

Projeto de Iniciação Científica PIBIC 2020

**Estudo do impacto funcional de mutações detectadas na enzima
glutaminase em tumores de câncer de mama**

ORIENTADOR: Sandra Martha Gomes Dias

Agosto 2020

Sumário

1. Introdução.....	3
1.1 Alterações tumorais	3
1.2 Análise de dados genômicos do TCGA.....	6
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. Metodologia	10
3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e mutação sítio-dirigida (já realizados).....	10
3.2. Transformação de bactérias	12
3.3. Minipreparação de plasmídeo (Miniprep).....	12
3.4. Sequenciamento de DNA	12
3.5. Expressão proteica heteróloga em bactérias e lise celular	13
3.6. Cromatografia de afinidade a metais quelados	13
3.7. Cromatografia de troca aniônica	14
3.8. Cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel)	14
3.9. Ensaio de atividade enzimática	15
3.10. Espalhamento de luz dinâmico (<i>Dynamic Light Scattering</i> , DLS)	15
3.11. <i>Thermal Shift</i>	15
3.12. Cultura de células e geração de sub-linhagens com expressão dos mutantes.	16
3.13. <i>Western Blotting</i>	16
3.14. Ensaio de proliferação celular	17
3.15. Ensaio de migração e invasão <i>in vitro</i>	17
4. Referências.....	18

Resumo

A proliferação celular comanda os processos de embriogênese e de crescimento do organismo, sendo essencial para a correta função de vários tecidos adultos. Além de ser importante para a homeostase do organismo, a sua desregulação compõe a força motriz do desenvolvimento tumoral. Em células tumorais, o consumo de glutamina e a atividade glutaminolítica encontram-se aumentados. O metabolismo de glutamina fornece não apenas energia mas apresenta papel chave na produção de blocos biossintéticos – essenciais para célula proliferativas, além de contribuir para a progressão maligna. A glutaminase é a primeira enzima na via de metabolismo da glutamina, convertendo glutamina em glutamato. Dois genes diferentes, *GLS* e *GLS2*, encontrados em cromossomos distintos codificam as enzimas glutaminases em mamíferos. A isoforma glutaminase C (GAC), produto de *splicing alternativo* do gene *GLS*, é a mais ubiquamente expressa em diferentes tipos de tumores. A GAC apresenta-se como tetrâmero em sua estrutura quaternária clássica; contudo, resultados prévios do grupo indicam que estes tetrâmeros de GAC podem se associar entre si, resultando em estruturas oligoméricas maiores do tipo bastão. A formação de oligômeros está relacionada a um aumento de atividade enzimática e ocorre na presença de fosfato inorgânico. A análise de dados genômicos de tumores, disponíveis no banco de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), revela a existência de diversas mutações em *GLS* em diferentes tipos tumorais, algumas ocorrendo em resíduos de aminoácidos altamente conservados. Nenhuma destas mutações, entretanto, foi descrita ainda como tendo relação direta com o desenvolvimento tumoral. Neste projeto vamos avaliar, por mutagênese sítio-dirigida, 8 mutações no gene codificante da isoforma GAC com alto potencial de afetar a atividade da enzima. Os mutantes serão expressos, produzidos e purificados de fonte heteróloga, e sua atividade cinética determinada e comparada com a da enzima selvagem. Em adição, vamos avaliar por *Dynamic Light Scattering* (DLS) e *Thermal Shift* o impacto das mutações para a oligomerização e estabilidade da enzima. Por fim, o(s) mutante(s) que impactarem na atividade da enzima serão expressos ectopicamente em linhagem de células de câncer de mama (com *knock down* da enzima endógena) para avaliar o feito do(s) mesmo(s) na proliferação, migração e invasão das células.

1. Introdução

1.1 Alterações tumorais

O processo de proliferação celular é essencial para a embriogênese, além de participar no crescimento e manutenção de diversos tecidos adultos. A regulação desse processo é um dos componentes-chave para a manutenção da homeostase em um indivíduo, e é o foco de vários estudos atuais. Tecidos muito proliferativos normais ou tumorais têm uma elevada necessidade de acumular biomassa, uma vez que necessitam aumentar a quantidade de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos para poderem gerar duas células-filha; em geral, estes tecidos captam mais nutrientes do que células quiescentes e os utilizam tanto para a produção de energia quanto em vias de síntese de macromoléculas (Vander Heiden et al., 2009).

Na década de 1920, o cientista alemão Otto Warburg notou que alguns tipos de células tumorais consumiam glicose a taxas elevadas, produzindo ácido láctico mesmo na presença de oxigênio (figura 1A) (Koppenol et al., 2011). A esta observação, válida especialmente para tipos tumorais mais agressivos, foi dado o nome de Efeito Warburg. À época, a explicação proposta por Warburg foi de que a respiração celular nestes tecidos tumorais estaria desregulada ou danificada. Atualmente, a teoria aceita é a de que a ativação da via glicolítica pode proporcionar vantagens ao tumor, como a produção de macromoléculas a partir dos metabólitos gerados. Além disso, sabe-se hoje, que esta via metabólica é controlada por vários oncogenes e genes supressores tumorais (Kim and Dang, 2006).

Sabe-se hoje que, salvo algumas exceções, células tumorais continuam realizando fosforilação oxidativa a partir de outras fontes. Uma das principais fontes de intermediários para alimentação do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) é a glutamina, aminoácido que pode ser convertido em α -cetogluturato (intermediário do TCA) ou então gerar uma grande gama de moléculas úteis para o metabolismo celular (Newsholme et al., 2003). Por ser o principal aminoácido na corrente sanguínea, ser consumida em grande quantidade (especialmente por tecidos proliferativos) e estar envolvida na manutenção da fosforilação oxidativa e geração de intermediários biossintéticos, a glutamina é um elemento de extrema importância para o metabolismo de diversos tumores (figura 1B) (Hensley et al., 2013).

As enzimas glutaminases fazem a conversão de glutamina em glutamato, sendo a primeira enzima de sua rota metabólica. Os genes *GLS* e *GLS2* codificam as 4 isoformas de glutaminase conhecidas em mamíferos. Dentre elas, a glutaminase C (GAC, resultante do splicing alternativo do gene *GLS*) se destaca por ser mais ubiquamente expressa em diferentes tecidos e por estar associada a tumores em diferentes estudos (Pan et al., 2015) (Huang et al., 2014). A enzima em sua forma ativa tem estrutura tetramérica; entretanto, resultados recentes do nosso grupo mostraram que, na presença de fosfato, a GAC pode se unir em unidades supratetraméricas do tipo fibras não beta-amilóides, formando oligômeros a partir de repetições de tetrâmeros (figura 2A) (Ferreira et al., 2013). Esta organização foi

caracterizada por microscopia eletrônica do tipo *negative staining*, mutagênese, *docking* e espectrometria de massas (MS) de unidades *crosslinked* por *disuccinimidyl suberate* (DSS) e mostrou se tratar de duas fitas de tetrâmeros unidos pelos N e C-terminais (figura 2B) arranjadas de modo helicoidal (figura 2C). (Ferreira et al., 2013). A determinação da estrutura destes polímeros está sendo definida por *cryo-electron microscopy* por nosso grupo de pesquisa).

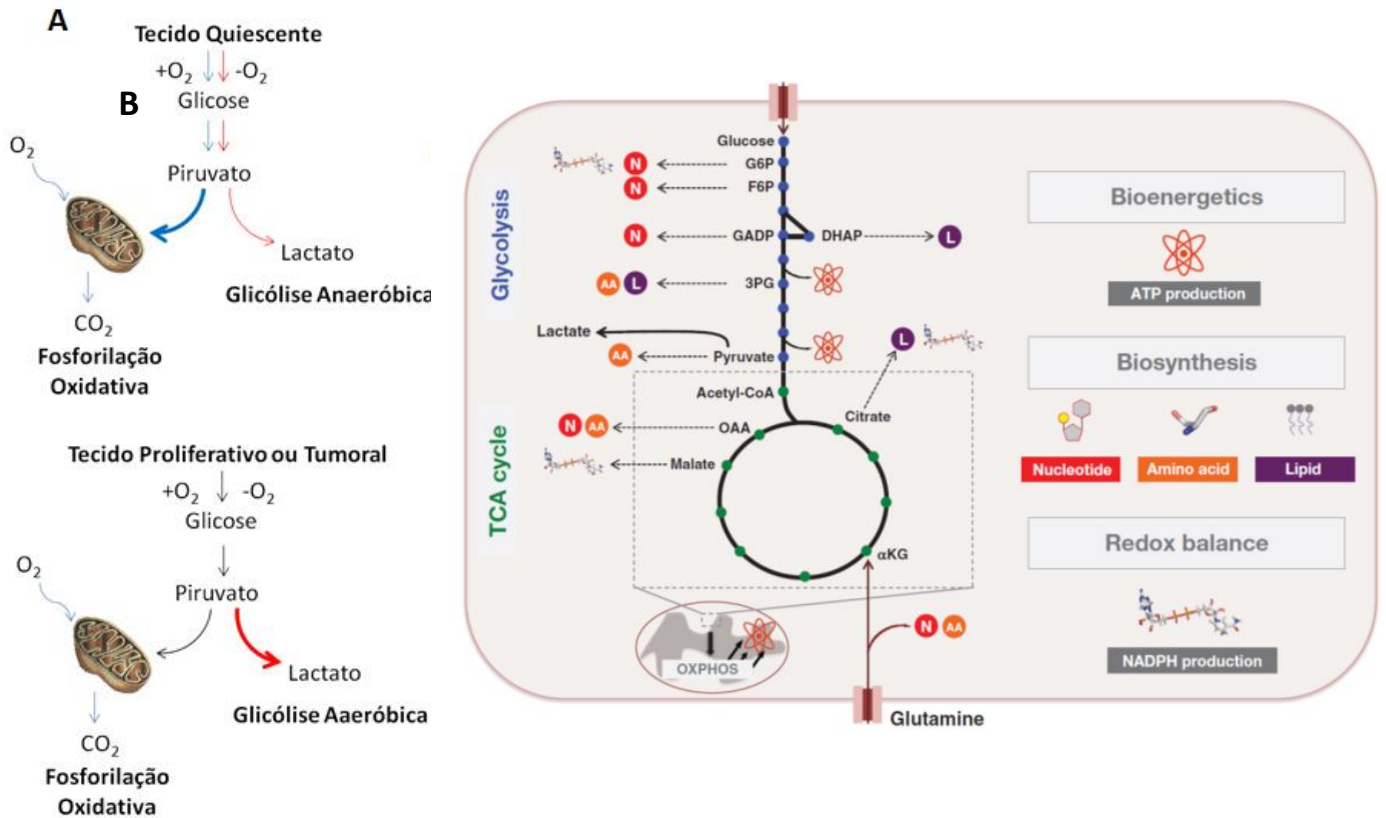


Figura 1. Alterações metabólicas em células proliferativas.(A). Diferenças entre o metabolismo de células quiescentes diferenciadas (em cima) e de células proliferativas (abaixo) no tocante ao destino do piruvato. (B). Células tumorais obtêm os precursores biossintéticos a partir do metabolismo da glicose e glutamina. A glicose e a glutamina, os quais são os dois nutrientes mais abundantes no meio extracelular, fornecem carbono para a síntese de ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (na imagem, representados com N, L e AA). A biossíntese de purina e pirimidina utiliza ribose 5-fosfato (R5P) produzida pelos braços oxidativos (a partir de G6P) e não-oxidativos (a partir de F6P) da via ribose fosfato, e aminoácidos derivados da glicose e glutamina. A síntese de ácidos graxos, necessária para a produção de lipídeos requer acetil-CoA (Ac-CoA) gerado a partir do citrato exportado da mitocôndria. A síntese de proteínas requer aminoácidos, tRNA e ribossomos, sendo que ambas, glicose e glutamina, são usados para gerar estas moléculas. Glutamina também doa nitrogênio para nucleotídeos e para a síntese de aminoácidos. Adaptado de Cantor et al, 2012. G6P, glicose-6-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; GADP, gliceraldeído3-fosfato; 3PG, 3-fosfoglicerato; DHAP, fosfato de diidroxiacetona; OAA, oxaloacetato; αKG, alfa cetoglutarato.

A oligomerização supratetramérica também está associada a um aumento na atividade enzimática da GAC, dado que o mutante K325A (presente na alça que bordeia o sítio catalítico denominada pelo grupo de *gating loop*) forma estas fibras mesmo na ausência de fosfato (figura 3A e B). Por outro lado, o mutante R322A, também presente nesta alça, não forma as fibras (conforme julgado por *negative staining* ME), mesmo na presença de fosfato (figura 3A e B). O inibidor de glutaminase BPTES (Robinson et al., 2007) age desestruturando esta organização e gerando tetrâmeros inativos (Ferreira et al., 2013).

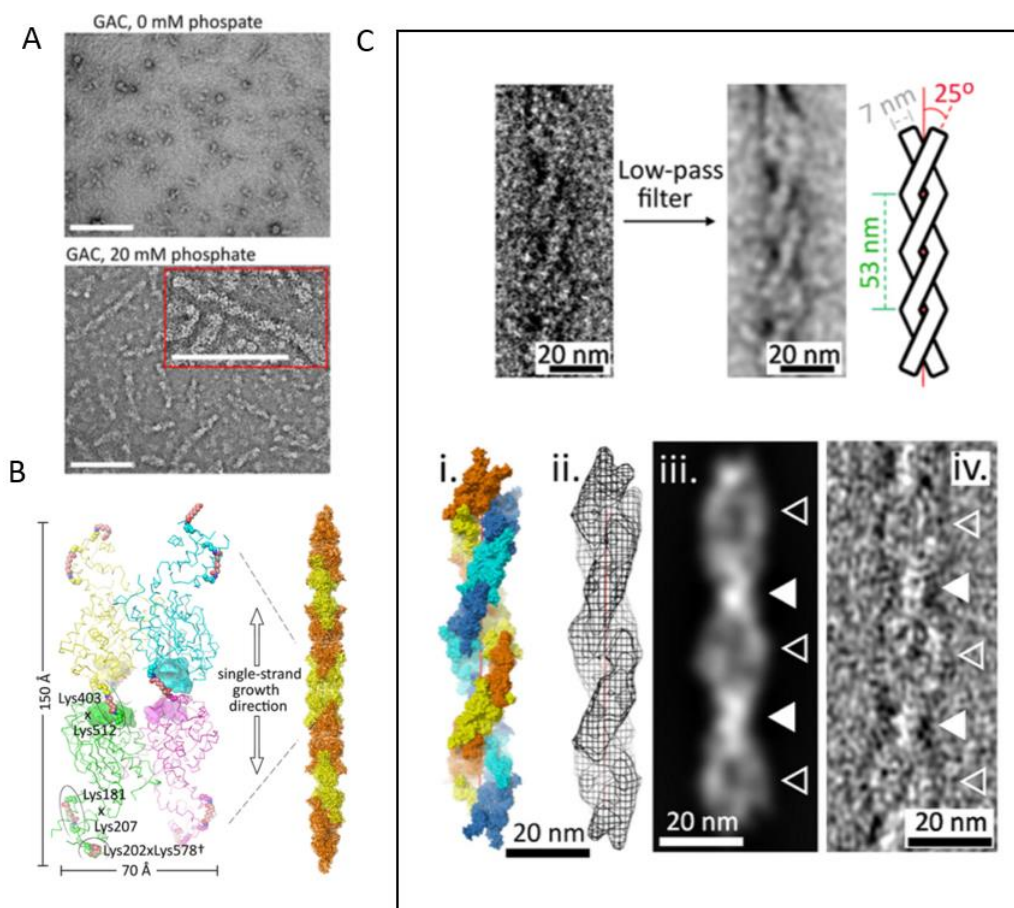


Figura 2. (A) Organização supratetramérica de GAC em presença de 20 mM de fosfato, ativador conhecido de glutaminases GLS1. (B) Posição relativa de pares de lisina *crosslinked* por DSS no tetrâmero, como identificado por EM. Os limites do sítio ativo são delimitados por superfícies sólidas. †, Lys578 não está modelada na estrutura cristalina. A direção proposta para o crescimento da fita simples é no eixo mais longo do tetrâmero, através de uma interação entre pares de domínios N-terminais. Cores alternadas facilitam a identificação dos tetrâmeros ao longo da fita. (C) A remoção de altas frequências (fortemente associadas a ruído) das micrografias de TEM destaca a natureza de dupla-fita da superestrutura, permitindo a determinação de suas características geométricas (quadro superior); a fita dupla foi modelada manualmente (*quadro i*), utilizando duas cópias entrelaçadas de fita simples. No *quadro ii*, o mapa de Fourier calculado com amplitudes e fases do modelo dupla-fita é projetado bidimensionalmente, e o resultado final é apresentado no *quadro iii*. As características são comparáveis às observadas no *quadro iv*, no que diz respeito à presença de áreas densas e finas (triângulos preenchidos) e áreas amplas e de baixa densidade (triângulos vazios) (Ferreira et al., 2013).

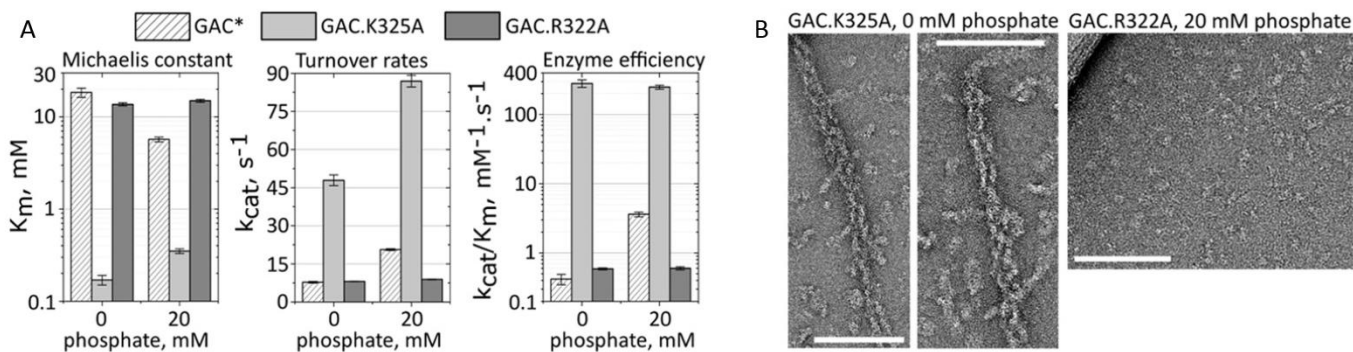


Figura 3. Comparação de mutantes GAC K325A e R322A com a proteína selvagem. (A) GAC K325A apresenta uma eficiência catalítica muito mais alta, mesmo na falta de fosfato, quando comparada à GAC *wild-type* e à mutante inativa GAC R322A. (B) A alta eficiência enzimática da GAC K325A correlaciona com sua tendência de formar polímeros estruturados como fitas, independente da presença de fosfato inorgânico e DSS. Por outro lado, a mutante cataliticamente inativa GAC R322A permanece em forma tetramérica, mesmo na presença de 20mM de fosfato. A escala representa 100 nm (Ferreira et al., 2013).

1.2 Análise de dados genômicos do TCGA

O banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) é um projeto publicamente financiado ligado ao NIH, contando com mais de 20.000 amostras de tumor e tecido normal pareado, de 33 diferentes tipos tumorais. Entre as análises genômicas e proteômicas feitas para cada tumor, estão o sequenciamento de RNA e DNA, sequenciamento de miRNA, análises de metilação de DNA e *profiling* proteômico (Tomczak et al., 2015). Além disto, dados clínicos dos pacientes também estão disponíveis.

Para o presente projeto, utilizamos o site cBioPortal, um centro de análise de dados de genoma que processa dados do TCGA, facilitando sua obtenção, uso e interpretação (Cerami et al., 2012) para verificarmos os aminoácidos mutados no gene *GLS* em todas as amostras de todos os tumores indexados no portal. Com esta análise, encontramos que o gene está mutado em diferentes regiões e em diferentes tipos tumorais (Figura 4). Para escolhermos as mutações de interesse, nos baseamos na análise do algoritmo do *mutation assessor*. O programa prediz o impacto funcional causado pela substituição de aminoácidos em proteínas, baseado na conservação evolutiva do aminoácido afetado em homólogos da proteína (Reva et al., 2011). Além de analisar a conservação evolutiva do resíduo entre as espécies, o algoritmo é capaz de dividir as sequências homólogas em subfamílias e analisar a especificidade funcional em resíduos de sequências da mesma subfamília, refinando ainda mais a análise. Não coincidentemente, os oito mutantes selecionados se encontram no domínio de glutaminase da enzima (figura 5).

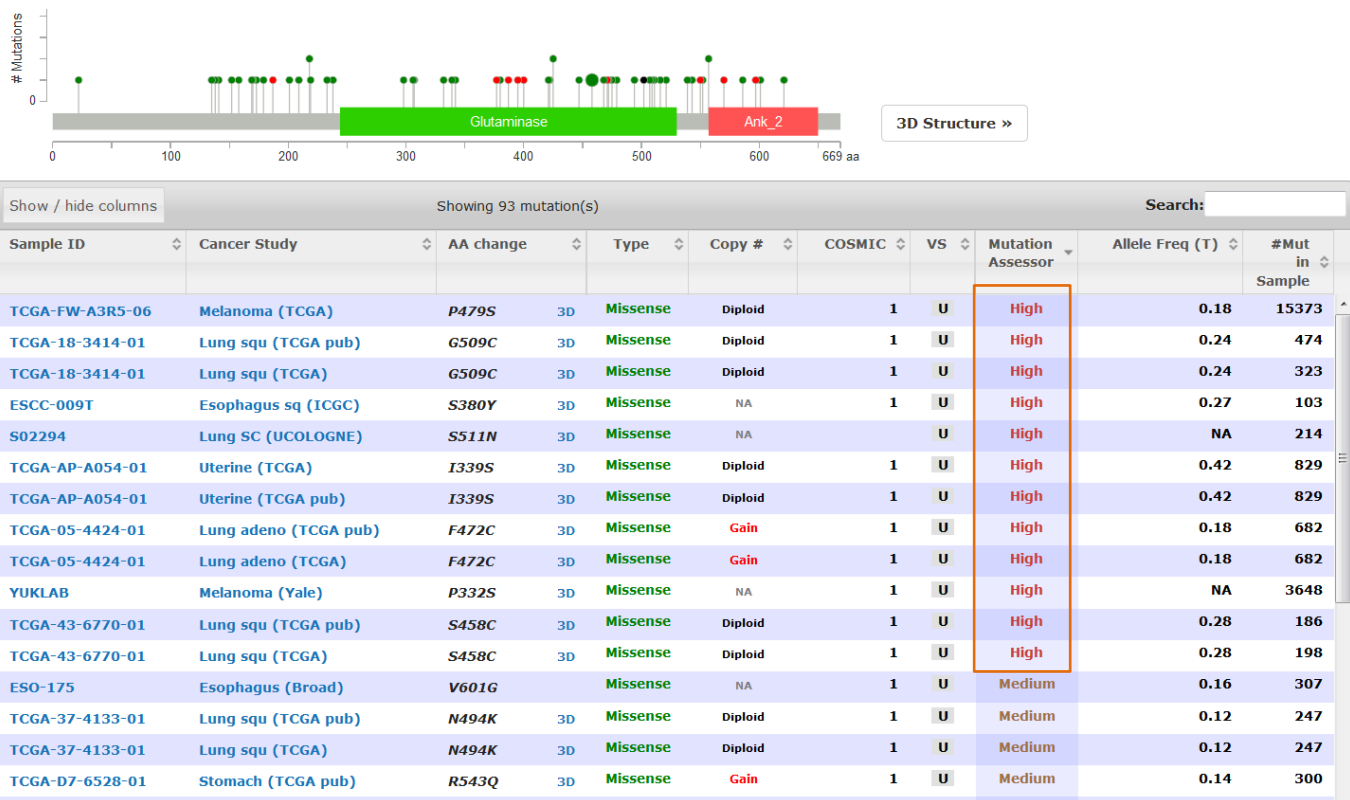


Figura 4. Query obtido para GLS no cBioPortal. As colunas da tabela trazem informação sobre o tipo de tumor, mutação ocorrida, número de cópias da mutação, frequência alélica e número total de mutações detectadas na amostra. Todas as mutações com escore *high* conforme julgado pelo *mutation assessor* foram escolhidas para o projeto (coluna marcada em laranja). O gráfico ao topo da tabela demonstra visualmente a posição e quantidade de resíduos mutado nos casos descritos. Os dados são relativos à GAC humana (hGAC); este projeto foi realizado com a GAC murina (mGAC), cuja sequência de aminoácidos apresenta identidade de 93% em relação à humana.

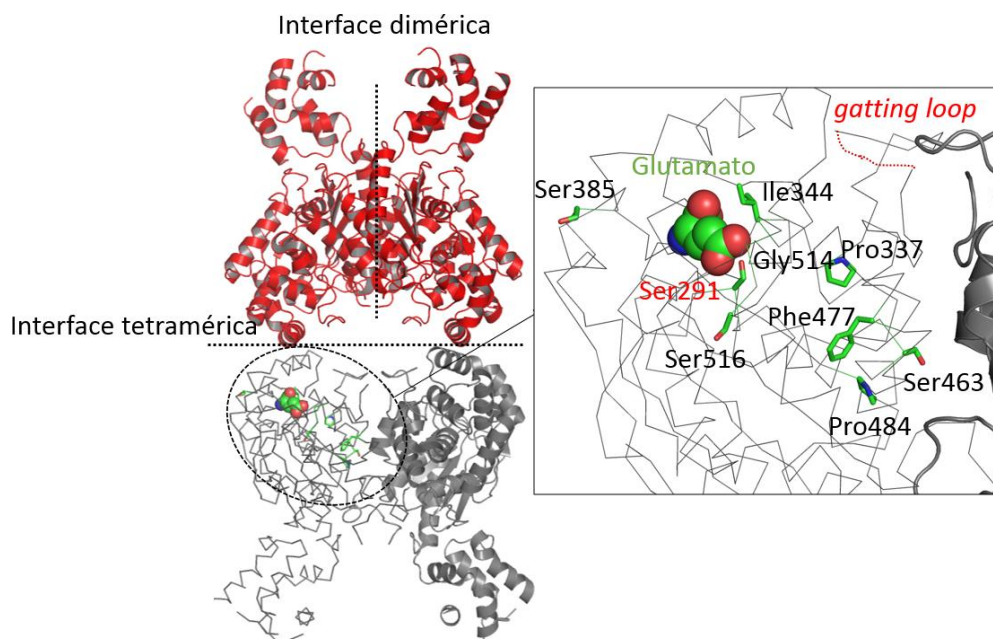


Figura 5. Representação da estrutura cristalográfica da proteína murina GAC (PDB ID 3ss3). Cada unidade do complexo tetramérico está representada por *ribbons* ou *cartoons*. As interfaces diméricas e tetramérica são indicadas, assim como o produto da reação catalisada pela enzima, glutamato (representado como esferas). No *inset*, detalhe do sítio catalítico de um dos monômeros e, representado por *sticks*, cada um dos resíduos identificados pelo *mutation assessor* como de alta chance de afetar a atividade da proteína, além do resíduo catalítico S219. De fato, todos os resíduos bordeiam o sítio podendo ter alguma implicação funcional para a enzima. O *gating loop* (Cassago et al., 2012)

está desordenado na estrutura e, portanto, representado por tracejado na figura. Os números dos resíduos equivalem, na sequência de camundongo, aos identificados pelo cBioPortal.

Outros dois parâmetros importantes gerados na análise do cBioPortal foram a frequência alélica da mutação na amostra e o número total de mutações encontradas na amostra. O primeiro parâmetro infere sobre a representatividade daquela mutação dentro do tecido tumoral analisado (mais especificamente, a porcentagem de *reads* mutantes detectados): quanto mais alta a frequência alélica (0-1), mais provável a mutação ser importante para o desenvolvimento e sobrevivência do tumor. O número total de mutações encontradas na amostra (além da mutação de interesse), gera indícios sobre o grau de transformação tumoral sendo mais alta em alguns tipos de tumores que em outros (Gao et al., 2013).

O paradigma oncogênico atual admite que os tumores são o resultado de um acúmulo de mutações que aumentam o *fitness* de suas células; entretanto, pode ser difícil analisar quais mutações agem dessa forma, especialmente para mutações de baixa frequência (Bozic et al., 2010). Um grande número de mutações podem ser do tipo *passenger*, isso é, estar presente em um dado tumor como co-produto coincidental de mutações oncogênicas (denominadas *driver*), mas não contribuir de fato com a oncogênese do tumor. Nesse contexto, a análise do potencial de uma dada mutação ser significativa para a progressão tumoral, seja pelo resultado do *mutation assessor* ou por uso de outros algoritmos e dados, é de grande relevância para que se possa realizar um processo prévio de triagem entre mutações *driver* e *passenger* (Raphael et al., 2014).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Conhecendo-se a importância desempenhada pela glutaminase no metabolismo de diversos tipos tumorais, o presente projeto visa analisar a influência na atividade enzimática e oligomerização de mutações descritas neste gene em tumores, mutações estas identificadas a partir de análise prévia da base de dados *The Cancer Genome Atlas*. Mutações que impactarem a atividade da enzima terão seu efeito avaliado nos fenótipos de proliferação, migração e invasão de linhagem de câncer de mama.

2.2. Objetivos específicos

- Inserir mutações encontradas no TCGA em plasmídeo pET-28a contendo sequência de GAC;
- Realizar expressão heteróloga de glutaminase C mutada e selvagem e purificá-la através de métodos cromatográficos;
- Avaliar a atividade enzimática por ensaio bioquímico e oligomerização/estabilidade por *Dynamic Light Scattering* e *Thermal Shift* das proteínas mutadas e selvagem.
- Introduzir as mutações de maior impacto na função da enzima em linhagem celular de câncer de mama (com o gene endógeno sob *knock down*) e verificar seu efeito sobre a proliferação, migração e invasão celulares.

3. Metodologia

3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e mutação sítio-dirigida (já realizados)

Os 8 mutantes descrito no projeto já foram introduzidos na sequência de GAC clonada em pET-28a. *Primers* contendo a sequência mutada foram sintetizados pela Exxtend (tabela 1). A PCR foi realizada para, simultaneamente, inserir mutações na sequência murina de GAC (mGAC) previamente clonada em plasmídeo pET-28a (já disponível no laboratório) (figura 6) e amplificar o plasmídeo mutado. A reação baseou-se no protocolo para mutação sítio-dirigida descrito anteriormente (Wang and Malcolm, 1999). Os três primeiros ciclos das reações de extensão ocorreram em tubos separados (cada tubo contendo apenas um dos dois *primers*. A cada um dos tubos foi adicionado os seguintes reagentes: 0,3 mM dNTP mix, 0,2 µM primer *forward* ou *reverse*, 50 ng de fita molde (pET-28a mGAC), 1 M betaína, HF Buffer 1X (New England Biolabs) e 1 U de DNA polimerase de alta fidelidade Phusion (New England Biolabs). Os três ciclos de primer único foram realizados a 98°C por 10 s, 50°C por 60 s e 72°C por 6 min (aproximadamente 1 min/kb). Essa abordagem evitou o autoanelamento dos primers, que são complementares entre si, e propiciou o anelamento com a fita parental. Em seguida, os tubos contendo os respectivos *primers* complementares foram unidos e foram feitos mais 25 ciclos de reação a 98°C por 10 s, 55°C por 30 s e 72°C por 3 min. Para a mutação S463Y, foi necessário otimizar a temperatura de anelamento nas duas etapas de PCR para evitar o surgimento de bandas inespecíficas e melhorar o rendimento da transformação bacteriana. Para isso, foi realizado um gradiente de temperatura (50°C, 52°C, 54°C e 56°C para os ciclos com um único *primer*; 55°C, 57°C, 59°C e 61°C para os ciclos com os dois *primers*). Os produtos de PCR que não apresentaram ampliações inespecíficas na eletroforese em gel de agarose foram escolhidos para transformação bacteriana. Após o término da reação, a fita parental foi digerida através da incubação da reação da PCR com a enzima de restrição DpnI por 60 min a 37°C (os plasmídeos mutados gerados a partir da fita parental não são degradados pela DpnI por não serem metilados). A amplificação do plasmídeo mutado foi observada em gel de agarose antes de utilizar o plasmídeo para transformação bacteriana.

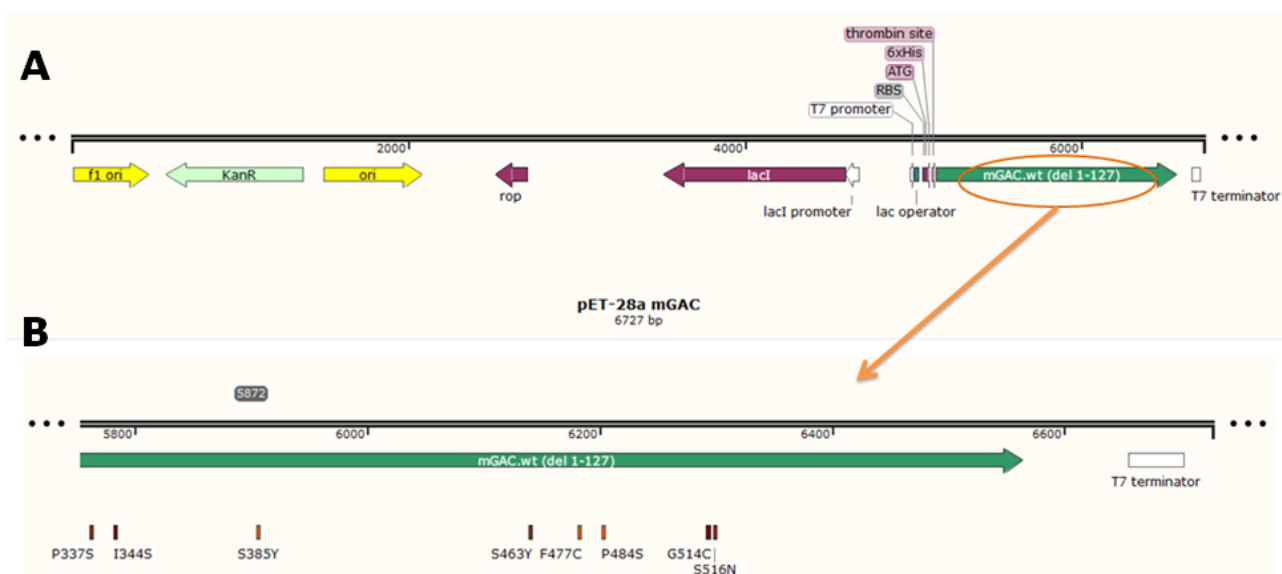


Figura 6. Mapa do vetor pET-28a mGAC. (A) A sequência codificadora para GAC murina foi inserida em vetor pET-28a. A expressão de mGAC é controlada pelo operador *lac*, sendo ativada na presença de lactose ou IPTG. A proteína é expressa com uma cauda de histidina (*6xHis*), de modo a ser purificada por resina de afinidade a metais quelados. (B) ampliação da porção codificadora de mGAC, evidenciando a localização das 8 mutações de interesse.

Tabela 1. Lista de primers usados para inserir a mutação no plasmídeo pET-28a mGAC. Em destaque os resíduos não complementares à fita parental, responsáveis pela inserção da mutação nas fitas copiadas.

Mutação	Primer ID	Sequência de bases (5'-3')
P337S	mGAC_P337S_Fow	gctccagcatttaccata <u>ct</u> attatgtggtttatcatc
	mGAC_P337S_Rev	gatgataaacacataat <u>agt</u> atggtaaagtctggagc
I344S	mGAC_I344S_Fow	tattagagaagtcacaaca <u>ctt</u> gctccagcatttaccatagg
	mGAC_I344S_Rev	cctatggtaaagtctggagca <u>agt</u> gttgtgacttctctaata
S385Y	mGAC_S385Y_Fow	cactttctcgttca <u>t</u> actgaaacgttgcattactgaatccaa
	mGAC_S385Y_Rev	ttggattcagtaatgcaacgtttcagt <u>at</u> gaacgagaaaagtg
S463Y	mGAC_S463Y_Fow	catgccacaagaatgcatcaa <u>ata</u> cagtgtattccgaactgcctc
	mGAC_S463Y_Rev	gaggcagttcggatacactg <u>tatt</u> ttgatgcattcttgtggcatg
F477C	mGAC_F477C_Fow	gtatgacttctcagggcagt <u>gt</u> gcgttccatggtg
	mGAC_F477C_Rev	caacatggaacgca <u>c</u> actgccctgagaagtcatac
P484S	mGAC_P484S_Fow	caactccagattttgca <u>ct</u> aagaccaacatggaacgcaactg
	mGAC_P484S_Rev	cagtttgcgttccatgttggtct <u>agt</u> gcaaaatctggagttg
G514C	mGAC_G514C_Fow	tccttaacactgttgc <u>a</u> catcttgcagaggag
	mGAC_G514C_Rev	ctcctcttgacaagatg <u>t</u> gcaacagtgttaagggga

S516N	mGAC_S516N_Fow	gtgaattcccttaaca <u>t</u> gttgcccatcttgtcaagag
	mGAC_S516N_Rev	ctcttgacaagatgggcaaca <u>a</u> tgttaagggaattcac

3.2. Transformação de bactérias

O plasmídeo contendo a sequência codificante de mGAC selvagem ou mutada será utilizado para transformar bactérias termocompetentes *E. coli* DH5 α . Um microlitro do produto de PCR será adicionado a 50 μ L de DH5 α termocompetente conforme publicado (Hanahan et al., 1991). A transformação ocorrerá por choque térmico. Após adição do produto de PCR, as bactérias serão incubadas no gelo por 4 min, em seguida incubadas a 42°C por 42s, e, finalmente, por 5 min no gelo. As bactérias transformadas serão incubadas por 45 min a 37°C em 450 μ L de meio SOC (20 g/L tryptona, 5 g/L extrato de levedura, 0,5g/L NaCl, 4,8 g/L MgSO₄, 3,603 g/L dextrose, 0,186 g/L KCl) antes de serem semeadas em uma placa de Petri com meio LB-ágar contendo 50 μ g/mL kanamicina. A placa será incubada por 16 h a 37°C para crescimento das colônias. Todas as colônias encontradas na placa serão interpretadas como positivas para pET-28a mGAC mutado. Três colônias de cada plasmídeo mutado serão escolhidas para inóculo em 10 mL LB (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 5g/L extrato de levedura) contendo kanamicina por 16 h a 37°C e subsequente confirmação por sequenciamento de DNA.

3.3. Minipreparação de plasmídeo (Miniprep)

O inóculo de bactérias transformadas será centrifugado (2150 g, 4 min) e o *pellet* utilizado para extração do plasmídeo. Para isso, serão seguidos os passos descritos pelo fabricante no kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega).

3.4. Sequenciamento de DNA

Os plasmídeos obtidos pela miniprep serão enviados para sequenciamento (serviço oferecido por *facility* do CNPEM). A escolha dos *primers* para sequenciar a região de cada mutação será escolhida com auxílio do *software* SnapGene (tabela 2). A reação para sequenciamento será preparada em microtubos de 0,6 mL contendo 0,5 pmols de *primer*, 300 ng de plasmídeo e água ultrapura q. s. p. 6 μ L. O resultado do sequenciamento dos plasmídeos será alinhado com a sequência de GAC contendo a respectiva mutação. As sequências confirmadas para a mutação serão expressas em sistema heteróloga, enquanto que os plasmídeos com problemas no sequenciamento (bases alteradas além da mutação, inserções e deleções de segmentos gênicos) retornarão para as etapas anteriores. Também serão sequenciados os plasmídeos contendo as mutações-controle para este projeto (GAC *wild-type*, controle negativo R322A, controle positivo K325A) que foram obtidas anteriormente pelo grupo (Ferreira et al., 2013).

Tabela 2. *Primers* utilizados para sequenciamento dos plasmídeos pET-28a mGAC mutantes.

Primer ID	Mutações englobadas	Sequência de bases (5' – 3')
KGA.I221.Cat.XhoI	P337S, I344S, S385Y	ctcgagaattcctgactttatgtcttt
sgRNA-GAC_Fow	S463Y, F477C, P484S, G514C, S516N	caccgttcatagtccaatggccaa

3.5. Expressão proteica heteróloga em bactérias e lise celular

Os plasmídeos com GAC selvagem ou mutante serão utilizados para transformar bactérias competentes. A cepa de *E. coli* Rosetta será escolhida como por ser capaz de produzir tRNA para códons raros em *E. coli*, melhorando assim o rendimento da expressão (Tegel et al., 2010). A transformação bacteriana ocorrerá conforme descrito no item 3.2 deste projeto, alterando apenas o antibiótico usado para seleção em meio LB-ágar (50 µg/mL kanamicina e 25 µg/mL cloranfenicol). Após 16h de incubação a 37°C, uma colônia de cada mutação será selecionada para pré-inóculo em 50 mL LB (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 10g/L extrato de levedura, 50 µg/mL kanamicina e 25 µg/mL cloranfenicol). Após mais 16h a 37°C, 20 mL do pré-inóculo serão inoculados em 2 L LB (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 10g/L extrato de levedura, 50 µg/mL kanamicina e 25 µg/mL cloranfenicol) a 37°C. Após 5 h, a temperatura será baixada para 18°C, e, após mais 1 h, será adicionado 0,2 mM IPTG para induzir a expressão da proteína. Assim, o inóculo será mantido sob agitação por aproximadamente 16 h (7 h de expressão induzida por IPTG) e, em seguida, centrifugado a 6850 x g por 12 min. O sobrenadante será descartado e o *pellet* de bactérias congelado brevemente com N₂ líquido. O *pellet* será descongelado e ressuscitado em 60 mL de solução de ressuspensão (50 mM tris-HCl pH 8,5, 500 mM NaCl, 10% glicerol). A ressuspensão será incubada por 1 h no gelo após adição de 2 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 240 mg lisozima, 120 mg DOC e 60 µg DNase I. A suspensão passará por nova centrifugação (25350 x g por 1 h, a 4°C). O sobrenadante (extrato) será então coletado para ser purificado por cromatografia de afinidade.

3.6. Cromatografia de afinidade a metais quelados

Quatro e meio mililitros de resina TALON® His-Tag serão adicionados a uma coluna cromatográfica simples de vidro. Esta resina permite a seleção de proteínas expressas em fusão com cauda de histidinas (6xHis-Tag), a qual interage de forma não-covalente com o cobalto presente na resina. A coluna será lavada com 30 mL de água ultrapura e equilibrada com solução contendo 50 mM tris-HCl (pH 8,5) e 10 mM NaCl. O extrato obtido anteriormente será adicionado à coluna, e a fração resultante (*flow-through*) coletada. Serão feitas e coletadas lavagens subsequentes visando obter a proteína de interesse na fração de eluição: lavagem 1 com 50mM

tris-HCl (pH 8,5), 10mM NaCl e 2mM β -mercaptoetanol; lavagem 2 com 50mM tris-HCl (pH 8,5), 10mM NaCl, 2mM β -mercaptoetanol e 5mM imidazol; lavagem 3 com 50mM tris-HCl (pH 8,5), 10mM NaCl, 2mM β -mercaptoetanol e 20mM imidazol. Após as lavagens, a proteína será eluída com 50mM tris-HCl (pH 8,5), 10mM NaCl, 2mM β -mercaptoetanol e 320mM imidazol. Por fim, a fração de eluição será submetida a um tratamento com trombina (50 μ L a 1 U/ μ L) a 4°C, *overnight*, de modo a clivar a região N-terminal contendo a *tag* de seis histidinas. Dez microlitros de cada fração obtida serão aplicados em gel de eletroforese (SDS-PAGE 10%) para confirmar tanto a presença da proteína na fração de eluição como a efetividade da clivagem.

3.7. Cromatografia de troca aniônica

Para progredir com a purificação da fração eluída, será usada uma coluna HiTrap Q HP 1 mL acoplada a um sistema de purificação ÄKTA. Serão preparadas duas soluções filtradas e deaeradas por sonicação para realizar o gradiente da troca iônica: Solução A (50 mM tris-HCl pH 8,5, 10 mM NaCl e 2 mM DTT) e Solução B (50mM tris HCl pH 8,5, 1M NaCl e 2 mM DTT). Após limpeza do sistema e equilíbrio da coluna, as amostras serão injetadas no sistema utilizando um *superloop* de 50 mL, *loop* de 5 mL ou válvula de injeção, dependendo do aparelho utilizado na purificação. A coluna será lavada com 2 CV de solução A e eluída com gradiente linear de 0-100% de solução B em 40 mL. Frações de 0,5 mL serão coletadas ao longo do gradiente. As frações correspondentes à proteína de interesse serão detectadas a partir do leitor de UV, acoplado ao aparelho entre a coluna de cromatografia e o coletor de frações. Em geral, as proteínas de interesse serão eluídas em frações correspondentes a 20% a 30% de solução B. A presença da proteína será confirmada por SDS-PAGE 10%.

3.8. Cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel)

A última etapa de purificação empregada será a de filtração em gel. Para tanto, será utilizada a coluna de purificação Superdex 200 10/300 GL acoplada a um sistema de purificação ÄKTA. A solução GF (30 mM tris-HCl pH 8,5, 500 mM NaCl e 0,5 mM TCEP) será filtrada e desareada. As frações coletadas da cromatografia de troca aniônica serão concentradas até cerca de 1 mL utilizando Amicon com corte de 30 kDa (EMD Millipore). Após lavagem do sistema e equilíbrio da coluna com água e solução GF, toda a quantidade de amostra concentrada será injetada no sistema via *loop* de 1 mL. Assim como na troca iônica, a eluição será coletada em frações de 0,5 mL cada. As frações correspondentes à proteína de interesse serão detectadas pelo leitor de UV (absorbância a 280 nm), e a presença da proteína nas frações do pico confirmada por SDS-PAGE. As frações do pico serão dosadas para a quantidade de proteína pelo espectrofotômetro NanoDrop medindo a absorbância a 280 nm e convertendo o valor obtido para ng/ μ L (utilizou-se para isso o coeficiente de extinção calculado pelo ProtParam para a proteína (Walker, 2005)).

3.9. Ensaio de atividade enzimática

O ensaio de atividade enzimática é baseado em uma reação acoplada à reação da glutaminase, gerando um produto detectável por espectrofotometria de luz visível (figura 7). Será preparado um *mix* para cada clone de GAC testado contendo os seguintes reagentes em 200 μ L: 50 mM tampão tris-acetato (pH 8,6), 0,19 mM EDTA, 20 mM K_2HPO_4 , 2 mM NAD^+ , 2,5 mU/ μ L GDH, 5 nM GAC e uma das 6 concentrações finais de glutamina em uma diluição seriada de 1:1 (60, 30, 15, 7,5, 3,75 e 1,875 mM de glutamina). As reações de cada GAC mutante para cada concentração de glutamina ocorrerão em triplicata, em uma placa de 96 poços. Para a leitura dos poços, será usado o leitor de microplacas EnVision. Cada poço terá o valor de absorbância a 340 nm medido 20 vezes em intervalos de cerca de 40 s. Os valores de K_m , K_{cat} e K_{cat}/K_m serão definidos pelo programa GraphPad Prism v6.0.

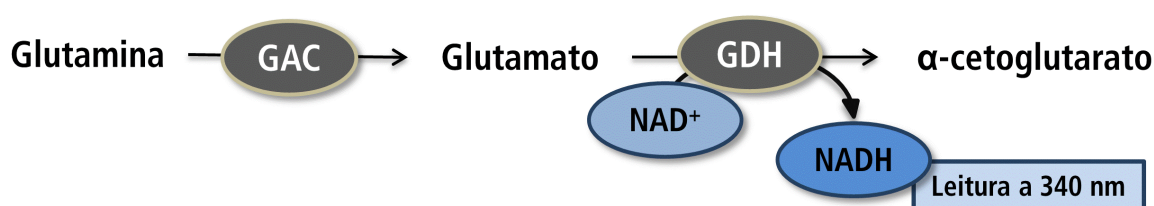


Figura 7. Esquema da reação realizada no ensaio de atividade enzimática de GAC. A glutaminase (GAC) converte glutamina em glutamato, o qual, por sua vez, é convertido em α -cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase (GDH). Essa reação requer a presença de NAD^+ , que será convertido em NADH. As moléculas de NADH absorvem a luz no comprimento de onda de 340 nm e são, portanto, detectáveis por espectrofotometria. Para cada molécula de NADH geradas, 1 molécula de glutamina foi clivada em glutamato.

3.10. Espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering, DLS*)

Para realizar a leitura de DLS no Zetasizer Nano (Malvern), as amostras a 20,6 μ M serão centrifugadas a 17950 x g por 3 min e diluídas em duas preparações, uma contendo 500 mM NaCl e a outra com 150 mM NaCl e 20 mM PO_4 , sempre com 10 μ L de amostra e 23,3 μ L de tampão. Da solução resultante, 20 μ L de amostra serão aplicadas em uma cubeta de quartzo 105.202-QS (Hellma) e analisadas pelo aparelho a 20°C.

3.11. *Thermal Shift*

Os experimentos de *thermal shift* serão montados em placas de PCR de 96 poços e realizados em um termociclador em tempo real (7500 Real-Time PCR System – Applied Biosystems). Em cada poço será adicionado 30 μ L de uma solução de GAC a 10 μ M em tampão 50 mM Tris pH 8.6, 500 mM NaCl, 20 mM K_2HPO_4 , acrescida de 0,1 % SYPRO® orange 5000 vezes concentrado em DMSO (Invitrogen). A temperatura será varrida de 25°C a 95°C (1°C/min) e medidas de fluorescência realizadas. A intensidade de fluorescência será plotada em função da temperatura, gerando uma curva sigmoide que pode ser descrita por dois estados de transição (mínima e máxima intensidade de fluorescência, proteína enovelada e desnaturada, respectivamente). O ponto de inflexão da curva de transição corresponde à

temperatura de desnaturação da proteína (T_m). O ajuste da curva e valores de T_m serão obtidos pelo GraphPad Prism v6.0.

3.12. Cultura de células e geração de sub-linhagens com expressão dos mutantes.

A linhagem MDA-MB-231 foi adquirida da empresa American Type Culture Collection (ATCC). A linhagem alterada MDA-MB-231 pLKO.1.TET_shGLS, gerada pelo Dr. Douglas Adamoski (ex-aluno de doutorado do grupo) será cultivada com RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SBF, Vitrocell) e puromicina na concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em estufa a 5% de CO_2 e 37°C . O vetor pLKO.1.TET, modificado por Douglas Adamoski, tem a expressão de shRNA regulável através da adição doxíciclina. Concentração e tempo ideias de incubação com doxíciclina para *knock down* de *GLS* será redefinido. O vetor pQC_MCS_GAC_neomicina (também gerado por Douglas Adamoski) será usado para introdução das mutações de interesse empregando-se mutagênese sítio dirigida. A sub-linhagem MDA-MB-231 pLKO.1.TET_shGLS será usada para transdução com vetor viral contendo pQC_MCS_GAC_neomicina. Processo de construção viral será realizado pelo Lab. De vetores Virais do LNBio. Para a titulação viral, células NIH3T3 serão plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24 horas, as células serão transduzidas com o vírus em uma curva de diluição abrangendo $1 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{L}$, $100 \mu\text{L}$ ou 1 mL de meio de cultura contendo partículas virais. Após 6 horas de transdução, o meio será retirado e as células receberão meio RPMI contendo o antibiótico neomicina. Após 7 dias de seleção, o número de colônias formadas será multiplicado pelo fator 10^4 e definido como o número de unidades formadoras de colônias (MOI, *multiplicity of infection*) por mL, ou UFC/mL (título viral).

Para a transdução, MDA-MB-231 pLKO.1.TET_shGLS (puromicina) será plaqueada em placas de 6 poços e transduzidas com vetor viral contendo pQC_MCS_GAC_neomicina em um MOI de 0.3 de modo a não termos mais que uma partícula viral por célula transduzida. Controle com vetor vazio (mock) também será gerado). A validação do experimento será confirmada por *Western blot*.

3.13. Western Blotting

Amostras de lisado total celular serão avaliadas em gel gradiente 3-15% de poliacrilamida em solução de Tris-glicina (25mM Tris base; 192mM Glicina; 0,1% SDS). Após a corrida, será realizada 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 (62,5mM Tris base; 48mM Glicina). Para o bloqueio da membrana com proteínas inespecíficas, a membrana será 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 serão lavadas em triplicata com TBS-T a cada 5 minutos sob agitação. Posteriormente as membranas serão incubadas com os seus respectivos anticorpos primários por 12-16 horas, a 4°C , sob agitação. Após remoção do anticorpo primário, as membranas serão novamente

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

3.14. Ensaio de proliferação celular

As sub-linhagens MDA-MB-231 pLKO.1.TET_shGLS + pQC_MCS_GAC WT/mutada/mock serão previamente incubadas com doxiciclina pelo tempo adequado para induzir *knock down* de *GLS*. Após isto, as células serão plaqueadas na quantidade de 3×10^3 /poço em placa de 96 wells, mantendo-se os antibióticos de seleção e doxiciclina. Poços controle do número de células plaqueadas serão gerados, o qual será fixado após 24 horas. As células serão cultivadas por 48, 72 ou 96 horas. No devido tempo, os poços placas serão fixadas com formaldeído a 3,7% em PBS 1X, por 25 minutos, e corados com DAPI a $0,4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, por 8 minutos, sendo conservada com $150 \mu\text{L}$ de PBS 1X até o momento da leitura. O número total de núcleos corados com DAPI será quantificado utilizando o microscópio de fluorescência com leitor de placas Operetta high-content imaging system (PerkinElmer) com uma objetiva de 10x e software Harmony (Perkin Elmer) com seleção do canal DAPI para contagem de núcleos. Os gráficos de proliferação celular serão obtidos com o programa GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, EUA).

3.15. Ensaios de migração e invasão *in vitro*

As sub-linhagens MDA-MB-231 pLKO.1.TET_shGLS + pQC_MCS_GAC WT/mutada/mock serão previamente incubadas com doxiciclina pelo tempo adequado para induzir *knock down* de *GLS*. Para o ensaio de migração, 4×10^5 células serão semeadas em meio RPMI com 1% de SFB em inserto de transwell (Greiner Bio-One) com membrana de poro $8 \mu\text{m}$ de uma placa de 24 poços. Meio completo (10% de SFB) será utilizado no compartimento inferior como quimioatrativo. As células migrarão por 24 horas. Para o ensaio de invasão, as mesmas linhagens serão semeadas (4×10^5) em meio RPMI com 1% de SFB em inserto de transwell (Greiner Bio-One) com membrana de poro $8 \mu\text{m}$ coberta com Matrigel (Corning) a $320 \mu\text{g}/\text{ml}$ (diluído 1:3 em meio de cultura) ou $160 \mu\text{g}/\text{ml}$ (diluído 1:6 em meio de cultura), de uma placa de 24 poços. Meio completo (10% de SFB) será utilizado no compartimento inferior como quimioatrativo. As células invadirão por 24 horas. Após a finalização dos ensaios, as membranas serão lavadas com PBS 1X, fixadas com formaldeído a 3,7% por 20 minutos e coradas com cristal violeta (0,5% em metanol) para posterior análise.

4. Referências

- Bozic, I., Antal, T., Ohtsuki, H., Carter, H., Kim, D., Chen, S., Karchin, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Nowak, M.A. (2010). Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 18545-18550.
- Cantor, J.R., and Sabatini, D.M. (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery* *2*, 881-898.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 1092-1097.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., and Larsson, E., et al. (2012). The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery* *2*, 401-404.
- Ferreira, A.P.S., Cassago, A., Gonçalves, K.d.A., Dias, M.M., Adamoski, D., Ascensão, C.F.R., Honorato, R.V., Oliveira, J.F. de, Ferreira, I.M., and Fornezari, C., et al. (2013). Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor. *The Journal of biological chemistry* *288*, 28009-28020.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., and Larsson, E., et al. (2013). Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Science signaling* *6*, p11.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F.R. (1991). [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. In *Bacterial genetic systems*, J.H. Miller, ed. (Elsevier), pp. 63-113.
- Hensley, C.T., Wasti, A.T., and DeBerardinis, R.J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of clinical investigation* *123*, 3678-3684.
- Huang, F., Zhang, Q., Ma, H., Lv, Q., and Zhang, T. (2014). Expression of glutaminase is upregulated in colorectal cancer and of clinical significance. *International journal of clinical and experimental pathology* *7*, 1093-1100.
- Kim, J.-W., and Dang, C.V. (2006). Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Res* *66*, 8927-8930.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., and Dang, C.V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature reviews. Cancer* *11*, 325-337.
- Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M.M.R., Pithon-Curi, T.C., and Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell biochemistry and function* *21*, 1-9.
- Pan, T., Gao, L., Wu, G., Shen, G., Xie, S., Wen, H., Yang, J., Zhou, Y., Tu, Z., and Qian, W. (2015). Elevated expression of glutaminase confers glucose utilization via glutaminolysis in prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications* *456*, 452-458.

- Raphael, B.J., Dobson, J.R., Oesper, L., and Vandin, F. (2014). Identifying driver mutations in sequenced cancer genomes: computational approaches to enable precision medicine. *Genome medicine* 6, 5.
- Reva, B., Antipin, Y., and Sander, C. (2011). Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucl. Acids Res.*, gkr407.
- Robinson, M.M., McBryant, S.J., Tsukamoto, T., Rojas, C., Ferraris, D.V., Hamilton, S.K., Hansen, J.C., and Curthoys, N.P. (2007). Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *The Biochemical journal* 406, 407-414.
- Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., and Persson, A. (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3). *Protein Expression and Purification* 69, 159-167.
- Tomczak, K., Czerwińska, P., and Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary oncology (Poznań, Poland)* 19, A68-77.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)* 324, 1029-1033.
- Walker, J.M. (2005). *The proteomics protocols handbook* (Totowa, N.J.: Humana Press).
- 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.
- Calithera Biosciences, Inc. (2016). Study of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Hematological Tumors. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Disponível em <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02071888>>. Identificador NLM: NCT02071888.