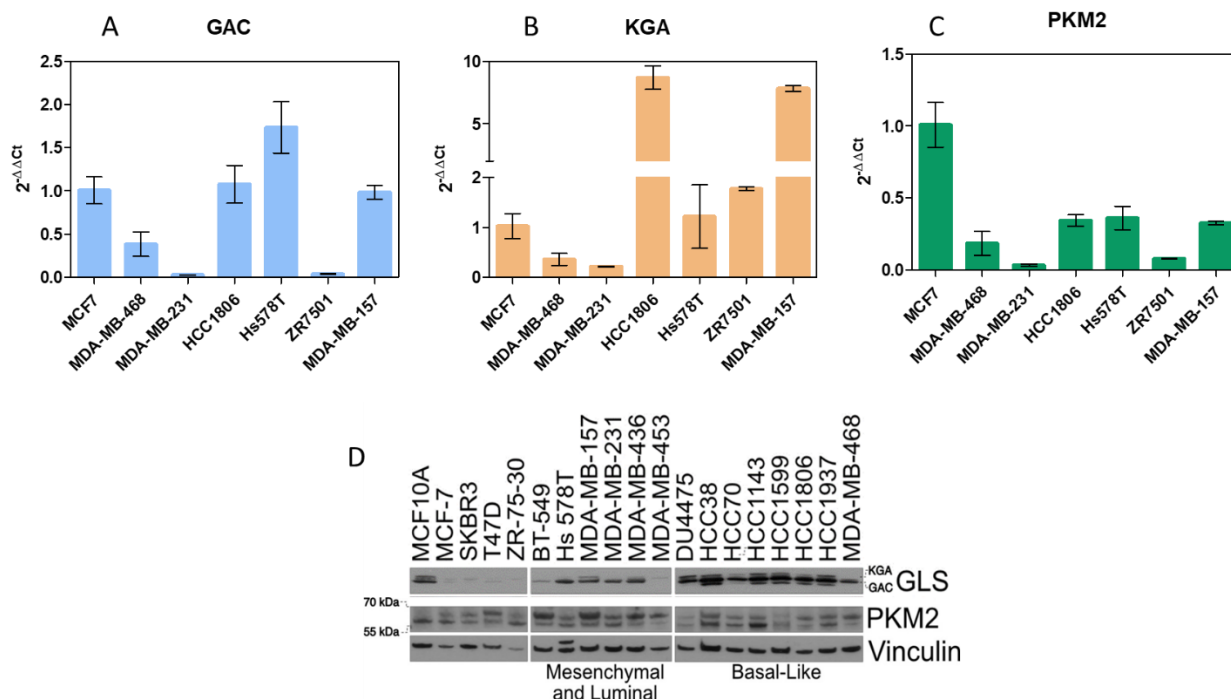


Figura 39. Análise da expressão endógena de GAC, KGA e PKM2 em linhagens celulares de câncer de mama.

Expressão relativa do mRNA de GAC (A), KGA (B) e PKM2 (C) analisada por qPCR. (D) Expressão das proteínas avaliadas por western blot. Os dados do qPCR foram normalizados pela expressão do normalizador 18S e pelo calibrador MCF7 pelo método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

De uma maneira geral, as linhagens de câncer de mama triplo negativo apresentaram maior expressão de GLS, conforme já publicado⁵⁷. Nas análises por *western blot*, PKM2 apresentou padrão duplo de banda, por motivos que desconhecemos.

Bandas mais intensas de PKM2 foram detectadas em BT-549, MDA-MB-157, MDA-MB-436, HCC38 e HCC1143. Destas linhagens, GLS também apresenta sinal forte em MDA-MB-157, MDA-MB-436, HCC38, HCC1143, podendo ser estes bons modelos de estudos para ampliarmos nossos experimentos. Para o momento, foi definida como linhagem modelo MDA-MB-231, por ser uma linhagem de câncer de mama triplo negativo (alvo de estudo de nosso grupo) altamente dependente de glutamina e conhecida por ter expressão exclusiva e elevada da isoforma PKM2¹¹⁵.

4.2.2 Co-Imunoprecipitação

Para confirmarmos a interação celular das proteínas realizamos experimentos de co-imunoprecipitação (Co-IP). Os ensaios foram preparados a partir de lisados celulares da co-expressão ectópica de GAC-V5/KGA-V5 e PKM2-Flag e endógena de GLS e PKM2, ambos em linhagem MDA-MB-231. Os anticorpos anti-flag (*mouse*) e anti-v5 (*rabbit*) *cross-linked* com a resina proteína A/G foram usados para a imunoprecipitação ectópica, enquanto o *cross-link* do anticorpo anti-GLS (*rabbit*) foi utilizado para avaliarmos a interação endógena. Como controle da interação endógena, o anticorpo anti-IgG *cross-linked* com a resina A/G foi utilizado.

Como mostrado na Figura 40, quando fizemos a imunoprecipitação com anti-V5 (Figura 40 A), confirmamos que KGA e GAC interagiram com a resina e que pôde-se detectar a co-imunoprecipitação de PKM2-Flag. Da mesma forma, conseguimos co-imunoprecipitar KGA e GAC quando utilizamos a resina *cross-linked* com anti-flag (Figura 39 B), reiterando a interação das proteínas nas condições avaliadas.

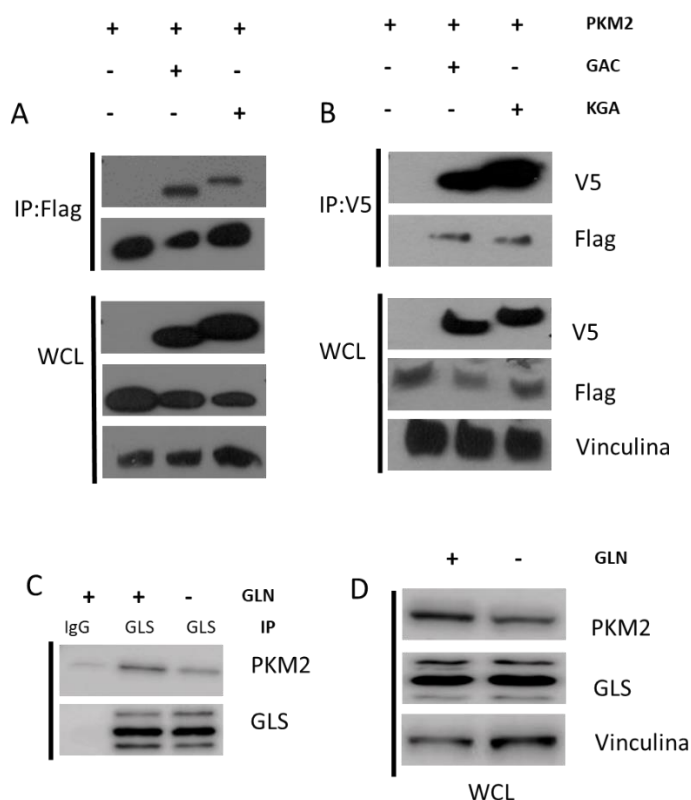


Figura 40. Ensaio de co-imunoprecipitação endógena e com co-expressão das proteínas fusionadas a cauda imunogênica.

Ensaio realizado imunoprecipitando as proteínas com anti-V5 (A), anti-flag (B), (C) anti-IgG (controle) e anti-GLS na presença e ausência de glutamina, (D) lisado total celular endógeno (WCL) na presença e ausência de glutamina. Nota-se que em todos os casos houve a interação das proteínas em linhagem MDA-MB-231 e que na ausência de glutamina parece que há a diminuição da interação das proteínas, dada a menor intensidade PKM2. GLN= Glutamina.

Avaliamos ainda se a interação entre as proteínas ocorre em nível de expressão endógeno, e para tanto, realizamos o Co-IP baixando as proteínas totais com anti-GLS (Figura 40 C) na ausência e presença de glutamina no meio de cultura celular. Como mostrado na Figura 40 C, foi possível detectar interação entre as proteínas endógenas em MDA-MB-231, mostrando a mesma não ser artefato da expressão ectópica das enzimas. Vimos ainda que na ausência de glutamina há uma diminuição na intensidade da banda de PKM2 imunoprecipitada, o que dá indícios que há menor afinidade de interação com GLS.

Achados recentes do nosso grupo mostram que o cultivo de células em meio com a concentração padrão de glutamina (2 mM) revela um perfil de imunofluorescência detectada pelo anticorpo anti-GAC coerente com a marcação mitocondrial (dados não mostrados). Com a remoção de glutamina do meio de

cultura leva à formação de estruturas filamentosas intramitocondriais. O grupo resolveu a estrutura destes filamentos por Cryo-EM, o qual, entendemos, ser formado na presença do ativador Pi e diminui o K_m da enzima^{41,50}, o que poderia explicar sua formação quando a glutamina é removida do meio de cultura.

Nossa hipótese é de que diminuição de glutamina em células cuja anaplerose deste aminoácido no TCA é importante para o funcionamento do mesmo, leva à diminuição na produção de NADH e FADH₂, e menor funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, bomba de prótons, e, por conseguinte, funcionamento da ATP sintase; desta maneira, haveria acúmulo de Pi na matriz mitocondrial e filamentação da enzima (dados não publicados). Com isso, a remoção de glutamina mimetizaria a adição de Pi *in vitro*, ocasionando a polimerização da enzima dentro das células. Coerente com este cenário, vimos que na ausência de glutamina há uma diminuição na intensidade da banda de PKM2 imunoprecipitada (Figura 40 C), o que dá indícios que há menor afinidade de interação com GLS.

4.2.3 Co-Localização e Duolink PLA

Utilizamos a linhagem PC3 transfectada para co-expressão de PKM2-Flag + GAC-V5 (Figura 41) para identificar, por imunofluorescência, a localização das mesmas na célula. Esta avaliação foi realizada em meio de cultura com 2 mM de glutamina (Figura 41 A) ou 0 mM de glutamina (Figura 41 B). Como já mencionado, GAC apresenta localização celular mitocondrial dispersa⁴¹, enquanto que em baixas concentrações ou na ausência desse aminoácido, foi observado pelo nosso grupo que GAC forma longas estruturas micrométricas filamentosas intramitocondriais como pode ser observado na imagem abaixo.

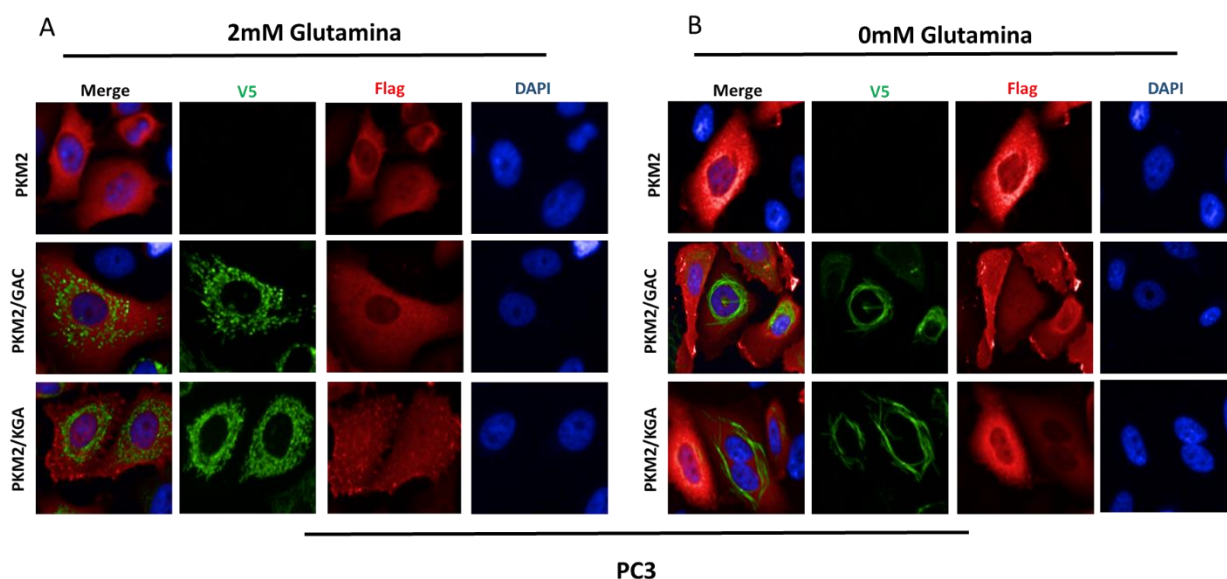


Figura 41. Imunofluorescência de PKM2-Flag (vermelho) e KGA e GAC-V5 (verde).
Co-expressão das proteínas em linhagem adenoma carcinoma próstata humano PC3 em meio DMEM completo (2 mM glutamina, A) ou em meio DMEM sem glutamina (B). Não há sinal claro de co-localização. PKM2 apresenta localização difusa, enquanto GLS apresenta localização mitocondrial. Com a ausência de glutamina há a formação de polímeros de GLS.

Os resultados obtidos confirmaram que na ausência de glutamina GAC vai de um estado difuso a um estado organizado em estruturas filamentosas, os quais denominamos filamentos, assim como já reportamos acontecer na presença de fosfato inorgânico⁵⁰. PKM2, por outro lado, se apresenta difusa e se estende por todo o citoplasma e a diminuição de glutamina do meio de cultura não alterou sua disposição celular.

Todavia, não há co-localização clara de PKM2 e GAC tanto em meio completo, quanto em meio sem glutamina. A associação entre as proteínas pode se dar em situação celular específica não contemplada nas condições de cultivo e/ou representa uma fração pequena das proteínas, de maneira que sua detecção por esta técnica não é facilitada.

Ainda com o intuito de inferirmos sobre o local onde ocorre a interação das proteínas, realizamos ensaio de fracionamento celular na linhagem MDA-MB-231 em condições de meio completo e na ausência de glutamina e glicose (Figura 42). Coerente com o ensaio de imunofluorescência, PKM2 foi detectada tanto em citoplasma quanto em mitocôndria e GLS apresentou-se majoritariamente em mitocôndria em todas as condições avaliadas. Este resultado nos dá indícios que a interação das proteínas ocorra na mitocôndria.

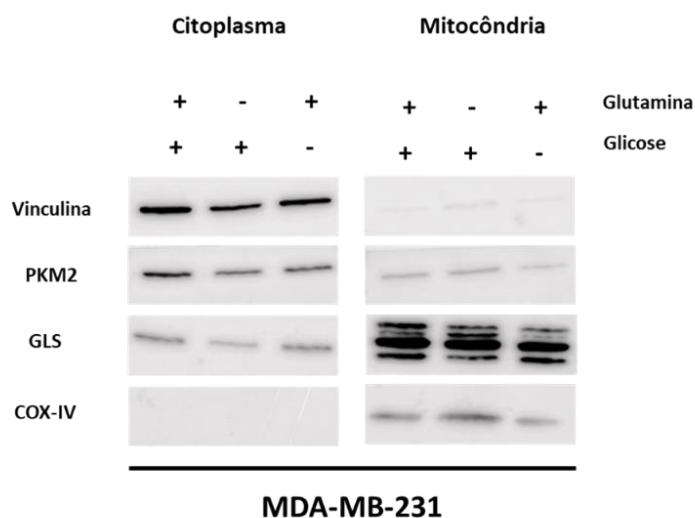


Figura 42. Fracionamento celular na linhagem MDA-MB-231.

Ensaio realizado em meio DMEM completo e na ausência de glicose e ou glutamina. PKM2 apresenta localização difusa, enquanto GLS apresenta localização mitocondrial. Com a ausência de GLN há a formação de polímeros de GLS.

Com o ensaio Duolink-PLA® comprovamos que a interação de PKM2 e GAC ocorre tanto de forma ectópica, quanto endógena em linhagem celular MDA-MB-231 (Figura 43 A e B, respectivamente). Dado que a reação só ocorre quando as proteínas se encontram próximas umas às outras (distância < 40 nm)¹¹⁶, podemos inferir que a interação destas proteínas esteja ocorrendo na mitocôndria, dado que localização celular de GAC é majoritariamente mitocondrial, e PKM2, uma proteína encontrada tipicamente no citoplasma celular pode ser translocada para o núcleo e mitocôndria onde desempenha funções não-canônicas, corroborando com o fracionamento celular.

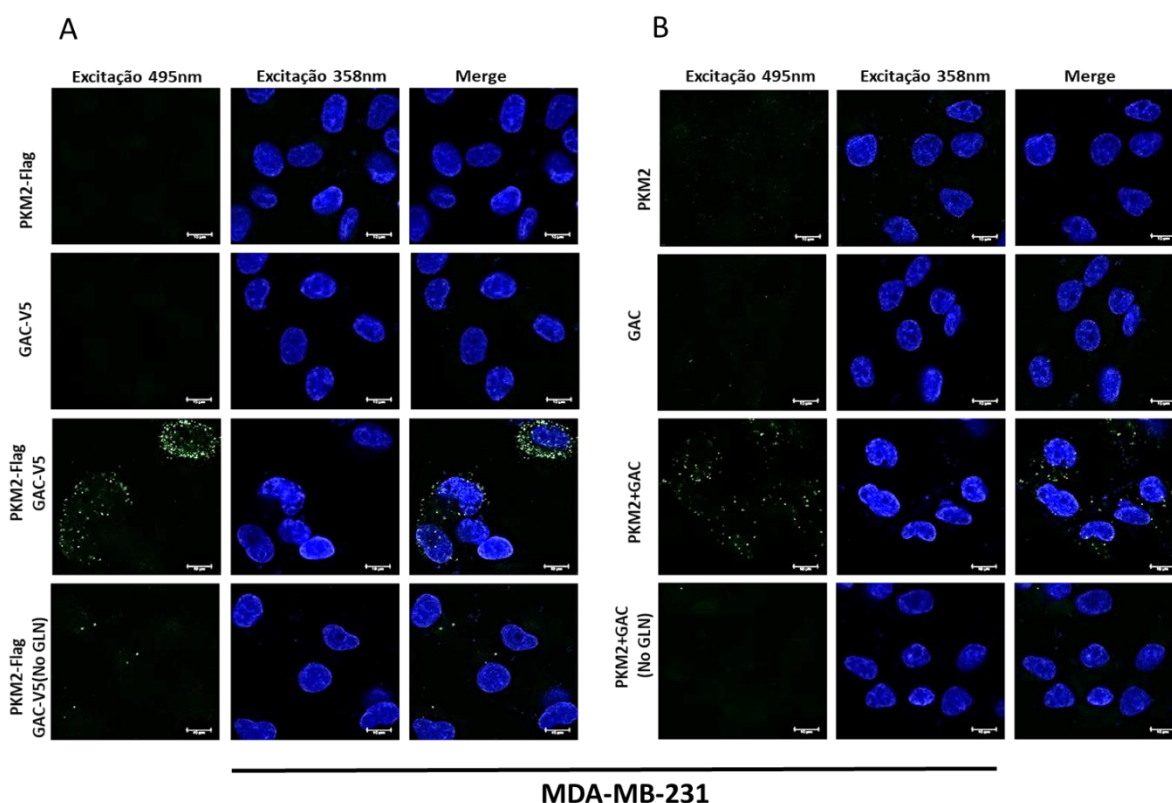


Figura 43. Duolink-PLA expressando PKM2-Flag e GAC-V5 e expressão endógena das proteínas.

Co-expressão das proteínas em linhagem adenoma carcinoma próstata humano PC3 em meio DMEM completo (2 mM glutamina, A) ou com ausência de glutamina (B) levando à perda do sinal de interação das proteínas. No GLN= Ausência de glutamina.

Curiosamente, quando removemos glutamina do meio de cultivo celular (Figura 43 B) vimos que houve a perda da interação das proteínas em sistema ectópico e endógeno, corroborando os achados obtidos no experimento de co-imunoprecipitação. Deste modo, levantamos novamente a hipótese de que a formação de espécies oligoméricas superiores de GLS leva à perda da interação com PKM2, um cenário essencial para nos guiar sobre as condições fisiológicas necessárias para que ocorra a interação entre as proteínas.

Elucidar o local e o contexto que favorece a interação de PKM2 e GLS nas células permitirá não somente compreender como se dá a formação do complexo, mas também desvendar as consequências que são geradas para o metabolismo tumoral e na atividade destas proteínas.

5 Discussão e Perspectivas

As enzimas GLS são peças chave na adaptação e manutenção do metabolismo do câncer. As GLS atuam no catabolismo de glutamina propiciando intermediários biossintéticos, ATP e moléculas importantes para o balanço redox, como NADPH e glutatona, para as células tumorais com alta taxa proliferativa. Por esta razão, a regulação do metabolismo de glutamina é um potencial alvo terapêutico. Todavia, os mecanismos pelos quais a atividade das GLS é regulada ainda não são totalmente conhecidos^{4,117}.

O gene homônimo, *GLS*, através de *splicing* alternativo, codifica para as isoformas KGA e GAC, ambas desempenham papel pró-tumoral sob o estímulo de oncogenes como cMyc e RhoGTPase, sendo GAC a isoforma com maior atividade catalítica dado a sua capacidade de organizar-se em estruturas filamentosas longas. Estas enzimas possuem identidade estrutural diferindo-se apenas em seu domínio C-terminal, onde em KGA são encontradas repetições do tipo LXXLL e ANK, as quais são relacionadas com interações proteína-proteína^{22,118–120}.

A interação de GLS com PPAR γ foi identificada e comprovada por nosso grupo. Neste estudo, vimos que a translocação de GLS para o núcleo celular promove a formação do complexo entre as proteínas, sequestrando PPAR γ de seu elemento responsivo DR1 e levando a perda sua atividade de receptor nuclear, evidenciando um papel não-canônico de GLS na regulação gênica⁴⁸. Em adição, KGA em neurônios interage com BNIP-H, o que diminui a atividade glutaminolítica da enzima e os níveis de glutamato nestas células⁴⁹. Coletivamente estes dados evidenciam a importância do estudo da interação de GLS com outras proteínas, o que pode tanto regular sua atividade, bem como promover sua ação em vias ainda não descritas.

Estudos de duplo-híbrido de levedura realizados por nosso grupo demonstraram que GAC e KGA possuem diversos candidatos de interação. Dentre estes, a possível interação com PKM2 despertou nosso interesse por se tratar de uma enzima central no metabolismo tumoral, bem como por estar relacionada à malignidade de diversos tipos de cânceres e ser constante alvo de estudos como candidato terapêutico^{61,86,102}.

Ensaios preliminares comprovaram a interação de PKM2 com GLS através de ensaios de *pull-down* e anisotropia de fluorescência com as enzimas expressas em sistema heterólogo, bem como a interação celular por co-imunoprecipitação, o que nos motivou a aprofundar os achados bioquímicos e celulares através deste trabalho.

Como apresentado, a enzima PKM2 é produto de *splicing* alternativo do gene *PKM*, através da exclusão do éxon 9 e inclusão do éxon 10, e em vias onde o inverso ocorre, há a expressão da isoforma PKM1. Enquanto PKM1 é expressa em tecidos com alta demanda energética e em situações fisiológicas, PKM2 é expressa em tecidos com alta taxa proliferativa e durante a fase embrionária, e de nosso interesse, é majoritariamente encontrada em células tumorais^{62,70,121,122}.

Pelo fato de PKM2 existir sob conformações ativa e inativa e ser modulada por diversos fatores, tais como modificações pós-traducionais, oncogenes e a presença de aminoácidos e metabólitos, sua expressão favorece a manutenção do fenótipo tumoral por permitir a adaptação do metabolismo de acordo com as demandas energéticas e biossintética celulares. Além disso, devido a modulação em sua estrutura e atividade, PKM2 foi descrita como parceiro de interação com diversas proteínas, levando a funções além de sua atividade clássica piruvato quinase na via glicolítica^{59,74,77,84,102,123,124}.

Em sua forma ativa tetramérica, PKM2 interage com diversas enzimas no citoplasma formando o “complexo enzimático glicolítico”. Conforme descrito por Mazurek e colaboradores, a formação deste complexo de enzimas glicolíticas leva a uma compartimentação dos processos metabólicos, promovendo maior eficiência na metabolização de glicose⁸⁷.

A inativação de PKM2, por sua vez, permite vantagens às células com altas proliferativas devido ao acúmulo de intermediários biossintéticos da via glicolítica¹²⁴, além de por promover atividades não-canônicas da enzima essenciais para a manutenção do potencial replicativo aumentando desta células^{61,69,81,124,125}. Por conseguinte, a menor taxa glicolítica passa a ser suprida pelas enzimas GLS através da glutaminólise.

Em sua conformação inativa dimérica, PKM2 pode ser translocada para o núcleo celular em situações de hipóxia, onde interage com HIF1 promovendo a transcrição de enzimas glicolíticas⁷². Já em situações de privação de glicose, PKM2 pode ser translocada para a mitocôndria, onde forma um complexo VDAC3

impedindo sua degradação, ocasionando o aumento da permeabilidade desta organela e o influxo de ATP para o citoplasma destas células⁹⁶.

Em nosso estudo, pudemos expressar e purificar todas as enzimas, bem como construções de domínios de GLS, em sistema heterólogo com alto grau de pureza e rendimento necessários para realizarmos os ensaios bioquímicos da caracterização da interação. Por possuírem massa molecular similares, não pudemos obter um perfil claro de formação do complexo através da etapa cromatográfica por exclusão molecular da incubação de PKM2+GAC e PKM2+KGA. Além disso, a diluição das proteínas na coluna de filtração em gel pode ter propiciado a dissociação do complexo.

Os ensaios de DLS e SEC-MALS não nos deram indícios claros da formação de uma população diferencial atrelada a formação do complexo. Limitações atreladas às técnicas, como sensibilidade de detecção, dissociação do complexo das proteínas durante as análises e similaridade na massa molecular das proteínas.

Esperávamos que com os ensaios de espectrometria de massas e cristalografia pudéssemos desvendar os resíduos de aminoácidos e regiões envolvidas na formação deste complexo, porém, em ambos os casos obtivemos resultados de apenas uma das proteínas e não conseguimos capturar a interação.

As análises da interação através de *pull-down* não puderam ser replicadas como nos resultados preliminares. Este fato pode ser justificado pelo fato de que nos primeiros ensaios realizados foram utilizadas amostras de PKM2 que eram obtidas em um pico no *void* da coluna de exclusão molecular, o qual não se enquadrava no perfil oligomérico esperado da enzima que pode existir em solução como monômero (~ 59 kDa), dímero (~ 120 kDa) e tetrâmero (~ 240 kDa)¹⁰² e que não foi mais obtido nos novos experimentos e purificações.

Nossos achados de microscopia eletrônica nos deram indícios mais claros da formação do complexo PKM2+GAC através de um perfil diferencial de partículas que parecem ser favorecidas pela presença do ativador alostérico de PKM2, F-1,6-BP. Este composto, leva a mudanças na estrutura da enzima promovendo a flexibilização de sua estrutura tornando-a “relaxada”, caracterizada como tetrâmero ativo relaxado ^{70,81,102}. Estes achados corroboram os resultados de anisotropia de fluorescência de que este aditivo influencia de maneira positiva na interação das proteínas.

Como mencionado, em todas as *grids* avaliadas, encontramos a presença de partículas com tamanhos variados. Este fato é plausível uma vez que PKM2 pode existir em solução em conformação monomérica, dimérica e tetrâmerica^{85,102}, assim como a transição dímero/tetrâmero de GAC⁵¹. Além disso, a rotação livre das moléculas e seu arranjo espacial aleatório nas *grids*, bem como as análises realizadas na mensuração das estruturas podem contribuir para a heterogeneidade das populações analisadas.

Neste momento, estamos aguardando a análise das imagens de Cryo-EM coletadas por colaboradores do grupo de Microscopia Eletrônica do LNNano para termos maiores informações sobre o possível complexo obtido e com isso esperamos poder ter maior clareza sobre como ocorre a interação entre as proteínas. Estes dados estão sendo processados pelo colaborador do projeto, Prof. Dr. André Ambrósio.

Com os ensaios de anisotropia de fluorescência observamos que a interação de PKM2 e GAC a interação é favorecida pelo tempo de incubação das enzimas e conforme mencionado, pela presença do ativador de PKM2, F-1,6-BP. Contudo, a presença de Pi leva à perda da interação, fato que atrelamos à formação das espécies filamentosas de GAC responsáveis por sua ativação³².

Como pôde ser observado nos ensaios de DLS, ocorre o deslocamento do tamanho de GAC na presença deste composto indicando a formação dos filamentos longos, enquanto que o mesmo não parece exercer efeitos sobre PKM2. Curiosamente, em todas as condições avaliadas no ensaio de anisotropia, não pudemos capturar a interação de PKM2 com KGA, o que nos dá indício de que GAC seja a isoforma preferencial para que ocorra a formação do complexo.

Coerente com este cenário, os ensaios realizados com construções de domínios de GLS, nos revelaram que o Domínio Catalítico é a região com maior afinidade por PKM2, e que mesmo com a adição de Pi não há interferência nos valores de K_d , dado que se justifica por este domínio por si não ser capaz de propiciar a formação das fibras de GLS¹²⁶, assim como mostrado por DLS. Deste modo, concluímos que a interação entre GAC e PKM2 seja mediada por este domínio e que a formação das fibras de GLS pode deixar inacessíveis sítios importantes para que a interação com PKM2 ocorra.

Apesar de o Domínio Catalítico ser uma região comum entre as isoformas

de GLS, e que PKM2 não parece interagir com KGA nos cenários avaliados, acreditamos que a presença do Domínio C-terminal de KGA pode ser interferir na formação do complexo, por ser a única região que se difere com GAC. Mesmo obtendo valores de K_d em escala de baixo micromolar, inferimos que esta seja uma interação transitória e fraca, visto que interações tipicamente fortes possuem valores de K_d em nível nanomolar^{127–129}.

A formação destas espécies filamentosas de GLS tem sido alvo constante de estudos por nosso grupo. Foi demonstrado através do trabalho publicado por Ferreira et al.⁵⁰, que na presença de Pi GAC se reorganiza em super-estruturas oligoméricas filamentosas que interagem entre si por empilhamento dos tetrâmeros (dados não publicados), sendo regulado por um loop (³²¹LRFNKL³²⁶), chamado pelo nosso grupo de *gating loop*⁵⁰ ou *activating loop* por outros grupos⁵².

Corroborando com a hipótese de que a filamentação de GLS prejudica a interação entre PKM2 e GLS, nossos ensaios de Co-IP e Duolink-PLA em células mostraram que a remoção de glutamina do meio de cultivo celular leva a perda do sinal de interação das proteínas. Estes resultados estão atrelados ao fato de que, quando removemos este aminoácido do meio de cultivo celular, ocorre o rearranjo destas enzimas, promovendo um perfil de marcação filamentar organizado e levando perda de uma marcação de GLS dispersa intramitocondrial.

Apesar de não podermos afirmar com clareza se estas estruturas em células são as mesmas que observados *in vitro* na presença de Pi, nossos indícios deixam claro que este rearranjo estrutural de GLS promove a perda da interação das proteínas. Neste cenário, a filamentação de GLS em células devido à baixa de glutamina, pode propiciar a perda da interação para que PKM2 atue no metabolismo de glicose no citoplasma através da conversão de PEP em piruvato, suprimindo o ciclo do TCA e provendo a formação de ATP para as altas demandas energéticas celulares (figura 44).

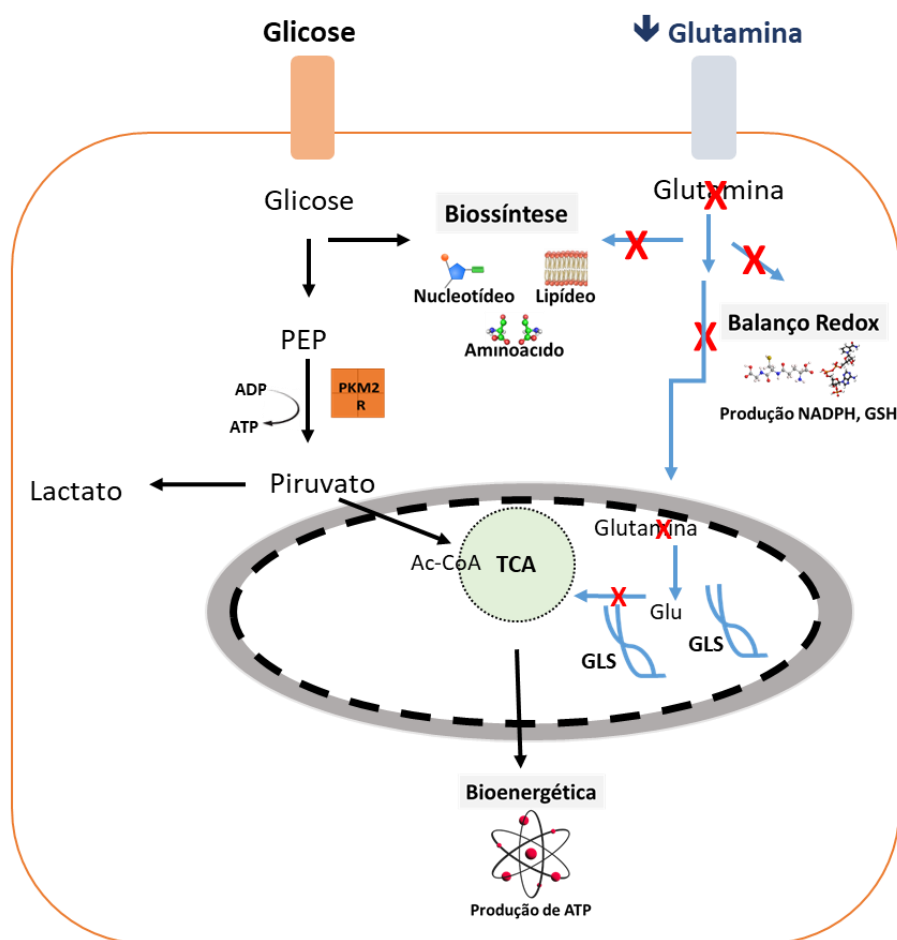


Figura 44. A filimentação de glutaminase leva a perda da interação com PKM2.

Na ausência de glutamina no meio de cultivo celular ocorre alteração do sinal de marcação de GLS que passa a apresentar um perfil organizado em. Neste contexto ocorre a perda da interação com PKM2 que pode levar a ativação da enzima para prover intermediários para a síntese de ATP no TCA. Similarmente, a adição de Pi leva o rearranjo de GLS em filamentos o que ocasiona a perda da interação *in vitro*. PEP: Fosfoenolpiruvato; ADP: Adenosina difosfato; ATP: Adenosina trifosfato; PKM2: Piruvato quinase M2; GLS: Glutaminase; Ac-CoA: acetilcoenzima A; TCA: ciclo do ácido tricarboxílico; Glu: Glutamato.

Por sua vez, os ensaios de atividade enzimática nos mostraram que GAC em concentração super-estequiométrica leva a perda da atividade piruvato quinase de PKM2. Neste contexto e pensando em um cenário celular, uma hipótese é de que GAC em altas concentrações celulares e em meio rico de seu substrato, glutamina, pode se complexar com PKM2 levando a sua inativação, a qual pode se dar pela translocação de PKM2 na mitocôndria (figura 45).

Deste modo, PKM2 inativa deixaria de prover piruvato para o ciclo do TCA, ocasionando a maior dependência de anaplerose de glutamina para suprir os blocos biossintéticos deste ciclo e o acúmulo dos intermediários glicolíticos para serem usados em outras vias importantes para sustentação do fenótipo tumoral, como a produção de nucleotídeos na via das pentoses, ácidos graxos e

aminoácidos. Para comprovar tal efeito, precisamos realizar ensaios de co-imunoprecipitação da fração mitocondrial de PKM2 e GAC e ver se neste compartimento ocorre a interação das enzimas, além de estudarmos mutações em PKM2 que possam favorecer este processo, uma vez, que já foi mostrado que a sucinilação de PKM2 pode promover sua translocação para esta organela⁹⁶.

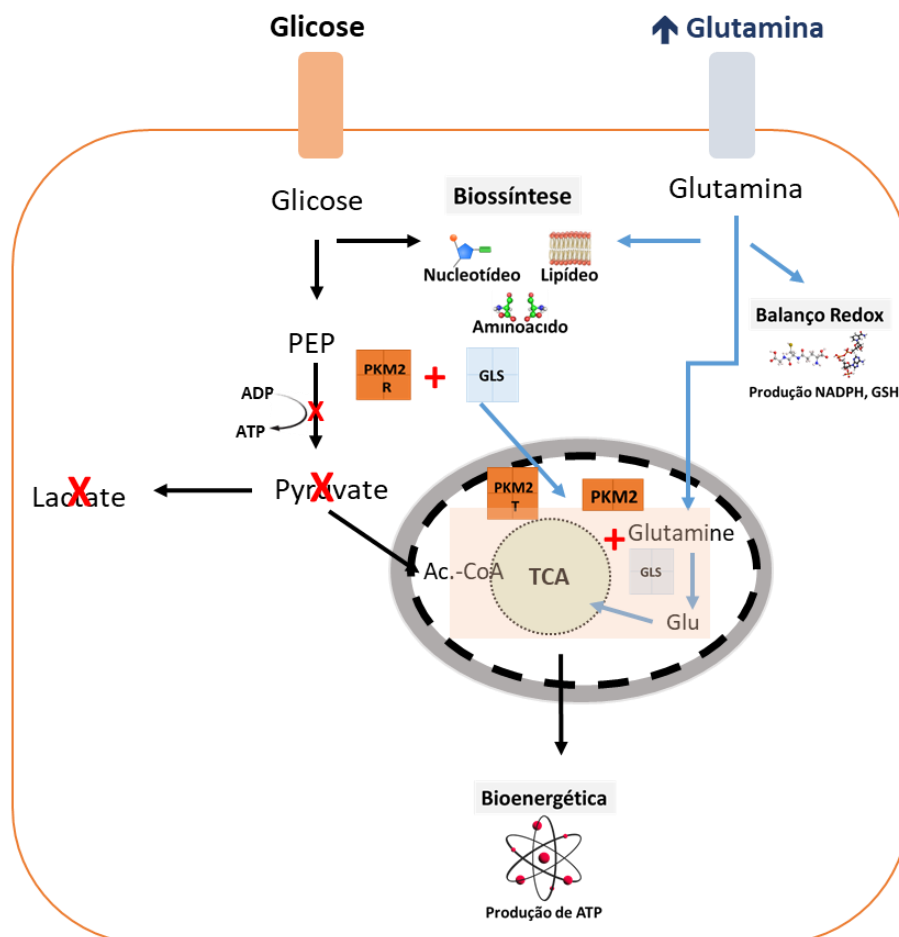


Figura 45. Interação de PKM2 com GAC leva a perda de sua atividade piruvato quinase.

Ensaios de atividade mostraram que GAC em altas concentrações leva a inibição da atividade piruvato quinase de PKM2. Neste cenário, os intermediários da via glicolítica passam a suprir outras vias importantes para manutenção da alta proliferativa celular, enquanto que a glutaminólise através da ação das GLS passa a suprir o ciclo do ácido tricarboxílico levando a formação de ATP. PEP: Fosfoenolpiruvato; ADP: Adenosina difosfato; ATP: Adenosina trifosfato; PKM2: Piruvato quinase M2; R: Tetrâmero relaxado ativo; T: Tetrâmero tenso inativo; GLS: Glutaminase; Ac-CoA: acetilcoenzima A; TCA: ciclo do ácido tricarboxílico; Glu: Glutamato.

Neste âmbito, nossa hipótese seria de que a interação de GAC com PKM2 defina um cenário de maior dependência de glutamina pela célula, e, além disto, deve ocorrer em cenário onde o aporte de acetil-CoA se dá por outra fonte que não piruvato glicolítico. Uma maneira de se aliar evidências neste sentido seria testar a dependência das células a glutamina, e atividade de glutaminase na

presença de moduladores de piruvato quinase. Além disto, a atividade de piruvato quinase intracelular poderia ser avaliada na presença de GAC super-expressa.

Outra abordagem seria verificar se há correlação entre nível de GAC intracelular, comparando-se diversas linhagens, com atividade de PKM2. Outros trabalhos já demonstraram que em contextos de hipóxia há intensificação da direção de metabolização de glutamina no sentido oxidativo, o que permite a produção de citrato somente a partir de carbonos glutaminolíticos^{130,131}, sendo este um cenário importante a ser avaliado na regulação da interação entre as proteínas.

Dado que a constante de dissociação da interação é da ordem de micromolar, o que é considerado “fraco” para interação entre proteínas¹²⁹, é esperado que a mesma seja contextual e dependente de sinais específicos, tais como metabólitos e presença de nutrientes que medeiam a atividade destas enzimas. Um cenário promissor a ser investigado é se PKM2 teria atividade de quinase sobre GAC, como já foi mostrado ter sobre outras proteínas^{67,77,132}. Além disso, a localização celular de PKM2, modificações pós-traducionais nesta enzima, assim como seu estado conformacional são importantes aspectos a serem considerado em relação ao seu estudo de interação com GLS.

Recentemente foi demonstrado por Li e colaboradores¹³³ que PKM2 dimérica é responsável pela regulação da expressão de GLS, e por conseguinte do metabolismo de glutamina. Este mecanismo ocorre através da interação de PKM2 com c-Myc IRES ocasionado a tradução desta oncoproteína, que por sua vez, leva ao aumento da expressão de GLS e do consumo de glutamina pelas células tumorais. Assim, PKM2 além de promover o controle da via glicolítica, ainda possui um papel recíproco na glutaminólise, demonstrando sua importância no fino balanço energético do metabolismo tumoral.

Considerando este cenário proposto por Li *et al.*¹³³, levantamos a hipótese a ser explorada de que um mecanismo de *feedback* controlado pela interação de GLS com PKM2, inative esta enzima, assim como demonstramos através dos ensaios de atividade piruvato quinase. Neste contexto, em altas demandas de glutamina, GLS inativaria PKM2 e promoveria a regulação de sua expressão gênica para atuar no metabolismo de glutamina, enquanto que PKM2 proveria outras funções essenciais para a sustentação do metabolismo tumoral.

Coletivamente, nossos dados trazem nova luz sobre a importância da

interação entre proteínas e o controle de suas funções. Precisamos explorar novos cenários e contextos que propiciem a interação de PKM2 e GAC, uma vez que a mesma deve ser controlada por mecanismos sofisticados nas células dependentes de seu estado nutricional e demandas específicas que controlam o metabolismo tumoral. Portanto, compreender com maior profundidade a como ocorre a interação destas proteínas é um desafio que envolve diversos parâmetros, como a presença de modificações pós-traducionais nas enzimas, o microambiente tumoral e ações de oncogenes, abrindo novos caminhos sobre a regulação do metabolismo do câncer.

6 Conclusão

- ✓ Detectamos e caracterizamos a interação inédita entre GAC e PKM2 através de ensaios bioquímicos e celulares.
- ✓ Estudos de anisotropia de fluorescência com as proteínas expressas e purificadas em sistema heterólogo mostraram que a interação ocorre através do Domínio Catalítico de GAC, sendo afetada pelos domínios N- e C-terminal da mesma. De acordo, PKM2 tem baixa afinidade por KGA. A interação é perdida pela formação de filamentos de GAC na presença de Pi.
- ✓ A interação de GAC leva a inativação de PKM2. Como PKM2 não interage com a forma mais ativa da enzima GAC (a filamentosa, que ocorre na presença de Pi) é provável que o mesmo não tenha papel no controle da atividade de GAC.
- ✓ Apesar dos diversos esforços, não conseguimos caracterizar o complexo GAC+PKM2 estruturalmente.
- ✓ A interação de GAC e PKM2 foi mostrada em células através de ensaios de co-imunoprecipitação e Duolink-PLA. Coerente com os ensaios *in vitro*, a oligomerização da enzima nas células (induzida pela supressão de glutamina no meio de cultura) quebra a interação entre GAC e PKM2.
- ✓ Confirmamos em células que a interação entre GAC e PKM2 se dá com a forma menos ativa de GAC. É provável que esta interação nas células também leve a diminuição na atividade de PKM2 e sinalize outra atividade de GAC alternativa a de processamento de glutamina em glutamato, e potencialmente ligada ao controle do fluxo de carbonos na via glicolítica.

7 Referências Bibliográficas

1. Katt, William P.; Ramachandran, Sekar; Erickson, Jon W.; Cerione, R. A. Dibenzophenanthridines as inhibitors of glutaminase C and cancer cell proliferation. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1269–1278 (2012).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
4. Vander Heiden, M. G. & DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **168**, 657–669 (2017).
5. DeBerardinis, Ralph J.; Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Oncology* **119**, 1–18 (2016).
6. Alquraishi, M. *et al.* Pyruvate kinase M2: A simple molecule with complex functions. *Free Radic. Biol. Med.* **143**, 176–192 (2019).
7. Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. V. Current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 325–337 (2011).
8. Capello, M., Ferri-Borgogno, S., Cappello, P. & Novelli, F. α -enolase: A promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J.* **278**, 1064–1074 (2011).
9. Williams, D. & Fingleton, B. Non-canonical roles for metabolic enzymes and intermediates in malignant progression and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **36**, 211–224 (2019).
10. Warburg, O. On the origin of cancer. *Science* (80-.). **123**, 309–314 (1956).
11. Lv, L. *et al.* Acetylation Targets the M2 Isoform of Pyruvate Kinase for Degradation through Chaperone-Mediated Autophagy and Promotes Tumor Growth. *Mol. Cell* **42**, 719–730 (2011).
12. Gao, P. *et al.* c-Myc suppression of miR-23 enhances mitochondrial glutaminase and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 62–765 (2009).
13. Zhu, M. *et al.* Biomolecular Interaction Assays Identified Dual Inhibitors of Glutaminase and Glutamate Dehydrogenase That Disrupt Mitochondrial Function and Prevent Growth of Cancer Cells. *Anal. Chem.* **89**, 1689–1696 (2017).
14. Gogvadze, V., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* **18**, 165–173 (2008).
15. Faubert, B., Solmonson, A. & DeBerardinis, R. J. . Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science* (80-.). **152**, 10 (2020).
16. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2016).
17. Sun, X. *et al.* Metabolic Reprogramming in Triple-Negative Breast Cancer. *Front. Oncol.* **2**, (2020).
18. Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L. A. & Mueller-Klieser, W. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int. J. Oncol.* **39**, 453–463 (2011).
19. Hay, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: Can it be exploited for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* **16**, 635–649 (2016).
20. Deberardinis, R. J. & Cheng, T. Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29**, 313–324 (2010).
21. Le, A. *et al.* Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for

- proliferation and survival in b cells. *Cell Metab.* **15**, 110–121 (2012).
22. Wise, D. R. *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18782–18787 (2008).
 23. DeBerardinis, R. J. . *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19345–19350 (2007).
 24. Katt, W. P., Lukey, M. J. & Cerione, R. A. Biomolecular interaction assays identified novel dual inhibitors of glutaminase and glutamate dehydrogenase that disrupt mitochondrial function and prevent growth of cancer cells. *Anal. Chem.* **89**, 1689–1696 (2017).
 25. Jiang, J., Srivastava, S. & Zhang, J. Starve cancer cells of glutamine: Break the spell or make a hungry monster? *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 26. Cluntun, A. A., Lukey, M. J., Cerione, R. A. & Locasale, J. W. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends in Cancer* **3**, 169–180 (2017).
 27. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
 28. Masisi, B. K. *et al.* The Role of Glutaminase in Cancer. *Histopathology* **1**, 1–25 (2019).
 29. Yu, D. *et al.* Kidney-type glutaminase (GLS1) is a biomarker for pathologic diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **6**, 7619–7631 (2015).
 30. Szeliga, M. & Albrecht, J. Opposing roles of glutaminase isoforms in determining glioblastoma cell phenotype. *Neurochem. Int.* **88**, 6–9 (2015).
 31. Godfrey, S., Kuhlenschmidt, T. & Curthoys, N. P. Correlation between activation and dimer formation of rat renal phosphate dependent glutaminase. *J. Biol. Chem.* **252**, 1927–1931 (1977).
 32. Ferreira, A. *et al.* Active Glutaminase C Self-assembles into a Supratetrameric Oligomer That Can Be Disrupted by an Allosteric Inhibitor *. *J. Biol. Chem.* **288**, 28009–28020 (2013).
 33. De la Rosa, V. *et al.* A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem. Int.* **55**, 76–84 (2009).
 34. Campos-Sandoval. Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: Affinity purification , kinetic and molecular characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 765–773 (2007).
 35. Rathore, M. G. *et al.* The NF-κB member p65 controls glutamine metabolism through miR-23a. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1448–1456 (2012).
 36. Dong, M. *et al.* Nuclear factor-κB p65 regulates glutaminase 1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Onco. Targets. Ther.* **11**, 3721–3729 (2018).
 37. Wang, J. *et al.* Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* **18**, 207–219 (2010).
 38. Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V, Nagano, H. & Mayama, T. Inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. **107**, (2010).
 39. Dias, M. M. *et al.* GLS2 is protumorigenic in breast cancers. *Oncogene* (2019). doi:10.1038/s41388-019-1007-z
 40. Porter, L. D. *et al.* Complexity and species variation of the kidney-type

- glutaminase gene. 157–166 (2002).
41. Cassago, A. *et al.* Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1092–1097 (2012).
 42. Capello, M. *et al.* Targeting the Warburg effect in cancer cells through ENO1 knockdown rescues oxidative phosphorylation and induces growth arrest. *Oncotarget* **7**, 5598–5612 (2016).
 43. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. & Parker, M. G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733–736 (1997).
 44. Li, J., Mahajan, A. & Tsai, M. Ankyrin Repeat: A Unique Motif Mediating Protein - Protein Interactions. *Biochemistry* **45**, 15168–15178 (2006).
 45. Li, J., Mahajan, A. & Tsai, M. D. Ankyrin repeat: A unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* **45**, 15168–15178 (2006).
 46. Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. & Peng, Z. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* **13**, 1435–1448 (2004).
 47. Pasquali, C. C. *et al.* The origin and evolution of human glutaminases and their atypical C-terminal ankyrin repeats. *J. Biol. Chem.* **292**, 11572–11585 (2017).
 48. De Guzzi Cassago, C. A. *et al.* Glutaminase Affects the Transcriptional Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) via Direct Interaction. *Biochemistry* **57**, 6293–6307 (2018).
 49. Buschdorf, J. P. *et al.* Brain-specific BNIP-2-homology protein Caytaxin relocalises glutaminase to neurite terminals and reduces glutamate levels. *J. Cell Sci.* **119**, 3337–3350 (2006).
 50. Ferreira, A. P. S. *et al.* Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor. *J. Biol. Chem.* **288**, 28009–28020 (2013).
 51. Li, Y. *et al.* Mechanistic basis of glutaminase activation: A key enzyme that promotes glutamine metabolism in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **291**, 20900–20910 (2016).
 52. Stalneck, C. A., Erickson, J. W. & Cerione, R. A. Conformational changes in the activation loop of mitochondrial glutaminase C: A direct fluorescence readout that distinguishes the binding of allosteric inhibitors from activators. *J. Biol. Chem.* **292**, 6095–6107 (2017).
 53. Wang, J. *et al.* Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* **18**, 207–219 (2011).
 54. Redis, R. S. *et al.* Allele-specific reprogramming of cancer metabolism by the long non-coding RNA, CCAT2. *Mol. Cell* **61**, 520–534 (2017).
 55. Lee, K. L., Kuo, Y. C., Ho, Y. S. & Huang, Y. H. Triple-negative breast cancer: Current understanding and future therapeutic breakthrough targeting cancer stemness. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 56. Altman, B. J., Stine, Z. E. & Dang, C. V. From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 619–634 (2016).
 57. Gross, M. I. *et al.* Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 890–901 (2014).
 58. Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2763–2788 (2009).

59. Dong, G. *et al.* PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis (Review). *Oncol. Lett.* **11**, 1980–1986 (2016).
60. Yang, W. & Lu, Z. Nuclear PKM2 regulates the Warburg effect. *Cell Cycle* **12**, 3154–3158 (2013).
61. Wong, N., De Melo, J. & Tang, D. PKM2, a central point of regulation in cancer metabolism. *Int. J. Cell Biol.* **2013**, (2013).
62. Gupta, V. & Bamezai, R. N. K. Human pyruvate kinase M2: A multifunctional protein. *Protein Sci.* **19**, 2031–2044 (2010).
63. Yang, W. & Lu, Z. Pyruvate kinase M2 at a glance. *J. Cell Sci.* **128**, 1655–1660 (2015).
64. Yamada, K. & Noguchi, T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* **337**, 1–11 (1999).
65. Kwon, O. H. *et al.* Pyruvate kinase M2 promotes the growth of gastric cancer cells via regulation of Bcl-xL expression at transcriptional level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 38–44 (2012).
66. Liang, J. *et al.* Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2. *Cell Res.* **27**, 329–351 (2017).
67. Amin, S., Yang, P. & Li, Z. Pyruvate kinase M2: A multifarious enzyme in non-canonical localization to promote cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1871**, 331–341 (2019).
68. Noguchi, T., Inoue, H. & Tanaka, T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **261**, 13807–13812 (1986).
69. Dayton, T. L., Jacks, T. & Vander Heiden, M. G. PKM 2, cancer metabolism, and the road ahead. *EMBO Rep.* **17**, 1721–1730 (2016).
70. Prakasam, G., Iqbal, M. A., Bamezai, R. N. K. & Mazurek, S. Posttranslational modifications of pyruvate kinase M2: Tweaks that benefit cancer. *Front. Oncol.* **8**, 1–12 (2018).
71. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. & Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364–368 (2010).
72. Luo, W. *et al.* Pyruvate Kinase M2 is a PHD3-stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell* **145**, 732–744 (2011).
73. Clower, C. V *et al.* hnRNP The alternative repressor splicing kinase isoform and PTB influence pyruvate and cell metabolism expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1894–1899 (2010).
74. Wang, P., Sun, C., Zhu, T. & Xu, Y. Structural insight into mechanisms for dynamic regulation of PKM2. *Protein Cell* **6**, 275–287 (2015).
75. Stuart, D. I., Levine, M., Muirhead, H. & Stammers, D. K. Crystal structure of cat muscle pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å. *J. Mol. Biol.* **134**, 109–142 (1979).
76. Mazurek, S. Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 969–980 (2011).
77. Li, Z., Yang, P. & Li, Z. The multifaceted regulation and functions of PKM2 in tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1846**, 285–296 (2014).
78. Iqbal, M. A. *et al.* Insulin enhances metabolic capacities of cancer cells by dual regulation of glycolytic enzyme pyruvate kinase M2. *Mol. Cancer* **12**, 1–12 (2013).
79. Yang, W. Structural basis of PKM2 regulation. *Protein Cell* **6**, 238–240

- (2015).
80. Jurica, M. S. *et al.* The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* **6**, 195–210 (1998).
 81. Dombrauckas, J. D., Santarsiero, B. D. & Mesecar, A. D. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry* **44**, 9417–9429 (2005).
 82. Hitosugi, T. *et al.* Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the warburg effect and tumor growth. *Sci. Signal.* **2**, (2009).
 83. Mohammad, G. H. *et al.* Targeting Pyruvate Kinase M2 and Lactate Dehydrogenase A Is an Effective Combination Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, 1372 (2019).
 84. Wong, N. *et al.* Changes in PKM2 associate with prostate cancer progression. *Cancer Invest.* **32**, 330–338 (2014).
 85. Morgan, H. P. *et al.* M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5881–5886 (2013).
 86. Macpherson, J. A. *et al.* Functional cross-talk between allosteric effects of activating and inhibiting ligands underlies PKM2 regulation. *Elife* **8**, (2019).
 87. Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F. & Eigenbrodt, E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 300–308 (2005).
 88. Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S. A. . & Freire, E. in *Protein-Protein Interactions* (eds. Meyerkord, C. L. & Hain, F.) 612 (Springer New York, 2015).
 89. Chaneton, B. *et al.* Biochemical and biophysical characterization of pyruvate kinase M2 activation by L-serine. *Cancer Metab.* **2**, 2014 (2014).
 90. Chaneton, B. & Gottlieb, E. Rocking cell metabolism: Revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 309–316 (2012).
 91. Guan, M. *et al.* Lapatinib inhibits breast cancer cell proliferation by influencing PKM2 expression. *Technol. Cancer Res. Treat.* **17**, 1–12 (2018).
 92. Lu, Y. *et al.* Estrogen activates pyruvate kinase M2 and increases the growth of TSC2-deficient cells. *PLoS One* **15**, 1–20 (2020).
 93. Lin, Y. *et al.* High expression of pyruvate kinase M2 is associated with chemosensitivity to epirubicin and 5-fluorouracil in breast cancer. *J. Cancer* **6**, 1130–1139 (2015).
 94. Hamabe, A. *et al.* Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15526–15531 (2014).
 95. Tamada, M. *et al.* Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res.* **72**, 1438–1448 (2012).
 96. Qi, H. *et al.* Succinylation-dependent mitochondrial translocation of PKM2 promotes cell survival in response to nutritional stress. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
 97. Stammers, D. & Muirhead, H. hree-dimensional Structure of Cat Muscle Pyruvate K at 6 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **95**, 213–225 (1975).
 98. Macintyre, A. N. & Rathmell, J. C. PKM2 and the Tricky Balance of Growth and Energy in Cancer. *Mol. Cell* **42**, 713–714 (2011).
 99. He, X. *et al.* PKM2 in carcinogenesis and oncotherapy. *Oncotarget* **8**,

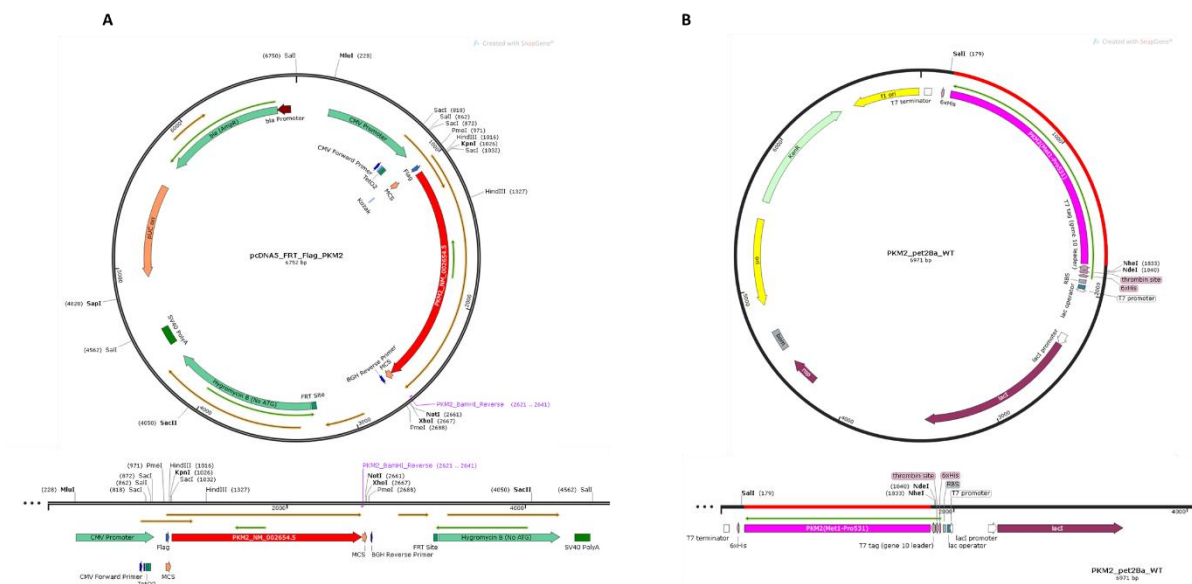
- 110656–110670 (2017).
100. Wu, H. *et al.* Overexpression of PKM2 promotes mitochondrial fusion through attenuated p53 stability. *Oncotarget* **7**, 78069–78082 (2016).
 101. Keller, K. E., Doctor, Z. M., Dwyer, Z. W. & Lee, Y. SAICAR Induces Protein Kinase Activity of PKM2 that Is Necessary for Sustained Proliferative Signaling of Cancer Cells. *Mol. Cell* **53**, 700–709 (2014).
 102. Anastasiou, D. *et al.* Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 839–847 (2012).
 103. Lu, W. Q., Hu, Y. Y., Lin, X. P. & Fan, W. Knockdown of PKM2 and GLS1 expression can significantly reverse oxaliplatin-resistance in colorectal cancer cells. *Oncotarget* **8**, 44171–44185 (2017).
 104. Kitayama, K. *et al.* Pyruvate kinase isozyme M2 and glutaminase might be promising molecular targets for the treatment of gastric cancer. *Cancer Sci.* **108**, 2462–2469 (2017).
 105. Kenny, J. *et al.* Bacterial expression, purification, and characterization of rat kidney-type mitochondrial glutaminase. *Protein Expr. Purif.* **31**, 140–148 (2003).
 106. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. **8**, (Wiley-VCH, 2001).
 107. Alberts, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. (Artmed).
 108. Harvard. Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). 1 (2017).
 109. Sahin, E. & Roberts, C. J. in *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* (eds. Voynov, V. & Caravella, J. A.) 499 (Humana Press, 2012).
 110. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 111. Gullberg, M. & Andersson, A.-C. Visualization and quantification of protein-protein interactions in cells and tissues. *Nat. Methods* **7**, v–vi (2010).
 112. Leuchowius, K. J. *et al.* High content screening for inhibitors of protein interactions and post-translational modifications in primary cells by proximity ligation. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 178–183 (2010).
 113. Trifilieff, P. *et al.* Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* **51**, 111–118 (2011).
 114. Ramachandran, S. *et al.* Structural basis for exploring the allosteric inhibition of human kidney type glutaminase. *Oncotarget* **7**, 17–19 (2016).
 115. Lin, Y. *et al.* Both high expression of pyruvate kinase M2 and vascular endothelial growth factor-C predicts poorer prognosis in human breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 8028–8037 (2015).
 116. Aslam S, M. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr. Protoc. Immunol.* **123**, 139–148 (2018).
 117. Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 325–37 (2011).
 118. Antonyak, M. A., Wilson, K. F. & Cerione, R. A. R(h)oads to microvesicles. *Small GTPases* **3**, 219–224 (2012).
 119. Márquez, J., López de la Oliva, A. R., Matés, J. M., Segura, J. A. & Alonso, F. J. Glutaminase: A multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochem. Int.* **48**, 465–471 (2006).

120. Turner, A. & McGivan, J. D. Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *Biochem. J.* **370**, 403–408 (2003).
121. Lau, A. N. *et al.* PKM2 is not required for colon cancer initiated by APC loss. *Cancer Metab.* **5**, 1–7 (2017).
122. Dayton, T. L. *et al.* Isoform-specific deletion of PKM2 constrains tumor initiation in a mouse model of soft tissue sarcoma. *Cancer Metab.* **6**, 10–15 (2018).
123. Gui, D. Y., Lewis, C. A. & Vander Heiden, M. G. Allosteric regulation of PKM2 allows cellular adaptation to different physiological states. *Sci. Signal.* **6**, 1–5 (2013).
124. Zhang, Z. *et al.* PKM2, function and expression and regulation. *Cell Biosci.* **9**, 1–25 (2019).
125. Israelsen, W. J. & Vander Heiden, M. G. Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **43**, 43–51 (2015).
126. Ferreira, A. P. S. *et al.* Active Glutaminase C Self-assembles into a Supratetrameric Oligomer That Can Be Disrupted by an Allosteric Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **288**, 28009–28020 (2013).
127. Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* **22**, 3486–3492 (2003).
128. Pierre, S. & Scholich, K. Toponomics: Studying protein-protein interactions and protein networks in intact tissue. *Mol. Biosyst.* **6**, 641–647 (2010).
129. Chen, J., Sawyer, N. & Regan, L. Protein-protein interactions: General trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area. *Protein Sci.* **22**, 510–515 (2013).
130. Belisario, D. C. *et al.* Hypoxia Dictates Metabolic Rewiring of Tumors: Implications for Chemoresistance. *Cells* **9**, 1–29 (2020).
131. Eales, K. L., Hollinshead, K. E. R. & Tennant, D. A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* **5**, e190–e190 (2016).
132. Gao, X., Wang, H., Jenny, Y. J., Liu, X. & Liu, Z. Pyruvate Kinase M2 Regulates Gene Transcription by Acting as A Protein Kinase Xueliang. *Mol. Cell* **45**, 598–609 (2012).
133. Li, L. *et al.* Pyruvate Kinase M2 Coordinates Metabolism Switch between Glycolysis and Glutaminolysis in Cancer Cells. *iScience* **23**, 101684 (2020).

8 Anexos

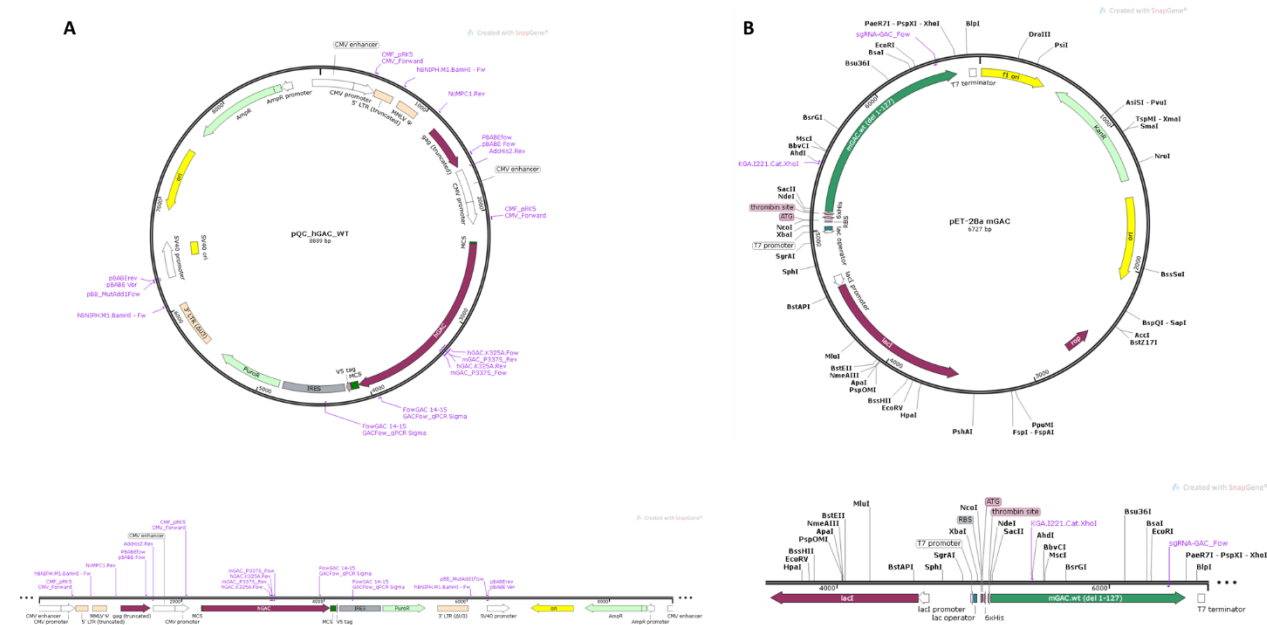
Anexo I. Mapa dos vetores utilizados.

1. Vetores pet28a(+) e pcDNA5 com o inserto PKM2.



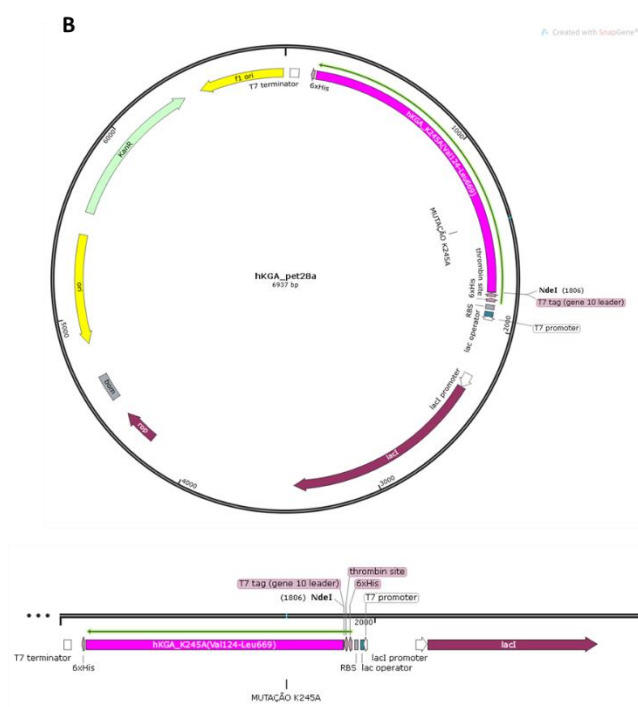
Plasmídeo circular emapa horizontal mostrando Flag presente na porção N-terminal de PKM2 em vetor pcDNA5 (A) e em vetor pet28a(+) com inserção de his-tag (B).

2. Vetores pet28a(+) e pQC com inserto de GAC.



Plasmídeo circular e horizontal mostrando V5 presente na porção N-terminal de GAC em vetor pQC (A) e (B) pet28a(+) com inserção de his-tag.

3. Vetores pet28a(+) e pQC com inserto de KGA.



MUTACAO K245A

Anexo II. Artigo Científico

“Glutaminase Affects the Transcriptional Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) via Direct Interaction.”

Glutaminase Affects the Transcriptional Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) via Direct Interaction

Carolina Aparecida de Guzzi Cassago,[†] Marília Meira Dias,[†] Matheus Pinto Pinheiro,[†] Camila Cristina Pasquali,[†] Alliny Cristiny Silva Bastos,^{†,‡} Zeyaul Islam,^{†,||} Sílvia Roberto Consonni,[§] Juliana Ferreira de Oliveira,[†] Emerson Machi Gomes,^{†,‡} Caroline Fernanda Rodrigues Ascensão,^{†,‡} Rodrigo Honorato,[†] Bianca Alves Pauletti,[†] Nathalia de Carvalho Indolfo,[†] Helder Veras Ribeiro Filho,[†] Paulo Sergio Lopes de Oliveira,[†] Ana Carolina Migliorini Figueira,[†] Adriana Franco Paes Leme,[†] Andre Luis Berteli Ambrosio,^{*,†,‡,#} and Sandra Martha Gomes Dias^{*,†,§}

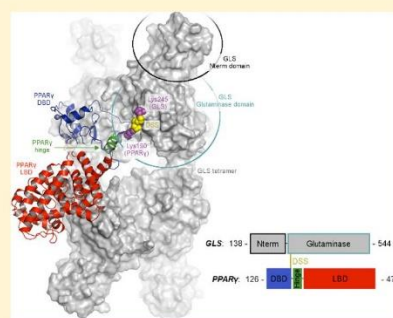
[†]Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Sao Paulo 13083-970, Brazil

[‡]Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo 13083-970, Brazil

[§]Department of Biochemistry and Tissue Biology, University of Campinas, Campinas, Sao Paulo 13083-872, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: Phosphate-activated glutaminases catalyze the deamidation of glutamine to glutamate and play key roles in several physiological and pathological processes. In humans, GLS encodes two multidomain splicing isoforms: KGA and GAC. In both isoforms, the canonical glutaminase domain is flanked by an N-terminal region that is folded into an EF-hand-like four-helix bundle. However, the splicing event replaces a well-structured three-repeat ankyrin domain in KGA with a shorter, unordered C-terminal stretch in GAC. The multidomain architecture, which contains putative protein–protein binding motifs, has led to speculation that glutaminases are involved in cellular processes other than glutamine metabolism; in fact, some proteins have been identified as binding partners of KGA and the isoforms of its paralogue gene, GLS2. Here, a yeast two-hybrid assay identified nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) as a new binding partner of the glutaminase. We show that KGA and GAC directly bind PPAR γ with a low-micromolar dissociation constant; the interaction involves the N-terminal and catalytic domains of glutaminases as well as the ligand-binding domain of the nuclear receptor. The interaction occurs within the nucleus, and by sequestering PPAR γ from its responsive element DR1, the glutaminases decreased nuclear receptor activity as assessed by a luciferase reporter assay. Altogether, our findings reveal an unexpected glutaminase-binding partner and, for the first time, directly link mitochondrial glutaminases to an unanticipated role in gene regulation.



Glutaminases (GLSs) catalyze hydrolytic deamidation of glutamine to generate glutamate and ammonia.¹ In mammals, GLS requires inorganic phosphate for full activation and fulfills a key role in a pleiotropy of physiological processes, such as hepatic ureagenesis, renal ammoniogenesis, and production of the neurotransmitter glutamate in the brain.² Glutaminase also initiates glutamine catabolism, which is critical for bioenergetic processes.³ Several studies have shown that increased glutamine metabolism is highly important to supporting the high rate of proliferation and survival of cancer cells. In that regard, glutamine catabolism provides pools of TCA cycle intermediates and supports the biosynthesis of proteins, lipids, and nucleotides and is an already-proven target for slowing cancer development, with mitochondrial glutaminases being a central player in this process.^{4,5}

In humans, two genes on different chromosomes encode glutaminase isoforms. The *GLS* gene is on chromosome 2 and encodes the kidney-type isozyme; the *GLS2* gene is in the second locus located on chromosome 12 and encodes the liver-type isozyme. The human kidney-type genomic sequence is divided into 19 exons.⁶ At least two different transcripts are produced from this gene: KGA mRNA, formed by exons 1–14 and 16–19, and the alternatively spliced transcript GAC mRNA, which uses only the first 15 exons, excluding exons 16–19.^{6,7} The human liver-type gene, on the other hand, has

Received: July 19, 2018

Revised: October 1, 2018

Published: October 8, 2018

18 exons⁸ and is the origin of the LGA and GAB isoforms through the use of different transcription initiation sites.⁹

While located on different chromosomes, the *GLS* and *GLS2* genes share a high degree of sequence similarity, with the main differences being located at exons 1 and 18. The sequences of exon 1 of both genes are 62.5% similar and contain the information involved in mitochondrial targeting and translocation processes. Similarly, exon 18, which encodes the C-terminal region of both proteins, displays the lowest level of sequence similarity (29.4%). Both KGA and LGA have ankyrin repeat sequences at their C-termini,¹⁰ which are well-known to be implicated in protein–protein contact,¹¹ as well as LXXLL [or nuclear receptor box (NRbox)] motifs at their N-termini, a signature sequence that enables the interaction of different proteins with nuclear receptors.¹²

The *GLS2* C-terminus is involved in recognition of PDZ (PSD95/Dlg/ZO1 domain) interaction sequences.¹³ Binding of LGA/GAB to Rac1 also requires the protein C-terminus, although the exact binding region has not been delineated.¹⁴ KGA, on the other hand, is a binding partner of BNIP-2 homology (BNIP-H) in the brain.¹⁵ BNIP-H overexpression in rat pheochromocytoma PC12 cells relocalized KGA from the mitochondria to neurite terminals, inhibiting KGA activity and reducing the level of the neurotransmitter glutamate.¹⁵ Bmcc1s is a brain-enriched short isoform of the BCH domain-containing molecule Bmcc1 and a binding partner of KGA, controlling the trafficking of KGA to the mitochondria.¹⁶

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors that belong to the nuclear hormone receptor superfamily. The γ isotype (PPAR γ) is a well-known regulator of several processes, such as glucose metabolism, adipocyte differentiation, and fatty acid storage; thus, it is considered a target for antidiabetic drugs.¹⁷ PPAR γ enhances the expression of proteins involved in lipid and glucose metabolism.¹⁸ In terms of structure, PPARs possess the canonical domains common to other nuclear receptor family members. This includes an AF-1 transactivation domain, located at the amino terminus, followed by a DNA-binding domain (DBD) and a dimerization and ligand-binding domain (LBD). The LBD, which is connected to the DBD by a long helix commonly termed a “hinge”, also has a ligand-dependent transactivation function AF-2 region present at the C-terminus. PPAR γ , as well as other nuclear receptors, uses the ligand-binding domain to bind to co-activators via the NRbox motif (LXXLL, where X is any amino acid) to enhance the transcription of target genes.¹⁹

Here, we used a yeast-two hybrid screening (Y2H) technique to detect new binding partners of KGA and assess potential extraglutaminolytic roles of KGA. The Y2H assay revealed that PPAR γ is an interacting partner of KGA. Fluorescence anisotropy confirmed direct contact between the proteins and unsurprisingly showed that GAC also binds the nuclear receptor. Further research identified the N-terminus and catalytic domains of the glutaminases and the ligand-binding domain of PPAR γ as being key for the interaction. The interface was identified by combining chemical cross-linking of the complex with subsequent proteolytic digestion and mass spectrometry, followed by site-directed mutagenesis. Accordingly, a molecular model is proposed. The glutaminase isoforms and PPAR γ co-localized in the nucleus and decreased the level of binding of PPAR γ to DNA responsive element 1 (DR1); hence, a negative influence on PPAR γ activity was observed in a reporter gene assay. Our

findings led to the proposal of a previously unforeseen role of glutaminase in transcription gene control via PPAR γ .

MATERIALS AND METHODS

Yeast Two-Hybrid Assay. Human full-length KGA (KGA-FL, Met1–Ly669) and subconstructs (N-terminus, M1–V220; N-terminus and Glut, Met1–Arg550; Glut, I221–R550; Glut and C-terminus, I221–K669; C-terminus, V551–K669) were amplified from a pcDNA3.1.hKGA-V5 construct (kindly provided by R. Cerione, Cornell University, Ithaca, NY), cloned into a pBTM116 KQ vector, and expressly linked to the C-terminus of the LexA DNA-binding domain peptide. An empty vector was used as a negative control (pBTM116 KQ.empty). Full-length PPAR γ (PPAR γ -FL) and subclones (N-terminus, M1–V80; N-terminus and DBD, M1–P206; DBD, E81–P206; DBD and LBD, E81–Y477; LBD, E207–Y477) were cloned into a pACT2 vector and fused with the GAL4 activation domain (AD) (Matchmaker System, Clontech). *Saccharomyces cerevisiae* strain L40 [Trp1-901, His3 Δ 200, Leu2-3, ade2 LYS2::(*lexAop*)4-HIS3 URA3::(*lexAop*)8-lac GAL4], which contains the heterologous reporter genes HIS3 and LacZ, was used in the assays. Yeast two-hybrid screening was performed against the HeLa cDNA library, with the bait cloned into a pACT vector. The autonomous activation of the HIS3 gene was tested by co-transformation of yeast cells with pBTM116 KQ-KGA full-length (pBTM.KGA-FL) and empty pACT2 as the control (pACT.empty) and, vice versa, grown in minimal medium plates without tryptophan, leucine, or histidine and with 5 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), a competitive inhibitor of imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (His3p). β -Galactosidase activity was measured by performing a filter assay. For this, yeast transformant colonies were transferred onto nylon membranes, permeabilized in liquid nitrogen, and placed on Whatman 3MM paper previously soaked in a 60 mM Na₂HPO₄/40 mM NaH₂PO₄/10 mM MgCl₂/50 mM 2-mercaptoethanol (pH 7.0) solution containing 1 mg mL⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal). For the screening assay, positive colonies were detected by the formation of dark blue coloration, and the plasmid from these colonies was extracted and sequenced. The strength of the interaction between the KGA and PPAR γ subclones was qualitatively estimated on the basis of the growth of the colonies after incubation with 3-AT at increasing doses in histidine-depleted medium.

Recombinant Protein Expression and Purification. The human KGA V124–L669 construct (KGA) was amplified from pcDNA3.1.hKGA-V5 and subcloned into a pET28a plasmid (Novagen), which expresses an N-terminal six-His tag. The GAC M128–S603 construct (GAC) was amplified from a mouse fetal brain tissue cDNA library and cloned into a pET28a plasmid, as previously described.²⁰ The V124–R550 construct (Nt+Glut) was generated from the pET28a KGA V124–L669 construct via site-directed mutagenesis of the Val551 residue into a stop codon (TAA) using a QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). The human PPAR γ (isoform 1) M1–Y477 construct was cloned into pcDNAFlag, and the RXR α M127–T462 construct (RXR α) cloned into pET28a. PPAR γ C111–Y477 (PPAR γ) and M185–Y477 (hinge-LBD, herein termed hLBD) were subcloned into the pET28a plasmid. Proteins were transformed into *Escherichia coli* thermo-competent cells (BL21-DE3 for GLS and Rosetta-2 for PPAR γ and RXR α

constructs) (Novagen). Transformed bacterial cells were cultured in LB medium in the presence of the appropriate antibiotic in an incubator shaker at 200 rpm and 37 °C. Overnight cultures were used to inoculate 5 L of fresh LB medium supplemented with the antibiotics in a ratio of 1:100 and left shaking at 200 rpm and 37 °C until an OD₆₀₀ (optical density) of 0.6 was reached. The cultures were then cooled to 18 °C (for GLS constructs) and 22 °C (for PPAR γ and RXR α constructs) for 1 h before induction with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 200 nM for GLS and 500 nM for PPAR γ and RXR α induction) for 16 h. For PPAR γ and RXR α constructs, 10 μ M zinc sulfate was added to the culture during protein expression. Cells were collected by centrifugation and resuspended in a 500 mM NaCl/10% glycerol/2 mM β -mercaptoethanol (BME)/1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) solution buffered with 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) for PPAR γ /RXR α and GLS constructs, respectively. Cell lysis was performed by incubation on ice with hen egg white lysozyme, DNase I, and deoxycholate (all three reagents from Sigma-Aldrich) for 1 h. The lysate was sonicated (30 times with 10 s pulses, on a SONICS VCX 500 instrument) and clarified by centrifugation (39000g for 1 h), and the supernatant was loaded into a Talon Metal Affinity Resin column (Clontech) previously equilibrated with purification buffer [10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5 or 7.5), and 2 mM BME]. The columns were washed with wash buffer [20 mM imidazole, 10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5 or 7.5), and 2 mM BME]. The recombinant proteins tagged with a polyhistidine tag were eluted with elution buffer [250 mM imidazole, 10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5 or 7.5), and 2 mM BME]. The affinity chromatography step was performed at 4 °C. The polyhistidine tag was subsequently removed by overnight incubation with bovine thrombin (Sigma-Aldrich), and the digested samples were loaded into a HiTrap Q (or SP, for PPAR γ and RXR α constructs) ion exchange chromatography column (GE Healthcare). Elution was achieved with a linear gradient of a 1 M NaCl/50 mM Tris-HCl (pH 8.5 or 7.5)/2 mM BME solution. The fractions containing the proteins of interest were loaded into a HiLoad 16/600 Superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated with 500 mM NaCl, 30 mM HEPES (pH 8), and 0.5 mM tris(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP). To produce the PPAR γ -RXR α complex at an equimolar ratio, purified PPAR γ DBD-LBD and RXR α DBD-LBD constructs were concentrated to 25 mg/mL each, and the samples were then combined in a 1:1 molar ratio and incubated for 1 h at 4 °C. The heterodimeric complex was purified on a Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) gel filtration column equilibrated with 150 mM NaCl, 30 mM HEPES (pH 8), and 0.5 mM TCEP. The protein concentration was determined by measuring the ultraviolet (UV) 280 nm absorbance and using calculated extinction coefficients.

Fluorescence Anisotropy Assay. Purified GLS constructs (GAC and KGA) were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Thermo Scientific) by mixing 1 mg of protein with a 20-fold molar excess of FITC in 50 mM borate buffer (pH 8.5) for 1 h at room temperature in the dark. The excess FITC was removed by size exclusion chromatography in a HiLoad 16/600 Superdex 200 column with a 150 mM NaCl/30 mM Tris (pH 7.5)/0.5 mM TCEP solution. Unlabeled PPAR γ constructs were serially diluted in a 1:2 ratio into a 150 mM NaCl/30 mM Tris (pH 7.5)/0.5 mM TCEP buffer solution to

reach the desired range. The GLS-FITC constructs were used at a final concentration of 5 nM. Protein solutions were incubated in triplicate in a 384-well black-walled microplate (Greiner Bio-One) at room temperature for 24 h in the dark. The obtained mean (subtracted from the background) and standard deviation experimental values were plotted and fitted with a logistic sigmoidal curve. The calculated inflection point (X_0) was taken as the dissociation constant (K_d). FITC-DNA fluorescence anisotropy was assessed as follows. A serial dilution of the PPAR γ -RXR α heterodimer (from 2 to 0 μ M) was performed in a dilution solution [20 mM HEPES (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 4 mM MgCl₂, and 2 mM DTT] and incubated with 10 nM labeled DR1 DNA (5'-FITC-AGCTTAGGTCACAGGTCAGAG-3', IDT), at 4 °C, in a total reaction volume of 50 μ L in a 384-well black-walled microplate (Greiner Bio-One). The binding curve for binding of the PPAR γ -RXR α heterodimer to DR1 DNA was used to select the dimer concentration that led to DNA binding saturation (5 times above the determined K_d of PPAR γ -RXR α :DR1 binding). GAC or KGA was serially diluted (from 30 to 0.23 μ M) in dilution buffer and incubated with 100 nM PPAR γ -RXR α heterodimer, at 4 °C for 30 min. After incubation, 10 nM labeled DR1 DNA was added to each well and the plate read after 10 min. Fluorescence polarization (FP) was measured in a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech) with excitation and emission wavelengths of 480 and 520 nm, respectively. Data management and analysis were performed using Origin 2018. Anisotropy data were fitted using a logistic sigmoidal model function to construct the binding curves, and the dissociation constants (K_d) were calculated from these curves. Likewise, the half-maximal effective concentration (EC_{50}) of glutaminases that disrupted the PPAR γ -RXR α :DR1 complex were calculated from a logistic sigmoidal model function by fixing the lower asymptote parameter at 0% (assuming complete disruption to PPAR γ -RXR α and DR1).

MicroScale Thermophoresis (MST). Purified GAC was labeled with FITC (Thermo Scientific) by mixing 1 mg of protein with a 20-fold molar excess of FITC in 50 mM borate buffer (pH 8.5) at room temperature for 1 h in the dark. The excess of FITC was removed by overnight dialysis at 4 °C with 30 mM HEPES (pH 8). Unlabeled hLBD, initially at a concentration of 250 μ M in a buffer containing 30 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween 20, and 0.5 mM TCEP, was serially diluted 1:2 (11 times) in the same buffer, and 25 nM FITC-GAC was added to each dilution. After a short period of incubation, the samples were loaded into MST standard glass capillaries and the MST analysis was performed using a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper), in triplicate.

Agarose Native Gel. The formation of the KGA-PPAR γ complex was analyzed by agarose gel electrophoresis under native conditions. To that end, 100 pmol of KGA was incubated with increasing amounts of PPAR γ (300, 500, and 700 pmol) in a solution containing 30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.5 mM TCEP in 15 μ L for 24 h at 4 °C. The same assay was performed by fixing the amount of PPAR γ at 100 pmol and adding increasing amounts (300, 500, and 700 pmol) of KGA. After the incubation time, a native electrophoresis sample solution [4 $\times$ Bis-Tris solution (Life Technology), 40% glycerol, and 0.1% bromophenol blue] was added and the same applied to a 1.5% agarose gel prepared in a 1 $\times$ Bis-Tris solution (pH 7.5) (Life Technology). The gel

was subjected to a tension of 6 V/cm for 10 min and 3 V/cm for 100 min at 4 °C and subsequently stained with Coomassie brilliant blue.

Pull Down with Cell Lysate. PC3 cells were cultivated in RPMI medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Vitrocell) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ until the confluency reached 80–90% on a 150 mm plate. Cells were lysed in 25 mM HEPES (pH 8), 150 mM NaCl, 0.01% NP-40, and a 5% glycerol solution supplemented with protease inhibitors. After lysis, the total protein mass was quantified by the Bradford method following the manufacturer's specifications (Bio-Rad) and with bovine serum albumin (BSA) as the standard protein. For the pull down, 200 pmol of His-KGA was incubated with 30 μ L of TALON resin (Clontech) equilibrated with a solution containing either 500 μ M rosiglitazone, 500 μ M GW9662, or 50 mM H₂KPO₄. After the resin had been washed to remove excess KGA, 400 μ g of cell lysate containing the respective ligands was added. Incubation proceeded for 18 h at 4 °C while the sample was being slowly stirred. The resin was washed three times, the loading buffer added, and the resin boiled. After sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) separation, the samples were subjected to Western blotting as described above. The membrane was stained with a Coomassie brilliant blue solution for loading control.

Cross-Linking, Mass Spectrometry, and Docking. KGA and PPAR γ were purified by gel filtration in a 150 mM NaCl/50 mM HEPES (pH 7.5)/2 mM dithiothreitol (DTT) solution. KGA (7.5 μ M) and PPAR γ (9 μ M) were incubated with 2.5 mM disuccinimidyl suberate (DSS) for 20 min at room temperature. The reaction was terminated by adding 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and the SDS–PAGE loading solution [60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 0.005% bromophenol blue, 10% glycerol, and 5% BME], followed by incubation at 95 °C for 10 min. Samples were analyzed by SDS–PAGE 10% stained with Coomassie brilliant blue. The higher-molecular weight band was removed, and the KGA–PPAR γ complexes were reduced (5 mM dithiothreitol for 25 min at 56 °C), alkylated (14 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark), and digested with trypsin (Promega). The samples were lyophilized with a vacuum concentrator and reconstituted in 0.1% formic acid. Four and one-half micrograms of the resulting peptides was analyzed on an LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) via liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) with an EASY-nLC system (Thermo Fisher Scientific) through a Proxeon nanoelectrospray ion source. Peptides were separated with a 2 to 90% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid using an EASY-Column precolumn [2 cm $\times$ 100 μ m (inside diameter), 5 μ m particle size] and a PicoFrit analytical column [20 cm $\times$ 75 μ m (inside diameter), 5 μ m particle size, New Objective] at a flow rate of 300 nL/min over 65 min. The nanoelectrospray voltage was set to 2.2 kV, and the source temperature was 275 °C. The instrument methods in the LTQ Velos Orbitrap were set up in the data-dependent acquisition mode of HCD fragmentation. The full scan mass spectra (m/z 300–1600) were acquired with the Orbitrap analyzer after accumulation to a target value of 1×10^6 . The resolution in the Orbitrap system was set to 60000, and the five most intense peptide ions with charge states of ≥ 2 were sequentially isolated to a target value of 50000 and fragmented in HCD with a normalized collision

energy of 40% with the resolution in the Orbitrap system set to 7500 for MS/MS. The signal threshold for triggering an MS/MS event was set to 80000 counts, and an activation time of 0.1 ms was used. Dynamic exclusion was enabled with an exclusion size list of 400, an exclusion duration of 60 s, and a repeat count of 2. For cross-linking analysis, the raw data files generated by Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific) were converted to a peak list format (mgf) using Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific). The mgf files were analyzed with MassMatrix software (www.massmatrix.net) to automatically search for chemical cross-links against a database containing the KGA amino acid sequences. The parameters for cross-linking analysis were carbamidomethylation (+57.021460 Da) as a fixed modification, oxidation of methionine (+15.99491 Da) as variable modifications, chemically cross-linked with disuccinimidyl suberate-DSS (138.06808 Da) noncleavable by enzymes, four trypsin missed cleavages, and a tolerance of 10 ppm for precursor and 0.02 Da for fragment ions. The potentially cross-linked peptide was manually validated. This experiment was independently performed twice. To obtain a model for the KGA–PPAR γ interaction, we applied a previously developed rigid-body docking algorithm restrained by experimental DSS cross-linking data.²¹ Using the intermonomer linkages that were obtained with the mass spectrometry assay, we selected a decoy that was in the lowest-energy range and within 11.4 Å of the lysine pair distance.

Immunoprecipitation and Identification of Binding Partners by Nanoflow nLC–MS/MS. Flag-PPAR γ was transiently expressed in HEK 293T cells transfected with the pLVIG.FLAG-PPAR γ (vector was kindly provided by M. Chaim, LNBio/CNPq/Brazil) construct grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. GAC-V5 was stably expressed in MDA-MB-231 cells transfected with pcDNA3.1.hGAC-V5²⁰ and grown in RPMI medium with 10% FBS. Nontransfected HEK293T cells were used as a control in the immunoprecipitation assay. MDA-MB-231 cells stably expressing GAC-V5 were immunoprecipitated with IgG as a control of unspecific binding. HEK293T (control and expressing Flag-PPAR γ) and MDA-MB-231 cells (expressing GAC-V5) were lysed with a 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)/150 mM NaCl/1 mM EDTA/1% Triton X-100 solution. The HEK293T protein extract was incubated with an anti-Flag M2 affinity gel (Sigma-Aldrich), and immunoprecipitation was performed by following the manufacturer's instructions. The MDA-MB-231 protein extract was incubated with protein A/G agarose (Thermo Scientific) previously cross-linked with anti-V5 (R96025, Life Technologies) or IgG (Rhea Biotech) with a Pierce cross-link immunoprecipitation kit (Thermo Scientific). Beads in both assays were extensively washed with 1 $\times$ PBS before elution. HEK293T and MDA-MB-231 samples were eluted using a molar excess of Flag and V5 peptides, respectively. A Western blot was performed using anti-PPAR γ (C26H12, Cell Signaling Technology) or anti-V5 (R96025, Life Technologies) to check for immunoprecipitation. Eluted fractions were resolved by SDS–PAGE and silver-stained following a modified protocol.²² The bands were removed from the gel, followed by protein reduction with dithiothreitol (10 mM for 30 min at 56 °C), alkylation with iodoacetamide (50 mM for 30 min at room temperature in the dark), and trypsin digestion for 16 h at 37 °C as described by Shevchenko et al.²² with modifications. The peptides derived

from the trypsin-digested samples were desalted with stage-tips,²³ dried in a vacuum concentrator, and reconstituted in 0.1% formic acid. An aliquot of 4.5 μ L was analyzed on an ETD-enabled Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) connected to the EASY-nLC system (Proxeon Biosystem, West Palm Beach, FL) through a Proxeon nanoelectrospray ion source. Peptides were separated with a 2 to 30% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid using an analytical PicoFrit column [20 cm $\times$ 75 μ m (inside diameter), 5 μ m particle size, New Objective] at a flow rate of 300 nL/min over 12 min (HEK293T control and HEK293T Flag-PPAR γ samples) and 30 min (GAC-V5 S0, S7, and 62 kDa samples). The nanoelectrospray voltage was set to 2.2 kV, and the source temperature was 275 $^{\circ}$ C. All instrument methods were set up in the data-dependent acquisition mode. The full scan MS spectra (m/z 300–1600) were acquired in the Orbitrap analyzer after accumulation to a target value of 1×10^6 . The resolution in the Orbitrap was set to 60000, and the 20 most intense peptide ions with charge states of ≥ 2 were sequentially isolated to a target value of 5000 and fragmented in the linear ion trap using low-energy CID (normalized collision energy of 35%). The signal threshold for triggering an MS/MS event was set to 1000 counts. Dynamic exclusion was enabled with an exclusion size list of 500, an exclusion duration of 60 s, and a repeat count of 1. An activation q of 0.25 and an activation time of 10 ms were used.²⁴ With respect to raw LC-MS/MS data analysis, peak lists (msf) were generated from the raw data files using Proteome Discoverer version 1.4 (Thermo Fisher Scientific) with the Sequest search engine and searched against Human Uniprot (91974 sequences; 36693332 residues; release March 2016) with carbamidomethylation (+57.021 Da) as the fixed modification, oxidation of methionine (+15.995 Da) as the variable modification, two trypsin missed cleavages, and a tolerance of 10 ppm for precursor and 1 Da for fragment ions. For protein identification, protein grouping and the strict parsimony principle were enabled, leucine and isoleucine were considered equal, and only peptides passing 1% FDR were considered.²⁵

Site-Directed Mutagenesis. To generate the ¹⁰LRDAA¹⁴ GLS double mutant, we used a two-stage polymerase chain reaction (PCR) protocol.²⁶ The mutagenic primers were 5'-GGGATGCTGCGGGACGCGGCCCTGCGGTCTCGTCCGCGC-3' and 5'-GGCGGGGCGACCGACCGCAGGGC-CGCGTCCCGCAGCATCCC-3'. Briefly, after an initial three-cycle PCR using only forward or reverse primers, a second PCR cycle was performed using the combined PCR products, after which the samples were treated with DpnI for 60 min at 37 $^{\circ}$ C. Mutated GAC or KGA sequences were generated in the pcDNA clones and then subcloned into pQC-IRES-puromycin using BamHI and PmeI restriction sites.

Co-Immunoprecipitation. In brief, 1.5 μ g of the pQC-PPAR γ -IRES-puromycin (pQC-PPAR γ), pQC-hGAC-V5-IRES-puromycin (pQC-GAC-V5, wild-type and mutant), and pQC-hKGA-V5-IRES-puromycin (pQC-KGA-V5, wild-type and mutant) constructs were transfected into 1.5×10^6 HEK293T or PC3 cells using polyethylenimine (PEI) 40 kDa (Sigma-Aldrich) at a 3:1 ratio of PEI (micrograms) to DNA (micrograms) in a saline solution. After incubation for 6 h with the transfection mix, fresh medium was added and the cells were incubated for 24 h. Cells were rinsed with ice-cold PBS and lysed on ice in 1 mL of lysis buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, and 0.3% CHAPS]. After centrifugation at 11000g for 15 min, the cell

lysates containing 500–1000 μ g of protein were incubated with the anti-PPAR γ antibody (81B8, Cell Signaling Technology) that was previously cross-linked with protein A/G agarose (Sigma-Aldrich) overnight at 4 $^{\circ}$ C under rotation. Immunoprecipitations captured with protein A/G agarose were washed five times with PBS and boiled in 4 $\times$ SDS sample buffer for Western blot analysis. Samples were resolved in 3 to 15% gradient gels by SDS-PAGE, and proteins were transferred to PVDF membranes (Bio-Rad), blocked in 3% nonfat milk, and blotted with the anti-V5 (R96025, Life Technologies), anti-PPAR γ (C26H12, Cell Signaling Technology), anti-vinculin (Abcam ab18058), and anti-GLS (Abcam ab156876) antibodies.

Cell Fractionation. Approximately 5×10^6 PC3 cells were seeded in 150 mm dishes and allowed to adhere overnight. Cells were transfected with 4.5 μ g of pQC-PPAR γ , pQC-hGAC-V5 (wild-type and mutant), or pQC-hKGA-V5 (wild-type and mutant) constructs using PEI 40 kDa (Sigma-Aldrich) at a 3:1 ratio of PEI (micrograms) to DNA (micrograms) in a saline solution. After incubation for 6 h with the transfection mix, fresh medium was added, and the cells were incubated for 24 h. Nuclear and cytoplasmic proteins were isolated with NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic extraction reagents (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. Mitochondria were isolated from 1×10^7 cells using a Qproteome Mitochondria isolation kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Samples were resolved in 3 to 15% gradient gels by SDS-PAGE, and proteins were transferred to PVDF membranes (Bio-Rad), blocked in 3% nonfat milk, and blotted with the anti-V5 (R96025, Life Technologies), anti-PPAR γ (C26H12, Cell Signaling Technology), anti-histone H3 (D1H2, Cell Signaling), anti-COX IV (3E11, Cell Signaling), anti-vinculin (Abcam ab18058), and anti-GLS (Abcam ab156876) antibodies.

Immunofluorescence. Approximately 3×10^3 PC3 cells were seeded in 96-well plates and allowed to adhere overnight. Cells were transfected with 50 ng of the pQC-PPAR γ , pQC-hGAC-V5 (wild-type and mutant), or pQC-hKGA-V5 (wild-type and mutant) constructs using PEI 40 kDa (Sigma-Aldrich) at a 3:1 ratio of PEI (micrograms) to DNA (micrograms) in a saline solution. After incubation for 6 h with the transfection mix, fresh medium was added, and the cells were incubated for 24 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.25% Triton X-100 for 5 min, and then blocked with 5 mg/mL heparin, 5 mg/mL dextran sulfate, and 0.1% Tween 20 in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 30 min. The samples were incubated with the anti-PPAR γ antibody (C26H12, Cell Signaling Technology) for 2 h, and after being extensively washed with PBS, the cells were incubated with a 1:1000 goat anti-rabbit IgG Dylight 488 secondary antibody (Pierce Antibodies) for 1 h. Next, samples were incubated with the anti-V5 mouse antibody (Life Technologies R96025) at room temperature for 2 h, and after extensive washes with PBS, the cells were incubated with the 1:1000 Alexa Fluor 633 goat anti-mouse secondary antibody (Thermo Scientific) for 1 h. All the incubations with antibodies were performed at room temperature. After DNA staining with 300 nM DAPI (Sigma-Aldrich) for 5 min, the cells were kept in PBS, and the samples were examined using a Leica TCS SP8 confocal lens on a Leica DMI6000 microscope or the OperettaTM harmony 2.0 imaging platform (Perkin Elmer). Data collected from Operetta were analyzed with the

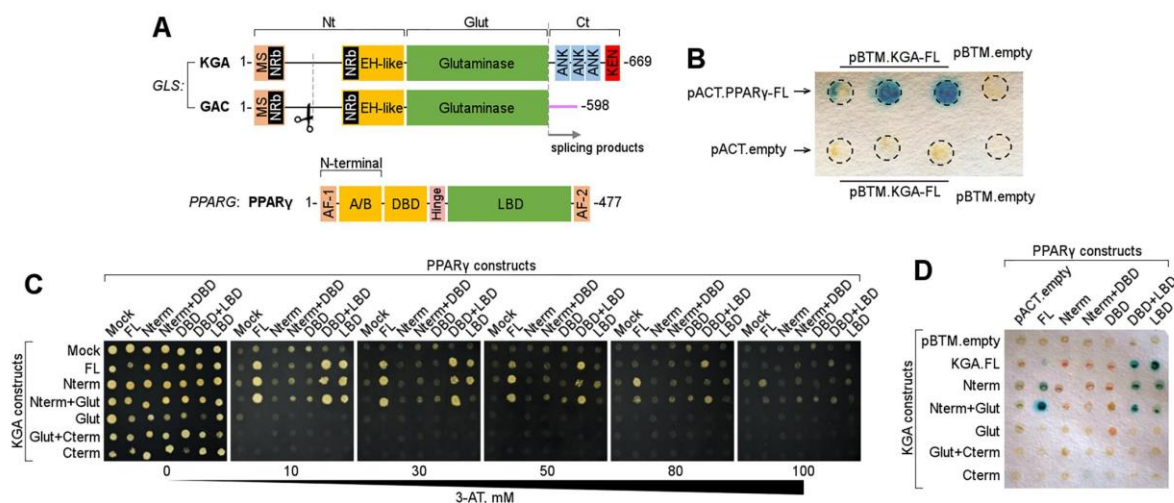


Figure 1. KGA is a binding partner of PPARγ. (A) Organization scheme of the KGA, GAC, and PPARγ protein domains. (B) KGA autoactivation assay showing that KGA does not autoactivate reporter gene expression. (C) The 3-AT increasing dose assay confirms that the glutaminase and PPARγ LBD domains are involved in the interaction and suggests that the hinge may also be important for the interaction. The presented yeast assays are representative of at least three independent assays. (D) The complementation bait–prey assay as evaluated by activation of the reporter gene expressing β -galactosidase (activity revealed by the blue color) showed that the N-terminus of KGA (Nterm) is the minimal unit involved in the contact with the PPARγ ligand-binding domain (see also Figure S1).

software Columbus (PerkinElmer) for nucleus and cytoplasm identification and fluorescence quantification.

Transmission Electron Microscopy. PC3 cells were seeded on a 35 mm Cellview cell culture dish (Greiner Bio-One) and transfected with 1 μ g of pQC-PPARγ, pQC-GAC-V5, or pQC-KGA-V5 using PEI 40 kDa at a 3:1 ratio of PEI (micrograms) to DNA (micrograms). After incubation for 6 h with the transfection mix, fresh medium was added, and the cells were incubated for 24 h. Cells were fixed in a solution containing 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4) for 1 h. Samples were dehydrated in an increasing gradient of ethanol and embedded in LR White resin (Electron Microscopy Sciences). Ultrathin sections (80 nm) were captured on nickel grids. The grids were immersed for 5 min in ultrapure filtered water for hydration and incubated for an additional 5 min with 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4). Nonspecific reactions were blocked with 1% BSA and 0.1 M glycine in 0.1 M Tris-HCl for 40 min. Next, the grids were washed in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) and incubated overnight with rabbit anti-PPARγ (81B8, Cell Signaling Technology) and mouse anti-V5 (R96025, Life Technologies) primary antibodies [1:200 in 0.1% BSA and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)] in a humidified chamber. The next day, grids were washed with 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) and incubated with goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG secondary antibodies [1:30 in 0.1% BSA and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)] coupled with 10 and 15 nm gold particles (Electron Microscopy Sciences, catalogue nos. 25108 and 25132, respectively), respectively, for 1 h. After being washed with 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), the grids were placed on filter paper for drying. Sections were counterstained with 2% uranyl acetate for 2 min and with 2% lead citrate for 20 s. Grids were analyzed using a Zeiss LEO 906 transmission electron microscope (University of Campinas).

Luciferase Assay. Approximately 5×10^3 cells were plated in 96-well plates and allowed to adhere overnight. Then, cells

were co-transfected with 1 ng of pGL4.75 (firefly luciferase plasmid), 74 ng of pGL4.27_3xDR1 (*Renilla* luciferase vector), and 50 ng of pQC-KGA or pQC-GAC for 6 h using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. After that, cells were incubated for an additional 24 h with fresh medium containing 200 nM rosiglitazone (Sigma-Aldrich) or dimethyl sulfoxide (DMSO). When indicated, increasing amounts of pQC-KGA or pQC-GAC were used (50, 75, or 100 ng). Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined with a Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) following the manufacturer's protocol, and firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity.

Gel Shift. The purified PPARγ–RXRα heterodimeric complex (12.5 μ M) was mixed with a DNA oligonucleotide containing the DR1 sequence (5'-GACCAGGACAAAGGTC-ACGTTTCGGGAGTCGACAGGGGACC-3') at an equimolar ratio and incubated for 2 h at 4 °C. The DNA-bound heterodimeric complex was combined with increasing amounts of glutaminase (18, 37, and 75 μ M). The samples were electrophoresed onto a 10 to 15% (w/v) gradient polyacrylamide nondenaturing gel using a PhastSystem (GE Healthcare) at 16 °C. After being stained for 30 min with an ethidium bromide solution (1% ethidium bromide in water), the gel was photographed on a UV transilluminator.

RESULTS

The PPARγ Hinge LBD Binds to the KGA N-Terminal and Glutaminase Domains. Y2H assays allow for identification of protein interaction partners for a protein of interest, confirming binary protein–protein interactions. We performed a Y2H assay using full-length human KGA [hKGA (Figure 1A)] as bait against a commercial cDNA library of HeLa cells. Among the detected potential binding partners (data not shown) was nuclear receptor PPARγ (Figure 1B). To further validate the assay by probing for the strength of the

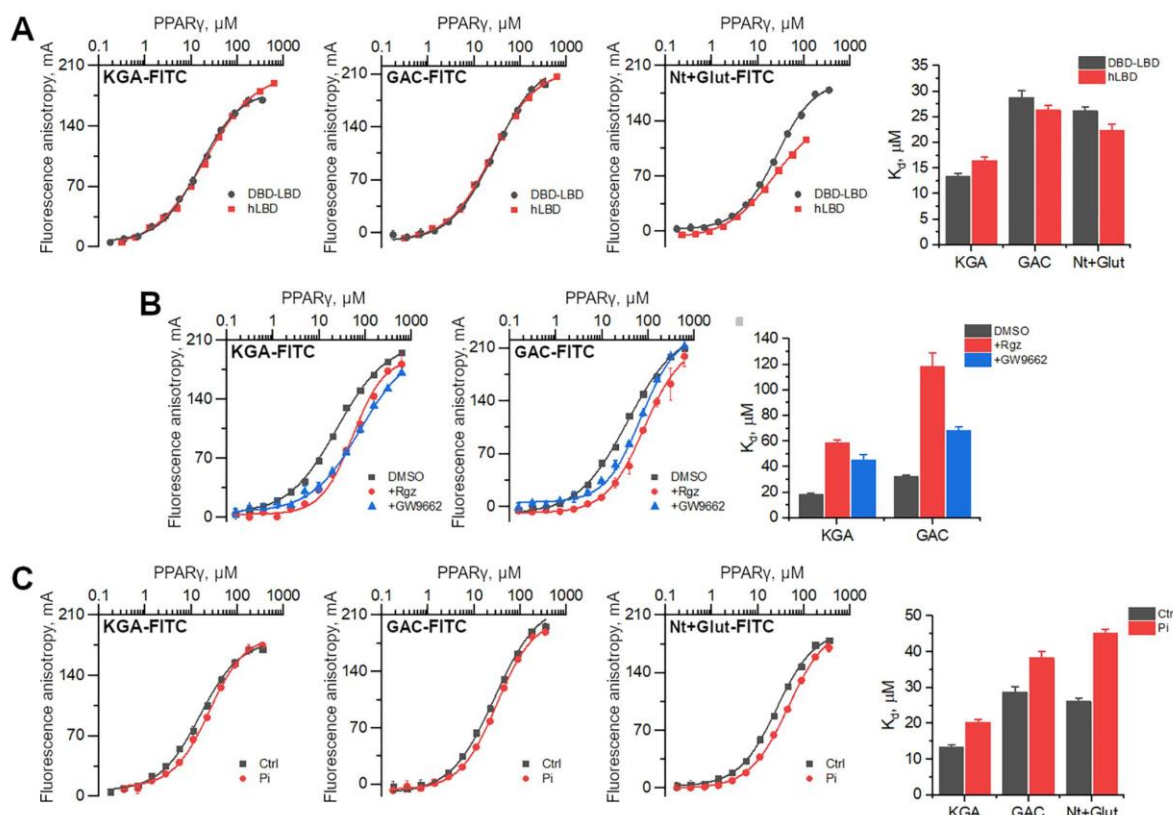


Figure 2. Anisotropy fluorescence assay that reveals the direct interaction between KGA and PPAR γ . (A) KGA-FITC, GAC-FITC, and Nt+Glut-FITC were incubated with increasing doses of PPAR γ DBD-LBD (PPAR γ) or hinge LBD (hLBD). hLBD and Nt+Glut constructs are the minimal units necessary for the contact. (B) KGA-FITC and GAC-FITC were incubated with increasing doses of hLBD in the presence of the synthetic ligands rosiglitazone and GW9662; LBD binding to these ligands increased the K_d . (C) KGA-FITC, GAC-FITC, and Nt+Glut-FITC, when incubated with phosphate, presented decreased affinities for PPAR γ . The graphics are representative of at least three independent experiments; the mean and standard deviation (SD) of three technical replicates are presented. Bar graphs compare the K_d values $\pm$ SD of the represented curves.

interaction, cells co-transformed with plasmids expressing KGA and PPAR γ were grown on synthetic medium that lacked histidine; the bait–prey interaction should reconstitute a functional transcription factor that transcribes the *HIS3* gene. Titration of 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole), a competitive inhibitor of imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (the protein product of *HIS3*), up to 100 mM, revealed that the KGA–PPAR γ interaction is background because it allowed the cells to grow well above the background growth of yeast that expressed only PPAR γ , even up to 50 mM 3-AT (Figure 1C).

Both KGA and PPAR γ are modular multidomain proteins (Figure 1A). We next evaluated the domains involved in the interaction by generating several deletion mutants. As shown in Figure 1D (and Figure S1), a β -galactosidase-X-gal assay indicated that both the N-terminus of KGA, here termed KGA.Nterm, and the PPAR γ LBD are the minimum component units involved in the contact. However, improved results in a 3-AT competition assay were obtained when the PPAR γ DBD–LBD construct was expressed in combination with the Nterm+Glut construct of KGA (meaning the N-terminal portion fused to the glutaminase domain), as seen in Figure 1C. Altogether, these results suggest that the PPAR γ LBD and the KGA N-terminus are crucial for the interaction,

which is further improved in the presence of the respective DBD (and the connected hinge) and glutaminase domains.

Characterization of the Interaction between KGA and PPAR γ . We next probed *in vitro* for the direct interaction using recombinant purified proteins. Because the Y2H assay identified component domains in KGA that are also fully present in GAC [Nterm+Glut (Figure 1A)], we also evaluated whether the latter can be a binding partner of PPAR γ . However, because production of full-length mammalian glutaminases in a bacterial system generates truncated heterogeneous and partially digested proteins, we opted for removing the first 128 amino acids from both isoforms, as previously described.²⁷ In addition, a third glutaminase construct, comprising only the domains of interest (termed Nt+Glut), was generated. The nuclear receptor counterpart was expressed with a deletion of its first 111 residues, thus removing the AF-1 A/B domains, and is hereafter termed PPAR γ DBD-LBD. A second PPAR γ construct, containing the LBD and hinge (termed PPAR γ hLBD), was also obtained.

We first confirmed direct binding of KGA to PPAR γ by performing native gel electrophoresis. The titration of PPAR γ onto KGA, and vice versa, led to the disappearance of the protein band with a fixed concentration, implying complex formation (Figure S2). We randomly labeled the purified

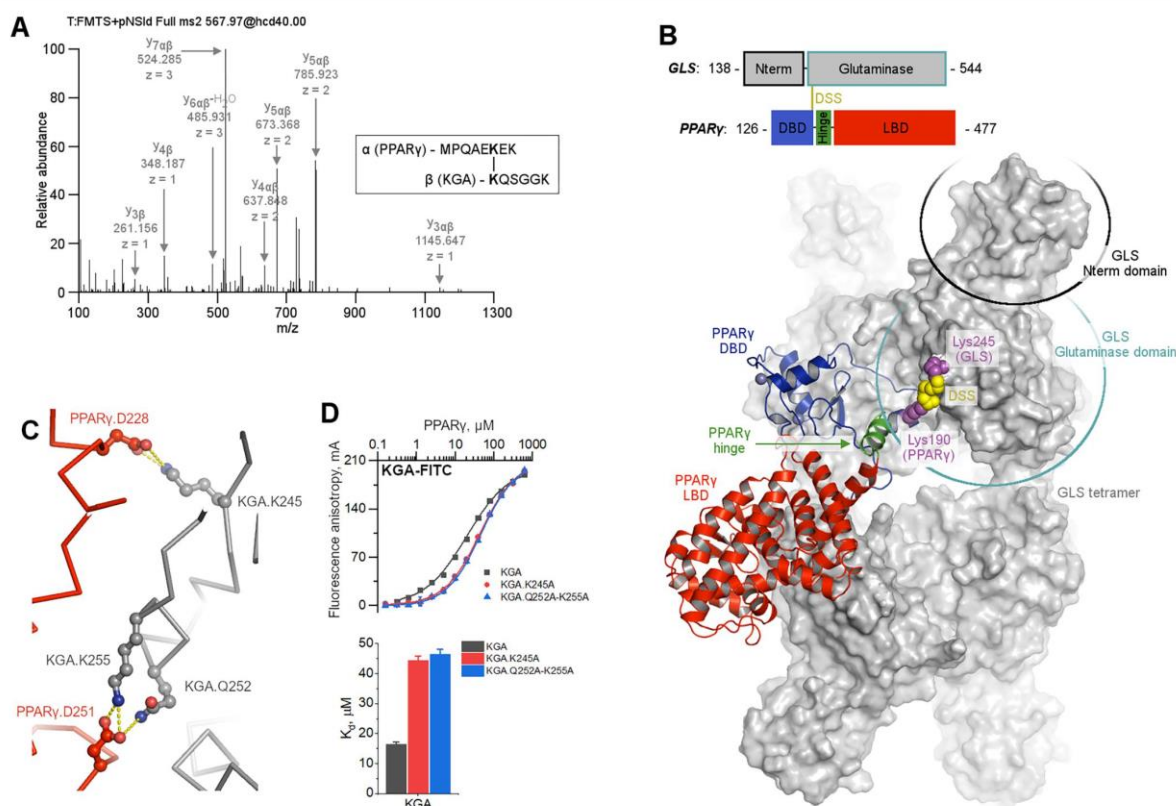


Figure 3. Structural model for the KGA/GAC interaction with PPAR γ . (A) KGA and PPAR γ purified proteins were incubated with the cross-linker agent DSS. The obtained complexes were resolved by SDS–PAGE; the high-molecular weight band was cut off, and the proteins were digested with trypsin and analyzed by mass spectrometry. Manual validation of the cross-linked peptide, with the spectra containing b and y ion series. (B) Best conformation mode based on both the cross-link distance and energy value. The glutaminase tetramer (Protein Data Bank entry 3SS3 contains the atomic coordinates of the GAC protein; the C-terminus is disordered and missing from the structure) is represented as a gray surface, and PPAR γ is shown as ribbons, with the LBD colored red, the hinge orange, and the DBD cyan. The DSS linker and lysines are represented as yellow and purple spheres, respectively. The inset is a scheme showing the protein domains cross-linked by DSS. The cross-linked peptide was identified in two independent docking assays. (C) Ribbon model of PPAR γ (red) and glutaminase (gray) displaying residues involved in the contact, according to the proposed docking structure. (D) Fluorescence anisotropy of wild-type (KGA, black line in top panel and black bar in bottom panel) and mutated KGA (KGA K245A, red line in top panel and red bar in bottom panel; KGA Q252A/K255A, blue line in top panel and blue bar in bottom panel) titrated against the PPAR γ hLBD.

glutaminase constructs with the fluorophore FITC, onto which PPAR γ .DBD–LBD was titrated up to 100 μ M (black curves in Figure 2A). The change in the tumbling rates of the molecules in solution, as a function of complex formation, was tracked by means of fluorescence anisotropy. The dose–response curves revealed that both isoforms bind to PPAR γ with low-micromolar dissociation constants (K_d), which are slightly stronger for KGA ($13.3 \pm 0.6 \mu$ M vs $28.9 \pm 1.3 \mu$ M for GAC), as shown with black bars in Figure 2A (right-most panel). Predictably, Nt+Glut also bound to PPAR γ .DBD–LBD but with an affinity similar to that for GAC [$26.2 \pm 0.8 \mu$ M (Figure 2A, bar graph)]. Additionally, as anticipated, when the shorter construct PPAR γ .hLBD was titrated, a similar scenario was obtained [$16.5 \pm 0.7 \mu$ M for KGA, $26.3 \pm 0.9 \mu$ M for GAC, and $22.3 \pm 1.3 \mu$ M for Nt+Glut binding (red data in Figure 2A)]. Together, these results confirmed that, in accordance with the Y2H assay, the glutaminase Nt+Glut and PPAR γ .hLBD components are sufficient for the interaction, and the respective dissociation constants are very similar to those obtained for PPAR γ .DBD–LBD.

PPAR γ Ligands and Inorganic Phosphate Affect the PPAR γ –KGA Interaction. PPARs are ligand-regulated transcription factors that control gene expression by binding to specific response elements (PPREs) within gene promoters. PPARs bind as heterodimers with a retinoid X receptor, and upon agonist binding (e.g., the artificial molecule rosiglitazone), they interact with cofactors, which stimulates gene transcription.¹⁹ On the other hand, antagonists such as GW9662 (2-chloro-5-nitrobenzanilide) bind covalently to PPAR γ and decrease the level of transcriptional activation.²⁸ However, GLS glutaminases (KGA and GAC) are activated by inorganic phosphate (P_i), which is known to drive a drastic change in the oligomeric state, from dimers and tetramers to polymeric double helices.²⁰

Curious about how the binding of such regulators could affect the association between glutaminases and PPAR γ , we performed anisotropy studies in the presence of these ligands. As shown in Figure 2B, rosiglitazone and GW9662 markedly decreased the binding affinity of PPAR γ .hLBD for KGA and GAC. More specifically, rosiglitazone increased the K_d for

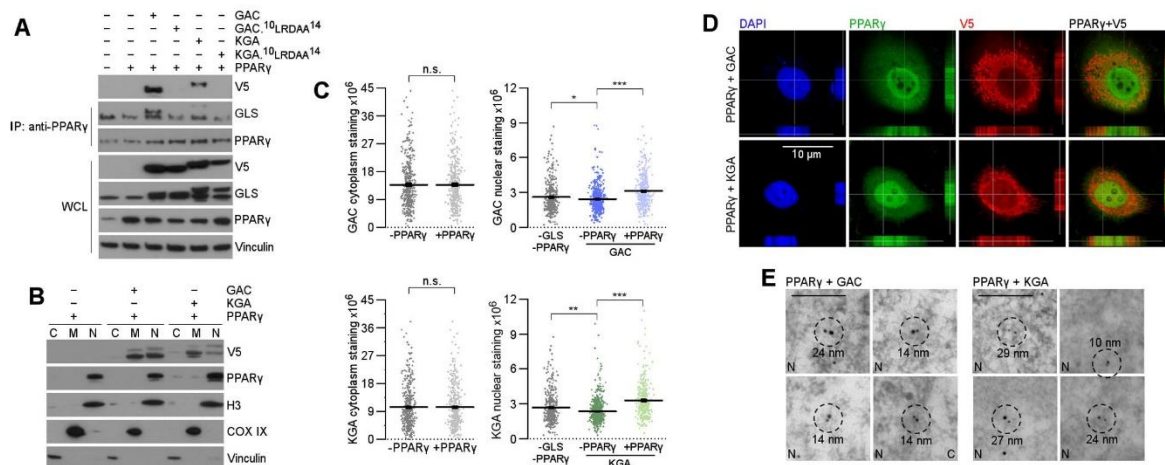


Figure 4. KGA and GAC co-localize with PPAR γ in the nuclei of mammalian cells. (A) PPAR γ and GAC-V5 or KGA-V5 were co-expressed in PC3 cells, and PPAR γ was immunoprecipitated from the whole cell lysate (WCL) and analyzed by Western blotting with anti-V5 and anti-GLS antibodies. Both WT ectopic and endogenous GAC and KGA (but not the $^{10}\text{LRDAA}^{14}$ equivalent mutants) were co-immunoprecipitated with the nuclear receptor. (B) PPAR γ was shown to be primarily located in the nucleus, while GAC and KGA were located in both cytoplasm and nuclear compartments, as revealed by Western blotting of fractionated cells. COX IX and vinculin were used as mitochondrial and nuclear markers, respectively. (C) Quantification of cytoplasmic (graphics on the left) and nuclear (graphics on the right) immunofluorescence signals of anti-V5 and anti-PPAR γ antibodies of individual cells ($n = 500\text{--}1000$). (D) Representative laser scanning confocal micrographs displaying glutaminases for nuclear occupation (scale bar of $10\ \mu\text{m}$). Nuclear staining can be better visualized at the orthogonal projections (cross sections, dashed lines, showing three-dimensional stacks). (E) Electron transmission microscopy revealed co-immunogold labeling of anti-V5 (15 nm gold particles) and anti-PPAR γ (10 nm gold particles) antibodies in the nucleus. Scale bars (200 nm) are shown at the top left. The distance between the gold particles was calculated on the basis of the scale bar. N, nucleus; C, cytoplasm. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

KGA from $18.5 \pm 0.8\ \mu\text{M}$ (DMSO control) to $58.7 \pm 5\ \mu\text{M}$. Additionally, the K_d for GAC increased from $32.3 \pm 1.1\ \mu\text{M}$ (vehicle control) to $118.2 \pm 10.5\ \mu\text{M}$ (light gray, Figure 2B). Again, compared to the vehicle controls, GW9662 increased the K_d for KGA and GAC to 45.5 ± 4 and $68.5 \pm 2.5\ \mu\text{M}$, respectively (dark gray, Figure 2B). Finally, incubation of KGA, GAC, and Nt+Glut with $20\ \text{mM}\ \text{P}_i$ led to a decrease in the binding constants of all the glutaminase constructs with relation to the PPAR γ DBD–LBD construct [for KGA, a K_d of $20.4 \pm 0.8\ \mu\text{M}$ with P_i against $13.3 \pm 0.6\ \mu\text{M}$ without P_i ; for GAC, a K_d of $38.3 \pm 1.9\ \mu\text{M}$ with P_i against $28.8 \pm 1.3\ \mu\text{M}$ without P_i ; for Nt+Glut, a K_d of $45.3 \pm 1.1\ \mu\text{M}$ with P_i against $26.2 \pm 0.8\ \mu\text{M}$ without P_i (Figure 2C)]. The influence of P_i on binding affinity was confirmed by a second method called thermophoresis, using the isoform most responsive to P_i , GAC.²⁰ By using this different technique, we measured a K_d of $7.4 \pm 0.8\ \mu\text{M}$ for binding of GAC to PPAR γ .hLBD without P_i , which increased to $32.1 \pm 22.0\ \mu\text{M}$ in the presence of P_i (Figure S3A). Finally, recombinant KGA-His pulled down endogenous PPAR γ present in a cell lysate (from prostate cancer cell line PC3), which was disturbed by incubation with either rosiglitazone, GW9662, or P_i (Figure S3B). Altogether, our findings revealed that PPAR γ –KGA/GAC binding is sensitive to structural changes in both proteins and is less likely to occur during PPAR γ transcriptional regulation or when the glutaminases are activated.

A Molecular Model of the Interaction between Glutaminases and PPAR γ . To obtain a molecular model of the interaction, we incubated purified recombinant KGA with PPAR γ .DBD–LBD and performed short-range chemical cross-linking using disuccinimidyl suberate (DSS, 11.4 Å linker). The DSS linker reacts with free primary amines, most frequently present in the side chain of lysine. Then, cross-

linked proteins were separated by SDS–PAGE. The higher-molecular weight band (Figure S4A), which was positive for both KGA and PPAR γ [as revealed by Western blotting (Figure S4B)], was digested with trypsin, and the resulting peptides were subjected to liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. After manually verifying possible hits from MassMatrix search results, we identified one cross-linked peptide with high confidence (pp score of 30) containing the tryptic peptides $^{185}\text{MPQAEKEK}^{192}$ (at the C-terminus of the PPAR γ DBD, close to the hinge) and $^{245}\text{KQSGGK}^{250}$ (at the catalytic domain of KGA), cross-linked by the side chains of the underlined lysine residues. The validation of the cross-linked peptides is shown in Figure 3A.

Structural aspects of the complex were predicted through molecular modeling by using the available crystal structures of GLS [tetramer in the asymmetric unit, Protein Data Bank (PDB) entry 3SS3²⁹] and PPAR γ (crystallized as a complex with RXR, PDB entry 3DZY³⁰) and a cross-linked peptide modeled with a spacer arm length for DSS of approximately 11.4 Å as a restraint for the maximum distance between the side chain of the amine groups of the linked lysines. The glutaminase X-ray model used is equivalent to the Nt+Glut construct, common to KGA and GAC, and the PPAR γ X-ray model included the DBD and LBD linked by the hinge helix. A custom docking algorithm resulted in 5000 decoys that were filtered by binding energy and compatible cross-linked pair distance. The best fitted model (Figure 3B) after the molecular dynamics simulation is compatible with the yeast two-hybrid and fluorescence anisotropy results. The model implies a binding surface involving the hinge and LBD regions of PPAR γ and the catalytic domain of glutaminase, although on the basis of the docking, the involvement of the DBD in the binding cannot be excluded (Figure 3B). A scheme displaying the

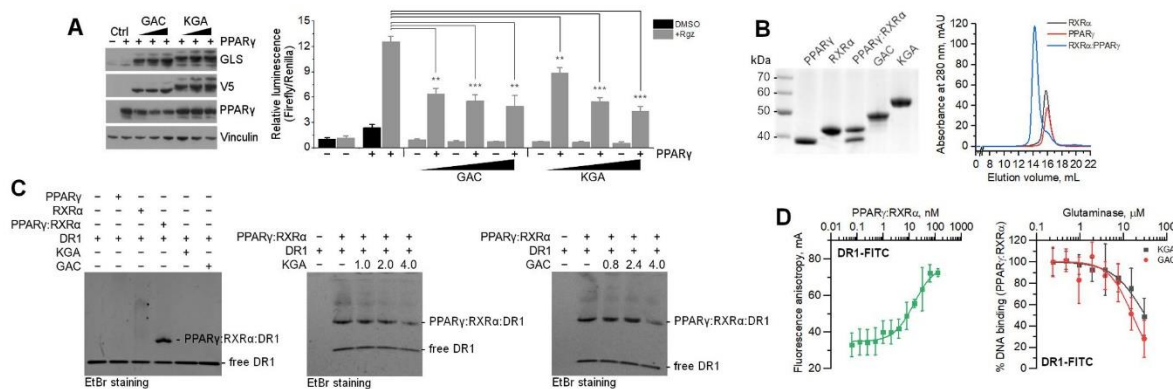


Figure 5. Binding of KGA and GAC to PPAR γ interferes with its transcriptional activity. (A) Co-expression of increasing KGA- or GAC-expressing plasmid concentrations with PPAR γ in HEK293T cells (Western blotting on the left) leads to transcriptional inhibition of a reporter gene (expressing luciferase) driven by PPAR γ responsive element DR1 (right). The luciferase graphic is representative of two independent experiments; the mean and standard deviation of three technical replicates are presented. Statistical significance was assessed by an unpaired *t* test; **p* < 0.01, and ****p* < 0.005. (B) The PPAR γ –RXR α complex was purified at homogeneity and an apparent 1:1 stoichiometry based on gel visualization (left). Gel filtration chromatography (right) showed that the PPAR γ –RXR α complex co-eluted with increased sized compared to individual proteins. (C) A gel-shift assay revealed that only the purified PPAR γ –RXR α complex (but neither individual nuclear receptors nor glutaminases) caused a shift on DR1 (left); purified KGA or GAC disturbed the binding of the heterodimer to DNA when each was incubated with the heterodimer at a 4-fold molar excess (GAC in the middle and KGA on the right). (D) Anisotropy of FITC-DR1 upon titration with the PPAR γ –RXR α complex revealed a K_d of 14.3 ± 1.4 nM (left); either GAC or KGA disturbed the interaction of the PPAR γ –RXR α complex with DR1 as revealed by a decrease in fluorescence anisotropy (right).

cross-linking between KGA and PPAR γ is shown as an inset in Figure 3B. To confirm the PPAR γ LBD–glutaminase domain-binding surface indicated by the docking assay, we generated the KGA K245A and KGA Q252A/K255A mutants [displayed in the model as interacting with PPAR residues D288 and D251, respectively (Figure 3C)] and assayed binding affinity by fluorescence anisotropy. Neither single nor double mutation abrogated the interaction but increased the K_d from 16.5 ± 0.7 μ M (KGA WT) to 44.4 ± 1.5 μ M (KGA.K245A) and 46.4 ± 1.6 μ M (KGA.Q252A/K255A) when the PPAR γ hLBD was assayed (Figure 3D). In conclusion, binding of PPAR γ to KGA/GAC involves LBD and glutaminase domains, but other regions of both proteins are also important for interaction.

GLSs Interact with PPAR γ in Mammalian Cells. Having confirmed the *in vitro* interaction between KGA/GAC and PPAR γ , we set out to detect whether they could be co-immunoprecipitated from mammalian cell lysates. We ectopically expressed full-length KGA and GAC fused to the immunogenic tag V5 at the C-terminus (termed GAC-V5 and KGA-V5) as well as full-length untagged PPAR γ in the PC-3 prostate cancer cell line. Because both GAC and KGA present the putative sequence 10 LRDLL 14 , resembling the LXXLL motif found in co-activators and involved in the nuclear receptor interaction with these regulatory proteins, 19 at the very end of the N-terminus, we evaluated whether the 10 LRDAA 14 double mutant could disrupt the interaction. The whole cell lysate was immunoprecipitated with the anti-PPAR γ antibody, and anti-V5 and anti-GLS antibodies were used to identify GAC/KGA co-immunoprecipitates. We promptly verified that both KGA-V5 and GAC-V5 wild type (as well as endogenous protein) co-immunoprecipitated with PPAR γ . In agreement, mass spectrometry analysis of immunoprecipitated Flag-PPAR γ or GAC-V5 reciprocally identified each endogenous protein as a binding partner (Table S1 and Figure S4C,D). Both 10 LRDAA 14 GAC-V5 and 10 LRDAA 14 KGA-V5 mutants, although expressed at levels equivalent to those of the

WT counterparts, were not detected in the co-immunoprecipitates (Figure 4A), implying that the 10 LRDLL 14 sequence is important for the interaction. The involvement of the 10 LRDLL 14 segment (but not the subsequent 139 LEDLL 143 sequence) in the interaction was confirmed by the Y2H assay (Figure S5A,B).

Curious about whether both mitochondrial glutaminases and cytosolic/nuclear PPAR γ co-localize in the same compartment in cells, we fractionated cell lysates into their nuclear, cytoplasmic, and mitochondrial compartments. Western blotting showed that both GAC-V5 and KGA-V5 were present in the mitochondrial and nuclear fractions, while PPAR γ was exclusively detected in the nuclear compartment, consistent with its gene transcription role in cells (Figure 4B). We then quantified the anti-V5 and anti-PPAR γ immunofluorescence signal of 500–1000 individual cells. Cells were analyzed by the software Columbus (PerkinElmer) with built-in algorithms that allow the identification of nuclear and cytoplasmic compartments. The data revealed that PPAR γ expression, by itself, increased the levels of GAC and KGA WT in the nucleus (with no impact on median intensity levels in the cytoplasm) (Figure 4C, GAC in top panels and KGA in bottom panels). Confocal fluorescence microscopy confirmed that GAC-V5 and KGA-V5 are located mainly in the cytoplasm, within structures that structurally resemble mitochondria [although some clear nuclear signal can be detected with Pearson correlation of pixel intensities of glutaminases and PPAR γ staining of 0.2397 and 0.2365 for the GAC and KGA, respectively; the region of interest (ROI) analyzed was the nucleus], while PPAR γ was mainly located in the nuclear compartment (Figure 4D). Transmission electron microscopy with immunogold-labeled anti-V5 and anti-PPAR γ antibodies confirmed that KGA, GAC, and PPAR γ are present within the nuclei of the analyzed cells, and on the basis of the measured distances between the gold particles, they are at distances ranging from 10 to 29 nm (Figure 4E). Because immunogold

particles are located approximately 30 nm from their respective antigenic sites using an indirect labeling method (primary plus secondary antibody),³¹ the measured distances are compatible with a protein–protein interaction. In summary, GAC, KGA, and PPAR γ co-localize in the nucleus.

Interaction of PPAR γ with GLSs Decreases DNA Binding and Transactivation Activity. By identifying that both KGA and GAC can co-localize with PPAR γ in the nucleus, we further evaluated whether glutaminase expression affected PPAR γ transactivation activity of a luciferase gene reporter in HEK293T cells. First, confirmation was provided that KGA-V5 or GAC-V5 and PPAR γ were ectopically expressed in the cells (Figure 5A, left panel). We then verified that while PPAR γ expression associated with the agonist rosiglitazone increased basal luciferase activity driven by the responsive element DR1 beyond 10-fold, co-expression of both GAC and KGA (in the presence of rosiglitazone) decreased the level of PPAR γ transactivation (Figure 5A, graphic at the right). Moreover, transfection with increasing amounts of DNA increased the repression effects of both GAC and KGA on the nuclear receptor, reaching 39 and 34% of inhibition at the highest concentration of transfected DNA, respectively. GAC and KGA also affected the luciferase activity driven by responsive element DR1 in the presence of PPAR γ and rosiglitazone in PC3 cells (Figure S6).

Given that GAC/KGA disrupted PPAR γ transactivation of the reporter gene expression and that the cross-linking data suggested the KGA–PPAR γ interaction surface likely spanned the nuclear receptor DNA-binding domain (Figure 3B), we employed a gel-shift assay to investigate whether this interaction disturbed the ability of the nuclear receptor to bind to responsive element DR1. Because PPAR γ acts a mandatory heterodimer with RXR α to control gene expression, we first co-purified both proteins at an equimolar level and used them to evaluate the glutaminase effect on binding of the heterodimer to DR1 (Figure 5B, Coomassie-stained gel on the left and gel filtration chromatography on the right). As expected, the PPAR γ –RXR α heterocomplex, but none of the individual proteins (including the glutaminases), was able to form a shifted DR1 band (Figure 5C, left-most panel). Incubation of a 4:1 molar excess of either GAC or KGA to PPAR γ –RXR α decreased the intensity of the PPAR γ :RXR α :DR1 shifted band, as revealed by EtBr staining on a native gel (Figure 5C, middle panel for GAC and right-most panel for KGA). To confirm the effect of GAC and KGA on binding of PPAR γ –RXR α to the DR1 element, we performed fluorescence anisotropy with FITC-labeled DR1. We first obtained a binding affinity of PPAR γ :RXR α for DR1 of 14.3 ± 1.4 nM, similar to values previously reported in the literature³² (Figure 5D, left). We then showed that titrating either GAC or KGA into the PPAR γ :RXR α :DR1 complex led to a decrease in FITC-labeled DR1 anisotropy, indicating a decrease in the affinity of the nuclear receptor heterodimer for the DNA (Figure 5D, right). GAC and KGA competitive EC₅₀ values for the nuclear receptor–DNA complex were calculated by extrapolating the curve to 0% DNA binding because we could not achieve GAC/KGA concentrations that allowed a complete disruption of the PPAR γ :RXR α :DR1 complex. The half-maximal effective concentration (EC₅₀) of GAC was 16 ± 2.2 μ M, while the KGA EC₅₀ was 31.7 ± 4.3 μ M, implying that GAC is more efficient in disrupting the PPAR γ :RXR α :DR1 complex. Altogether, these data show that GAC/KGA interacts with PPAR γ in the nucleus of cells and disrupts the

transactivation function of this nuclear receptor by weakening binding of the PPAR γ –RXR α complex to responsive element DR1.

DISCUSSION

In addition to the classical co-regulators (co-activators and co-repressors), other proteins have been shown to bind and alter the transcriptional function of nuclear receptors. One of the splicing variants of the thioredoxin reductase (TrxR) enzyme contains the LXXLL motif and was implicated as a directing binding partner of the estrogen receptor (ER). More specifically, studies have shown that TrxR affected estrogen-dependent genic activation by outcompeting ER co-activator binding, indicating that this TrxT isoform is an important modulator of the estrogen signaling pathway.³³ The tumor suppressor anti-proliferation factor 2 (BTG2) also has an LXXLL motif within its sequence and was revealed to directly bind to the androgen receptor (AR), an interaction that is strengthened by the androgen hormone.³⁴ Ectopic BTG2 expression led to inhibition of the transcriptional activation mediated by AR and promoted cell growth inhibition of prostate cancer cells.³⁴ Orphan receptor Nurr77 was shown to translocate to the mitochondria and bind to Bcl-2, converting Bcl-2 to its pro-apoptotic form by exposure of its SH3 domains and sequestration of the anti-apoptotic protein Bcl-X_L.³⁵

Human KGA, LGA, and GAB glutaminase isoforms share a glutaminase domain that is well-conserved in sequence and structurally similar to bacterial glutaminases; however, in eukaryotes, the glutaminase domain is flanked by a long N-terminal domain region, folded in part into an EF-hand-like four-helix bundle (EH-like) and a C-terminal domain with three demonstrated ankyrin (ANK) repeats.¹⁰ The ANK repeats are involved in protein–protein contacts and have been found in numerous proteins with functions that include cytoskeleton integrity, transcription and cell cycle regulation, cell–cell signaling, inflammatory response, development, and various transport phenomena.³⁶ In contrast, GAC has a shorter, 48-amino acid C-terminus with no canonical motif or domain. In addition, all the glutaminase isoforms present LXXLL motifs: the LRDLL (residues 10–14) and LEDLL (residues 139–143) motifs are present in both GLS isoforms, and the sequence LGDLL is formed by residues 72–76 in GAB and 35–39 in LGA.

As expected, on the basis of its multidomain structure, several proteins have already been described as glutaminase-binding partners. At the very end of the KGA C-terminus, there is a KEN motif (lysine-glutamate-asparagine³⁷). The substrates of the anaphase-promoting complex or cyclosome with the subunit Cdh1 [APC/C(Cdh1)], an E3 ubiquitin ligase involved in cell cycle control, are directed to degradation through binding of APC/C(Cdh1) to the KEN-box motif.³⁸ Aside from the KEN box, KGA also possesses a nearby D-box motif, which is essential for ubiquitin ligase recognition.^{39,40} Indeed, the KGA protein level is regulated during the cell cycle by a ubiquitination process and is stabilized in the G1 phase, when it promotes a biomass increase (nucleotide synthesis) and proliferation.⁴⁰

KGA also binds to a brain-specific member of the BNIP-2 family, BNIP-2 homologue (BNIP-H) or Caytaxin, that is exclusively expressed in the brain and codified by the ATCAY gene. Human Cayman ataxia and mouse or rat dystonia, linked to mutations in the gene ATCAY (Atcay), are recessive congenital disorders associated with neuronal disorders.

Binding of KGA to BNIP-H involves its glutaminase domain and inhibits KGA glutaminolytic function, reducing the levels of the neurotransmitter glutamate.¹⁵

On the other hand, LGA/GAB isoforms have the four-residue sequence ESMV at the very end of the C-terminus, which are involved in interactions with proteins containing PDZ domains (PSD95/Dlg/ZO1), usually found in the brain.^{13,41} The two-hybrid technique, with the 347–602 C-terminal portion of the protein as bait, was used to identify α 1-syntrophin and glutaminase-interacting protein 1 (GIP-1) as binding partners of both LGA and GAB.¹³ GIP-1 is also known as Tax-interacting protein-1 (TIP-1). TIP-1 (or GIP-1) works as a GAB scaffold and likely directs this protein to multiple cell locations, such as the membrane, nucleus, and mitochondria of neurons and astrocytes.⁴²

Because most of the proteins previously identified as glutaminase-binding proteins are neuronal/astrocyte proteins, we set out to identify new binding partners of the KGA isoform by performing a yeast two-hybrid assay using a HeLa cell cDNA library. One of the unexpected binding partners identified in the screening was the nuclear receptor PPAR γ . Although this is the first time that a glutaminase is implicated as a binding partner of a nuclear receptor, other transcriptional factors have already been revealed as interacting partners of many metabolic enzymes. Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP1), a rate-limiting enzyme in the gluconeogenesis pathway, which generates glucose from noncarbohydrate sources, binds to the HIF inhibitory domain and suppresses HIF-1 α transcriptional activity in clear cell renal carcinoma cells.⁴³ GAPDH is a glycolytic enzyme that catalyzes the conversion of glyceraldehyde 3-phosphate into 1,3-bisphosphoglycerate. In the nucleus, GAPDH was identified as an essential component of the transcriptional co-activator OCA-S, which drives the expression of the histone H2B gene in the S phase.⁴⁴ Guanosine 5-monophosphate (GMP) synthase (GMPS) mediates the final step of the de novo synthesis of guanine nucleotides by converting xanthosine 5-monophosphate (XMP) into GMP. Studies have shown that GMPS associates with the nuclear ubiquitin-specific protease 7 (USP7) (reviewed in ref 45) in *Drosophila* and human cells. GMPS:USP7, by targeting either chromatin or transcription factors, modulates gene expression.⁴⁵ In another interesting case, epidermal growth factor receptor (EGFR) activation induced translocation of the glycolytic enzyme embryonic pyruvate kinase M2 (PKM2) isoform, but not PKM1, into the nucleus, where it bound to β -catenin. This interaction was necessary for both proteins to be directed to the CCND1 promoter, leading to removal of HDAC3 from the promoter, followed by histone H3 acetylation and cyclin D1 expression.⁴⁶

Fluorescence anisotropy data showed that the nuclear receptor LBD (with the potential involvement of the hinge segment and DBD) interacts with the N-terminus and glutaminase domains of the glutaminases, which are a common feature of both the GAC and KGA isoforms; there is no clear involvement of the glutaminase C-terminus in mediating the interaction. Mass spectrometry of the digested and cross-linked KGA–PPAR γ complex identified a linked peptide, and by using the constraint parameters derived from the cross-linker spacer length, we proposed a docking model that agreed with an interaction interface involving these domains, which was further confirmed by mutagenesis for the PPAR γ LBD–glutaminase domain interface. This type of interaction replicates the interaction of BNIP-H with KGA, which also

involves the KGA glutaminase domain.¹⁵ Additionally, the molecular model is compatible with the possibility of four PPAR γ monomers binding to a KGA/GAC tetramer. Once the interaction surface was shown to involve the PPAR γ LBD, it was again not unexpected that the artificial agonist and antagonist, rosiglitazone and GW9662, respectively, which are both ligands of this domain, affected the binding of the nuclear receptor to the glutaminases.

The LBD adopts a three-layer α -helical sandwich fold, comprised of 12 α -helices with a ligand-binding pocket.⁴⁷ The AF-2 surface (helix 3/4/5/12 interface) is highly hydrophobic and provides a binding site for co-activator proteins with an LXXLL recognition motif.⁴⁸ In the apo (or unliganded) form, helix 12 is generally thought to be extended away from the LBD.⁴⁹ However, in the case of apo PPAR γ , helix 12 adopts multiple conformations in solution rather than a single extended conformation.⁵⁰ It has been observed generally that agonist ligands position helix 12 to cover the ligand-binding site, leaving the AF-2 surface-exposed for co-regulator binding.⁵¹ Rosiglitazone makes several contacts in the ligand-binding pocket of PPAR γ , stabilizing a conformation suitable for binding co-activator proteins.⁵² The crystal structure of the PPAR γ –RXR α complex bound to DR1 revealed that both GW9662 and rosiglitazone ligands did not significantly alter the overall conformation of the receptors, including the receptor–co-activator interaction,³⁰ which is compatible with our findings that both ligands affect the glutaminase interaction the same way.

In addition, our data show that rosiglitazone decreased the binding affinity for GAC/KGA by increasing K_d by nearly 3 times. This observation, associated with the fact that the ¹⁰LRDAA¹⁴ double mutation in the glutaminase N-terminus affected the GAC/KGA:PPAR γ co-immunoprecipitation (and KGA yeast two-hybrid contact), led to the proposition that the binding of glutaminase to PPAR γ may follow classical nuclear receptor co-activator interface binding. Unfortunately, we were restrained from testing the ¹⁰LRDAA¹⁴ importance for the purified protein interaction because to achieve a suitable amount of stable protein in *E. coli* we had to delete the first 123 and 127 amino acids of the KGA and GAC constructs, respectively. Such an interface could also not be probed in the docking assay because the glutaminase crystallographic structure used does not contain the N-terminal segment from residue 1 to 127.

Both glutaminases displayed nuclear localization along with PPAR γ (at distances compatible with protein–protein interaction), even though fluorescence and transmission electron microscopy confirmed a weak co-localization of both glutaminases and the nuclear receptor in the nucleus. This weak co-localization signal is in agreement with the relatively high K_d measured for the glutaminase–PPAR γ interaction, because strong binding partners usually have a nanomolar level dissociation constant.^{53,54} Altogether, these data suggest that the glutaminases are transient binding partners of PPAR γ . Finally, these observations may indicate that the GAC/KGA–PPAR γ interaction is conditional in cells and may occur under specific stimuli and cell physiological states that require definition. Moreover, for reasons we do not yet comprehend, localization of glutaminase within the nucleus was further enhanced by PPAR γ expression.

Although GAB and LGA have already been found in the nuclear compartment,⁵⁵ and KGA outside the mitochondria,²⁹ this is the first time the GLS isoforms have been reported to be

capable of translocating to the nucleus. The observation that the glutaminase activator inorganic phosphate decreased the binding affinity for PPAR γ corroborates a scenario in which the interaction occurs in a compartment where glutaminase activity is not required. Curiously, the ¹⁰LRDAA¹⁴ double mutation increased the intensity of the fluorescence signal in the nucleus of both GAC and KGA (data not shown), revealing that this segment, which is part of the mitochondrial targeting sequence⁵⁶ and is cleaved off after entrance into the organelle, may be involved in translocation of glutaminase to the nuclear compartment. However, the mechanism for this remains elusive.

Having found that the glutaminases and PPAR γ can co-localize in the nucleus, we raise the hypothesis that glutaminases could affect the transcriptional regulation role of PPAR γ . Indeed, co-transfection of GAC and KGA with PPAR γ in the presence of the agonist rosiglitazone decreased the level of PPAR γ -driven luciferase transcription (and activity) from a reporter plasmid under DR1 control. Glutaminase activity was not responsible for such alteration because transfection of the catalytically impaired mutant S286A further decreased PPAR γ transactivation activity (data not shown). Moreover, GAC and KGA negatively affected the transcription by sequestering the nuclear receptor from its responsive element DR1, as revealed by the gel-shift assay and DNA anisotropy competition assay.

In cells, transcriptional control is orchestrated by a combination of transcription factors, and binding of glutaminase to PPAR γ may affect the final output of this conjunctive control. The implication of this output for cell biology in either physiological or pathological states has yet to be uncovered. Altogether, these findings point to a new role of glutaminase proteins and imply their involvement in cellular processes other than glutamine to glutamate metabolism.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00773.

Figures S1–S6 and Table S1 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Laboratório Nacional de Biociências-LNBio, CNPEM, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Pólo II de Alta Tecnologia, Campinas, SP 13083-100, Brazil. Telephone: +55 19 3512 1115. Fax: +55 19 3512 1004. E-mail: sandra.dias@lnbio.cnpe.br.

*Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo-Av. João Dagnone, 1100 Jardim Santa Angelina, São Carlos, SP 13563-120, Brazil. E-mail: andre@ifsc.usp.br.

ORCID

Sandra Martha Gomes Dias: 0000-0002-1589-7856

Present Addresses

[†]Z.I.: Qatar Biomedical Research Institute, Doha, Ad Dawhah, Qatar.

[‡]E.M.G.: Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil.

[#]A.L.B.A.: São Carlos Institute of Physics (IFSC), University of São Paulo (USP), São Carlos, SP 13563-120, Brazil.

Author Contributions

C.A.d.G.C., M.M.D., M.P.P., and C.C.P. contributed equally to this work. The manuscript was written through contributions of all authors. S.M.G.D. and A.L.B.A. designed the research. C.A.d.G.C., M.M.D., M.P.P., C.C.P., A.C.S.B., Z.I., S.R.C., J.F.d.O., E.M.G., C.F.R.A., R.H., B.A.P., N.d.C.I., and H.V.R.F. conducted the experiments. S.M.G.D., A.L.B.A., S.R.C., P.S.L.d.O., A.F.P.L., and A.C.M.F. analyzed the experimental data. S.M.G.D., A.L.B.A., M.P.P., C.A.d.G.C., C.C.P., and M.M.D. wrote the paper. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by FAPESP Grants 2014/20673-2 and 2017/11766-5 (to A.L.B.A.), 2015/25832-4 (to S.M.G.D.), and 2016/22246-0 (to A.C.M.F.) and Fellowships 2011/10127-2 (to C.A.d.G.C.), 2014/19518-2 (to C.C.P.), 2010/13992-3 (E.M.G.), and 2011/13981-4 (C.F.R.A.). The authors thank LNBio for financial support.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank LNBio for access to the Mass Spectrometry (MAS), Biological Imaging (LIB), Bioassay Laboratory (LBE), Spectroscopy and Calorimetry (LEC), and Bioinformatics (LBI) facilities. The authors are very grateful to Dr. Alessandra Girasole for expert technical support.

■ ABBREVIATIONS

GLS, glutaminase; PPARs, peroxisome proliferator-activated receptors; DBD, DNA-binding domain; LBD, ligand-binding domain; DR1, DNA responsive element 1; TrxR, thioredoxin reductase; ER, estrogen receptor; BTG2, BTG antiproliferation factor 2; AR, androgen receptor; ANK, ankyrin; GIP-1, glutaminase-interacting protein 1; TIP-1, Tax-interacting protein-1; FBP1, fructose 1,6-bisphosphatase; USP7, ubiquitin-specific protease 7; EGFR, epidermal growth factor receptor; PKM2, pyruvate kinase M2.

■ REFERENCES

- (1) Krebs, H. (1935) Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem. J.* 29, 1951–1969.
- (2) Curthoys, N. P., and Watford, M. (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 15, 133–159.
- (3) Kovacevic, Z., and McGivan, J. (1983) Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol. Rev.* 63, 547–605.
- (4) Altman, B. J., Stine, Z. E., and Dang, C. V. (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 16, 619–634.
- (5) Lukey, M. J., Wilson, K. F., and Cerione, R. A. (2013) Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism. *Future Med. Chem.* 5, 1685–700.
- (6) Porter, L. D., Ibrahim, H., Taylor, L., and Curthoys, N. P. (2002) Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiol. Genomics* 9, 157–66.
- (7) Elgadi, K. M., Meguid, R. A., Qian, M., Souba, W. W., and Abcouwer, S. F. (1999) Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol. Genomics* 1, 51–62.

- (8) Pérez-Gómez, C., Matés, J. M., Gómez-Fabre, P. M., del Castillo-Olivares, A., Alonso, F. J., and Márquez, J. (2003) Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene. *Biochem. J.* 370, 771–784.
- (9) Martín-Rufián, M., Tosina, M., Campos-Sandoval, J. a, Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J. a, Alonso, F. J., Matés, J. M., and Márquez, J. (2012) Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One* 7, e38380.
- (10) Pasquali, C. C., Islam, Z., Adamoski, D., Ferreira, I. M., Righeto, R. D., Bettini, J., Portugal, R. V., Yue, W. W., Gonzalez, A., Dias, S. M. G., and Ambrosio, A. L. B. (2017) The origin and evolution of human glutaminases and their atypical C-terminal ankyrin repeats. *J. Biol. Chem.* 292, 11572–11585.
- (11) Li, J., Mahajan, A., and Tsai, M. (2006) Ankyrin Repeat : A Unique Motif Mediating Protein - Protein Interactions. *Biochemistry* 45, 15168–15178.
- (12) Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733–736.
- (13) Olalla, L., Aledo, J. C., Bannenberg, G., and Márquez, J. (2001) The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett.* 488, 116–122.
- (14) Zhang, C., Liu, J., Zhao, Y., Yue, X., Zhu, Y., Wang, X., Wu, H., Blanco, F., Li, S., Bhanot, G., Haffty, B. G., Hu, W., and Feng, Z. (2016) Glutaminase 2 is a novel negative regulator of small GTPase Rac1 and mediates p53 function in suppressing metastasis. *eLife* 5, e10727.
- (15) Buschdorf, J. P. (2006) Brain-specific BNIP-2-homology protein Caytaxin relocates glutaminase to neurite terminals and reduces glutamate levels. *J. Cell Sci.* 119, 3337–3350.
- (16) Boulay, A.-C., Burbassi, S., Lorenzo, H.-K., Loew, D., Ezan, P., Giaume, C., and Cohen-Salmon, M. (2013) Bmcc1s interacts with the phosphate-activated glutaminase in the brain. *Biochimie* 95, 799–807.
- (17) Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M., and Klierer, S. A. (1995) An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* 270, 12953–12956.
- (18) Kubota, N., Terauchi, Y., Kubota, T., Kumagai, H., Itoh, S., Satoh, H., Yano, W., Ogata, H., Tokuyama, K., Takamoto, I., Mineyama, T., Ishikawa, M., Moroi, M., Sugi, K., Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Noda, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2006) Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 8748–8755.
- (19) Desvergne, B., and Wahli, W. (1999) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors : Nuclear Control of Metabolism*. *Endocr. Rev.* 20, 649–688.
- (20) Ferreira, A. P. S., Cassago, A., Gonçalves, K., Dias, M. M., Adamoski, D., Ascensão, C. F. R., Honorato, R. V., de Oliveira, J. F., Ferreira, I. M., Fornezari, C., Bettini, J., Oliveira, P. S. L., Paes Leme, A. F., Portugal, R. V., Ambrosio, A. L. B., and Dias, S. M. G. (2013) Active Glutaminase C Self-assembles into a Supratetrameric Oligomer That Can Be Disrupted by an Allosteric Inhibitor. *J. Biol. Chem.* 288, 28009–28020.
- (21) Aragão, A. Z. B., Nogueira, M. L. C., Granato, D. C., Simabuco, F. M., Honorato, R. V., Hoffman, Z., Yokoo, S., Laurindo, F. R. M., Squina, F. M., Zeri, A. C. M., Oliveira, P. S. L., Sherman, N. E., and Paes Leme, A. F. (2012) Identification of Novel Interaction between ADAM17 (a Disintegrin and Metalloprotease 17) and Thioredoxin-1. *J. Biol. Chem.* 287, 43071–43082.
- (22) Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- (23) Rappsilber, J., Mann, M., and Ishihama, Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* 2, 1896–1906.
- (24) Kawahara, R., Lima, R. N., Domingues, R. R., Pauletti, B. A., Meirelles, G. V., Assis, M., Figueira, A. C. M., and Leme, A. F. P. (2014) Deciphering the Role of the ADAM17-Dependent Secretome in Cell Signaling. *J. Proteome Res.* 13, 2080–2093.
- (25) Kawahara, R., Meirelles, G. V., Heberle, H., Domingues, R. R., Granato, D. C., Yokoo, S., Canevarolo, R. R., Winck, F. V., Ribeiro, A. C. P., Brandão, T. B., Filgueiras, P. R., Cruz, K. S. P., Barbuto, J. A., Poppi, R. J., Minghim, R., Telles, G. P., Fonseca, F. P., Fox, J. W., Santos-Silva, A. R., Coletta, R. D., Sherman, N. E., and Leme, A. F. P. (2015) Integrative analysis to select cancer candidate biomarkers to targeted validation. *Oncotarget* 6, 43635.
- (26) Wang, W., and Malcolm, B. A. (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *BioTechniques* 26, 680–682.
- (27) Kenny, J., Bao, Y., Hamm, B., Taylor, L., Toth, A., Wagers, B., and Curthoys, N. P. (2003) Bacterial expression, purification, and characterization of rat kidney-type mitochondrial glutaminase. *Protein Expression Purif.* 31, 140–148.
- (28) Leesnitzer, L. M., Parks, D. J., Bledsoe, R. K., Cobb, J. E., Collins, J. L., Consler, T. G., Davis, R. G., Hull-Ryde, E. A., Lenhard, J. M., Patel, L., Plunket, K. D., Shenk, J. L., Stimmel, J. B., Therapontos, C., Willson, T. M., and Blanchard, S. G. (2002) Functional Consequences of Cysteine Modification in the Ligand Binding Sites of Peroxisome Proliferator Activated Receptors by GW9662. *Biochemistry* 41, 6640–6650.
- (29) Cassago, A., Ferreira, A. P. S., Ferreira, I. M., Fornezari, C., Gomes, E. R. M., Greene, K. S., Pereira, H. M., Garratt, R. C., Dias, S. M. G., and Ambrosio, A. L. B. (2012) Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1092–1097.
- (30) Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P., and Rastinejad, F. (2008) Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 456, 350–356.
- (31) Hermann, R., Walther, P., and Müller, M. (1996) Immunogold labeling in scanning electron microscopy. *Histochem. Cell Biol.* 106, 31–39.
- (32) Mulero, M., Perroy, J., Federici, C., Cabello, G., and Ollendorff, V. (2013) Analysis of RXR/THR and RXR/PPARG2 Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *PLoS One* 8, e84569.
- (33) Damdimopoulos, A. E., Miranda-Vizuete, A., Treuter, E., Gustafsson, J. A., and Spyrou, G. (2004) An alternative splicing variant of the selenoprotein thioredoxin reductase is a modulator of estrogen signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 38721–38729.
- (34) Hu, X.-D., Meng, Q.-H., Xu, J.-Y., Jiao, Y., Ge, C.-M., Jacob, A., Wang, P., Rosen, E. M., and Fan, S. (2011) BTG2 is an LXXLL-dependent co-repressor for androgen receptor transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 903–909.
- (35) Kolluri, S. K., Zhu, X., Zhou, X., Lin, B., Chen, Y., Sun, K., Tian, X., Town, J., Cao, X., Lin, F., Zhai, D., Kitada, S., Luciano, F., O'Donnell, E., Cao, Y., He, F., Lin, J., Reed, J. C., Satterthwait, A. C., and Zhang, X. (2008) A Short Nur77-Derived Peptide Converts Bcl-2 from a Protector to a Killer. *Cancer Cell* 14, 285–298.
- (36) Mosavi, L., Cammett, T., Desrosiers, D. C., and Peng, Z.-y. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 13, 1435–1448.
- (37) Qi, W., and Yu, H. (2006) KEN-Box-dependent Degradation of the Bub1 Spindle Checkpoint Kinase by the Anaphase-promoting Complex/Cyclosome. *J. Biol. Chem.* 282, 3672–3679.
- (38) Pfleger, C. M., and Kirschner, M. W. (2000) The KEN box: An APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14, 655–665.
- (39) Colombo, S. L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., De Leon, J., Schmitt, C. A., Boorn, L., Davis, N., and Moncada, S. (2010) Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18868–18873.

- (40) Colombo, S. L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., Carcamo, S., Kovacs, I., Tudzarova, S., and Moncada, S. (2011) Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21069–21074.
- (41) Márquez, J., López de la Oliva, A. R., Matés, J. M., Segura, J. a, and Alonso, F. J. (2006) Glutaminase: A multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochem. Int.* 48, 465–471.
- (42) Olalla, L., Gutiérrez, A., Jiménez, A. J., López-Téllez, J. F., Khan, Z. U., Pérez, J., Alonso, F. J., de la Rosa, V., Campos-Sandoval, J. a, Segura, J. a, Aledo, J. C., and Márquez, J. (2008) Expression of the scaffolding PDZ protein glutaminase-interacting protein in mammalian brain. *J. Neurosci. Res.* 86, 281–292.
- (43) Li, B., Qiu, B., Lee, D. S. M., Walton, Z. E., Ochocki, J. D., Mathew, L. K., Mancuso, A., Gade, T. P. F., Keith, B., Nissim, I., and Simon, M. C. (2014) Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression. *Nature* 513, 251–255.
- (44) Zheng, L., Roeder, R. G., and Luo, Y. (2003) S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114, 255–266.
- (45) van der Knaap, J. A., and Verrjzer, C. P. (2016) Undercover: Gene control by metabolites and metabolic enzymes. *Genes Dev.* 30, 2345–2369.
- (46) Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K., and Lu, Z. (2011) Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 478, 118–122.
- (47) Pike, A. C. W. (2006) Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 1–14.
- (48) Savkur, R. S., and Burris, T. P. (2004) The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J. Pept. Res.* 63, 207–212.
- (49) Ambrosio, A. L. B., Dias, S. M. G., Polikarpov, I., Zurier, R. B., Burstein, S. H., and Garratt, R. C. (2007) Ajulemic Acid, a Synthetic Nonpsychoactive Cannabinoid Acid, Bound to the Ligand Binding Domain of the Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . *J. Biol. Chem.* 282, 18625–18633.
- (50) Hughes, T. S., Chalmers, M. J., Novick, S., Kuruvilla, D. S., Chang, M. R., Kamenicka, T. M., Rance, M., Johnson, B. A., Burris, T. P., Griffin, P. R., and Kojetin, D. J. (2012) Ligand and Receptor Dynamics Contribute to the Mechanism of Graded PPAR γ Agonism. *Structure* 20, 139–150.
- (51) Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J.-Å., and Carlquist, M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753–758.
- (52) Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K., and Milburn, M. V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature* 395, 137–143.
- (53) Nooren, I. M. a. (2003) NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* 22, 3486–3492.
- (54) Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G., and Orengo, C. (2010) Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure* 18, 1233–1243.
- (55) Olalla, L., Gutiérrez, A., Campos, J. a, Khan, Z. U., Alonso, F. J., Segura, J. a, Márquez, J., and Aledo, J. C. (2002) Nuclear Localization of L-type Glutaminase in Mammalian Brain. *J. Biol. Chem.* 277, 38939–38944.
- (56) Gómez-Fabre, P. M., Aledo, J. C., Del Castillo-Olivares, A., Alonso, F. J., Núñez De Castro, I., Campos, J. a, and Márquez, J. (2000) Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochem. J.* 345 (Part 2), 365–375.

Anexo III. Artigo Científico

“GLS2 is protumorigenic in breast cancers.”



GLS2 is protumorigenic in breast cancers

Marília M. Dias^{1,2} · Douglas Adamoski^{1,2} · Larissa M. dos Reis^{1,2} · Caroline F. R. Ascensão^{1,2} · Krishina R. S. de Oliveira^{1,2} · Ana Carolina Paschoalini Mafra^{1,2} · Alliny Cristiny da Silva Bastos^{1,2} · Melissa Quintero¹ · Carolina de G. Cassago¹ · Igor M. Ferreira¹ · Carlos H. V. Fidelis³ · Silvana A. Rocco¹ · Marcio Chaim Bajgelman¹ · Zachary Stine⁴ · Ioana Berindan-Neagoe^{5,6,7} · George A. Calin^{8,9} · Andre Luis Berteli Ambrosio^{1,10} · Sandra Martha Gomes Dias¹

Received: 17 October 2018 / Revised: 21 August 2019 / Accepted: 26 August 2019
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2019

Abstract

Many types of cancers have a well-established dependence on glutamine metabolism to support survival and growth, a process linked to glutaminase 1 (GLS) isoforms. Conversely, GLS2 variants often have tumor-suppressing activity. Triple-negative (TN) breast cancer (testing negative for estrogen, progesterone, and Her2 receptors) has elevated GLS protein levels and reportedly depends on exogenous glutamine and GLS activity for survival. Despite having high GLS levels, we verified that several breast cancer cells (including TN cells) express endogenous GLS2, defying its role as a bona fide tumor suppressor. Moreover, ectopic *GLS2* expression rescued cell proliferation, TCA anaplerosis, redox balance, and mitochondrial function after GLS inhibition by the small molecule currently in clinical trials CB-839 or *GLS* knockdown of GLS-dependent cell lines. In several cell lines, *GLS2* knockdown decreased cell proliferation and glutamine-linked metabolic phenotypes. Strikingly, long-term treatment of TN cells with another GLS-exclusive inhibitor bis-2'-(5-phenylacetamide-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES) selected for a drug-resistant population with increased endogenous GLS2 and restored proliferative capacity. GLS2 was linked to enhanced in vitro cell migration and invasion, mesenchymal markers (through the ERK-ZEB1-vimentin axis under certain conditions) and in vivo lung metastasis. Of concern, *GLS2* amplification or overexpression is linked to an overall, disease-free and distant metastasis-free worse survival prognosis in breast cancer. Altogether, these data establish an unforeseen role of GLS2 in sustaining tumor proliferation and underlying metastasis in breast cancer and provide an initial framework for exploring GLS2 as a novel therapeutic target.

Introduction

Glutamine metabolism is a well-known target for slowing cancer development, as both glutamine uptake and the rate

of glutaminolysis are increased in tumors. Glutamate (the product of glutamine catalysis by the glutaminases) is a key metabolite for mitochondrial bioenergetics and biosynthetic pathways, especially in cancer cells. Glutamate feeds into the tricarboxylic acid cycle (TCA) as α -ketoglutarate and also participates in cell antioxidant defense via glutathione (GSH) synthesis. The *Glutaminase 1* (*GLS*) gene under the control of the MYC oncogene [1] gives rise to the splicing variants Glutaminase C (GAC) and Kidney-type Glutaminase (KGA) [2], which are collectively referred to as GLS. GLS supplies the increased metabolic needs of tumors, and the suppression of *GLS* expression or enzymatic activity produces antagonistic effects across a variety of tumor types, including lymphoma, glioma, breast, pancreatic, nonsmall cell lung, and renal cancers [3–10]. High-grade and metastatic breast cancers, especially the triple negative (TN) subtype, are highly glutaminolytic, a phenotype that has been associated with elevated *GLS* expression [10–12]. In recent years, interest in glutamine metabolism as a

These authors contributed equally: Marília M. Dias, Douglas Adamoski, Larissa M. dos Reis, Caroline F.R. Ascensão

These authors jointly supervised: Andre L.B. Ambrosio, Sandra M.G. Dias

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41388-019-1007-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Andre Luis Berteli Ambrosio
andre@ifsc.usp.br

✉ Sandra Martha Gomes Dias
sandra.dias@lnbio.cnpem.br

Extended author information available on the last page of the article.

possible target for anticancer agents has increased. Notably, the GLS inhibitor CB-839 [13] is currently in clinical trials in the USA for solid (including TN) and hematological tumors.

In addition, the literature shows that glutamine metabolism and reactive oxygen species (ROS) homeostasis driven by the p53-inducible gene *Glutaminase 2 (GLS2)* are linked to a unique metabolic role in suppressing tumor growth [14, 15]. By using alternative transcription initiation sites, *GLS2* generates the isoforms Liver-type Glutaminase (LGA) and Glutaminase B (GAB) [16], which are collectively referred to as GLS2. Glioblastomas [17] and hepatocellular carcinomas (HCC) [18] with restored *GLS2* expression grow more slowly, as do colorectal and nonsmall cell lung carcinomas [15]. GLS is implicated in tumor metastasis [19], whereas *GLS2* decreases HCC cell invasiveness by counteracting the small GTPase Rac1 [20] and by binding and stabilizing Dicer to facilitate miR-34a maturation and Snail repression in a glutaminase activity-independent manner [21]. However, the high-risk group MYCN-amplified neuroblastoma tumor cells have higher *GLS2* expression levels and are particularly prone to apoptosis upon glutamine deprivation [22]. Therefore, whereas GLS isozymes are almost invariably prooncogenic and are thus a therapeutic target, *GLS2* displays a context-specific role for which functional and regulatory mechanisms have yet to be proposed.

In this paper, we evaluated whether *GLS2* was as a tumor suppressor in breast cancers. We discovered that *GLS2* could be detected in several breast cancer cell lines, and GLS inhibition of glutamine-addicted breast cancer cells lines with CB-839 could be rescued by *GLS2* expression. Expression of wild-type *GLS2* (but not the catalytically inactive S219A mutant) in a TN cell line recovered the cells' proliferation, colony formation capability, glutamine metabolism, cell energetics, redox balance, and biosynthetic capacity after *GLS* knockdown. Accordingly, *GLS2* knockdown decreased the cell growth and glutamine metabolism-related cell phenotype. Of concern, we demonstrate that the long-term specific inhibition of GLS (with BPTES (24)) selected for a population with a marked increase in endogenous *GLS2* levels and restored growth capacity. *GLS2* expression increased the epithelial-to-mesenchymal (EMT) markers vimentin and actin-based stress fibers, as well as in vitro migration and invasion, a phenomenon controlled, in certain cell lines and tumors, by ERK and the transcription factor ZEB1. Accordingly, *GLS2* expression combined with *GLS* knockdown dramatically increased the number of metastatic foci in the lungs of mice injected in the flanks with breast cancer cells. Importantly, higher levels of *GLS2* in breast tumors is significantly linked to decreased prospects for overall and disease-free patient survival. Our findings raise concerns about

therapeutic approaches that exclusively target GLS because cells can adapt by expressing protumorigenic *GLS2*.

Results

***GLS2* sustains the growth of GLS-dependent breast cancer cells after CB-839 treatment or *GLS* knockdown**

Since *GLS2* has been proposed as a tumor suppressor [14, 15], we investigated the endogenous levels of *GLS2* in a panel of 18 breast cancer cell lines (4 non-TN and 14 TN [23]) and the nontumorigenic epithelial cell line MCF10A. We detected *GLS2* protein (Fig. 1a) (and mRNA, Supplementary Fig. 1a) in all cell lines evaluated. Curiously, most of the cell lines that expressed *GLS2* also expressed GLS, with the non-TN having the lowest overall glutaminase levels.

By using the clinically relevant GLS inhibitor CB-839 [13] we evaluated the GLS-inhibition sensitivity of eight cell lines: four GLS-dependent TN (MDA-MB-231, HCC1806, BT549, and Hs578t), the not dependent on glutaminase activity TN cell line MDA-MB-453 [24], and three non-GLS dependent non-TN cell lines (MCF7, SKBR3, and T47d). As expected, the TN cell lines were more sensitive to CB-839 treatment (and had higher glutaminase activity and sensitivity to glutamine withdrawal, Supplementary Fig. 1b) than the non-TN ones, with the exception of the MDA-MB-453 (Fig. 1b). However, instead of acting as a tumor suppressor, ectopic expression of *GLS2* (GAB isoform, herein referred generically as *GLS2*) (as confirmed by western blotting, Supplementary Fig. 1c) recovered cell death or the proliferation inhibition of GLS-dependent cells treated with CB-839 (Fig. 1c). Coherent with *GLS2* being important for cell growth, *GLS2* knockdown in five cell lines (ZR-75-1, MCF7, T47d, DU4475, and MDA-MB-468) decreased cell proliferation compared with the control cells (Supplementary Fig. 1d) as well as the colony formation of ZR-75-1 cells (Supplementary Fig. 1e).

We then asked whether *GLS2* expression can rescue MDA-MB-231 cell (the cell line most sensitive to CB-839 treatment, Fig. 1b) growth after *GLS* knockdown. As expected, cells harboring *GLS* knockdown (shGLS, Supplementary Fig. 2a, b) proliferated more slowly than did the control cells (shGFP) under both low- and high-serum conditions (Fig. 2a) and formed fewer colonies in a clonogenic assay (Fig. 2b). Supplementation with 2-methyl- α -ketoglutarate (DM- α KG) rescued the proliferation of shGLS cells, implying that the TCA cycle is key to the impairment of shGLS cell growth (Fig. 2a, b). Ectopic expression of mitochondrial *GLS2* (Supplementary Fig. 2a–c), but not the catalytically impaired *GLS2*.S219A mutant, restored the levels of mitochondrial glutaminase activity

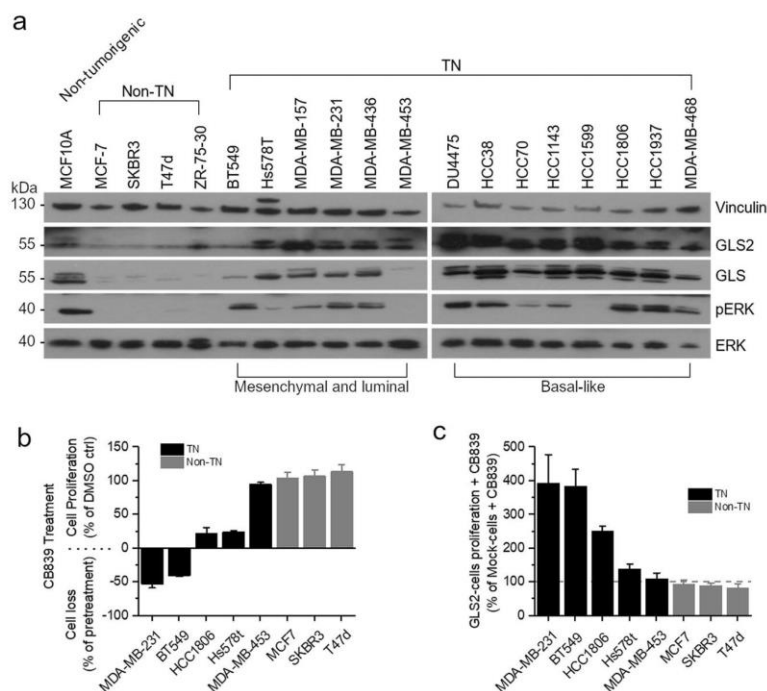


Fig. 1 GLS2 can be detected in breast cancer cells and rescues from GLS inhibition. **a** Endogenous GLS2, GLS, ERK, and pERK levels as evaluated by western blotting in a panel of breast cancer cell lines. The displayed anti-GLS2, anti-vinculin, and anti-pERK were blotted from the same membrane (and have the same exposure times). Using the same samples, a second membrane was used to blot anti-GLS and anti-ERK. **b** TN cell lines are more sensitive than non-TN ones to CB-839 treatment. **c** Ectopic *GLS2* expression (GLS2-cells) in eight different

cell lines after GLS inhibition with CB-839 recovers cell proliferation in the GLS-addicted TN cell lines MDA-MB-231, HCC1806, BT549, and Hs578t. CB-839 treatment (1 μ M) either promoted the loss or decreased the proliferation of four TN cell lines (the exception being MDA-MB-453) and only slightly affected the growth of non-TN cells. Graphs **b**, **c** represent the mean $\pm$ standard deviation (SD) of $n = 4$ biological replicates

(Supplementary Fig. 2d), proliferation status (Fig. 2a), and clonogenic potential (Fig. 2b) to those levels observed in cells expressing *GLS*. In conclusion, *GLS2* sustains the growth of breast cancers cells.

GLS2 mimics GLS in its effects on TCA anaplerosis, cell energetics, and redox balance in breast cancer cells

We next investigated the effects of both *GLS* silencing and *GLS2* expression on the homeostasis of the TCA cycle in the glutamine-dependent MDA-MB-231 cell line by quantifying the overall pools of key metabolic intermediates that function as anaplerotic branches, using gas chromatography followed by mass spectrometry. We verified an expected decrease in glutamate (the first compound in line after glutamine metabolism), as well as malate and citrate (a key metabolite for lipid synthesis) levels after *GLS* knockdown, which was totally or partially recovered by wild-type (but not the S219A mutant) *GLS2* (Fig. 3a).

These results demonstrate that *GLS* knockdown affected the glutamine-dependent anaplerotic flux, which, in turn, affected the overall NADH/NAD⁺ ratio (Supplementary Fig. 2e). Consequently, both basal and uncoupled rates of oxygen consumption were also lowered (nonsignificant, Supplementary Fig. 2f), inducing phenotypic changes, as assessed by the mitochondrial fragmentation texture index (Fig. 3b). The increased fragmentation is suggested to be a result of oxidative stress induction, as confirmed by the fluorescent protein probe pMitoTimer (Fig. 3c). Consequently, ATP production was also compromised (Supplementary Fig. 2g). Cells expressing ectopic *GLS2* (but not the *GLS2*.S219A mutant) regained all the biosynthetic and energy status markers (Fig. 3a, b, Supplementary Fig. 2e–g).

GLS silencing induced generalized oxidative stress in cells because of the decreased intracellular levels of glutamate (Fig. 3a), which also affected total GSH (Fig. 4a, on the left). This condition also decreased the reduced to oxidized GSH and NADP ratios (Fig. 4a, on the right, and Fig. 4b,

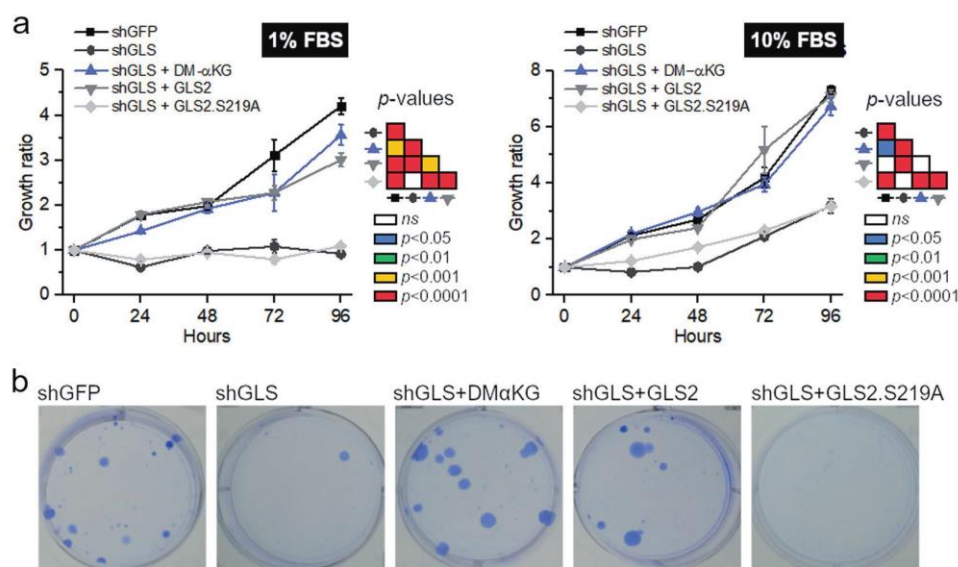


Fig. 2 GLS2 rescues cell proliferation and colony formation. *GLS* knockdown decreases cell proliferation in both 10% (graphic on the right) and 1% (graphic on the left) FBS-supplemented medium (**a**) and the clonogenic potential (**b**) of MDA-MB-231 cells, which was rescued by the ectopic expression of wild-type (WT) *GLS2* (but not the catalytically inactive mutant S219A) or the addition of 5 mM 2-

methyl- α -ketoglutarate (DM- α KG). Graphs on **a** represent the mean $\pm$ standard deviation (SD) of $n = 4$ biological replicates. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA (Analysis Of Variance) with post hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference) tests; ns non-significant

respectively) and increased the level of ROS (Fig. 4c). As above, ectopic wild-type *GLS2* (but not the S219A mutant) rescued the phenotype (Fig. 4a–c). Knocking down *GLS2* in ZR-75-1 cells (Supplementary Fig. 3a) led to extracellular glutamine accumulation (Supplementary Fig. 3b), lower ATP levels (Supplementary Fig. 3c), a lower NADH/NAD⁺ ratio (Supplementary Fig. 3d), and increased oxidative stress (Supplementary Fig. 3e). Taken together, these data show that glutaminase activity is important to provide the biosynthetic and energetic needs as well as the cell redox homeostasis of highly glutaminolytic cells, a function exerted by either *GLS* or *GLS2*.

GLS2-expressing cells have differential sensitivity to glucose, glutamine, and asparagine deprivation

To determine whether the different glutaminases convey differential nutrient dependence for the cells, we analyzed their need for glucose, glutamine, and asparagine to support cell growth. Both *GLS* (shGFP)- and *GLS2*-expressing cells had a higher requirement for glucose, as dictated by their higher sensitivity to glucose withdrawal for growth (Supplementary Fig. 4a) and higher 6-NBDG (a glucose-based fluorescent probe) uptake (Supplementary Fig. 4b). Furthermore, the subcell line expressing wild-type *GLS2* (shGLS + *GLS2*) required more glutamine for growth than did the other subcell lines (Supplementary Fig. 4c). This

observation is likely linked to the fact that, although both the control and shGLS + *GLS2* cells consumed similar amounts of glutamine (Supplementary Fig. 4d, left panel), the cells expressing *GLS2* secreted less glutamate (Supplementary Fig. 4d, right panel), confirming their greater dependence on glutaminolytic carbons. Asparagine is a conditionally essential amino acid, and asparagine dependence is well documented for leukemias [25] and solid tumors [26–28]. Because cells expressing ectopic wild-type (and mutated) *GLS2* exhibited decreased asparagine synthetase (*ASNS*) expression (Supplementary Fig. 4e), we investigated whether MDA-MB-231 cells grow differentially on complete media and media depleted in aspartate or asparagine. The depletion of asparagine (but not aspartate) decreased the growth of *GLS2*-expressing cells (Supplementary Fig. 4f). In summary, *GLS2* conveys a differential utilization of glutamine carbons in the TCA cycle and an auxotrophic dependence on asparagine, suggesting that alternative routes are activated to meet the metabolic needs of the cycle.

Long-term BPTES treatment selected for *GLS2*-expressing, inhibitor-resistant cells

The effect of BPTES and CB-839 on in vitro and in vivo cell growth has been evaluated by several groups [29]. However, no study has investigated the long-term effect of

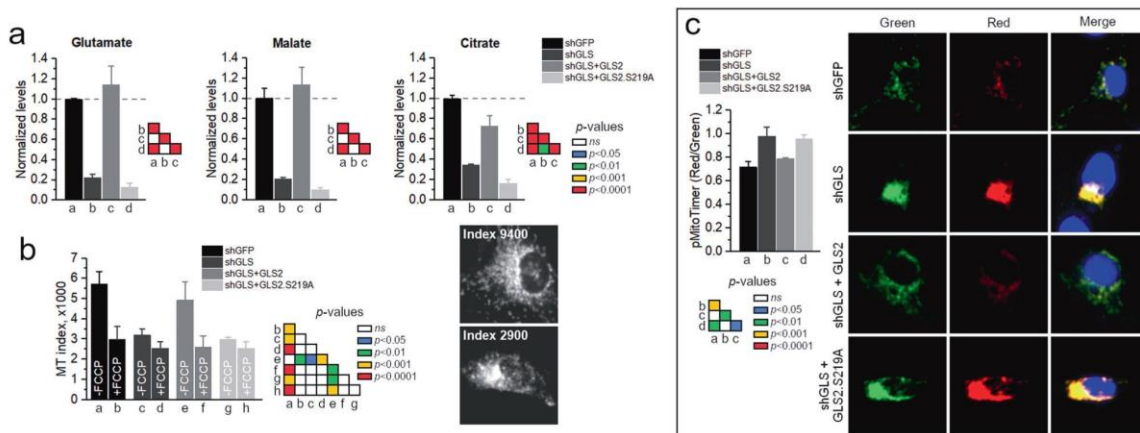


Fig. 3 *GLS2* expression recovers TCA anaplerosis and cell energetics after *GLS* knockdown. **a** GC-MS overall pools of glutamate (graphic on the left), malate (graphic in the center), and citrate (graphic on the right) normalized to the control (shGFP) show that *GLS2* expression recovers the metabolite level after *GLS* knockdown in MDA-MB-231 cells. *GLS2* expression reestablishes mitochondrial activity as measured by a texture index related to fragmentation (inactivation) status (the higher, less fragmented, and more active mitochondria—see inset pictures) (**b**), and pMitoTimer protein probe red/green fluorescence

ratio (defective mitochondria present in an oxidative environment, which causes the probe to shift to red fluorescence emission) (**c**). Confocal fluorescence microscopy images depicting red/green signal superposition (**c**, on the right). Graphs on **a** represent the mean $\pm$ standard deviation (SD) of $n = 4$ biological replicates. Graphs on **b**, **c** represent mean $\pm$ SD of $n = 3$ biological replicates. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA with post hoc Tukey HSD tests; ns non-significant

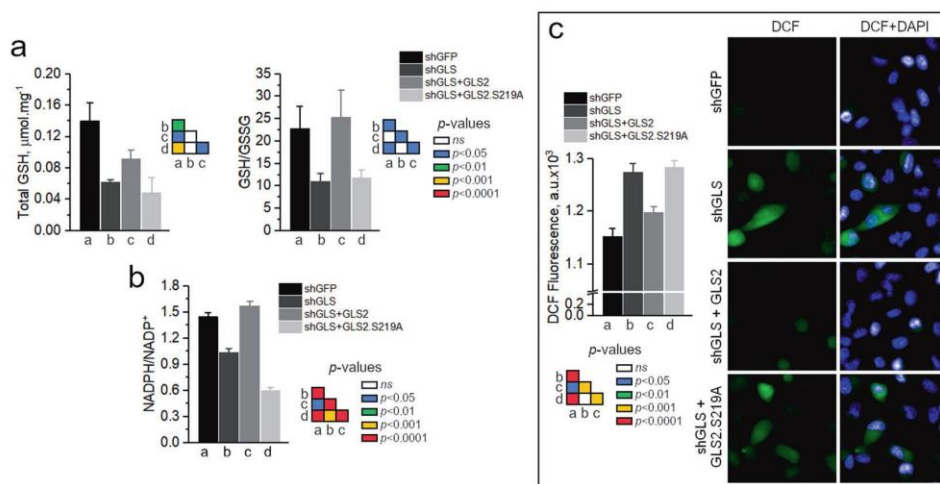


Fig. 4 *GLS2* expression recovers redox balance after *GLS* knockdown. Low *GLS* expression decreases the total glutathione levels (**a**, on the left), the GSH/GSSG (**a**, on the right), and NADPH/NADP⁺ ratios (**b**) and increases the total ROS levels (**c**). Fluorescence microscopy images depicting nuclei stained by DAPI (blue) and DCF fluorescent signal (green) (**c**, on the right). Graphs on **a**, **b** represent mean $\pm$ SD of

$n = 3$ biological replicates. On **c**, graph represent mean $\pm$ SD of $n = 1$ biological replicate, containing 5906, 2240, 10801, and 3067 individually analyzed cells of shGFP, shGLS, shGLS + GLS2, and shGLS + GLS2S219A, respectively. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA with post hoc Tukey HSD tests; ns non-significant

this treatment in breast cancer, especially regarding the metabolic adaptation and drug-resistance mechanism. We investigated whether the long-term BPTES treatment of the TN MDA-MB-231 cell line could evoke changes in the endogenous glutaminase levels that would support survival. While the GAC and KGA mRNA levels showed a 2–3-fold

increase after 4 days of treatment with 2 μM BPTES, the *GLS2* level increased ~ninefold during the same period (Supplementary Fig. 5a). In agreement, *GLS* knockdown led to an increased *GLS2* mRNA level in as early as 2 days and at least up to 7 days after viral transduction with a vector containing a shRNA against *GLS* (Supplementary

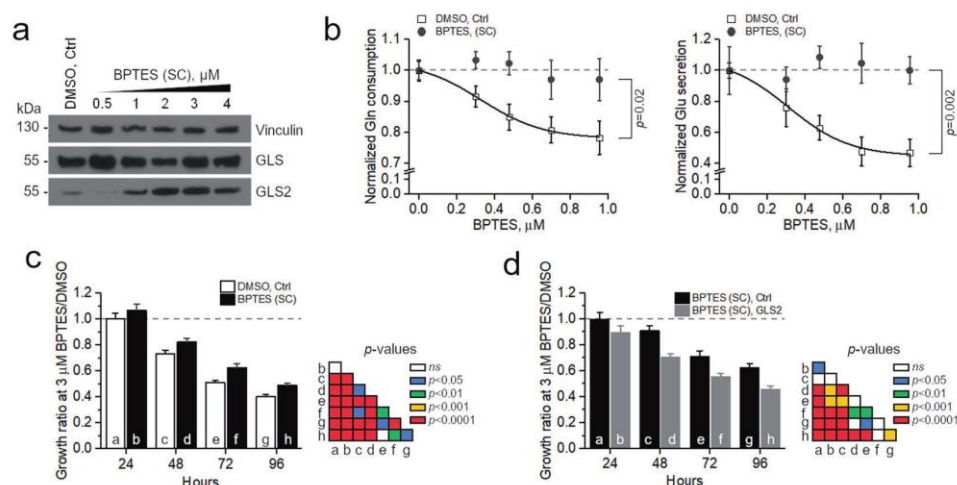


Fig. 5 BPTES-induced expression of endogenous GLS2. **a** Thirty days of treatment with 0.5–4 μM doses of BPTES led to the selection of surviving cells (SCs) with increased GLS2 protein levels compared to DMSO-treated cells. **b** DMSO-treated cells have IC₅₀ values for glutamine consumption (graphic on the left) and glutamate secretion (graphic on the right) rates of ~2 μM, whereas BPTES-treated SCs (the 3 μM dose assay) have IC₅₀ values greater than 8 μM. **c** BPTES-

treated SCs are less sensitive to the growth inhibition caused by BPTES. **d** GLS2 knockdown increases the BPTES growth sensitivity of SCs. Graphs in **b** represent the mean ± SD of *n* = 3 biological replicates. Student's *t* test was applied. In **c**, **d** the graphs represent the mean ± SD of *n* = 4 biological replicates. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA with post hoc Tukey HSD tests; ns non-significant

Fig. 5b). We then treated cells for a 30-day period with 0.5–4 μM BPTES and probed the pool of adapted surviving cells (SCs) for possible changes in GLS and GLS2 levels. Surprisingly, we found that the overall pool of SCs displayed increased levels of endogenous GLS2 protein (Fig. 5a), while no striking changes in GLS were found. Consequently, SCs were less sensitive to BPTES treatment, as indicated by glutamine consumption and glutamate secretion (Fig. 5b), as well as by the increased proliferation rates in the presence of BPTES (in comparison with DMSO-treated cells) (Fig. 5c). Finally, the knockdown of endogenous GLS2 in SCs (Supplementary Fig. 5c) increased their sensitivity to BPTES with respect to proliferation (Fig. 5d). Also, long-term treatment with CB-839 for 30 days slightly increased endogenous GLS2 mRNA and protein levels in MDA-MB-231 and MCF7 cell lines, but not in HCC1806 (Supplementary Fig. 6a, b, respectively). In summary, prolonged treatment of glutamine-dependent cells with a GLS-specific inhibitor led to long-term adaptation by increasing the levels of the GLS2 isozyme.

Increased expression of GLS2 increases mortality risk in breast cancer patients and lung metastasis in an in vivo assay

Since GLS2 presented a clear protumorigenic effect on breast cancer cells, we looked for gene alterations in the genomic and transcriptomic data from breast cancer tissues available from The Cancer Genome Atlas (TCGA) [30]

through the cBioPortal web-based program (1093 patients of breast-invasive carcinoma). Our analysis revealed that a similar number of patient samples had amplification or increased mRNA levels (tumors with expression level below a Z-score of +2.5 were classified as “low” and those with expression higher than +2.5 were classified as “high”) of either *GLS* (5%) or *GLS2* (3%) (Fig. 6a). Astonishingly, there was a clear association between the amplification and increased expression (34 cases) of *GLS2* and a decreased overall (1090 cases), disease-free (DSF, 998 cases), and distant metastasis-free survival (DMSF, 1028 cases) among afflicted patients (Fig. 6b, left, middle and right panels, respectively). The overall and disease-free survival estimates for the cases with high (and amplified) *GLS* were deemed statistically indistinguishable from those with low *GLS* (Supplementary Fig. 7a, b). The same conclusions were achieved for the *GLS2* gene by analyzing data from a second breast cancer cohort publicly available from the International Cancer Genome Consortium (ICGC, 50 cases) (Supplementary Fig. 7c, d). Since TCGA provides proteomic data (from mass spectrometry) for some of the tumors, we used the data to evaluate the correlation among the mRNA and protein levels (by using GLS2-specific peptides) and found a positive Pearson correlation of 0.63 (Supplementary Fig. 7e). Importantly, we compared *GLS2* expression in 71 normal versus 995 tumor breast tissues from the TCGA and found that in the high *GLS2* group, *GLS2* expression is higher than in the normal tissues (Supplementary Fig. 7f). In agreement, *GLS2* expression was confirmed to be higher in

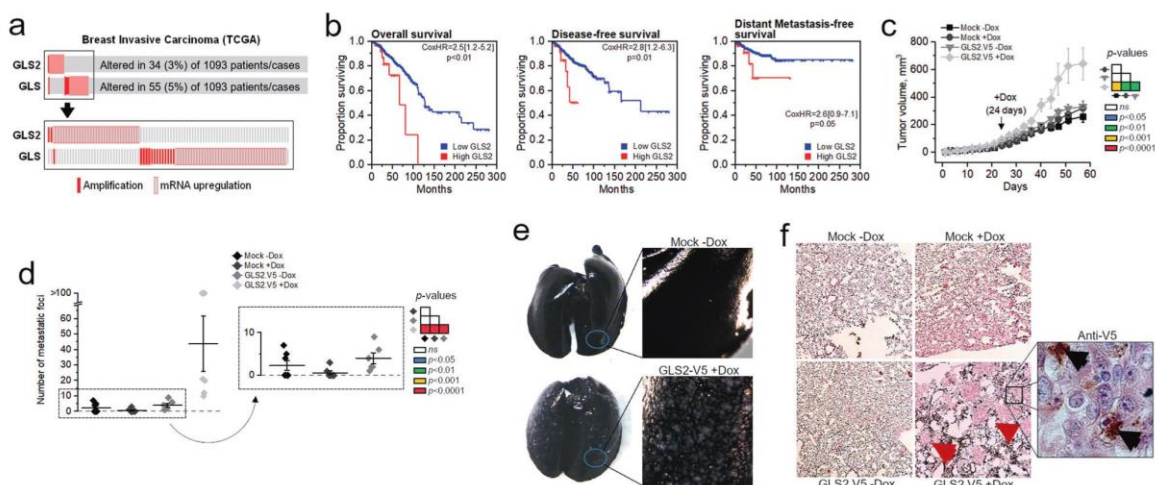


Fig. 6 High *GLS2* expression is linked to a worse prognosis in breast cancer patients and an increase in in vivo lung metastasis in a mouse model. **a** *GLS2* is amplified or more highly expressed (Z-score of +2.5) in 3% (compared with 5% for *GLS*) of 1093 Breast Invasive Carcinoma cases from the TCGA database. Curiously, only one case displayed simultaneous *GLS* and *GLS2* amplification (or increased gene expression), suggesting a strong tendency toward the mutual exclusivity of these alterations (log odds ratio of −0.566). Kaplan–Meier analysis showed that overall, disease-free and distant metastasis-free (**b**, left, middle and right, respectively) survival time significantly decreases in patients with tumors exhibiting *GLS2* alterations. Primary tumor volume (**c**) and lung metastasis foci (**d**) are

dramatically enhanced in *GLS2*-expressing cells when *GLS* is knocked down. Inset in **d** displays Mock (−Dox), Mock (+Dox), and *GLS2* (−Dox) groups. **e** *GLS2* (+Dox) Indian ink-stained lungs display more metastatic foci (white dots) than Mock (−Dox) lungs. **f** Immunohistochemistry of hematoxylin and eosin-counterstained sections show *GLS2* in metastasis foci. Red arrowheads point to lung metastasis; black arrowheads denote *GLS2*-V5-expressing cells in the inset. In **c**, the primary tumors of seven animals are displayed, and in **d**, the lungs of 6–7 animals were analyzed per group. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA with post hoc Tukey HSD tests; ns non-significant

tumors (45 samples) than in normal tissues (15 samples) by qPCR in a third cohort of breast cancer patients (Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. 7g).

It is well known that a patient's higher death risk is usually related to the increased invasion and metastasis capability of a primary tumor [31]. Indeed, as shown above, in both TCGA and ICGC cohorts, higher *GLS2* expression (and amplification) implied in increased metastasis among the afflicted patients, which decreased their chance of survival. We evaluated the differentially expressed gene list (FDR < 0.05, −2 ≥ fold change ≥ +2) between the high and low *GLS2* expression groups. Process networks, such as “Proteolysis_Connective tissue degradation”, “Cytoskeleton_Intermediate filaments”, and “Proteolysis_ECM remodeling”, were among the top ten most affected ones (*p*-value between 1.466e^{−8} and 2.042e^{−6}) (Supplementary Table S2), suggesting that cell invasion capacity could be a feature of high *GLS2* expression group.

Intrigued by these results, we evaluated the influence of *GLS2* in in vitro migration and invasion assays. *GLS2* expression increased the migration and invasion capacity of MCF7 cells (Supplementary Fig. 8a–c) and the invasion of MDA-MB-231 and Hs578t cells (Supplementary Fig. 8d). We then evaluated the impact of *GLS2* expression on in vivo metastasis. *GLS* has previously been implicated in

in vivo tumor metastasis [19]; thus, to minimize the effect of *GLS*, we knocked down this gene in our model. We injected Mock (stably transduced with empty vector) or *GLS2*_V5-expressing MDA-MB-231 cells (both stably transduced with a vector expressing doxycycline (Dox)-inducible shRNA against the *GLS*) into the lateral flanks of NOD/SCID mice and allowed the tumors to grow to approximately 40 mm³. At this point, the expression of sh*GLS* was induced by water-administered Dox. After 33 days of Dox treatment, the mice were sacrificed, and the lungs were evaluated for the number of metastatic foci. Surprisingly, while Dox treatment efficiently induced *GLS* knockdown and the *GLS2* level was maintained in the primary tumors (Supplementary Fig. 9a, b), there was no significant difference in the size of the primary tumors in the animals injected with Mock (−Dox) or Mock sh*GLS* (+Dox) (Fig. 6c). *GLS2* expression in the presence of *GLS* slightly (although not significantly) increased the size of the primary tumors (Fig. 6c) and the number of apparent metastatic foci in the lungs compared to Mock (−Dox) (Fig. 6d). Astonishingly, *GLS2* expression (concomitant with *GLS* knockdown) dramatically increased the volume of the primary tumors (Fig. 6c), as well as the number of lung metastatic foci (from 2 to >100 compared with 1–9 foci found in the lungs of the other three groups), which were

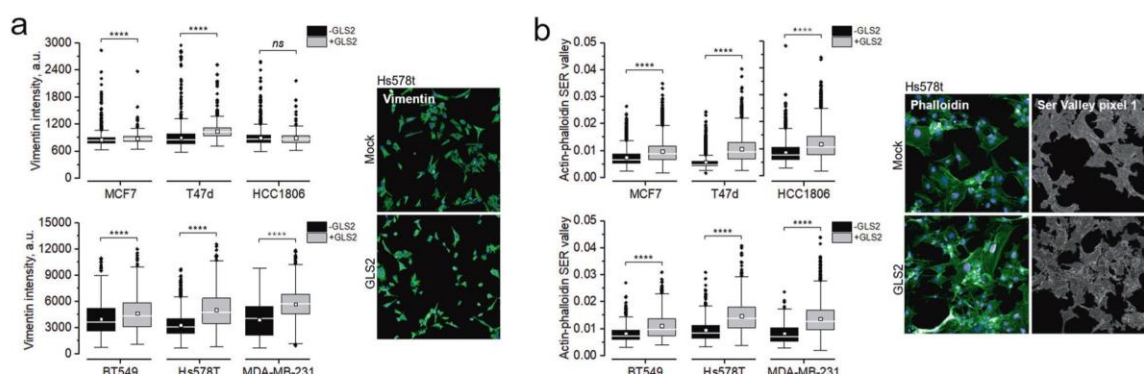


Fig. 7 *GLS2* expression increased mesenchymal markers. *GLS2* expression enhances the immunofluorescence signal of the EMT markers vimentin (**a**, representative image for Hs578t) and actin-formed stress fibers (**b**, as identified by phalloidin staining and SER Valley texture quantification, representative image for Hs578t) of the six breast cancer cell lines evaluated. We tested cells from the luminal, estrogen receptor-positive, and more epithelial type (MCF7 and T47d), as well as more aggressive, basal, and TN cell lines (HCC1806, BT549, Hs578t, and MDA-MB-231). Actin-stress fibers were evaluated by phalloidin stain and an image-based texture quantification called SER Valley [53]. In **a**, box-plot of $n = 1$ biological replicate,

containing 8119/2082 cells (MCF7, $-GLS2/+GLS2$), 3724/2121 cells (T47d, $-GLS2/+GLS2$), 5716/680 cells (HCC1806, $-GLS2/+GLS2$), 1137/2177 cells (BT549, $-GLS2/+GLS2$), 4382/2567 cells (Hs578t, $-GLS2/+GLS2$), and 693/6215 cells (MDA-MB-231, $-GLS2/+GLS2$). In **b**, box-plot of $n = 1$ biological replicate, containing 5726/5989 cells (MCF7, $-GLS2/+GLS2$), 1711/2084 cells (T47d, $-GLS2/+GLS2$), 5726/5989 cells (HCC1806, $-GLS2/+GLS2$), 1157/5576 cells (BT549, $-GLS2/+GLS2$), 933/1964 cells (Hs578t, $-GLS2/+GLS2$), and 380/5974 cells (MDA-MB-231, $-GLS2/+GLS2$). Welch's unequal variances *t*-test was applied; **** $p < 0.001$

also expressing *GLS2* (Fig. 6d–f). Not surprisingly, the transcriptomic data from seven paired primary/metastatic sites available from the TCGA cohort revealed that, while 5 out of 7 samples presented downregulation of the *GLS* level, also 5 out of the 7 presented the opposite trend for the *GLS2* level; in three samples, the downregulation of *GLS* was accompanied by the upregulation of *GLS2* (Supplementary Fig. 7h, arrow marked samples). Our results demonstrate that *GLS2* promotes in vivo lung tumor metastasis in a xenograft model. In addition, the tumor patient analysis indicates that higher levels of *GLS2* are associated with a poor prognosis for breast cancer patients.

ERK1/2 signaling is downstream of *GLS2* invasion and growth-promoting capabilities

EMT is a complex process, in which epithelial cells acquire the characteristics of invasive mesenchymal cells, such as increased expression of a type III intermediate filament called vimentin. The expression of vimentin in breast cancer cells increases cell stiffness, cell motility, and directional migration and reorients microtubule polarity to form actin-based stress fibers [32]. To determine whether *GLS2* can enhance the mesenchymal characteristics of different breast cancer cells, we evaluated the gain (or enhancement) of the markers vimentin and actin-based stress fibers in six cell lines upon *GLS2* expression. In all tested cell lines, *GLS2* expression increased the vimentin immunofluorescent signal (with the exception of HCC1806) (Fig. 7a) and actin-based

stress fiber formation (Fig. 7b). Indeed, while MCF7 Mock cells displayed the classic “cobble-stone” morphology that is characteristic of breast cancer epithelial cells, *GLS2* expression altered cells toward a more elongated morphology characteristic of mesenchymal state (Supplementary Fig. 8e). Curiously, in MDA-MB-231 *GLS2*-V5 (+Dox), the condition that most generated lung metastatic foci in the mice model (Fig. 6d), had the higher in vitro vimentin levels compared to the other treatments (Supplementary Fig. 10a); the same result was obtained when cells were treated with CB-839 (combined to *GLS*-V5 expression) instead of having *GLS* knocked down (Supplementary Fig. 10b). Finally, the 30 days treatment of MDA-MB-231 with CB-839 induced both the expression of endogenous *GLS2* and the increase in vimentin (Supplementary Fig. 6b).

ERK signaling is required to induce EMT through the upregulation of transcription factors and master regulators of this process, such as ZEB1 [33]. ZEB plays an important role in the EMT of breast tumors [34, 35]. We then wondered whether cell lines with higher *GLS2* protein levels had higher ERK phosphorylation levels. Indeed, we found a positive Pearson correlation (0.62, $p = 0.00454$) between *GLS2* and ERK phosphorylation on Thr202/Tyr204 (pERK) levels as calculated from the western blotting results of a panel of breast cancer cell lines (Fig. 1a and Supplementary Fig. 11a). We have also evaluated the correlation between *GLS2* transcript levels and an ERK activation score developed by us in 24 publicly available breast cancer data set (including the TCGA one, totalizing 14,287

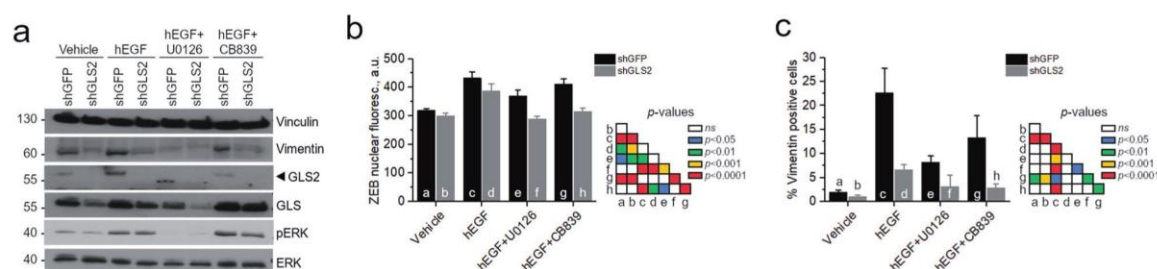


Fig. 8 *GLS2* expression increased ERK phosphorylation, ZEB1 and vimentin levels. **a** EGF treatment in MDA-MB-468 increased ERK phosphorylation on the Thr202/Tyr204 residues, which was counteracted by *GLS2* knockdown and/or Mek1/2 inhibition with U0126. Vimentin levels accompanied ERK phosphorylation levels. CB-839 restored GLS levels, confirming *GLS2* role on ERK phosphorylation, and vimentin levels. The displayed anti-GLS and anti-vinculin were blotted on the same membrane, and anti-GLS2 and anti-ERK were blotted on a second membrane prepared with the same samples. Anti-pERK was blotted on a third membrane using the same samples. Of

note, ERK inhibition decreases overall *GLS2* levels, for reasons we do not understand (arrowhead indicates the position of the *GLS2* band). **b** ZEB1 nuclear immunofluorescence signal was quantified from individual cells and average signal displayed. **c** Percentage of vimentin-positive cells was determined by immunofluorescence using as a threshold the average signal measured in the control cells (shGFP without EGF). In **b**, **c** the mean $\pm$ SD of $n = 3$ biological replicates. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA with post hoc Tukey HSD tests; ns non-significant

tumors). We found a positive correlation in 19 data sets, from which ten had p -values < 0.05 ; negative correlations were statistically nonsignificant (p -value ≥ 0.05) (Supplementary Tables S3–S5 and Supplementary Fig. 12a–d). In agreement, ectopic expression of *GLS2* in HCC1806 and Hs578t cells (but not MDA-MB-231, a cell line with highly activated ERK [36]) increased pERK levels (Supplementary Fig. 11b). MDA-MB-468 is a cell line that expresses *GLS2*, displays epithelial features and lower invasive capability [37]; also, phenotypic changes associated with the ERK pathway activator epidermal growth factor (EGF)-induced EMT are well characterized in MDA-MB-468 and include changes in transcription factors and vimentin expression [38]. Therefore, we knocked down *GLS2* in MDA-MB-468 and evaluated the effect on ERK phosphorylation, ZEB1 and vimentin, in the presence or absence of EGF. Not surprisingly, EGF treatment induced pERK, which also responded to *GLS2* since *GLS2* knockdown led to a decrease in pERK (Fig. 8a). EGF induces ZEB1 [39] and vimentin [40], while ZEB1 by itself is a positive regulator of vimentin expression [41]. EGF treatment increased ZEB1 at protein (Fig. 8b and Supplementary Fig. 13a) and mRNA levels (Supplementary Fig. 13b) and vimentin protein levels (Fig. 8a, c and Supplementary Fig. 13c), which was counteracted by ERK inhibition with U0126 and/or *GLS2* knockdown (Fig. 8a–c). Since *GLS2* knockdown also affected GLS protein levels (Fig. 8a), we evaluated whether GLS inhibition by CB-839 could affect the ERK signaling pathway independently of *GLS2*. Firstly, control cells (shGFP) treated with EGF and CB-839 did not alter vimentin and pERK compared with shGFP treated only with EGF (Fig. 8a–c) showing that GLS inhibition, by itself, does not affect these proteins. Secondly, cells treated with EGF and CB-839 presented decreased

vimentin and ZEB1 protein levels under *GLS2* knockdown (shGLS2 compared with shGFP, Fig. 8a–c); in this case, interestingly, CB-839 restored GLS levels (a consequence of CB-839 treatment that we do not understand), confirming the specific role of *GLS2* on the EGF-ERK-ZEB1-vimentin axis.

We have also evaluated the impact of *GLS2* in ZEB1 total levels in another cell line, Hs578t. *GLS2* knockdown in Hs578t markedly decreased pERK and ZEB1 total levels (Supplementary Fig. 14a, b). CB-839, by its turn, increased pERK and ZEB1 levels, which paralleled to an increase in *GLS2* endogenous levels; as expected, *GLS2* knockdown decreased both pERK and ZEB1 (Supplementary Fig. 14b). In summary, knocking down *GLS2* in MDA-MB-468 and Hs578t decreased pERK and ZEB1 levels in a *GLS2*-dependent manner. Finally, ERK inhibition by U0126 (Supplementary Fig. 8a) decreased MCF7 migration (Supplementary Fig. 8b) (but not invasion, Supplementary Fig. 8c) induced by *GLS2* expression.

Aside from EMT-promoting properties, ERK signaling also has growth-promoting properties in cells [42]. Since *GLS2* is important for cell proliferation as demonstrated above, to verify the reliance on ERK for growth, *GLS2*-expressing MDA-MB-231 cells were treated with the MEK1/2 inhibitor PD98059 against a background of attenuated expression (shGLS) to remove any potential effect caused by GLS (Supplementary Fig. 11c). As expected, inhibiting ERK had a stronger effect on *GLS2*-driven cell proliferation (Supplementary Fig. 11c). Accordingly, DU4475 control cells (shGFP), which express endogenous *GLS2*, were more sensitive to PD98059 than the *GLS2*-knocked down cells (shGLS2) (Supplementary Fig. 11d). In summary, EGF stimulated ZEB1 and vimentin expression, which was dependent on *GLS2* and, in some cases, ERK

phosphorylation. ERK phosphorylation is also important for GLS2-driven cell proliferation.

Discussion

GLS or GLS2: is glutaminase activity all that matters?

In this work, we showed that GLS2 recovered the growth of glutamine-addicted cell lines after GLS inhibition. In agreement with our findings, a recent publication studying prostate cancer cells showed that both PC3 cell line and metastatic PC3M subcell line treated with CB-839 for 72 h responded by increasing GLS2 protein levels [43]. PC3M had lower GLS2 levels and was more susceptible to GLS inhibition than PC3 [43].

Further evaluation showed that *GLS2* expression, in addition to restoring in vitro proliferative capabilities after *GLS* knockdown, also rescued markers of oxidative balance, cell energetics, and biosynthetic status. Despite this effect, key differences in how GLS2-expressing cells utilize and process nutrients were revealed. Cells have active mechanisms to regulate the metabolism of glucose or glutamine, depending on their availability. Glucose flux into the hexosamine biosynthetic pathway to support surface receptor glycosylation can regulate the growth-factor-dependent uptake of glutamine [44]. Reciprocally, glutamine availability can modulate glucose uptake through the transcription factor MondoA [45]. We have shown that cells expressing either *GLS* or *GLS2* increased their utilization of (and growth dependence upon) glucose (in comparison to shGLS and shGLS.S219A cells). Curiously, cells with high glutaminase activity also captured more glutamine and, as a net result, exhibited increased glutamine levels compared with cells with low glutaminase (data not shown); this difference in glutamine intracellular content may be the driving force behind the higher glucose utilization of glutaminase-expressing cells. However, this possibility requires further proof.

Cells presenting either GLS or GLS2 showed differences in glutamine dependence. Although already highly dependent on glutamine, cells expressing *GLS2* relied even more on glutamine for growth. The presence of GLS2 did not impart higher glutamine uptake but rather less glutamate secretion, indicating a reduced waste of glutamine carbons. A direct consequence of such behavior may be that less glutamate secretion results in less cystine import (through the xCT antiporter [10]), which helps to explain the lower total GSH level (even though glutamate was replenished) and not total ROS restoration in *GLS2*-expressing cells compared with control *GLS*-expressing cells. However,

why GLS2-expressing cells require extra glutamine carbons remains to be answered.

Moreover, cells expressing GLS2 presented decreased *ASNS* expression. Consequently, asparagine withdrawal severely impaired cell growth. Curiously, recent work by Pavlova et al. showed that breast cancer cells use glutamine to synthesize asparagine (a pathway that involves the TCA cycle and *ASNS*), and suppressing glutamine from the medium rendered cells dependent on exogenous asparagine for growth [46]. Our data revealed that *GLS2* expression resulted in the dependence on asparagine for growth even in the presence of glutamine, likely due to decreased *ASNS* expression. The mechanism behind decreased *ASNS* expression remains to be discovered. These findings suggest an unforeseen opportunity for the treatment of high-GLS2-level tumors involving the inhibition of asparagine uptake transporters and/or extracellular asparagine depletion by asparaginase treatment.

Intriguingly, a principal component analysis (PCA) plot of ¹H-NMR metabolomics data (33 metabolites) showed that GLS2.S219A cells are clearly distinguishable from the other subcell lines (though highly similar to *GLS*-depleted cells) (Supplementary Fig. 15a and Supplementary Table S6), which reflects differences in their respective metabolomes. Notably, the metabolite pools from cells expressing either *GLS* (shGFP) or *GLS2* (shGLS + GLS2) are significantly different as revealed by the unsupervised pattern recognition found by PCA and the hierarchical cluster analysis dendrogram applied to a heatmap (Supplementary Fig. 15b). One hypothesis is that extra-glutaminolytic domains of glutaminase may affect cell metabolism in ways that have not yet been discovered, for instance, by promoting the direct interaction between GLS2 and other proteins, independently of its glutaminase activity.

The genetic background behind GLS2's protumorigenic role on breast cancer

The most well-documented cases, in which *GLS2* expression impaired tumor growth, either by itself or in synergy with *GLS* knockdown, occurred in hepatic and glial cells, which originally have high GLS2 levels in normal tissues [14, 15]. GLS2 may have antiproliferative properties associated with the ROS balance in organs, in which free radical-triggered tissue damage is an important driver of transformation. Indeed, a reduced ROS index ($O_2(-):H_2O_2$ ratio) is correlated with longer survival in glioma patients [47], and EGFR hyperactivation, an oncogenic pathway with a critical role in glioblastoma pathogenesis, leads to ROS accumulation and a reliance on DNA repair genes for survival [48].

p53 is important for GLS2-related decreased HCC cell migration and invasion [20]. Many of the tested breast cancer cell lines (with the exception of MCF7) have low p53 transcriptional activity (Supplementary Fig. 16), which may partially explain GLS2's proinvasive role. Another possibility is that GLS2's tumor suppressor or protooncogenic capacity is related to nonglutaminolytic function and potential tissue-specific protein–protein interactions. More recently, we showed that the GLS isoforms GAC and KGA bind and regulate the transcriptional activity of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma, a master regulator of several metabolic processes in cells that presents contextual tumor-suppressor or tumor promoting roles [49]. Our observations show that the long-term inhibition of GLS increases endogenous GLS2, which is puzzling from a mechanistic standpoint. In silico analysis of the region 500 bp to 3 kb upstream of the transcription initiation site in the promoter sequence indicated several potential GLS2-regulating TFs apart from p53 (Supplementary Fig. 17a–d). Among those TFs, some potentially oncogenic TF binding sites were detected (Supplementary Fig. 17b–d), but their role in GLS2 transcriptional activation requires further investigation.

Cells expressing *GLS2* injected into the flanks of NOD/SCID mice, an experimental setting recognizably harsh for spontaneous distant metastasis [50], when combined with attenuated levels of *GLS*, generated an astonishingly high number of metastatic foci (compared with the other three experimental groups), which were uncountable in many of the evaluated lungs. A recent study published that *GLS* is important for in vivo tumor metastasis and the growth of colon cancer cells [19]. The fact that GLS2 increased lung metastasis more significantly when *GLS* was knocked down shows that the effect was not due to GLS and, more importantly, that the enhancement of GLS2's prometastatic role depends on having a lower GLS level for reasons that deserve further investigation. The role of GLS2's glutaminase activity in this process was not evaluated and also warrants further studies.

We observed that *GLS2* expression enhanced the EMT markers vimentin and actin stress fibers in all tested cell lines, despite its hormonal receptor status, causing remarkable morphological changes toward mesenchymal traces in cells displaying epithelial features. The GLS2 protein levels had a positive Pearson correlation with the endogenous phosphorylation levels of ERK Thr202/Tyr204 in the tested cell lines; however, the ectopic expression or knockdown of GLS2 did not always enhance or decrease, respectively, pERK levels in all tested cell lines. Such lack of consistency may be due to the different levels of KRas (an upstream regulator of ERK) constitutive activation already described for different breast cancer cell lines [51]. Nonetheless, ERK inhibition affected the proliferation and migration commanded by GLS2. How

exactly GLS2 activates ERK-Zeb1-vimentin (Supplementary Fig. 18) and the universality of this axis in breast cancer requires further studies.

Finally, the description of GLS2 as a protooncogenic protein yields unique implications for the future development of small-molecule-oriented therapeutics targeting glutaminases in cancer. Recent work has revealed a series of alkyl benzoquinones that inhibit GAB more strongly than KGA and decrease in different carcinoma cell lines [52]. These findings corroborate our data and validate GLS2 as a potential anticancer target.

Materials and methods

Details regarding **cell biology, TCGA computational analysis, and functional studies** can be found in the Supplemental Information.

Acknowledgements This work was supported by the São Paulo State Research Foundation, FAPESP, under grants 2012/14298-9 (ALBA) and 2014/20673-2 (ALBA), 2014/15968-3 (SMGD), 2015/25832-4 (SMGD) and fellowships 2013/05668-0 (IMF) 2013/23510-4 (CFRA), 2012/11577-4 (MMD), 2014/18061-9 (LMR), 2014/17820-3 (DAM), 2016/06625-0 (ACPM), 2014/06512-6 (KRSO), 2011/10127-2 (CAGC), and 2012/09452-9 (MQE). We thank LNBio for financial support and access to all facilities (PBQT, LCCMI, LPP, LEC, LVV, and LIB). Data used in this publication were generated by the National Cancer Institute Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC). The results published here are in whole or part based upon data generated by the TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>. We thank Dr Alessandra Girasole for expert technical support. GAC is the Felix L. Haas Endowed Professor in Basic Science. Work in GAC's laboratory is supported by National Institutes of Health (NIH/NCATS) grant UH3TR00943-01 through the NIH Common Fund, Office of Strategic Coordination (OSC), the NCI grants 1R01 CA182905-01 and 1R01CA222007-01A1, an NIGMS 1R01GM122775-01 grant, a U54 grant #CA096297/CA096300 – UPR/MDACC Partnership for Excellence in Cancer Research 2016 Pilot Project, a Team DOD (CA160445P1) grant, a Chronic Lymphocytic Leukemia Moonshot Flagship project, a Sister Institution Network Fund (SINF) 2017 grant, and the Estate of C. G. Johnson, Jr.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, Lee Y-S, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009;458:762–5.
2. Elgadi KM, Meguid Ra, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms

- generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genom*. 1999;1:51–62.
3. Wang J-B Bin, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010;18:207–19.
 4. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res*. 2010;70:8981–7.
 5. Liu W, Le A, Hancock C, Lane AN, Dang CV, Fan TW-M, et al. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:8983–8.
 6. van den Heuvel APJ, Jing J, Wooster RF, Bachman KE. Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther*. 2012;13:1185–94.
 7. Yuneva MO, Fan TWM, Allen TD, Higashi RM, Ferraris DV, Tsukamoto T, et al. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab*. 2012;15:157–70.
 8. Son J, Lyssiotis Ca, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*. 2013;496:101–5.
 9. Gameiro PA, Yang J, Metelo AM, Pérez-Carro R, Baker R, Wang Z, et al. In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell Metab*. 2013;17:372–85.
 10. Timmerman LA, Holton T, Yuneva M, Louie RJ, Padró M, Daemen A, et al. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell*. 2013;24:450–65.
 11. Cassago A, Ferreira APS, Ferreira IM, Fornezari C, Gomes ERM, Greene KS, et al. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:1092–7.
 12. Kung HN, Marks JR, Chi JT. Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS Genet*. 2011;7:e1002229.
 13. Gross MI, Demno SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2014;13:890–901.
 14. Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and anti-oxidant function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:7455–60.
 15. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, et al. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:7461–6.
 16. Martín-Rufián M, Tosina M, Campos-Sandoval Ja, Manzanares E, Lobo C, Segura Ja, et al. Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcriptcanism. *PLoS ONE*. 2012;7:e38380.
 17. Szeliga M, Albrecht J. Opposing roles of glutaminase isoforms in determining glioblastoma cell phenotype. *Neurochem Int*. 2015;88:6–9.
 18. Liu J, Zhang C, Lin M, Zhu W, Liang Y, Hong X. Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K / AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5:2635–47.
 19. Lee SY, Jeon HM, Ju MK, Jeong EK, Kim CH, Park HG, et al. Dlx-2 and glutaminase upregulate epithelial-mesenchymal transition and glycolytic switch. *Oncotarget*. 2016;7:7925–39.
 20. Zhang C, Liu J, Zhao Y, Yue X, Zhu Y, Wang X, et al. Glutaminase 2 is a novel negative regulator of small GTPase Rac1 and mediates p53 function in suppressing metastasis. *Elife*. 2016;5:1–20.
 21. Kuo T, Chen C, Hua K, Yu P, Lee W. Glutaminase 2 stabilizes Dicer to repress Snail and metastasis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2016;383:1–13.
 22. Xiao D, Ren P, Su H, Yue M, Xiu R, Hu Y, et al. Myc promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2. *Oncotarget*. 2015;6:40655–66.
 23. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750–67.
 24. Lampa M, Arlt H, He T, Ospina B, Reeves J, Zhang B, et al. Glutaminase is essential for the growth of triple-negative breast cancer cells with a deregulated glutamine metabolism pathway and its suppression synergizes with mTOR inhibition. *PLoS ONE*. 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185092>.
 25. Ubuka T, Meister A. Studies on the utilization of asparagine by mouse leukemia cells. *J Natl Cancer Inst*. 1971;46:291–8.
 26. Lorenzi PL, Llamas J, Gunsior M, Ozbun L, Reinhold WC, Varma S, et al. Asparagine synthetase is a predictive biomarker of L-asparaginase activity in ovarian cancer cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:3123–8.
 27. Panosyan EH, Wang Y, Xia P, Lee W-NP, Pak Y, Laks DR, et al. Asparagine depletion potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors. *Mol Cancer Res*. 2014;12:694–702.
 28. Sircar K, Huang H, Hu L, Cogdell D, Dhillon J, Tzelepi V, et al. Integrative molecular profiling reveals asparagine synthetase is a target in castration-resistant prostate cancer. *Am J Pathol*. 2012;180:895–903.
 29. Katt WP, Lukey MJ, Cerione RA. A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Med Chem*. 2017;9:223–43.
 30. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2:401–4.
 31. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:277–300.
 32. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*. 2015;6:15966–83.
 33. Shin S, Dimitri CA, Yoon S, Dowdle W, Blenis J. ERK2 but not ERK1, induces epithelial to mesenchymal transformation via DEF motif dependent signaling events. *Mol Cell*. 2010;38:114–27.
 34. Jang MH, Kim HJ, Kim EJ, Chung YR, Park SY. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. *Hum Pathol*. 2015;46:1267–74.
 35. Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by δ EF1 proteins in epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β . *Mol Biol Cell*. 2007;18:3533–44.
 36. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JHA, Kallemeijn WW, Schutte M. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase or RAS Pathway Mutations in Human Breast Cancer Cell Lines. *Mol Cancer Res*. 2007;5:195–201.
 37. Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann ER. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;31:325–35.
 38. Davis FM, Parsonage MT, Cabot PJ, Parat M, Thompson EW. Assessment of gene expression of intracellular calcium channels, pumps and exchangers with epidermal growth factor-induced

- epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer cell line. *Cancer Cell Int.* 2013;13:1.
39. Xu Q, Zhang Q, Ishida Y, Hajjar S, Tang X, Shi H, et al. EGF induces epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties in human oral cancer cells via promoting warburg effect. *Oncotarget.* 2016;8:9557–71.
 40. Kim J, Kong J, Chang H, Kim H, Kim A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7:85021–32.
 41. Sánchez-Tilló E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res.* 2011;1:897–912.
 42. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:1263–84.
 43. Zacharias NM, McCullough C, Shanmugavelandy S, Lee J, Lee Y, Dutta P, et al. Metabolic differences in glutamine utilization lead to metabolic vulnerabilities in prostate cancer. *Sci Rep.* 2017;7:1–11.
 44. Wellen KE, Lu C, Mancuso A, Lemons JMS, Ryczko M, Dennis JW, et al. The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev.* 2010;24:2784–99.
 45. Billin aN, Eilers aL, Coulter KL, Logan JS, Ayer DE, MondoA, a novel basic helix-loop-helix-leucine zipper transcriptional activator that constitutes a positive branch of a max-like network. *Mol Cell Biol.* 2000;20:8845–54.
 46. Pavlova NN, Hui S, Ghergurovich JM, Fan J, Intlekofer AM, White RM, et al. As extracellular glutamine levels decline, asparagine becomes an essential amino acid. *Cell Metab.* 2018;27:428–38.
 47. Koh LW-H, Koh GR-H, Ng FS-L, Toh TB, Sandanaraj E, Chong YK, et al. A distinct reactive oxygen species profile confers chemoresistance in glioma-propagating cells and associates with patient survival outcome. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:2261–79.
 48. Nitta M, Kozono D, Kennedy R, Stommel J, Ng K, Zinn PO, et al. Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. *PLoS ONE.* 2010;5:1–9.
 49. de Guzzi Cassago CA, Dias MM, Pinheiro MP, Pasquali CC, Bastos ACS, Islam Z, et al. Glutaminase affects the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) via direct interaction. *Biochemistry.* 2018;acs.biochem.8b00773.
 50. Bastide C, Bagnis C, Mannoni P, Hassoun J, Bladou F. A Nod Scid mouse model to study human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2002;5:311–5.
 51. Kim RK, Suh Y, Yoo KC, Cui YH, Kim H, Kim MJ, et al. Activation of KRAS promotes the mesenchymal features of basal-type breast cancer. *Exp Mol Med.* 2015;47:e137–9.
 52. Lee Y-Z, Yang C, Chang HH-S, Hsu H, Qiu Y, Chao Y-S, et al. Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget.* 2014;5:6087–101.
 53. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, et al. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;193:409–24.

Affiliations

Marilia M. Dias^{1,2} · Douglas Adamoski^{1,2} · Larissa M. dos Reis^{1,2} · Carolline F. R. Ascensão^{1,2} · Krishina R. S. de Oliveira^{1,2} · Ana Carolina Paschoalini Mafra^{1,2} · Alliny Cristiny da Silva Bastos^{1,2} · Melissa Quintero¹ · Carolina de G. Cassago¹ · Igor M. Ferreira¹ · Carlos H. V. Fidelis³ · Silvana A. Rocco¹ · Marcio Chaim Bajgelman¹ · Zachary Stine⁴ · Ioana Berindan-Neagoe^{5,6,7} · George A. Calin^{8,9} · Andre Luis Berteli Ambrosio^{1,10,10} · Sandra Martha Gomes Dias¹

¹ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Sao Paulo 13083-970, Brazil

² Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Institute of Biology University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo, Brazil

³ ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, Sao Paulo 13083-970, Brazil

⁴ The Wistar Institute, 3601 Spruce Street, Philadelphia, PA 19104, USA

⁵ Research Center for Functional Genomics, Biomedicine and Translational Medicine, University of Medicine and Pharmacy “Iuliu-Hatieganu”, 400337 Cluj-Napoca, Romania

⁶ MedFuture Research Center for Advanced Medicine, University of

Medicine and Pharmacy “Iuliu-Hatieganu”, 400349 Cluj-Napoca, Romania

⁷ Department of Functional Genomics and Experimental Pathology, The Oncology Institute “Prof. Dr. Ion Chiricuță”, 400015 Cluj-Napoca, Romania

⁸ Department of Experimental Therapeutics, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd. Unit 1950, Houston, TX 77030, USA

⁹ Center for RNA Inference and Non-Coding RNAs, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd. Unit 1950, Houston, TX 77030, USA

¹⁰ Present address: Sao Carlos Institute of Physics (IFSC), University of Sao Paulo (USP), Sao Carlos, Sao Paulo 13563-120, Brazil

Anexo IV. Artigo Científico

“Structure and activation mechanism of the human liver-type glutaminase GLS2.”



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Structure and activation mechanism of the human liver-type glutaminase GLS2

Igor M. Ferreira^a, José Edwin N. Quesñay^{a, b}, Alliny CS. Bastos^{a, c}, Camila T. Rodrigues^b, Melanie Vollmar^d, Tobias Krojer^d, Claire Strain-Damerell^{d, e}, Nicola A. Burgess-Brown^d, Frank von Delft^{d, e, f, g}, Wyatt W. Yue^{d, ***}, Sandra MG. Dias^{a, **}, Andre LB. Ambrosio^{a, b, *}

^a Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Campinas, São Paulo, Zip Code, 13083-970, Brazil

^b São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, SP, Zip Code, 13563-120, Brazil

^c Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^d Structural Genomics Consortium, University of Oxford, Old Road Campus, Roosevelt Drive, Headington, OX3 7DQ, UK

^e Diamond Light Source Ltd., The Research Complex at Harwell, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, OX11 0FA, UK

^f Department of Biochemistry, University of Johannesburg, Auckland Park, 2006, South Africa

^g Research Complex at Harwell, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, OX11 0FA, UK



ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2020

Received in revised form

23 February 2021

Accepted 14 March 2021

Available online 18 March 2021

Keywords:

Glutaminase

Liver-type

Isozyme

Breast cancer

Metabolism

Crystal structure

Kinetics

Cooperativity

ABSTRACT

Cancer cells exhibit an altered metabolic phenotype, consuming higher levels of the amino acid glutamine. This metabolic reprogramming depends on increased mitochondrial glutaminase activity to convert glutamine to glutamate, an essential precursor for bioenergetic and biosynthetic processes in cells. Mammals encode the kidney-type (GLS) and liver-type (GLS2) glutaminase isozymes. GLS is over-expressed in cancer and associated with enhanced malignancy. On the other hand, GLS2 is either a tumor suppressor or an oncogene, depending on the tumor type. The GLS structure and activation mechanism are well known, while the structural determinants for GLS2 activation remain elusive. Here, we describe the structure of the human glutaminase domain of GLS2, followed by the functional characterization of the residues critical for its activity. Increasing concentrations of GLS2 lead to tetramer stabilization, a process enhanced by phosphate. In GLS2, the so-called “lid loop” is in a rigid open conformation, which may be related to its higher affinity for phosphate and lower affinity for glutamine; hence, it has lower glutaminase activity than GLS. The lower affinity of GLS2 for glutamine is also related to its less electropositive catalytic site than GLS, as indicated by a Thr225Lys substitution within the catalytic site decreasing the GLS2 glutamine concentration corresponding to half-maximal velocity ($K_{0.5}$). Finally, we show that the Lys253Ala substitution (corresponding to the Lys320Ala in the GLS “activation” loop, formerly known as the “gating” loop) renders a highly active protein in stable tetrameric form. We conclude that the “activation” loop, a known target for GLS inhibition, may also be a drug target for GLS2.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer cells undergo extensive reprogramming of the metabolic pathways related to energy and biosynthetic building block synthesis. In general, tumors differ from healthy cells in their

utilization of glucose, typically secreted as lactate, even under conditions of normal oxygen tension, a phenomenon termed the “Warburg effect” [1]. However, in addition to glucose metabolism, increased glutamine utilization has also attracted the scientific community’s attention as a new target for the development of therapies [2]. In cancer, both glutamine uptake and the rate of glutamine-to-glutamate conversion are increased, with mitochondrial glutaminases playing central roles in this process [3,4]. Glutamine-derived glutamate is a key anaplerotic source of the tricarboxylic cycle, providing ATP and carbon species for biosynthetic pathways; also, glutamate participates in glutathione production and, therefore, cellular redox balance.

* Corresponding author. São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, SP, Zip Code, 13563-120, Brazil.

** Corresponding author.

*** Corresponding author.

E-mail addresses: wyatt.yue@sgc.ox.ac.uk (W.W. Yue), sandra.dias@inbio.cnpem.br (S.M.G. Dias), andre@ifsc.usp.br (A.L.B. Ambrosio).

Mammals have two glutaminase genes. The *GLS* gene (position 2q32-q34 in the human genome), under the control of the MYC [4] and c-Jun [5] oncogenes, gives rise to the splicing variants glutaminase C (GAC) and kidney-type glutaminase (KGA) [6]. The *GLS2* (position 12q13.3 in the human genome) is a p53-inducible gene that uses alternative promoters to generate two isoforms: liver-type glutaminase (LGA) and glutaminase B (GAB) [7]. *GLS2* was initially identified in the liver, but it is also found in brain tissues and the pancreas [8]. The first LGA cDNA was cloned from rat liver [9], and the first variant identified in human cells was cloned from ZR-75 lineage breast cancer cells and was then called the GA of the liver but is often also referred to as LGA [10,11]. However, the same research group that identified LGA in ZR-75 cells eventually renamed this glutaminase GAB and hypothesized that a shorter form of the enzyme (corresponding to rat LGA) might also exist in humans [12]. This hypothesis was subsequently demonstrated by the same group [7].

In contrast to the *GLS* isoforms GAC and KGA, *GLS2* has been traditionally described as having high K_m (or high $K_{0.5}$ for non-hyperbolic Michaelian behavior) for glutamine, low $K_{0.5}$ for phosphate (although this ion induces attenuated activation), no inhibition by the reaction product glutamate, and an obligatory requirement for ammonia as an activator, which explains the sigmoidal shape of its kinetic curve [11,13,14]. As described above, aside from the longer GAB isoform, the *GLS2* gene also codifies a shorter LGA isoform that is 67 amino acids shorter than GAB at the N-terminus. Additionally, in humans, LGA has two functional start codons, separated by 30 amino acids; only the longer version of the protein retains activity [15]. GAB is also active but seems to have different kinetics properties than those of LGA [10].

Glutamine metabolism and redox balance driven by *GLS2* in the context of p53 activation is linked to its unique metabolic role in suppressing tumor growth [16,17]. Glioblastoma [18,19] and hepatocarcinoma [20], with restored *GLS2* expression, grow comparatively less aggressively. Equivalent data have also been presented for colorectal and non-small lung carcinomas [17]. On the other hand, MYCN-amplified neuroblastoma cells exhibit higher *GLS2* expression levels (compared to cells with nonamplified MYCN) and are particularly prone to apoptosis upon glutamine deprivation [21]. A series of small molecules with alkyl benzoquinone functional groups decreased the intracellular glutaminase activity in lung, breast, and liver carcinoma cell lines and inhibited GAB more strongly than KGA [22]. Finally, *GLS2* was recently shown to be an oncogene in breast cancer in our laboratory [23] and by other groups [24]. These findings corroborate *GLS2* as a potential anticancer target under specific contexts.

While several crystal structures of *GLS* are currently available and much is known about its mechanism of activity and inhibition [25–28], little has been described about the structural determinants of *GLS2*, although we have determined the crystallographic structure of its C-terminal ANK domain [25]. The recent accumulated literature pointing to *GLS2* as a previously unforeseen anticancer target makes the investigation of its mechanism of activity and opportunities for chemical inhibition a necessity. In this manuscript, we present the crystallographic structure of the human *GLS2* catalytic domain and evaluate critical residues essential for its activity to provide a starting framework for the development of future *GLS2*-oriented therapies.

2. Results

2.1. At higher concentrations, *GLS2* presents sigmoidal non-Michaelis-Menten kinetics

By using a construct in which the first 72 residues were deleted

to form a sequence common in both LGA and GAB isozymes (herein called *GLS2*, UniProt reference sequence Q9UI32-1), we previously showed that *GLS2* was a less active glutaminase isozyme (since it presented a higher K_m , lower K_{cat} and lower catalytic efficiency, K_{cat}/K_m , value), compared to GAC and KGA, when these were all assayed under identical protein and phosphate (Pi) concentrations [26].

In the present work, we performed a detailed enzymatic study of mouse *GLS2* to evaluate protein concentration and phosphate's combined effect on its oligomerization and activity. The reaction velocities driven by *GLS2* (from 5 nM to 500 nM protein concentration) in the absence or presence of 20 mM Pi were measured against and plotted as a function of increasing amounts of L-glutamine (up to 60 mM). The resulting curves can be clustered into two main categories according to the refined value of n after model fitting with a 4-parameter Hill equation. More specifically, the graphs on the left in Fig. 1A and B shows that, for the lower *GLS2* concentrations, i.e., between 5 and 50 nM in the absence of Pi, and 5 and 10 nM with 20 mM Pi, n is approximately 1.0 ± 0.1 (Fig. 1C). This indicates that noncooperative Michaelis-Menten-like hyperbolic kinetic models best explain the data; in this situation, $K_{0.5}$, or the substrate concentration for half-saturation, is equivalent to K_m . However, at higher protein concentrations, n increases to be approximately equal to 4 (Fig. 1C) at 500 nM *GLS2*. In this situation, the curves are explained by a sigmoid, indicating positive cooperativity (Fig. 1A and B, graphs on the right). Interestingly, this shift in the enzymatic kinetic profile coincides with a change in the protein's oligomeric state, transitioning from dimer to tetramer, as the protein concentration increases in the absence of phosphate (Fig. 3D).

Phosphate stimulates a complete transition in quaternary structure toward tetramerization (Fig. 3d), even at the lowest *GLS2* concentration, namely 5 nM. As the protein concentration rises further, a continuous increase in maximum reaction velocity (V_{max}), both with and without phosphate, is observed (Fig. 1D, left graph). For instance, in the absence of Pi, V_{max} are 0.08 ± 0.01 and $1.7 \pm 0.03 \mu\text{M s}^{-1}$, at 5 and 500 nM *GLS2*, respectively, whereas in 20 mM Pi, V_{max} are 0.25 ± 0.03 and $2.81 \pm 0.07 \mu\text{M s}^{-1}$, for equivalent concentrations. On the other hand, the analysis of the $K_{0.5}$ values indicates an uncoupled behavior: at lower protein concentrations (5–25 nM), phosphate does not affect $K_{0.5}$, around 40 mM. At higher protein levels (beyond 50 nM), phosphate leads to a decreased $K_{0.5}$, down to 10.7 ± 0.3 mM, at 500 nM *GLS2* (Fig. 1D, right graph), thus improving the apparent affinity of *GLS2* for L-glutamine.

Despite the increase in V_{max} that accompanies a likewise increased *GLS2* concentration (Fig. 1D, left graph), the proportion is not maintained. The turnover numbers (k_{cat}) in Fig. 1E, left graph, show that the maximum number of substrate conversion per second per active site substantially deteriorates as the enzyme concentrations increase (Fig. 1E). For instance, in the absence of Pi, turnover rates are $16 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ (for 5 nM *GLS2*) and $3.4 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ (for 500 nM *GLS2*), respectively, i.e., a near five-fold decrease. In 20 mM Pi, corresponding numbers are $50 \pm 6 \text{ s}^{-1}$ (for 5 nM *GLS2*) and $5.6 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ (for 500 nM *GLS2*), a nine-fold decrease. Therefore, when enzyme efficiency is finally calculated ($k_{cat}/K_{0.5}$; Fig. 1E, right graph), it can be observed that, in the absence of phosphate (light gray), enzyme efficiency is compromised.

Indeed, as expected, phosphate increases the catalytic efficiency at all tested protein concentrations, albeit modestly, when compared to its absence. On the other hand, phosphate does not significantly alter *GLS2* efficiency as protein concentration increases (Fig. 1E, right graph, dark gray).

A relative analysis, done by dividing the kinetic parameters in the presence and absence of phosphate, at equivalent protein

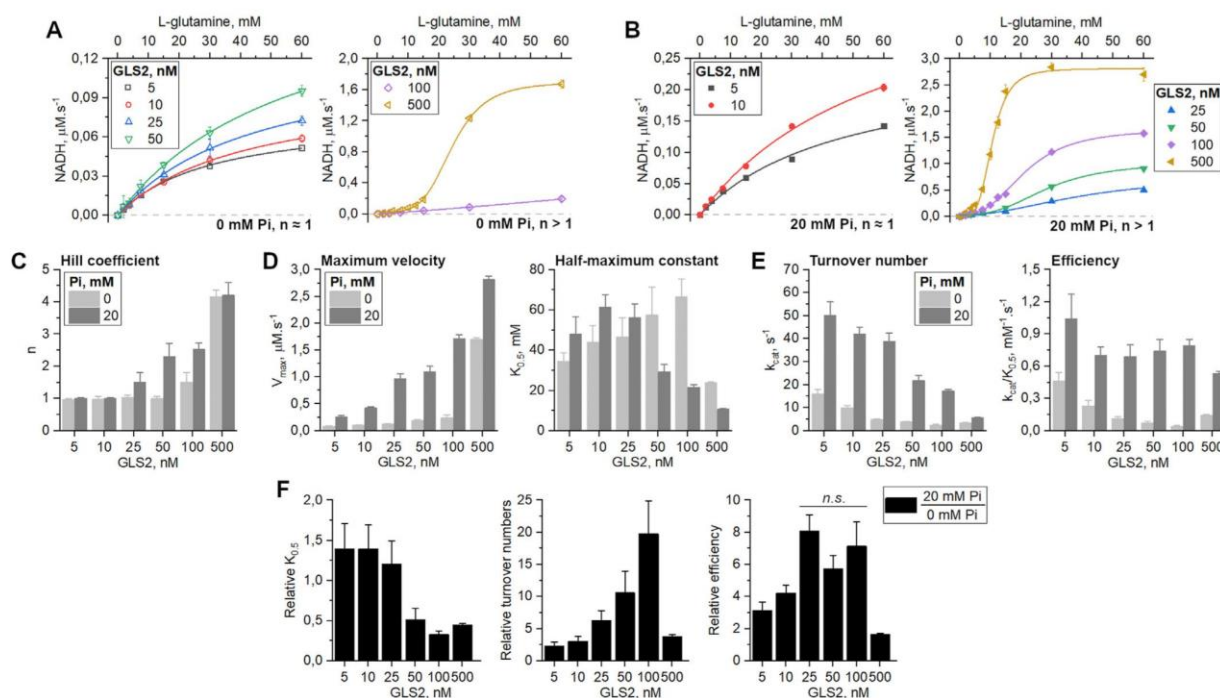


Fig. 1. Enzymatic characterization of GLS2. The allosteric cooperative activation profile of GLS2 is dependent on the protein concentration (A) and is amplified in the presence of 20 mM inorganic phosphate (B). (C) Increasing protein concentration and phosphate levels increase the Hill coefficient, calculated based on the sigmoidal kinetic curves up to -4 . (D) V_{max} and $K_{0.5}$ of GLS2 at increasing protein concentrations in the absence or presence of phosphate and catalytic efficiency, followed by respective (E) turnover rates ($k_{cat} = V_{max}/[GLS2]$) and efficiency ($k_{cat}/K_{0.5}$). (F) Relative kinetic parameters calculated as the ratio between the presence and absence of inorganic phosphate. *n.s.* means statistically non-significant, according to a multivariate ANOVA.

concentrations, show that the apparent affinity for the substrate and the turnover rates (Fig. 1F, left and middle graphs) improve considerably when the enzyme is between 5 and 100 nM. Within this range, according to the respective Hill coefficients (Fig. 1C), which grow from 1 to about 2.5, the positive cooperativity results gradually in a more efficient enzyme (Fig. 1F, right graph), although efficiency peaks at already 25 nM GLS2 (according to a multivariate ANOVA). Interestingly, however, at 500 nM GLS2, when the binding sites in the tetramer may be fully occupied ($n = 4$), the efficiency is severely decreased (Fig. 1F, right graph) mainly because the turnover rates are slowed (Fig. 1F, middle graph).

2.2. The crystal structure of the human GLS2 glutaminase domain

We determined the ligand-free structure for the human GLS2 glutaminase domain at a maximum resolution of 2.2 Å (PDB 4bqm, R_{factor} of 18% and R_{free} of 20%, Table 1). The crystallized construct comprises residues Ile154 to Gly479 (Fig. 2A), common to both the LGA and GAB isoforms. The GLS2 glutaminase domain belongs to the serine-dependent beta-lactamase/transpeptidase-like superfamily of structures [29]. The active site, with a volume of approximately 500 Å³ (Fig. 2A), is located between an α/β sandwich and a purely α subdomain. As previously demonstrated for GLS glutaminases, two critical flexible loops control accessibility to this region: the “lid” region (residues Val246-Phe256 [30]) and the “activation” loop (Leu316-Phe322 [26,27,30]), which are present at different conformations or are completely disordered across the two monomers in the asymmetric unit. The novel structure presents a backbone tracing that is virtually identical to that of the human GLS glutaminase domain. The root mean square deviation

in the positions of the alpha carbons of 0.6 Å (Fig. 2B) is in perfect agreement with the value expected for a sequence identity of 78.4%, according to the empirical expression derived by Chothia and Lesk [31].

At the quaternary level, when comparing the crystallographic structure of GLS2 and GLS with glutaminases from other organisms, such as *Bacillus subtilis* (Ybgj, PDB: 1MKI) and *Escherichia coli* (YbaS, PDB: 1U60), which are not necessarily dependent on inorganic phosphate for activation, it was noted that the tetramer (D2 symmetry dimer of dimers) is fully conserved. By applying crystalline symmetry operations inherent to each structure, we observed that they all had a tetrameric organization (Fig. 2C). The mean quadratic deviation of the tetramers’ overlap was 1.6 Å for YbaS and 1.5 Å for Ybgj.

By superposing the unbound GLS2 structure with some available GLS structures in an unbound state or bound to different elements such as glutamate, ions, and inhibitors (data not shown), we verified that the “lid” loop in GLS is always in a closed conformation, with Tyr249 facing down to the active site (Fig. 2D, PDB 3czd used as an example for GLS). In our structure, the presence of a distinct serine residue (Ser189) in GLS2 in a position corresponding to Phe256 in human GLS stabilizes a unique local rigid structure via three hydrogen bonds with adjacent residues. The hydroxyl side chain group of Ser189 contacts both the main chain amino and carboxylic groups of Ile183 and the side chain amine group of Lys188 (Fig. 2D, yellow dashes). Consequently, the phenolic hydroxyl side chain of GLS2 Tyr182 (corresponding to Tyr249 in the YIP segment in GLS) projects outward in the structure, pointing away from the active site and toward the solvent region (Fig. 2D, upper panel).

Table 1
X-ray crystallography data collection parameters and structure refinement statistics.

Data collection	
Beamline	I03 at Diamond
Space group	H 3 2
Cell parameters a, b, c (Å)	203.6, 203.6, 99.0
Resolution range (Å)	65.83–2.18 (2.24–2.18)
Unique reflections	40642 (2830)
R _{symm} (%)	7 (53)
Completeness (%)	100 (100)
I/σ(I)	23.5 (4.4)
Average Mosaicity (°)	0.5
B-factor from Wilson Plot (Å ²)	44.8
Monomers/AU	2
Solvent content (%)	52.2
Matthews coeff. (Å ³ /Da)	2.6
Refinement	
Resolution range (Å)	2.18–65.83
Reflections (cross-validation)	2036 (5%)
Rfactor/Rfree (%)	17.8/20.3
Rmsd from standard geometry	
Bond length (Å)	0.012
Bond angles (°)	1.435
Ramachandran plot	
Most favored (%)	96
Allowed (%)	4
Outlier (%)	0

Another distinctive feature of GLS2 is the electrostatic landscape of its catalytic site (orange dashed line in Fig. 2E). The surface potential analysis of the substrate-binding cleft, based on APBS, suggests a less positively charged region than the corresponding GLS isozyme, particularly in a channel adjacent to the right of the glutamine/glutamate binding site (Fig. 2E). The structure and sequence alignments indicated that only one residue is different in this region among the two isozymes in this region, i.e., a threonine at position 225 in GLS2, which is substituted in GLS by a lysine (Fig. 3A, and dashed white lines in Fig. 2E). Accordingly, the point mutant T225K experimentally decreased the $K_{0.5}$ of GLS2 from 22 ± 1 mM (wild type) to 15 ± 1 mM for 100 nM protein, making it slightly more similar to GLS. We speculate that the driving factor of this increase in L-glutamine's apparent affinity upon threonine substitution may not be the charge itself because neutrally charged amide should bind more tightly with fewer charged groups nearby. Upon closer structural inspection, this channel may accommodate the previously unseen active conformation of the so-called “activation” loop (dashed green lines in Figs. 2E, and Fig. 3A), which is still missing from all crystal structures of mammalian glutaminases determined to date. The remaining differences in the surface's overall shape, flanking left the active site are mostly due to repositioning the “lid” loop, as described in the previous paragraph (dashed pink lines, Fig. 2E).

2.3. Site-directed mutagenesis reveals additional crucial residues for enzyme activity

We have previously identified the “activation” loop (Leu316-Phe322 [30], formerly referred to as the “gating” loop [26]), adjacent to the active site, as essential for filament formation and phosphate-dependent activation of the GLS isoforms [26,27]. Like most available GLS structures, the “activation” loop does not assume a preferential conformation in the ligand-free form of GLS2 (Leu249-Ser255, Fig. 3A). In GLS2, two positions (GLS2 Tyr251 and Ser255) in the “activation” loop are different from those of GLS (GLS Phe318 and Phe322, Fig. 3A), which may explain the differences in their activity profiles. However, a double-substituted GLS2 mutant (Tyr251Phe-Ser255Phe), mimicking the GLS “activation” loop,

behaved similarly to wild-type GLS2, as indicated by $K_{0.5}$ values and catalytic efficiency data (Fig. 3B and C). Here, the assays were performed at 100 nM enzyme and 20 mM phosphate, where relative efficiency is maximized (Fig. 1E). Finally, we evaluated the importance of Lys253 in GLS2. This position corresponds to Lys320 in human GLS, where a substitution to alanine led to highly active mutant GLS that was prone to form polymers [24] spontaneously. The Lys253Ala mutant has a five-fold lower $K_{0.5}$ value than the wild type (4 ± 1 mM GLS2 with Lys253Ala and 21 mM for the wild type) and a catalytic efficiency four-fold higher (Fig. 3b-c). The Lys253Ala mutant protein also contributes to stabilizing the tetramers, as shown in Fig. 3D, maintaining GLS2 in the tetrameric form even at low concentrations and in the absence of phosphate. Altogether, the “activation” loop in GLS2 regulates tetramerization and substrate access to the active site.

3. Discussion

3.1. GLS2 is a cooperative glutaminase

While the kidney enzyme KGA initially showed Michaelian hyperbolic kinetics according to glutamine concentration, with a K_m of 4–5 mM [32], the liver enzyme LGA has sigmoidal kinetics, with $K_{0.5}$ of 17 mM for glutamine at 50 mM Pi (reviewed by Ref. [33]). The distinguishing feature of liver glutaminase is its requirement for ammonia as an obligatory activator. More specifically, it has been shown that for human GLS2, from fresh surgical biopsy specimens, ammonia shifts $K_{0.5}$ to lower values without changing V_{max} or sigmoidicity [14]. Similar requirements were demonstrated in intact mitochondria [13], swollen mitochondria or sonicated mitochondria [34], and with the partially purified enzyme [35].

Furthermore, the liver glutaminase's kinetic properties are different depending on whether the enzyme is associated with the inner mitochondrial membrane or solubilized by sonication or phospholipase treatment. When membrane-associated, hepatic glutaminase has a K_m of 6 mM for glutamine and exhibits hyperbolic behavior according to the glutamine concentration. However, the solubilized enzyme shows a higher $K_{0.5}$ for glutamine and exhibits sigmoidal kinetics [33]. As highlighted earlier, the shift to the

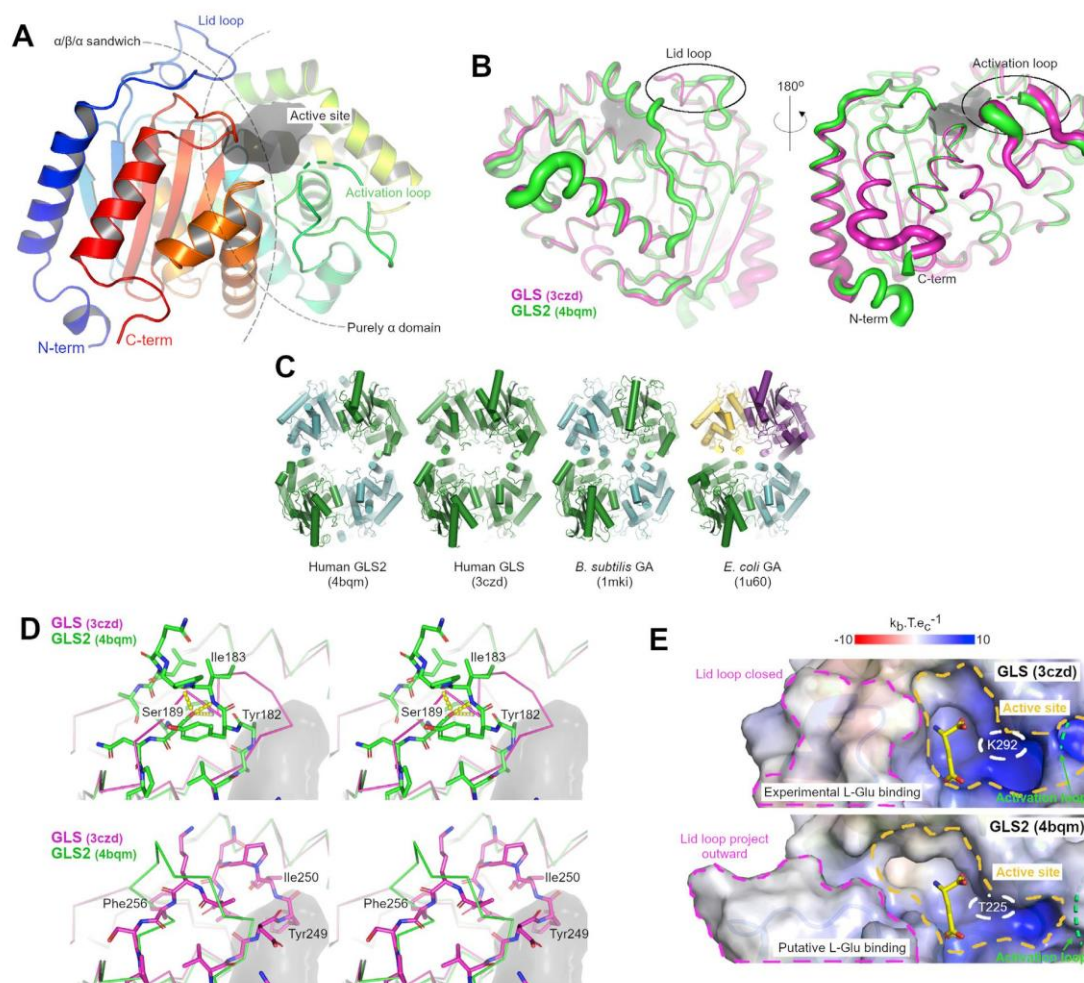


Fig. 2. Structural characterization of GLS2. (A) Cartoon representation of the crystal structure of the glutaminase domain of GLS2. The solid gray surface delimits the boundaries of the active site. (b) GLS crystal structure (PDB: 3czd) was superposed onto GLS2 to indicate conformational differences at the lid loop and at the activation loop. Ribbon thickness is relative to the average crystallographic temperature factors. (C) Comparison between the tetramers of the catalytic domains of GLS2, GLS, and the glutaminases from bacteria Ybgj (*B. subtilis*) and Ybas (*E. coli*). The quaternary structure of glutaminases is highly conserved, particularly that of the tetramer. Tetramers are generated from the application of crystalline symmetry to the components of each crystal's asymmetric unit. In this case, colors represent equivalent molecules according to crystalline symmetry. (D) Wall-eyed stereo view of the "lid" loop, highlighting equivalent GLS Tyr249 (magenta) and GLS2 Tyr182 (green) in different conformations because of the unique presence of Ser189 and the hydrogen bond network in GLS2 (Phe256 in GLS). (E) The substrate-binding cleft (delimited by the orange dashed line) is less electropositive in GLS2, particularly in the channel right to the substrate's putative docking site; this channel may accommodate a novel stable conformation of the activation (green dashed lines), which is still missing in all crystal structures of mammalian glutaminases. A pink dashed line highlights conformational differences at the "lid" loop. The green dashed line in both panels indicated the missing activation loop.

left of the sigmoidal curve induced by ammonia allows increased activity at physiological glutamine concentrations in mitochondria [14].

In agreement with these findings, we demonstrated the GLS2 sigmoidal kinetics *in vitro*, especially at high protein concentrations and in the presence of phosphate. We further showed that the Hill coefficient change follows an increasing pattern concomitant to tetramerization, suggesting that allosteric cooperation follows. However, while cooperativity enhances the substrate's apparent affinity, the rates of conversion are compromised, resulting in conserved efficiency throughout. This is a very different scenario than that described for GLS, since the latter is a noncooperative enzyme (i.e., hyperbolic kinetics) and relies on polymerization for a highly increased efficiency [26,27]. However, further

experimentation is required to test the effects of infused ammonia in the assays with the purified recombinant protein. The protein concentrations tested in this work may be reached in the cells due to protein-protein interactions, which may direct the protein to a specific organelle or cell region. The ankyrin domains and ZB motif in the C-terminus and NRBox (nuclear receptor box) in the N-terminus of GLS2 can act as scaffolds for protein-protein interactions in mitochondria or in other organelles, as demonstrated recently for KGA [36]. They can also be involved in determining protein localization in the cell. The ZB motif binds to glutaminase-interacting protein-1, a PDZ domain-containing protein in the brain, and it can be involved in glutaminase cell localization [8,25,37].

The oligomeric properties of the liver and kidney enzymes are

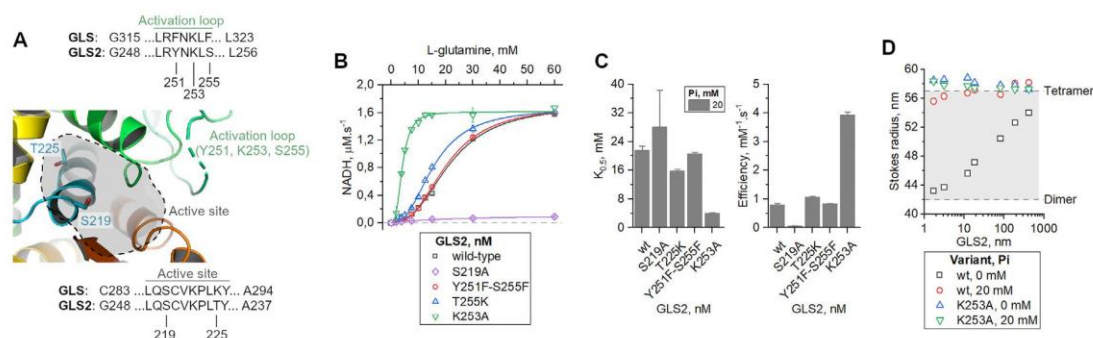


Fig. 3. Residues critical for GLS2 activity. (A) The primary GLS2 and GLS “activation” loop sequences indicate, by numbering, the crucial amino acid substitutions for GLS and GLS2. (B–C) Tyr251Phe – Ser255Phe double mutation does not affect GLS2 activity; on the other hand, Thr225Lys and Lys253Ala replacements, increase active site electropositivity and modify the “activation” loop, respectively, thus increasing protein activity. As expected, the catalytic Ser219 replacement with alanine disrupted protein activity. (D) In the absence of phosphate, GLS2 presents a concentration-dependent oligomerization profile, shifting from dimerization to tetramerization (black squares). Phosphate addition results in a shift in the equilibrium towards higher molecular weight species, stabilizing tetramers (red circles). The high enzymatic capacity of the K253A mutant correlates with its enhanced tendency to self-assemble into tetramers, therefore suggesting the “activation” loop as a hot spot for GLS2 activity. The gray area delimits the expected Stokes radius between full-length GLS2 dimers and tetramers using the GLS structures as references.

different. Kidney glutaminase polymerizes into higher-order species (filaments) in phosphate/borate buffer [27,38,39]. The liver enzyme appears to be a tetramer that does not require higher-order polymerization [27,40]. The maximum Hill coefficient value calculated for GLS2 was 4, and it was reached when the protein was in the tetrameric form, with or without phosphate, according to our analytical gel filtration findings. The total number of ligand binding sites is an upper bound for the experimentally determined n [41,42], indicating that glutamine likely has four allosteric binding sites in the tetramer. However, putative fully binding sites compromise the enzyme's efficiency by slowing substrate turnover (Fig. 1E). To date, in addition to the active site itself, no additional binding region for L-glutamine or any other ligand has been verified for mammalian glutaminases. For instance, ammonia, which is another product of catalysis, and known to activate GLS2 [14] significantly, may directly bind to the protein at another site as it accumulates, thus contributing to the observed cooperativity. Further experimentation is required to answer these and other fundamental questions, such as why GLS2 is an allosteric enzyme and why it is so highly regulated.

Given that the tetramerization interface places four neighboring active sites in very close proximity [26], we propose that the positive cooperativity described here is due to concerted allosteric regulation among the adjacent active sites upon oligomerization, limited to tetramer formation. A more drastic improvement in the catalytic constants was observed for GLS, extending into polymers, with tetramers as the minimum repeating unit [27]. Overlaying the GLS and GLS2 crystal structures shows that the catalytic domains fold in a nearly identical fashion with few stretches of residues that differ significantly. Indeed, as we have previously demonstrated, differences in oligomerization capacity are in the N- and C-terminal portions of these two isoforms [27].

In our previous work, we described the GAC structure bound to inorganic phosphate. The phosphate ion was buried inside GAC's highly positive active site, making polar contacts with the catalytic Ser291 and other residues in the catalytic site. Moreover, we showed that phosphate plays a central role in increasing the enzyme's turnover rate [26]. Enzyme inhibition by glutamate has been reported for GLS isoforms [33], and we can now speculate this to be due to a more positive active site (Fig. 2D). Furthermore, Sayre and Roberts showed that the glutamate-induced inhibition of glutaminases is based on its competition with phosphate [44]. In this sense, we initially proposed that Pi competes with glutamate for

the cationic active site, accelerating product exchange and simultaneously preventing enzyme inhibition as the product accumulates [26]. Later, Li and colleagues [30] described replacing the Tyr254 (present in the highly conserved YIP sequence within the “lid” loop, present at the opening of the catalytic site) to Phe in GAC, which caused a significant shift in the dose-response to inorganic phosphate (leading to a decrease in the $K_{0.5}$ for this ion), indicating that disrupting the active site lid with a Tyr to Phe substitution can significantly enhance the binding of inorganic phosphate and alter the specific activity of the enzyme.

We also verified that inorganic phosphate aids in stabilizing tetramers, but not filaments; the tetrameric form in the presence of phosphate has the lowest enzyme efficiency. Activated by phosphate, GLS has Tyr254 in the “lid” loop pointing inward, and the GLS crystallographic structure showed a phosphate ion within the catalytic site [26]. Moreover, replacing this Tyr with a Phe increased GLS affinity for phosphate [30], implying that the phenolic hydroxyl group expels phosphate from this position. On the other hand, the GLS2 “lid” loop has a stabilized conformation with Tyr182 (corresponding to Tyr249 in GLS) pointing outward to the catalytic site. Because GLS2 also binds phosphate within its catalytic site, the Tyr182 orientation may explain why GLS2 has a decreased $K_{0.5}$ for phosphate and a higher affinity for phosphate binding. We previously demonstrated that phosphate enhances the GLS2 glutamine $K_{0.5}$ [26] and shows that this enhancement holds for a protein concentration of 10 nM. Altogether, we speculate that the higher affinity of GLS2 for phosphate (compared to that of GLS) relates to a disturbance of the phosphate and glutamine interaction and an increase in glutamine $K_{0.5}$. Curiously, the lowest $K_{0.5}$ for glutamine was observed when the protein was stabilized in tetramers (at higher protein concentrations) and was enhanced by phosphate, implying that, under this condition, the disturbance-based mechanism was no longer operational.

3.2. The GLS2 structure is a resource for designing GLS-oriented inhibitors

Previous work has revealed a series of alkyl benzoquinones that inhibit GLS2 more strongly than they do to GLS and decreased intracellular glutaminase activity in lung, breast, and liver carcinoma cell lines [22]. GLS2 was also shown to be tumorigenic in breast cancer [23,24]. These findings validate GLS2 as a potential anticancer target.

The GLS-specific inhibitors BPTES and its more potent analog, CB-839, prevent polymer formation and GLS activation [27] by trapping the “activation” loop of GLS in a rigid open conformation [27,45]. The molecular basis of BPTES specificity for GLS was shown to involve Phe318 and Phe322 [45], which are tyrosine and serine, respectively, in GLS2. These are the only amino acid differences between the GLS and GLS2 “activation” loops. Another “activation” loop residue essential for BPTES binding, Lys320 (based on human GLS numbering), was also shown to be critical for GLS activation [27]. Although polymer formation is not required for its activation, GLS2 activity is driven by the “activation” loop and is controlled by Lys253 (Lys320 in GLS), the replacement of which with alanine drives the protein to a tetrameric, highly activated form. Considering these findings, we established the GLS2 “activation” loop as a hot spot for the targeted design of small-molecule inhibitors with the possibility of fine-tuning GLS/GLS2 exclusivity via the Phe318/Tyr251 and Phe322/Ser255 substitutions. Finally, the description of GLS2 as a pro-oncogenic protein has unique implications for the future development of small-molecule-oriented therapeutics targeting glutaminases in cancer.

Overall, our results show that increased levels of GLS2 result in the stabilization of tetramers and sigmoidal nonclassical Michaelis-Menten kinetics. The GLS2 “lid” loop presents a stabilized conformation with Tyr182 pointing outwards, explaining the decreased $K_{0.5}$ for phosphate in the catalytic site (and, consequently, phosphate inhibition). Finally, the GLS2 “activation” loop also has a role in controlling protein activity, as shown by the Lys253Ala mutation enhancing the protein activity without driving the protein to oligomeric forms of higher order than a tetramer.

4. Material and methods

4.1. Recombinant protein production, enzymatic assay, size-exclusion serial dilution, and site-directed mutagenesis

Human GLS2 was used for crystallization purposes, while enzyme kinetics assays were performed with the mouse construct, which shares a 95% sequence identity with the human protein. Mouse GLS2 (Leu72–Val602) cloning was previously described [26]. Point mutants were generated by PCR using internal primers with the mutations and the QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies). The human GLS2 catalytic domain construct (NP_037399.2, Ile154–G479) was cloned into the pNIC28-Bsa4 vector and expressed in *E. coli* strain BL21(DE3)-R3-pRARE2. The cells were grown in 10 L of terrific broth medium, and the expression was induced by 0.1 mM IPTG added at 18 °C. Then, the cells were harvested and resuspended in 50 mM HEPES, pH 7.5; 500 mM NaCl; 20 mM imidazole; 5% glycerol; 0.5 mM TCEP and 1 tablet of EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) in solution and disrupted by passing through a high-pressure homogenizer at 15,000 psi for 4 cycles. The soluble fraction was loaded onto Ni-NTA resin (Qiagen), and the recombinant protein (which contained a His-tag fusion on its N-terminus) was eluted with 250 mM imidazole. The eluate was then loaded onto a HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) gel filtration column equilibrated with 10 mM HEPES, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.5 mM TCEP; and 5% glycerol. After gel filtration, the protein was concentrated using an Amicon ultrafiltration device (10 kDa cutoff; Millipore), diluted in HEPES pH 8.0 solution, and then loaded onto a HiTrap Q HP (GE Healthcare) anionic exchange column. The elution was performed with a linear gradient of NaCl from 50 mM to 2 M over 70 min. The streamlined glutaminase activity assay and the size-exclusion analysis of the serial dilution were performed as previously published, with the exception that the increased amounts (as indicated in the text) of GLS2 were used in the assays. Measurements were performed in

triplicate and analyzed using GraphPad Prism 5 (GraphPad software) and Origin 8.1 (OriginLab). A general formula of a Hill equation for dose-response kinetics of the type:

$$V = V_{min} + (V_{max} - V_{min}) \frac{[S]^n}{K_{0.5}^n + [S]^n}$$

was used to model the curves, where V_{min} and V_{max} are the minimum and maximum reaction rates for a given protein concentration, respectively; $[S]$ is the substrate (L-glutamine) concentration for each assay; $K_{0.5}$ is the substrate concentration occupying one-half of the active sites; n is the Hill coefficient that determines the degree of cooperativity. V_{min} , V_{max} , $K_{0.5}$, and n were freely adjusted during curve fitting.

4.2. Crystallization and X-ray crystallography

Crystals were grown by the sitting drop vapor diffusion method at 293 K. A sitting drop consisting of 100 nl of protein in 13 mg/ml and 50 nl well solution was equilibrated against the well solution containing 0.1 M Tris, pH 8.5; 0.2 M sodium chloride; and 25% (w/v) PEG 3350. The crystals were mounted in the presence of 25% (v/v) ethylene glycol and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were obtained with Diamond Light Source beamline I03. Data were processed using Mosflm [46] and Scala [47] software. The first set of phases was obtained by molecular replacement as implemented in Phaser [48], using the crystallographic model of the glutaminase domain of GLS (PDB code 3czd [26]). Positional and B-factor refinement cycles were performed with Refmac [49]. The manual generation of the extra portions and real-space refinement, including Fourier electron density map inspection, were performed with Coot [50]. The final model's overall stereochemical quality and the agreement between them and the experimental data were assessed by the program Molprobity [51] and the appropriate Coot routines.

Author contributions

The manuscript was written through the contributions of all authors. SMGD, ALBA, and WWY designed the research; IMF, JENQ, ACSB, CTR, MV, TK, CSD, and NBB conducted the experiments; SMGD, ALBA, FVD, and WWY analyzed the experimental data; SMGD, ALBA, and IMF wrote the paper. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding sources

This work was supported by São Paulo State Research Foundation, FAPESP, under grants 2012/14298-9 and 2014/20673-2 (A.L.B.A.), 2014/15968-3 and 2019/16351-3 (S.M.G.D.) and fellowships 2013/05668-0 and BEPE 2012/04563-7 (I.M.F.). We acknowledge CIBFar (FAPESP CEPID 2013/07600-3) for full support. The Structural Genomics Consortium is a registered charity (number 1097737) that receives funds from AbbVie, Boehringer Ingelheim, the Canada Foundation for Innovation, the Canadian Institutes for Health Research, Genome Canada, GlaxoSmithKline, Janssen, Lilly Canada, the Novartis Research Foundation, the Ontario Ministry of Economic Development and Innovation, Pfizer, Takeda, and the Wellcome Trust [092809/Z/10/Z].

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest related to this work.

Acknowledgments

We thank LNBio for financial support and access to all facilities (LBE, LPP, LEC, and Robolab). We thank Dr. Alessandra Girasole for expert technical support. The authors would like to thank Diamond Light Source for beamtime (proposal mx8421), and the staff of beamline I03 for assistance with crystal testing and data collection.

References

- [1] W.H. Koppenol, P.L. Bounds, C.V. Dang, Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism, *Nat. Rev. Canc.* 11 (2011) 325–337, <https://doi.org/10.1038/nrc3038>.
- [2] D.R. Wise, C.B. Thompson, Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer, *Trends Biochem. Sci.* 35 (2010) 427–433, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003>.
- [3] J.-B. Wang, J.W. Erickson, R. Fuji, S. Ramachandran, P. Gao, R. Dinavahi, K.F. Wilson, A.L.B. Ambrosio, S.M.G. Dias, C.V. Dang, R.A. Cerione, Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation, *Canc. Cell* 18 (2010) 397, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.011>.
- [4] P. Gao, I. Tchernyshyov, T.C. Chang, Y.S. Lee, K. Kita, T. Ochi, K.I. Zeller, A.M. De Marzo, J.E. Van Eyk, J.T. Mendell, C.V. Dang, C-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism, *Nature* 458 (2009) 762–765, <https://doi.org/10.1038/nature07823>.
- [5] M.J. Lukey, K.S. Greene, J.W. Erickson, K.F. Wilson, R.A. Cerione, The oncogenic transcription factor c-Jun regulates glutaminase expression and sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy, *Nat. Commun.* 7 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.1038/ncomms11321>.
- [6] K.M. Elgadi, R.A. Meguid, M. Qian, W.W. Souba, S.F. Abcouwer, Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing, *Physiol. Genom.* 1999 (1999) 51–62, <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.1999.1.2.51>.
- [7] M. Martín-Rufián, M. Tosina, J.A. Campos-Sandoval, E. Manzanares, C. Lobo, J.A. Segura, F.J. Alonso, J.M. Matés, J. Márquez, Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism, *PLoS One* 7 (2012), e38380, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038380>.
- [8] J. Márquez, A.R. López de la Oliva, J.M. Matés, J.A. Segura, F.J. Alonso, Glutaminase, A multifaceted protein not only involved in generating glutamate, *Neurochem. Int.* 48 (2006) 465–471, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.10.015>.
- [9] M. Il Chung-Bok, N. Vincent, U. Jhala, M. Watford, Rat hepatic glutaminase: identification of the full coding sequence and characterization of a functional promoter, *Biochem. J.* 324 (1997) 193–200, <https://doi.org/10.1042/bj3240193>.
- [10] J.A. Campos-Sandoval, A.R. López de la Oliva, C. Lobo, J.A. Segura, J.M. Matés, F.J. Alonso, J. Márquez, Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: affinity purification, kinetic and molecular characterization, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 765–773, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.002>.
- [11] P.M. Gómez-Fabre, J.C. Aledo, A. Del Castillo-Olivares, F.J. Alonso, I. Núñez De Castro, J.A. Campos, J. Márquez, Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase, *Biochem. J.* 345 (2000) 365–375, <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3450365>.
- [12] V. de la Rosa, J.A. Campos-Sandoval, M. Martín-Rufián, C. Cardona, J.M. Matés, J.A. Segura, F.J. Alonso, J. Márquez, A novel glutaminase isoform in mammalian tissues, *Neurochem. Int.* 55 (2009) 76–84, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.02.021>.
- [13] A.J. Verhoeven, J.F. van Iwaarden, S.K. Joseph, A.J. Meijer, Control of rat-liver glutaminase by ammonia and pH, *Eur. J. Biochem.* 133 (1983) 241–244, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07454.x>.
- [14] P.J. Snodgrass, P. Lund, Allosteric properties of phosphate-activated glutaminase of human liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 798 (1984) 21–27, [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(84\)90005-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(84)90005-9).
- [15] M. Martín-Rufián, M. Tosina, J.A. Campos-Sandoval, E. Manzanares, C. Lobo, J.A. Segura, F.J. Alonso, J.M. Matés, J. Márquez, Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism, *PLoS One* 7 (2012), e38380, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038380>.
- [16] W. Hu, C. Zhang, R. Wu, Y. Sun, A. Levine, Z. Feng, Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 7455–7460, <https://doi.org/10.1073/pnas.1001006107>.
- [17] S. Suzuki, T. Tanaka, M.V. Poyurovsky, H. Nagano, T. Mayama, S. Ohkubo, M. Lokshin, H. Hosokawa, T. Nakayama, Y. Suzuki, S. Sugano, E. Sato, T. Nagao, K. Yokote, I. Tatsuno, C. Prives, Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 7461–7466, <https://doi.org/10.1073/pnas.1002459107>.
- [18] M. Szeliga, J. Albrecht, Opposing roles of glutaminase isoforms in determining glioblastoma cell phenotype, *Neurochem. Int.* 88 (2015) 6–9, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.11.004>.
- [19] M. Szeliga, M. Bogacińska-Karaś, A. Różycka, W. Hilgier, J. Marquez, J. Albrecht, Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells, *Tumor Biol.* 35 (2014) 1855–1862, <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1247-4>.
- [20] J. Liu, C. Zhang, M. Lin, W. Zhu, Y. Liang, X. Hong, Y. Zhao, K.H. Young, W. Hu, Z. Feng, Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma, *Oncotarget* 5 (2014) 2635–2647, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1862>.
- [21] G. Qing, B. Li, A. Vu, N. Skuli, Z.E. Walton, X. Liu, P.A. Mayes, D.R. Wise, C.B. Thompson, J.M. Maris, M.D. Hogarty, M.C. Simon, ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation, *Canc. Cell* 22 (2012) 631–644, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.021>.
- [22] Y.Z. Lee, C.W. Yang, H.Y. Chang, H.Y. Hsu, I.S. Chen, H.S. Chang, C.H. Lee, J. chy Lee, C.R. Kumar, Y.Q. Qiu, Y.S. Chao, S.J. Lee, Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells, *Oncotarget* 5 (2014) 6087–6101, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2173>.
- [23] M.M. Dias, D. Adamoski, L.M. dos Reis, C.F.R. Ascensão, K.R.S. de Oliveira, A.C.P. Mafrá, A.C. da Silva Bastos, M. Quintero, C. de G. Cassago, I.M. Ferreira, C.H.V. Fidelis, S.A. Rocco, M.C. Bajgelman, Z. Stine, I. Berindan-Neagoe, G.A. Calin, A.L.B. Ambrosio, S.M.G. Dias, GLS2 is protumorigenic in breast cancers, *Oncogene* 39 (2020) 690–702, <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1007-z>.
- [24] M.J. Lukey, A.A. Cluntun, W.P. Katt, M. chong, J. Lin, J.E. Druso, S. Ramachandran, J.W. Erickson, H.H. Le, Z.E. Wang, B. Blank, K.S. Greene, R.A. Cerione, Liver-type glutaminase GLS2 is a druggable metabolic node in luminal-subtype breast cancer, *Cell Rep.* 29 (2019) 76–88, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.076>, e7.
- [25] C.C. Pasquali, Z. Islam, D. Adamoski, I.M. Ferreira, R.D. Righeto, J. Bettini, R.V. Portugal, W.W.Y. Yue, A. Gonzalez, S.M.G. Dias, A.L.B. Ambrosio, The origin and evolution of human glutaminases and their atypical C-terminal ankyrin repeats, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 11572–11585, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787291>.
- [26] A. Cassago, A.P.S. Ferreira, I.M. Ferreira, C. Fornezari, E.R.M. Gomes, K.S. Greene, H.M. Pereira, R.C. Garratt, S.M.G. Dias, A.L.B. Ambrosio, Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 1092–1097, <https://doi.org/10.1073/pnas.1112495109>.
- [27] A.P.S. Ferreira, A. Cassago, K. De Almeida Gonçalves, M.M. Dias, D. Adamoski, C.F.R. Ascensão, R.V. Honorato, J.F. De Oliveira, I.M. Ferreira, C. Fornezari, J. Bettini, P.S.L. Oliveira, A.F.P. Leme, R.V. Portugal, A.L.B. Ambrosio, S.M.G. Dias, Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 28009–28020, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501346>.
- [28] W.P. Katt, M.J. Lukey, R.A. Cerione, A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis, *Future Med. Chem.* 9 (2017) 223–243, <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0190>.
- [29] S. El-Gebali, J. Mistry, A. Bateman, S.R. Eddy, A. Luciani, S.C. Potter, M. Qureshi, L.J. Richardson, G.A. Salazar, A. Smart, E.L.L. Sonnhammer, L. Hirsh, L. Paladini, D. Piovesan, S.C.E. Tosatto, R.D. Finn, The Pfam protein families database in 2019, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D427–D432, <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>.
- [30] Y. Li, J.W. Erickson, C.A. Stalneck, W.P. Katt, Q. Huang, R.A. Cerione, S. Ramachandran, Mechanistic basis of glutaminase activation, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 20900–20910, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720268>.
- [31] C. Chothia, A.M. Lesk, The relation between the divergence of sequence and structure in proteins, *EMBO J.* 5 (1986) 823–826, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04288.x>.
- [32] J.D. Klingman, P. Handler, Partial purification and properties of renal glutaminase, *J. Biol. Chem.* 232 (1958) 369–380, [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)70403-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)70403-1).
- [33] N.P. Curthoys, M. Watford, Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism, *Annu. Rev. Nutr.* 15 (1995) 133–159, <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.15.070195.001025>.
- [34] J.D. McGivan, N.M. Bradford, Characteristics of the activation of glutaminase by ammonia in sonicated rat liver mitochondria, *BBA - Gen. Subj.* 759 (1983) 296–302, [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(83\)90327-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(83)90327-6).
- [35] M. Patel, J.D. McGivan, Partial purification and properties of rat liver glutaminase, *Biochem. J.* 220 (1984) 583–590, <https://doi.org/10.1042/bj2200583>.
- [36] C.A. de Guzzi Cassago, M.M. Dias, M.P. Pinheiro, C.C. Pasquali, A.C.S. Bastos, Z. Islam, S.R. Consonni, J.F. de Oliveira, E.M. Gomes, C.F.R. Ascensão, R. Honorato, B.A. Pauletti, N.D.C. Indolfo, H.V.R. Filho, P.S.L. de Oliveira, A.C.M. Figueira, A.F. Paes Leme, A.L.B. Ambrosio, S.M.G. Dias, Glutaminase affects the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) via direct interaction, *Biochemistry* 57 (2018) 6293–6307, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00773>.
- [37] L. Olalla, A. Gutiérrez, A.J. Jiménez, J.F. López-Téllez, Z.U. Khan, J. Pérez, F.J. Alonso, V. de la Rosa, J.A. Campos-Sandoval, J.A. Segura, J.C. Aledo, J. Márquez, Expression of the scaffolding PDZ protein glutaminase-interacting protein in mammalian brain, *J. Neurosci. Res.* 86 (2008) 281–292, <https://doi.org/10.1002/jnr.21505>.
- [38] B.R. Olsen, G. Svenneby, E. Kvamme, B. Tveit, T. Eskeland, Formation and ultrastructure of enzymically active polymers of pig renal glutaminase, *J. Mol. Biol.* 52 (1970) 239–245, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90028-8).
- [39] S. Godfrey, T. Kuhlenschmidt, P. Curthoys, Correlation between activation and

- dimer formation of rat renal phosphate-dependent glutaminase, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 1927–1931, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71846-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71846-2).
- [40] Y.Z. Huang, W.E. Knox, A comparative study of glutaminase isozymes in rat tissues, *Enzyme* 21 (1976) 408–426, <https://doi.org/10.1159/000458890>.
- [41] M.I. Stefan, N. Le Novère, Cooperative binding, *PLoS Comput. Biol.* 9 (2013), e1003106, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003106>.
- [42] H. Prinz, Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms, *J. Chem. Biol.* 3 (2010) 37–44, <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0029-3>.
- [44] F.W. Sayre, E. Roberts, Preparation and some properties of a phosphate-activated glutaminase from kidneys, *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 1128–1134, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77352-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77352-9).
- [45] B. Delabarre, S. Gross, C. Fang, Y. Gao, A. Jha, F. Jiang, J. Song J., W. Wei, J.B. Hurov, Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor, *Biochemistry* 50 (2011) 10764–10770, <https://doi.org/10.1021/bi201613d>.
- [46] T.G.G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H.R. Powell, A.G.W. Leslie, iMOSFLM : a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 67 (2011) 271–281, <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>.
- [47] P. Evans, Scaling and assessment of data quality, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 62 (2006) 72–82, <https://doi.org/10.1107/S0907444905036693>.
- [48] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 658–674, <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- [49] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 53 (1997) 240–255, <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>.
- [50] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 486–501, <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- [51] V.B. Chen, W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 12–21, <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.

Anexo V. Formulário CIBio-CNPEM.

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2017-23

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

1. Título do projeto: Caracterização bioquímica e celular da interação da enzima Glutaminase com as enzimas glicolíticas Enolase I e Piruvato Kinase M2

2. Pesquisador responsável: Sandra Martha Gomes Dias

3. Experimentador(es): Alliny Cristiny da Silva Bastos

Nível do treinamento do experimentador: ☐ Iniciação científica, ☐ Mestrado, ☒ Doutorado,
☐ Pós-doutorado, ☐ Nível técnico, ☐ Outro, especifique:

4. Unidade operativa: ☐ LNLS ☐ LNNano ☐ CTBE ☒ LNBio

5. Maior Classe de risco de OGM deste projeto: ☒ Risco I ☐ Risco II ☐ Risco III ☐ Risco IV

6. O projeto é confidencial? ☒ Não ☐ Sim

7. No caso de projeto confidencial, o título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM? ☐ Não ☐ Sim

8. Qual é o objetivo do projeto? Caracterização em ensaios bioquímicos e celulares da interação das isoformas KGA e GAC com as proteínas ENO1 e PKM2 e avaliação do impacto destas parcerias para o metabolismo tumoral. O projeto será iniciado com a avaliação da interação de GAC e KGA com estas duas proteínas, mas, dependendo da evolução dos resultados, enfoque será dado a apenas uma das interações para que a mesma possa ser caracterizada mais profundamente.

9. Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador, o transgene e classe de risco do OGM. (1) pcDNA5.1_PKM2_Flag: vetor de expressão em células de mamífero, linhagem humana de próstata PC-3, expressão de PKM2 de Homo sapiens, risco I; (2) pcDNA5.1_ENO1_Flag: vetor de expressão em células de mamífero, linhagem humana de próstata PC-3, expressão de ENO1 de Homo sapiens, risco I; (3) pcDNA5.1_Flag: vetor de expressão em células de mamífero, linhagem humana de próstata PC-3, plasmídeo controle, risco I; (4) pQC_hGAC_IRES_puro: retrovírus murino para expressão de GAC, linhagem humana de próstata PC-3, expressão de GAC de Homo sapiens, risco I; (5) pQC_hKGA_IRES_puro: retrovírus murino para expressão de KGA, linhagem humana de próstata PC-3, expressão de KGA de Homo sapiens, risco I; (6) Ecoli-DH5alpha-pcDNA5.1: bactéria E Coli, risco I; (7) Ecoli-DH5alpha-pQC_IRES_puro: bactéria E Coli, risco I; (8) pET28a_ENO1: vetor de expressão em células bacterianas, expressão de ENO1 de Homo sapiens, risco I; (9) pET28a_PKM2: vetor de expressão em células bacterianas, expressão de PKM2 de Homo sapiens, risco I; (11).

10. Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM: (1) PKM2: isoforma I da enzima piruvato kinase; participa do metabolismo da glicose; (2) ENO1: enolase I, participa do metabolismo da glicose; (3) GAC: glutaminase C, metabolismo da glutamina (4) KGA: kidney-type glutaminase, metabolismo da glutamina.

11. Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente? Não.

12. Algum OGM é agente patogênico esporulante? ☒ Não ☐ Sim: _____

13. Algum OGM é agente patogênico e pode se propagar pelo ar? ☒ Não ☐ Sim: _____

14. Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs? Descreva. Todos os OGMs apresentam resistência ao antibiótico ampicilina ou kanamicina ou cloranfenicol. Nenhum transgene confere infectividade ou patogenicidade ao organismo receptor.

15. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma avaliação médica periódica para experimentadores? ☒ Não ☐ Sim. Que tipo de avaliação? (Ex: consulta com médico, exames laboratoriais etc...) Qual periodicidade? Onde será realizada esta avaliação?

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2017-23

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

16. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma vacinação preventiva para experimentadores? ☒ Não ☐ Sim. Qual periodicidade? Onde será realizada esta vacinação?

17. No caso de uma eventual contaminação com organismos patogênicos ou toxinas, descreva medidas emergenciais para tratamento de pessoas envolvidas, descontaminação de equipamentos, instalações e meio ambiente.

O pesquisador principal tem conhecimento de que conforme a RDC 50 de 21/02/2002 da Anvisa, é responsável por determinar a classificação de riscos de seu projeto, assim como determinar EPIs e medidas de segurança necessárias para prevenir a contaminação de experimentadores, equipamentos, instalações, terceiros e meio ambiente. O pesquisador responsável também precisará providenciar rotina para realização de exames médicos e laboratoriais para sua equipe, bem como vacinações quando aplicável. Todos os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados pelo pesquisador principal, que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

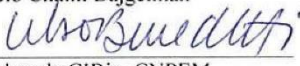
Assinatura eletrônica do pesquisador responsável:

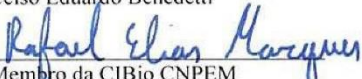
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 17/8/2017.

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

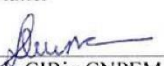
comentários da CIBio:


Presidente da CIBio CNPEM
Marcio Chaim Bajgelman


Membro da CIBio CNPEM
Celso Eduardo Benedetti


Membro da CIBio CNPEM
Rafael Elias Marques Pereira Silva


Membro da CIBio CNPEM
Roberto Ruller

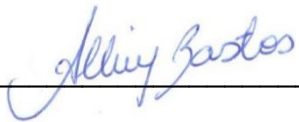

Membro da CIBio CNPEM
Silvia Kazue Missawa

Anexo VI. Declaração de direitos autorais.

Declaração

As cópias de artigo de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou em anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado intitulada, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CELULAR DA INTERAÇÃO DA ENZIMA GLUTAMINASE COM A ENZIMA GLICOLÍTICA PIRUVATO QUINASE M2 não infringem os dispositivos da Lei nº 9610/98 nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 24 de julho de 2021

Assinatura:  _____

Nome da autora: Alliny Cristiny da Silva Bastos
RG: MG16389360

Assinatura:  _____

Nome da orientadora: Sandra Martha Gomes Dias
RG: M7854719