



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL
Y FUNCIONAL DE LA ISOENZIMA
GLUTAMINASA GLS2 Y SU
IMPLICACIÓN EN CÁNCER**

M^a Carmen Gómez García

Directores: Javier Márquez Gómez y José A. Campos Sandoval

Programa de doctorado: Biotecnología Avanzada

Facultad de Ciencias


Universidad de Málaga

2022



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: María del Carmen Gómez García

 <https://orcid.org/0000-0003-0401-8809>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL
Y FUNCIONAL DE LA ISOENZIMA
GLUTAMINASA GLS2 Y SU
IMPLICACIÓN EN CÁNCER**

Programa de Doctorado: Biotecnología Avanzada

Autora: María del Carmen Gómez García

Directores: Javier Márquez Gómez y José Ángel Campos
Sandoval

Málaga, junio de 2022



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

JUAN ANTONIO GARCÍA RANEA, Director del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

ACREDITA QUE: la Tesis Doctoral titulada: “CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA ISOENZIMA GLUTAMINASA GLS2 Y SU IMPLICACIÓN EN CÁNCER”, que presenta Dña. M^a DEL CARMEN GÓMEZ GARCÍA para optar al título de Doctor en Ciencias, ha sido realizada bajo la dirección de los doctores D. Javier Márquez Gómez, Catedrático de Universidad, y D. José Ángel Campos Sandoval, Profesor Ayudante Doctor, ambos del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Málaga a 6 de junio de 2022.

Fdo.: Juan Antonio García Ranea





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y

JOSÉ ÁNGEL CAMPOS SANDOVAL, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN que Dña. MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ GARCÍA, Licenciada en Químicas por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos recogidos en la presente Memoria para optar al Grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Málaga. Así mismo, el profesor J. Márquez ha sido el tutor de la doctoranda durante toda su etapa predoctoral.

Por consiguiente, ambos co-directores **AUTORIZAN** la lectura y defensa de esta memoria de Tesis Doctoral.

Así mismo, los co-directores de la Tesis certifican que todas las publicaciones (y comunicaciones a Congresos) que avalan la presente memoria de Tesis Doctoral no han sido utilizadas en tesis anteriores y han sido generadas, parcial o totalmente, a partir de resultados y metodologías desarrollados durante la realización de la Tesis Doctoral de Dña. M^a del Carmen Gómez García.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente en Málaga a 6 de junio de 2022.

Fdo. Javier Márquez Gómez
Catedrático Bioquímica y Biol. Molecular
Tutor y Director de la Tesis

Fdo. José Ángel Campos Sandoval
Profesor Ayudante Doctor
Co-director de la Tesis



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ GARCÍA

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA ISOENZIMA GLUTAMINASA GLS2 Y SU IMPLICACIÓN EN CÁNCER

Realizada bajo la tutorización de JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ y dirección de JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ Y JOSE ÁNGEL CAMPOS SANDOVAL (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 6 de JUNIO de 2022

Fdo.: MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ GARCÍA

Doctorando/a

Tutor/a

Fdo.: JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



ANDALUCÍA TECH
Campus de Excelencia Internacional

Escuela de Doctorado

Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM ■ AENOR



ba
bequal

Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es

Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos de investigación del Plan Nacional de Biomedicina, convocatoria Retos de la Sociedad, SAF2015-64501-R y RTI2018-096866-B-I00, de los Ministerios de Economía y Competitividad y Ciencia e Innovación, respectivamente. Así mismo, otras actividades experimentales relacionadas en esta memoria han sido soportadas por el proyecto de excelencia CVI-6656 de la Consejería Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía y por el proyecto RD12/0028/0013 de la red de trastornos adictivos (RTA, programa RETICS, Instituto de Salud Carlos III). La doctoranda M^a del Carmen Gómez García ha disfrutado de contratos predoctorales con cargo a los proyectos de investigación SAF2015-64501-R y RTI2018-096866-B-I00. Parte de los resultados y metodologías recogidas en la presente Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

- Juan de los Santos-Jiménez, José A. Campos-Sandoval, Clara Márquez-Torres, Nieves Urbano-Polo, David Brøndegaard, Mercedes Martín-Rufián, Carolina Lobo, Ana Peñalver, **María C. Gómez-García**, Janet Martín-Campos, Carolina Cardona, Laura Castilla, Felipe da Costa Souza, Tzuling Cheng, Juan A. Segura, Francisco J. Alonso, Rui Curi, Alison Colquhoun, Ralph J. DeBerardinis, Javier Márquez and José M. Matés. Glutaminase isoforms expression switches microRNA levels and oxidative status in glioblastoma cells. **J. Biomed. Sci**, 28:14 (2021).
- Campos-Sandoval JA, **Gómez-García MC**, Santos-Jiménez JL, Matés JM, Alonso FJ, Márquez J. Antioxidant responses related to temozolomide resistance in glioblastoma. **Neurochem. Int.** 149: 105136 (2021).
- López de la Oliva AR*, Campos-Sandoval JA*, **Gómez-García MC***, Cardona C, Martín-Rufián M, Sialana, FJ, Castilla L, Bae N, Lobo C, Peñalver A, García-Frutos M, Carro D, Enrique V, Paz JC, Mirmira RG, Gutiérrez A, Alonso FJ, Segura JA, Matés JM, Lubec G, Márquez J. Nuclear translocation of glutaminase GLS2 in human cancer cells associates with proliferation arrest and differentiation. **Sci Rep** 10:2259 (2020).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A todas mis M's

*“No fracasé, sólo descubrí las 999 maneras
de cómo no hacer una bombilla”*

Thomas Alva Edison



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

Quiero y debo empezar agradeciendo a mis directores de tesis el enorme esfuerzo que han hecho y toda la ayuda prestada en este arduo proyecto. Ha sido un camino duro, largo y lleno de eventos desafortunados, que hemos conseguido sobrellevar de la mejor forma posible. A Javier, gracias por la oportunidad de unirme al que hoy en día es mi grupo y donde he podido aprender todo lo que sé sobre ciencia. Tu motivación y entusiasmo me han ayudado a seguir adelante en los malos momentos. A Jose, sin él esta tesis no hubiese sido lo que es. Gracias por toda tu ayuda y tu apoyo moral, por escuchar mis delirios y por la discusión científica, que de tantos fosos me ha sacado. Nunca sabré cómo compensártelo, pero seguiré buscando. Gracias a todos los que habéis estado acompañándome estos años en el lab: Laura Castilla, Carolina Cardona, David Carro, Marina, David Bröndegar, Marta, Manu, Francis, Jose Manuel, etc. Gracias Merche, siempre has creído en mí y en aquello que podría salir de mi tesis. Una de las personas a las que tengo en un ladito especial de mi corazón y que fue, es y siempre será mi amiga, es Ana. Gracias por tantos momentos, y por los que vendrán.

A los que estáis ahora conmigo, deciros que me he sentido apoyada en todo momento por vosotros. De mi compi Juan, podría decir que es la persona más inteligente que he conocido nunca, con la gran virtud de la generosidad de compartirlo todo con los demás. Anabel, gracias por tu apoyo moral. Eres un corazón limpio que he tenido la suerte de tener de compi de sufrimientos y alegrías. Al igual que Vicky, persona indispensable en mi día a día. ¡Qué pérdida he estado sin ti! Carolina Roza, he disfrutado de muchas risas y momentos especiales contigo. Brindo por muchos más.

Debo también agradecer a Josan y a todo su grupo del HTXL la oportunidad de hacer ciencia en uno de los mejores centros de investigación de Europa. Ha sido un verdadero regalo. Gracias a Florine, Guillaume, Peter, Damien, Raphael, Susana y muy especialmente a Irina y Anne-Sophie. A Vincent, por ser mi guía científico y fuente de conocimiento sobre la purificación y expresión de proteínas, estando en todo momento disponible para prestarme su ayuda. A Pauline, por hacer mi vida en Grenoble mucho más agradable y amena, siendo una de las mejores personas que he conocido.

En el plano personal, más que agradecer debo disculparme por no estar, por faltar. Y tras las disculpas, ¡GRACIAS! Empiezo por la familia que he elegido. Mis admiradísimas Palo y Rocío, mujeres y madres de bandera. Gracias por vuestra amistad sincera y transparente, y por hacerme sentir parte de vuestra maravillosa familia. A Fran,

Agradecimientos

sí Francisca, eres y serás siempre mi inspiración. Al igual que Mane y Mar, gracias por ese máster y lo más importante, gracias por seguir ahí. A la familia que me ha tocado, es la mejor que se puede tener. Es imposible nombraros a todos, pero me voy a permitir agradecer a Esther y Raúl. Gracias por haberme hecho conocer a esas dos personitas que me alegran la vida. A Isa, Rocío, Isabel y mi sol Celia, gracias por hacerme sentir como en casa y entender mis ausencias.

Finalmente, agradezco a mis padres por apoyarme en todo momento y enseñarme desde pequeña la cultura del esfuerzo. A ti, mi “compi” de vida, no tengo palabras para agradecer la atención que pones en mis discursos sobre glutaminasa y tu paciencia infinita. Gracias por entender lo que implica esta vocación.

Por último, a ti que estás leyendo esto y no te encuentras en los agradecimientos, ¿Cómo puede ser? Si me conoces, sabrás la respuesta.

Abreviaturas



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AcCoA: Acetil coenzima A

BCA: Ácido bicinconínico

BLI: Interferometría de biocapa

BSA: Albúmina de suero bovino

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CV: Volúmenes de columna

CRIMS: *Crystallographic Information Management System*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: 2'-desoxinucleósido 5'-trifosfato

DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucina

DPA: *Day after proliferation arrest*

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*

FDR: Tasa de falsos positivos

GA: Glutaminasa

GAB: Transcrito e isoenzima GA larga codificada por el gen *GLS2/Gls2*

GAC: Transcrito e isoenzima GA corta codificada por el gen *GLS/Gls*

GBM: Glioblastoma

GIP: Proteína que interacciona con glutaminasa

GLUD: Glutamato deshidrogenasa

GO: Ontología génica

HCC: Carcinoma hepatocelular

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperacínil]-etanosulfónico

Abreviaturas

HRP: Peroxidasa de rábano picante

IMAC: Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

KGA: Transcrito e isoenzima GA larga codificada por el gen *GLS/Gls*

LB: Medio de crecimiento bacteriano Luria-Bertani

LGA: Transcrito e isoenzima GA corta codificada por el gen *GLS2/Gls2*

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MS/MS: Espectrometría de masas de fragmentación

MS: Espectrometría de masas

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina, forma oxidada

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina, forma reducida

NADPH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato

OAA: Oxalacetato

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: *Protein Data Bank*

PDZ: Iniciales de *postsynaptic density protein PSD-95, Drosophila tumor suppressor protein DLG and tight junction protein ZO-1*

PEG: Polietilenglicol

PMA: Acetato de forbol miristato

RBS: Sitio de unión al ribosoma

RMN: Resonancia magnética nuclear

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico

RSA: Albúmina de suero de rata

SDS: Dodecil sulfato sódico (lauril sulfato sódico)

SDS-PAGE: Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SEC: Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel

TAE: Tampón Tris-acetato-EDTA

TBP: TATA *binding protein*

TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina

TEMED: N, N, N', N'- tetrametil etilendiamina

T_m: Temperatura de fusión

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

TTBS: Solución salina tamponada con Tris y Tween 20

U: Unidad internacional de actividad enzimática

UHPLC-HRMS: Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución

WT: Línea celular *wild type* o silvestre

YFP: *Yellow fluorescent protein*

α -KG: α -cetoglutarato



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Summary



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

PhD THESIS SUMMARY

TITLE: “STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF GLUTAMINASE GLS2 ISOENZYME AND ITS INVOLVEMENT IN CANCER”

(CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA ISOENZIMA GLUTAMINASA GLS2 Y SU IMPLICACIÓN EN CÁNCER)

GRADUATE STUDENT: MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ GARCÍA (Bachelor’s Degree in Chemistry)

DIRECTOR and TUTOR: Dr. JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ, Full Professor of Biochemistry and Molecular Biology

CO-DIRECTOR: Dr. JOSÉ ANGEL CAMPOS SANDOVAL, Assistant Professor of Biochemistry and Molecular Biology

DEPARTMENT/ORGANISM: MOLECULAR BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY/FACULTY OF SCIENCES, UNIVERSITY OF MÁLAGA

ABSTRACT:

Human glutaminase (GA) isoenzymes play a key role in cancer growth and proliferation. They catalyze the first step of the glutaminolysis pathway: the conversion of glutamine (Gln) to glutamate (Glu) and ammonium ions. This pathway is activated in many types of cancers as an essential source for energy and building blocks, which are strongly required by the proliferation programme of tumor cells. In mammals, including humans, there are two types of GA isoenzymes, named GLS and GLS2. GLS and GLS2 have distinct patterns of expression and regulation in different organs and tumor types. GLS is ubiquitously expressed and is also highly expressed in several types of tumors, as a result of direct regulation by oncogenes such as KRAS and MYC. GLS2 is expressed mostly in the liver, brain, and pancreas and is directly regulated by p53, p63, and p73. In glioblastoma and cancers of liver and colon, GLS2 expression is lost due to DNA methylation of the *GLS2* gene. Recent experimental evidence obtained from tumor and non-tumor cells has shed light on the seemingly opposing role played by GLS and GLS2 in tumorigenesis. GLS isoforms are upregulated in parallel with the proliferation rate, whereas GLS2 isoforms are related to quiescent, nonproliferating, and differentiated cell states. In this PhD Thesis, we have performed different experimental approaches trying to obtain a deep insight into the functions of GLS2 isoenzymes. The Thesis consists of two separate chapters: the first one is devoted to the structural and functional characterization of the GLS2 protein (isoenzyme GAB), while the second part deals with proteomics studies of human glioblastoma (GBM) cell lines with regulated expression of GLS2. In the first part, the student was able to express and purify recombinant human GLS2 proteins in two different heterologous expression systems: prokaryotic (*E. coli*) and eukaryotic (insect cells infected with recombinant baculovirus). Furthermore, two different protein forms were expressed: the complete GLS2 protein (GLS2₁₋₆₀₂) and a truncated form designed to avoid aggregation and increase protein yields: GLS2₅₆₋₆₀₂. Both protein forms were purified to homogeneity, by a combination of affinity chromatography and size-exclusion chromatography and showed fully catalytic activity.

Summary

The thermal stability was determined by using Thermal Shift Analysis. The truncated GLS2 form shows higher melting temperatures ($T_m = 78^\circ\text{C}$) than its complete counterpart ($T_m = 61^\circ\text{C}$). Then, a massive crystallization trial of GLS2₅₆₋₆₀₂, purified from eukaryotic cells, was performed after checking almost 4.000 thousand conditions with different media, varying the buffer composition, pH and precipitant agents. Protein microcrystals of GLS2 were successfully obtained in a medium containing 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, and 1.6 M lithium sulfate. The purified GLS2 proteins were functionally characterized by enzymatic analysis and their capacity of interaction with partner proteins, like GIP (“Glutaminase-Interacting Protein”). The interaction GLS2-GIP was characterized by BLI: a K_D of 77 nM was obtained, which means that a strong functional interaction occurs between both protein partners. Furthermore, a kinetic characterization of pure GLS2₅₆₋₆₀₂ was performed. The protein isolated from baculovirus displays Michaelis-Menten kinetics, low dependence for the activator inorganic phosphate (Pi) and a K_m of 2 mM for Gln. In sharp contrast, the pure protein isolated from bacteria shows a sigmoidal dependence on Gln and allosteric behavior. Furthermore, human GLS2 was identified as being hypusinated by mass spectrometry (MS) analysis, a posttranslational modification which may be relevant for its nuclear targeting and/or function. The Thesis’ second chapter presents a quantitative proteomic approach in human glioma cells overexpressing GLS2. First, several results were shown to support the adequacy of this cellular model and to support the role of GLS2 as a tumor suppressor in cancer. We have demonstrated a dual targeting of GLS2 in human cancer cells. Immunocytochemistry and subcellular fractionation gave consistent results demonstrating nuclear and mitochondrial locations, with the latter being predominant. Moreover, GLS2 expression and nuclear accrual notably increased by treatment of SH-SY5Y cells with differentiation agent PMA and it correlated with cell cycle arrest at G2/M and upregulation of tumor suppressor p53 and p21 proteins. A similar response was obtained by overexpression of GLS2 in T98G glioma cells, including downregulation of oncogene c-Myc. Finally, a quantitative proteomic approach was implemented in the human GBM cell line LN229 stably transfected with GLS2 (LN229-GLS2(+)). As controls, we include the wild-type cell line (LN229-WT) and the cell line transfected with the empty expression vector (LN229-pcDNA3). Samples were analyzed by LC-MS/MS and label free quantification using an Orbitrap analyzer. A total of 3082 protein hits were identified as differentially expressed in LN229-GLS2(+) versus control LN229-pcDNA3. From this hit pool, 300 proteins were estimated to be repressed (abundance ratio LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 ≤ 0.6) and 186 upregulated (abundance ratio LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 ≥ 1.5) for a statistical value of p (t Student) ≤ 0.05 . Then, a bioinformatic data mining was performed with the protein hits. First, protein-protein interaction networks were characterized by using the bioinformatic tool STRING. These networks were then submitted to a functional enrichment pipeline by using the software Cytoscape and the application ClueGo. The analysis was restricted to three different categories of gene ontology (GO): molecular functions, biological processes and cellular localizations. Finally, in order to analyze separately the three GO categories and confirm the results obtained with ClueGo, protein data were processed with the FunRich software too. The main hits and interacting networks obtained were ascribed to proteins involved in cellular adhesion, migration, cell cycle, protein degradation and glycolysis. An anti-proliferative response can be envisioned due to the metabolic reprogramming induced by GLS2 expression in human glioma cells.

To achieve the main results described in this Thesis, the graduate student has made use of a vast number of state-of-the-art methodologies and techniques of scientific areas belonging to cellular and molecular biology, immunology, biochemistry, biophysics,

microscopy, proteomics and bioinformatics. Main techniques and methods employed included: molecular cloning, protein expression and purification, chromatography, electrophoresis of proteins and nucleic acids, thermal shift analysis, protein crystallization, bio-layer interferometry, mass spectrometric analysis of protein digests and use of bioinformatic software for data mining of omics results.

1. INTRODUCTION

1.1 Metabolic reprogramming in cancer

In the last decade, we have witnessed a renaissance of cancer metabolic studies after years of being largely ignored in favor of powerful large-scale -and trendy-functional genomic and proteomic studies. Nowadays, the study of cancer metabolism is regaining center stage and becoming a hot issue in tumor biology and clinical research, after a period where such kind of experimental approaches were somehow forgotten or disregarded. Paradoxically, this renewed interest has been largely induced by sound results from cancer genomic, proteomic, and metabolomic (canceromics) studies which are now identifying key players and revealing novel molecular mechanisms underlying cell proliferation in tumors. Thus, this canceromics work is bringing back the focus to metabolic studies which are recovering their original high-profile status in cancer research. This area of research is based on the principle that metabolic activities are altered in tumor cells relative to normal cells, and that these alterations favor the acquisition and maintenance of malignant properties. Because some of the altered metabolic features are found in many types of cancer, metabolic reprogramming was considered a hallmark of cancer in the second reformulation of this concept by Hanahan and Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011) (Fig. 1.1).

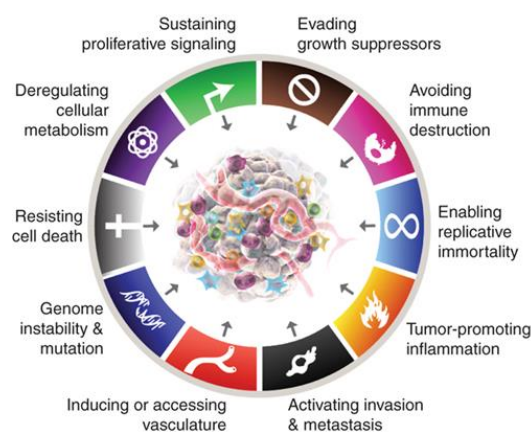


Figure 1.1. The eight hallmarks of cancer along with two enabling characteristics (genome stability and mutation, tumor promoting inflammation), as proposed by Hanahan & Weinberg (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144(5), 646–674.* Figure for educational purposes taken from Hanahan (2022) *Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery, 12(1), 31–46.*

Summary

Cancer cells develop and succeed by shifting to different metabolic programs compared with their normal cell counterparts (Fig. 1.1). One of the classical hallmarks of cancer cells was first noticed by Otto Warburg in his seminal studies of tumor metabolism: high glycolytic fluxes even in the presence of abundant O₂ and heightened levels of lactate produced (Fig. 1.2). Another common metabolic feature of cancer cells is a high rate of glutamine (Gln) consumption normally exceeding their biosynthetic and energetic needs. The term Gln addiction is now widely used to reflect the strong dependence shown by most cancer cells for this essential nitrogen substrate after metabolic reprogramming (Wise *et al.*, 2008).

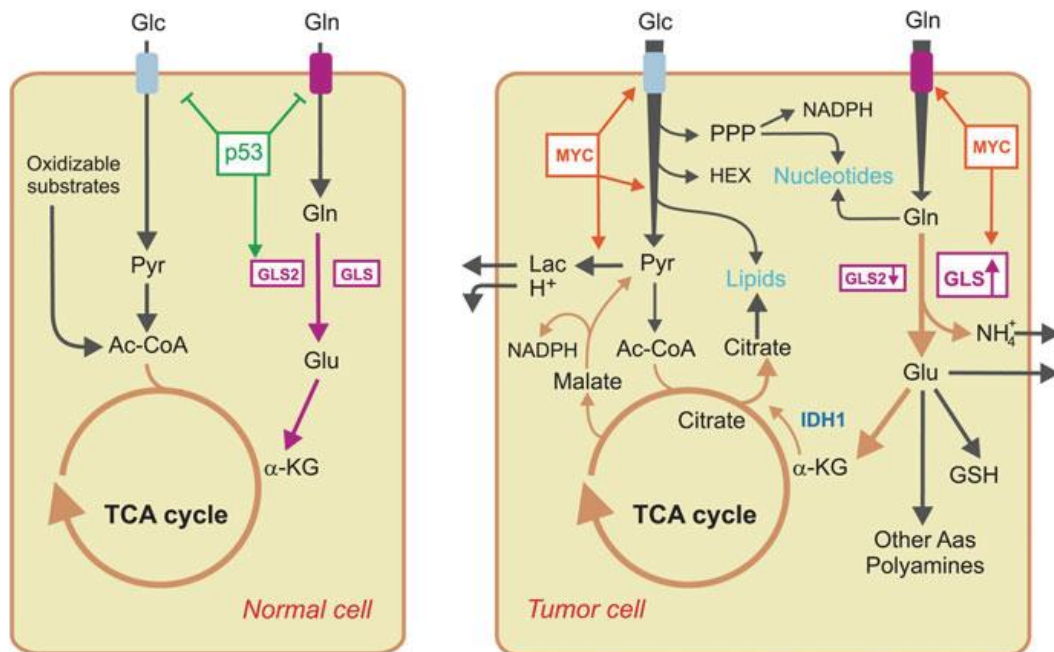


Figure 1.2. Main changes in Gln-related metabolic pathways after malignant transformation. In normal, nonproliferating cells, a balanced metabolism of glucose (Glc) and Gln, along with a functional tumor suppressor p53 gene, allows a complete TCA cycle coupled to pyruvate (Pyr) production from glycolysis. Expression of GLS and GLS2 isoforms is kept under normal tissue-specific homeostatic values and mitochondrial Glu used for energy generation through α -KG incorporation into the TCA cycle. The metabolic reprogramming of cancer cells in Myc-dysregulated tumors includes increased cellular uptakes of Glc and Gln, as well as GLS overexpression. In contrast, GLS2 is repressed in many tumors. Glucose is metabolized into Pyr through the reactions of glycolysis, yielding two molecules of ATP. Pyruvate can be further oxidized in the Krebs cycle or converted into lactate when oxygen levels are low or during “aerobic” glycolysis. Partial oxidation of Gln into Pyr and further into lactate (glutaminolysis) serves as an alternative source of ATP production and to replenish intermediates in the TCA cycle. Excess of Glu and ammonia from enhanced Gln catabolism through GA is transported out of the cells (with relevance in the import of other nutrients like essential amino acids). The amino acid Glu is also used for GSH, polyamines, and amino acids synthesis. Gln can be the main source for lipid synthesis being converted into citrate by reductive carboxylation of α -KG by isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1). Malic enzyme reaction, one of the reactions of glutaminolysis, produces NADPH, which is also required for lipid synthesis. In addition, amido and amino nitrogen of Gln are used for nucleotide synthesis, together with phosphoribosyl pyrophosphate (PPP) produced from glucose, through the reactions of the pentose phosphate pathway. Finally, Glc and Gln also feed the hexosamine biosynthetic pathway (HEX/HBP) regulating the cellular nutrient status.

Like glycolytic intermediates, tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates are also used as precursors for macromolecule synthesis. Their utilization in biosynthetic pathways requires that carbon be resupplied to the cycle so that intermediate pools are maintained; pathways that “refill” the cycle are termed anaplerotic pathways, and they generate TCA cycle intermediates that can enter the cycle at sites other than acetyl-coenzyme A. Two activities that provide anaplerotic fluxes in cancer cells are glutaminolysis, which produces α -ketoglutarate from Gln, and pyruvate carboxylation, which produces oxaloacetate from glucose/pyruvate. Therefore, cancer cell metabolic reprogramming includes a shift in energy production from oxidative phosphorylation (OXPHOS) to less efficient glycolysis, even in the presence of oxygen (Warburg effect), and enhanced use of Gln for increased biosynthetic needs.

In the absence or scarce oxygen, normal cells convert glycolytic pyruvate into lactate (anaerobic glycolysis), thus preventing pyruvate to enter mitochondrial OXPHOS. As a result, rapid but limited ATP production takes place, generating only two moles of ATP per mole of glucose. When oxygen is abundant, normal cells perform mitochondrial OXPHOS and generate 36 moles of ATP per glucose mole. However, cancer and normal proliferating cells convert pyruvate into lactate irrespective of the presence of oxygen, a phenomenon termed as Warburg effect or aerobic glycolysis, bypassing OXPHOS (Vander Heiden *et al.*, 2009). Warburg postulated that high lactate production is due to mitochondrial dysfunction in cancer cells. However, it proved unfitting in later studies (Frezza & Gottlieb, 2009). In fact, in some cases, mitochondria play a contributory role in cancer progression (Weinberg *et al.*, 2010). Even though aerobic glycolysis is not energetically as efficient as OXPHOS, it can support increased proliferation of tumor cells by allowing high rate of anabolism through fast delivery of energy and biosynthetic building blocks necessary to drive tumor growth (Vander Heiden *et al.*, 2009) (Fig. 1.2).

1.2. Glutamine metabolism and glutaminases in cancer

High Gln consumption is a key feature of tumor cells but also of normal proliferating cells (Fig. 1.2). A considerable number of sound evidence early confirmed that Gln is a major respiratory fuel for most human and experimental tumors (Kvamme & Svenneby 1960; Kovacevic & Morris 1972). Comparison of Gln metabolism between tumor cells and non-transformed cells of the same origin demonstrated a considerably faster rate of Gln utilization by tumors, which usually behave as avid Gln consumers; for example, in human hepatocytes vs. hepatoma cells (Souba, 1993), and in rat kidney fibroblasts vs. rat fibrosarcoma cells (Fischer *et al.*, 1998).

The major degradative pathway for Gln and the first step in glutaminolysis is carried out in mitochondria and initiated by the enzyme GA. Four different GA isoenzymes have been described so far in mammalian tissues which are encoded by separate genes in different chromosomes (Márquez *et al.*, 2016; Martín-Rufián *et al.*, 2012). In humans, the *GLS* gene is located in chromosome 2 and encodes isozymes termed KGA and GAC, while the *GLS2* gene on chromosome 12 codes for isozymes called GAB and LGA (Aledo *et al.*, 2000). The KGA mRNA arising from the mammalian *Gls* gene is formed by joining exons 1-14 and 16-19, while the alternative spliced transcript GAC uses only the first 15 exons, omitting exons 16-19 (Elgadi *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2002). The existence of two transcript variants for the *Gls2* gene, GAB and LGA, has been also recently demonstrated (Martín-Rufián *et al.*, 2012). The canonical long transcript, named GAB, is formed by joining the full 18 exons of the *Gls2* gene,

Summary

whereas the short transcript LGA lacks exon 1. The LGA variant arises by alternative transcription initiation and possesses an alternative promoter located in the first intron of the *Gls2* gene (Martín-Rufián *et al.* 2012). The distinct GA isozymes differ in their pattern of expression in mammalian tissues and cells, as well as in their molecular, kinetic, and regulatory properties (Márquez *et al.*, 2016; Campos-Sandoval *et al.*, 2007).

With the renewed interest on Gln metabolism in cancer cells, a great deal of effort is being dedicated to understanding the mechanisms that regulate GLS gene expression and activity. A key discovery was the reversion of malignant phenotype and loss of tumorigenic capacity *in vivo* of Ehrlich ascites tumor cells after knocking down murine GLs with antisense technology (Lobo *et al.*, 2000). Subsequent studies in which GLS expression was reduced by RNA interference confirmed the important function of this isoenzymes in cancer (Gao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). The oncogenic transcription factor c-Myc, involved in the regulation of Glc metabolism, is also implicated in Gln metabolism in Myc-transformed cells. Thus, by downregulation of miRNAs miR-23a and miR-23b, which target GLS 3'-untranslated region (UTR), c-Myc indirectly relieves repression of GLS (Gao *et al.*, 2009). The mTORC1 signaling pathway positively regulates GLS by enhancing Myc translation efficiency (Csibi *et al.*, 2014). Like c-Myc, NF- κ B p65 subunit suppresses miR-23a expression, resulting in higher levels of GLS (Rathore *et al.*, 2012).

Finally, in relation with signaling pathways controlling GLS isoforms, a synergistic cross-talk between KGA-mediated glutaminolysis and epidermal growth factor (EGF)-activated Raf-Mek-Erk signaling has been recently reported in human 293 T cells (Thangavelu *et al.*, 2012). The increase in KGA activity mediated by the Raf-Mek-Erk module was found to be phosphorylation dependent, because specific inhibition of kinases or co-expression of protein phosphatase PP2A completely abrogate the enhanced KGA activity.

In sharp contrast with GLS isoforms, the role of GLS2 in tumor cells is far from being well understood. We have summarized the history of the major findings for GLS2 in cell growth, survival, differentiation and proliferation in Fig. 1.3. Much evidence suggests that it behaves as a tumor suppressor gene in certain types of malignancies such as glioblastoma, liver, and colon cancers (Fig. 1.3), where GLS2 expression is repressed as a result of DNA methylation (Zhang *et al.*, 2013; Szeliga *et al.*, 2016) and GLS become the predominant GA isoforms (Szeliga *et al.*, 2005). Hence, repression of GLS2 might have a causative role in the malignization process as part of the transcriptional program of transformation. Analysis of GA expression profiles in several tumors showed a pervasive pattern associated to the malignant transformation: upregulation of GLS isoenzymes and simultaneous silencing of GLS2 isoforms. Thus, we postulated that GA enzymes showed opposing roles in cancer: GLS expression correlated with increased rates of proliferation while predominance of GLS2 was related to differentiated and quiescent cell states (Pérez-Gómez *et al.*, 2005).

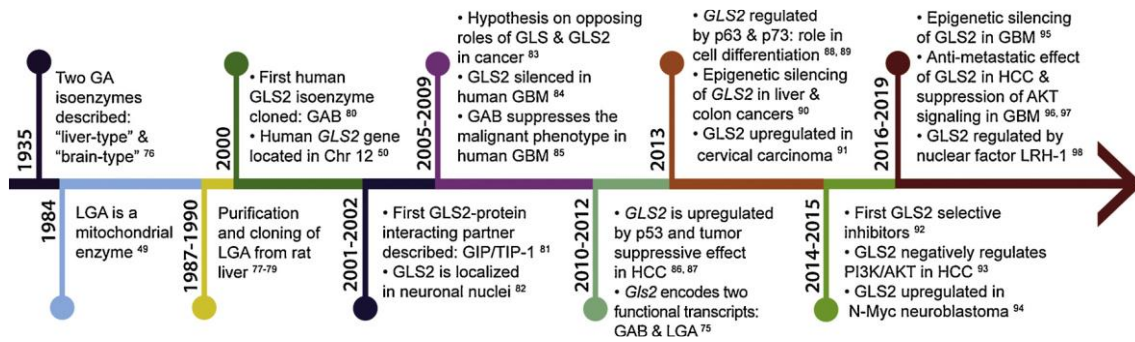


Figure 1.3. Timeline of milestones in the history of glutaminase GLS2 isoenzymes to elucidate their roles in cell growth, survival, differentiation and proliferation. *Relevant findings supporting a segregation of functional roles between GLS and GLS2 isoforms in tumor biology are highlighted. Other main scientific achievements regarding GLS2 roles in mammalian tissues, particularly in liver, were omitted for the purpose of this review. GAB, long glutaminase 2 isoform; GBM, glioblastoma; GLS, glutaminase isoenzyme; GLS2, glutaminase 2 isoenzyme; HCC, hepatocellular carcinoma; LGA, short glutaminase 2 isoform; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; TSS, transcription start site. Numbered references and image taken from Matés et al., (2020) Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 98, 34-43.*

In agreement with this hypothesis, constitutive overexpression of GLS2 in human glioblastoma cells of different tumorigenic potentials and genetic backgrounds suppressed the malignant phenotype by inducing strong inhibitions in cell migration and proliferation (Szeliga *et al.*, 2009; Majewska *et al.*, 2019). Furthermore, GLS2 was confirmed as a target gene of the tumor suppressor p53, in such a way that p53-controlled enhanced GLS2 expression was linked to a tumor-suppressive response, including reduced growth and colony formation of tumor cells (Hu *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010). Later on, direct regulation of GLS2 was demonstrated by other transcription factors belonging to the p53 family: p63 and p73 (Giacobbe *et al.*, 2013; Velletri *et al.*, 2013). The antiproliferative effect elicited by GLS2 may involve deep transcriptome alterations shifting the oncogene/tumor suppressor gene expression balance (Szeliga *et al.*, 2009), but may also induce changes in signaling pathways controlling proliferation. In this regard, recent studies are now shedding light on potential antiproliferative mechanisms elicited by GLS2. Thus, GLS2 showed tumor suppression activity in HCC and negatively regulated the PI3K/AKT signaling, frequently activated in HCC; hence, authors concluded that GLS2-induced PI3K/AKT impairment greatly contributed to the function of GLS2 in tumor suppression (Liu *et al.*, 2014). Of note, a similar result was found in human glioblastoma cell lines of different tumorigenic potentials and genetic backgrounds (Majewska *et al.*, 2019).

1.3. Crystal structures of mammalian glutaminase enzymes and glutaminase inhibitors

Currently, there are 42 mammalian GA three-dimensional structures in the PDB (Protein Data Bank) repository. Only two structures belong to the GLS2 isoforms, because the overwhelming majority of structures were determined for GLS isoenzymes.

Summary

Actually, the two GLS2 structural determinations are partial structures comprising only the GA catalytic domain. In the PhD Thesis (Table 1.1) all the mammalian crystalline GA structures are shown, including a list reporting the ligands which were used for co-crystallization studies.

The main allosteric inhibitors of GA are structural analogs of BPTES (bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide) and compound 968. The optimization of these compounds to obtain more stable and specific analogs was made possible by determining the crystal structures of enzyme-inhibitor complexes for GLS isoenzymes (DeLaBarre *et al.*, 2011; Thangavelu *et al.*, 2012). One of the BPTES analogs, the compound CB-839, which has greater biocompatibility, is currently in clinical trials in combination with other therapies. In a recent study in breast cancer cells, compound 968 was found to preferentially inhibit GLS2 in the luminal subtype (Lukey *et al.*, 2019). Only one other series of specific GLS2 inhibitors, the alkyl benzoquinones, isolated from the plant *Ardisia virens*, is known (Lee *et al.*, 2014). In HCC (HepG2) cells, GA activity was inhibited using several compounds from this series, and the one that showed the greatest inhibition capacity was AV-1.

The structure of the catalytic center of KGA has two domains: domain I corresponds to residues Ile22-Pro281 and Cys424-Leu533 and domain II is formed by residues Phe282-Thr423. Both Gln and Glu are linked to the active site by numerous hydrogen bonds with highly conserved residues in the KGA isoenzyme homologues. The crystal structure of the KGA-BPTES complex revealed the binding of the inhibitor to an allosteric cavity formed by Leu321, Phe322, Leu323 and Tyr394, in addition to the Phe318 and Asn324 residues, that interact with the phenylacetamide motif of the side chain of the inhibitor and Glu325, that interacts with the aliphatic part. BPTES binding induces conformational changes in the main residues of the loop Glu312-Pro329, essential in the stabilization of the catalytic cavity, generating a stable and inactive conformation. The study of the crystal structure of the complete GAC isoform, bound to its product, with and without BPTES (DeLaBarre *et al.*, 2011) describes a tetrameric conformation with a Glu molecule in the active site. This structure represents a non-active conformation and BPTES is likely to stabilize this conformation.

In the first structural studies of GA, it had been seen that the presence of inorganic phosphate (Pi) induced oligomerization, giving rise to the active tetrameric structure of the protein (Godfrey *et al.*, 1977; Morehouse *et al.*, 1981). It was found that in the tetrameric conformation there is one Pi ion for each monomer, included within a highly positive active site and establishing a polar contact with Ser291, Asn340 and Tyr471. Therefore, Pi would be an allosteric activator that would induce conformational changes in the activation loop, which comprises residues 320 to 327 (Li *et al.*, 2016). Pi competes with Glu for the same residues of the active cationic site of the enzyme, promoting product elimination during the catalytic cycle and thus avoiding GLS inhibition by product accumulation.

The crystal structure of the catalytic domain of GLS2 (PDB: 4BQM) was published in 2021 (Ferreira *et al.*, 2021). In this publication, the region between residue Ile154 and Gly497, which is common for the LGA and GAB isoforms, is described. The crystal structure of GLS contains a region that covers the active site as a lid, and that can be found in different conformations. In the closed conformation, the Tyr249 residue is within the active site. In the case of GLS2, the equivalent residue is Tyr183, which faces away from the active site cavity. Another characteristic that distinguishes the structure of

GLS2 is the only amino acid that is different in the catalytic site: a serine residue at position 225 in GLS2, substituted by a lysine in GLS. For GLS2, the activation loop is located in the Leu249-Ser255 region; there are two positions of GLS2, Tyr251 and Ser255, that are different in GLS, Phe318 and Phe322, the only residues that are different between the two isoforms in the activation loop.

2. METHODOLOGY

The main methodologies and techniques implemented in this PhD Thesis are briefly summarized below.

2.1. Cell cultures

Human hepatoblastoma HepG2 cells (European Collection of Cell Cultures, Cambridge, UK) were cultured as described previously (Pérez-Gómez *et al.*, 2005). The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line (European Collection of Cell Cultures, Cambridge, UK) was grown in RPMI (Sigma) medium supplemented with 10 % FCS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). The T98G and LN229 human glioma cell lines were cultured as described previously (Szeliga *et al.*, 2009). Cultures were incubated in a humidified atmosphere at 37 °C with 5 % CO₂. All cell lines were checked to be free of mycoplasma contamination.

2.2. Expression constructs and cellular transfections

The coding region of the human GLS2 cDNA was synthesized by the company GenScript and inserted into pcDNA3 vector. For expression of GLS2 proteins in *E. coli*, the coding region of the truncated form GLS2₇₃₋₆₀₂ was subcloned into the *Nde*I y *Not*I sites of expression vector pET-15b, while the coding sequences of GLS2₅₆₋₆₀₂ y GLS2₆₂₋₄₈₃ were subcloned into the same sites of the expression vector pET-28b. The sequences of all the primers required for amplifications of GLS2 truncated forms are available in the Memory.

The MultiBac expression system was used for expression of GLS2 constructs in the baculovirus system, which is based in the Tn7 transposition event (Berger *et al.* 2004). Two constructs containing the GLS2 coding sequence were designed employing the transfer vector pFastBac1: one contained the whole coding sequence (pFastBac1-GLS2₁₋₆₀₂), and the other the partial truncated sequence GLS2₅₆₋₆₀₂ (pFastBac1-GLS2₅₆₋₆₀₂). These two transfer plasmids were synthesized and optimized for expression of proteins in insect cells by the Recombinant Protein Expression Service of the company GenScript. In the pFastBac1 vector, the transcription of the coding sequence for the target gene is under control of the promoter of the polyhedrin gene, a crystalline matrix protein of the baculovirus. In both constructs, the recombinant GLS2 protein will be produced with an affinity tag of 6xHis at the C-terminal end.

The coding sequence of the target gene (GLS2), presents in the transfer plasmid, is integrated after Tn7 transposition in the modified genome of the baculovirus, which is

Summary

kept as a bacmid in a special *E. coli* strain. In this work, the strain DH10EMBacY was used, which carries a Multibac bacmid derivative named EmBacY. This new bacmid contains the coding sequence of the yellow fluorescent protein (YFP) under the control of the polyhedrin promoter, which allows easy monitoring of both the virus titer and the expression of the target protein.

2.3. Heterologous expression of human GLS2 glutaminases

All the studies with the baculovirus expression system were done with Sf9 and Sf21 insect cell lines derived from *Spodoptera frugiperda*. Recombinant baculovirus for the GLS2 proteins were obtained as described in the Memory or (for Sf9 cells) as described before, together with methodology for culture of these cells (Campos-Sandoval *et al.*, 2007). Sf1 cells were grown in suspension in Sf-900 II medium with no serum, in 250 or 500 mL flasks in a metabolic incubator without CO₂ exchange at 27 °C. Then, cells were seeded in 140 mm culture plates and infected with the recombinant virus.

The induction of *E. coli* cells was carried out overnight using 1 mM of IPTG at 30 °C. The culture was spun down and the pellet was conserved at -80 °C. Also, the recombinant human GIP protein was expressed in bacteria and purified by affinity chromatography as described before (Aledo *et al.*, 2000).

2.4. Optimization of GLS2 expression in insect cells

After detection of the first fluorescent insect cells, infected with the high-titer viral stock (V_1), by fluorescence microscopy, aliquots of 10^6 cells were taken every 24 h. The aliquots were suspended in 500 μ L of cold PBS, sonicated (as detailed in the Thesis) and centrifuged at 14000 g for 10 min. Then, the fluorescence of these samples was determined by pipetting 100 μ L of the supernatant in a black 96-well plaque (BD Falcon) and measured in a Spark multimode reader fluorimeter (Tecan) ($\lambda_{exc}=513$ nm; $\lambda_{em}=529$ nm). The sample fluorescence was plotted versus time. A curve was obtained, and the plateau phase of the curve showed the fluorescence maximal value, as well as the best time for cell recollection. This result was compared with the GLS2 expression analysis which was done in parallel by using Western blot. To assess the optimal amount of V_1 virus that should be added to the insect cells, small cultures of 25 mL were prepared at cellular density of 0.5×10^6 cells/mL. A small volume of virus was added to each culture, in order to determine the multiplicity of infection (MOI, number of viral particles infecting a single cell). The cultures were monitored, and fluorescent measurements were taken while, at the same time, the expression of GLS2 was followed by Western blot.

2.5. Purification of recombinant GLS2 expressed in insect cells

Infected cells were recovered by centrifugation at 1000 g for 15 min and kept at -80 °C until use. The purification of recombinant GLS2 proteins, whole and truncated forms, involved the same purification steps which consist of two chromatographic procedures: immobilized metal affinity chromatography (IMAC) with Ni²⁺ ions and size-

exclusion chromatography (SEC). A detailed protocol for both chromatographic procedures is fully detailed in the PhD Thesis. Both columns were coupled to a Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system ÄKTAprime (GE Healthcare).

2.6. Crystallization of pure GLS2₅₆₋₆₀₂ produced in baculovirus system

The crystallization assays were performed at the Protein Crystallization Facility belonging to the High Throughput Crystallization Lab (HTXL), which is located at the European Molecular Biology Lab (EMBL) of Grenoble (France), under the supervision of Dr. José A. Márquez, a reputed world-class expert in the field of crystallization and characterization of proteins. Crystallization trials were done using the sitting drop vapor diffusion technique, employing a Mosquito-LCP (TTP Labtech) robot. Drops containing purified protein solution plus precipitant solution at different ratios were added in each well (three drops as much) (Cipriani *et al.*, 2012; Márquez *et al.*, 2014). Different conditions were checked: protein concentrations, pH, precipitant agent concentrations, buffer composition and temperatures (4 °C and 20 °C). Many commercial plaques and home-made plaques were evaluated, as described with detail in the PhD Thesis. An automatic image system (RockImager, Formulatrix Inc.) recorded the drops inside the wells, following a previously established schedule (2 days, 4 days, 8 days, 20 days, 34 days, 63 days and 88 days after seeding the plaques). All these images can be examined online by using the CRIMS (Crystallographic Information Management System, www.crimis-project.eu) platform.

2.7. Western blotting

Cell extracts and pure GA proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting essentially as described (Campos *et al.*, 2003). The blots were developed with the Pierce™ SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate as recommended by the supplier (Thermo Scientific). The working dilution of the anti-GLS2 antibody was 1:1000 typically. A complete list of commercial antibodies used in this Thesis, indicating the description, commercial source and working dilutions has been included in the Materials and Methods section of the PhD Thesis. For Western blotting of brain tissues, a mouse (adult male C57BL/6) whole brain extract was prepared as outlined before (Cardona *et al.*, 2015). Rat (adult male Sprague-Dawley) prefrontal cortex (PFC) was a kind gift of Dr. Gert Lubec. Whole protein extract of rat PFC was obtained as described elsewhere (see López de la Oliva *et al.*, 2020). All animal experiments were carried out in accordance with the European Union regulations (Council Directive 86/609/ECC of 24 November 1986) and approved by the committee of animal use for research at Malaga University, Spain (RD 1201/2005 of 10 October 2005).

2.8. In-gel and in-solution proteolytic digestions

Total protein extracts from GBM cell lines or two micrograms of the purified GLS2 protein sample were digested with trypsin or chymotrypsin (1:100 w/w). The purified protein was digested as previously described (see references in López de la Oliva *et al.*, 2020). All digests were desalted and concentrated with customized reversed-phase C18 stage tips (López de la Oliva *et al.*, 2020). Lyophilized peptides were reconstituted

Summary

in 5% formic acid and analyzed by LC-MS/MS. For GBM extracts, an in-gel proteolysis was performed by mixing samples with a solution of acrylamide, followed by rapid addition of ammonium persulfate ((NH₄)₂S₂O₈) and TEMED (Sigma). After polymerization for 20 min, the gel was cut in small cubes of 1-2 mm that were treated with 50% acetonitrile (CH₃CN) in 25 mM NH₄HCO₃. Samples were dried and desiccated with CH₃CN; then, they were S-carbamidomethylated by using 10 mM DTT in 50 mM NH₄HCO₃ for 30 min at 56°C. After removal of the DTT excess, samples were treated with 55 mM iodoacetamide in 50 mM NH₄HCO₃ for 20 min at room temperature in the dark. Gel pieces were again dehydrated and the proteins enzymatically digested. A protease solution, containing trypsin (Pierce) or chymotrypsin (Pierce), was added. In both cases, digestion was performed overnight at 37 °C. Peptides were extracted from the gel pieces with CH₃CN and 0.1% (v/v) HCOOH (formic acid) at room temperature for 30 min. Samples were dried in a Speed-Vac concentrator (Thermo Fisher Scientific) and dissolved again in 50 µL de HCOOH 0.1 %. The samples were sonicated for 30 min and centrifuged at 14000 g for 5 min. Finally, they were quantified in a UV-visible spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). All samples were normalized at 0.5 µg/µL with 0.1% HCOOH before being transferred to the injection vials.

2.9. LC-MS/MS analysis

A) Purified GLS2 protein

Mass spectrometry was performed on a hybrid linear trap quadrupole Orbitrap Q-Exactive HF spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) using the Xcalibur version 2.1.0 coupled to an Agilent 1200 HPLC nanoflow system via a nanoelectrospray ion source using liquid junction (Proxeon, Odense, Denmark). Solvents for liquid chromatography-mass spectrometry separation of the digested samples were as follows: solvent A consisted of 0.4% formic acid in water and solvent B consisted of 0.4 % formic acid in 70% methanol and 20% isopropanol. From a thermostatic micro-autosampler, 8 µL of the tryptic peptide mixture were automatically loaded onto a trap column (Zorbax 300SB-C18 5 µm, 5 × 0.3 mm, Agilent) with a binary pump at a flow rate of 45 µL/min. 0.1% TFA was used for loading and washing the precolumn. After washing, the peptides were eluted by back-flushing onto a 16 cm fused silica analytical column with an inner diameter of 50 µm packed with C18 reversed phase material (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 3 µm, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany). The peptides were eluted from the analytical column with a 27 min gradient ranging from 3 to 30% solvent B, followed by a 25 min gradient from 30 to 70% solvent B, and, finally, a 7 min gradient from 70 to 100% solvent B at a constant flow rate of 100 nL/min. The analyses were performed in a data-dependent acquisition mode using a top 15 CID or HCD method. Dynamic exclusion for selected ions was 60 s. A single lock mass at m/z 445.120024 was employed. The maximal ion accumulation time for MS in the Orbitrap and MS2 in the linear trap was 500 and 50 ms, respectively. Automatic gain control was used to prevent overfilling of the ion traps. For MS and MS2, automatic gain control was set to 106 and 5,000 ions, respectively. Peptides were detected in MS mode at a resolution of 60000 (at m/z 400). The threshold for switching from MS to MS2 was 2000 counts. All samples were analyzed as technical, back-to-back replicates. Raw data were interpreted using Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific) and proteins were identified using the Mascot search engine (Matrix Science, London, UK). Spectra were matched against the SwissProt/UniProt human (*Homo sapiens*) protein database. The MS/MS ion search parameters

were the following: the number of maximum missed cleavages for trypsin was 2; peptide mass tolerance was ± 10 ppm ($\#^{13}\text{C} = 1$) and fragment mass tolerance was ± 0.1 Da; carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were determined as fixed and variable modifications, respectively. Additional search using hypusine, deoxyhypusine and acetylhypusine modifications on lysine residues was performed. The significant threshold for matched peptides was given as $p < 0.05$. Protein identity was considered as verified if it was present at least with two unique peptide sequences. This whole protocol is described in López de la Oliva *et al.* (2020).

B) GBM samples

Samples were injected into a nano-liquid chromatography system, Easy nLC 1200 UHPLC, coupled to a hybrid mass spectrometer Quadrupole-Orbitrap Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific). Data acquisition and processing were performed with the software Tune 2.9 and Xcalibur 4.1.31.9. The solvents employed in the chromatography were: 0.1 % HCOOH (A) and 0.1 % HCOOH in 80 % CH₃CN (B). Samples (2 μL , 100 ng of peptide mixture) were loaded with a Autosampler thermostat in a reversed-phase precolumn (Acclaim PepMap 100, 75 μm x 2 cm, C18, 3 μm , 100 Å, Thermo Fisher Scientific), keeping the pressure to a maximum of 980 mbar. Then, the sample was analyzed in an analytical reversed-phase column of 50 cm of length (PepMap RSLC C18, 2 μm , 100 Å, 75 μm x 50 cm, Thermo Fisher Scientific). The elution gradient starts from 2-20 % B for 120 min, followed by a gradient from 20 to 35 % of solvent B for 30 min and, finally, the mobile phase was adjusted to 95 % B for 15 min; then, the mobile phase was set at 2 % B for re-equilibration and starting a new analysis. The flow rate was always 300 nL/min. A calibration solution of positive ions named LTQ Velos ESI (Pierce, IL, USA) was used for calibration of the instrument. Also, an internal calibration was done with the polysiloxane ion signal coming from the ambient air at a m/z ratio of 445.120024. The MS acquisition was set in the range 300-1750 m/z with a resolution of 120000. By using the data-dependent acquisition mode, the 20 precursor ions with charges between +2 and +5 showing the most intense signals were selected for fragmentation, with a window of 1.2 m/z units, in order to obtain the corresponding MS/MS (MS2) spectra. Fragment ions were generated in a collision cell by higher-energy collision dissociation (HCD), with a first fixed m/z ratio of 110 and were detected in an Orbitrap MS analyzer at a resolution of 30000. A dynamic exclusion of 30 s was implemented for the selected ions, whereas the maximum accumulation time allowed was set at 50 ms, both for MS and MS2 modes. Automatic gain control was always used to avoid the saturation of the ion trap; it was set in 3×10^6 ions and 10^5 ions for MS and MS2, respectively. Three technical replicates were analyzed for each sample.

The MS and MS2 spectra were matched against the *Homo sapiens* protein database SwissProt, version 2017.10.25 (42.252 sequences). Raw data acquired were analyzed in the platform Proteome Discoverer™ 2.3 (Thermo Fisher Scientific), using the SEQUEST® HT motor with mass tolerances of 10 ppm and 0,02 Da for precursor and fragment ions, respectively. Two omitted tryptic sites were allowed and the enzymes selected were trypsin and chymotrypsin. S-carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues and acetylation of N-terminal residues were determined as fixed and variable modifications, respectively. Coincident peptide spectra and the subsequent protein identification were validated by using the Percolator algorithm, employing a database of inverted proteins as bait and with a strict limit of false

Summary

discovery rate (FDR) of 1 %. Results were filtered to show only those proteins with at least two distinct peptide sequences.

2.10. Bioinformatic analysis

A separated bioinformatic analysis was performed for down- and upregulated GBM proteins as a result of GLS2 expression. The protein-protein interaction network of relevant hits was performed with the software STRING, where each node represents a protein and the connectors between them are referred to a physical or functional interaction. As STRING parameters, a high-level of confidence was set (0.7) and a high FDR value (1 %). Also, a layer of only 20 interactors was allowed for each interaction network, in order to reduce the high number of non-connected nodes. The interaction networks were analyzed with the software Cytoscape v3.9.1: proteins (nodes) with the highest degree of connectivity (number of interactors) and higher central intermediation (number of times a specific node is the nearest to other nodes) were selected. Clusters of the interacting networks were prepared with the MCODE application of Cytoscape, which allows the formation of protein clusters with high density of connections. Those groups with the highest scores were analyzed with ClueGO, using the databases KEGG and REACTOME to get information on metabolic pathways involved.

A functional enrichment analysis was implemented with the differentially expressed proteins by using the ClueGO software and selecting the databases of Gene Ontology (GO) for the following categories: biological processes, molecular functions and cellular components. A selection of hits was always done to allow those having a statistical probability value (t Student) of $p \leq 0,05$, which was calculated with the exact test of Fisher following the correction of Benjamini-Hochberg to avoid false positives. An additional software that was used in the mining of proteomic data was FunRich (Functional Enrichment Analysis) under similar statistical parameters ($p \leq 0,05$ and the correction of Benjamini-Hochberg to avoid false positives).

3. RESULTS

I. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF GLS2

3.1. Recombinant human GLS2 expression in prokaryotic system

In previous works of our research group, we used different expression vectors to produce human GLS2 proteins in prokaryotic systems (*E. coli*), given their obvious methodological advantages. Using pET vectors, it was possible to overexpress the precursor and "mature" forms (without the putative mitochondrial import peptide, residues 1-14) of GLS2, but with a low yield of soluble protein and without detectable enzymatic activity (Campos *et al.*, 2003). Therefore, we decided to produce other truncated forms of the protein with pET vectors, with the main aim of obtaining enough soluble and active GLS2 to carry out kinetic studies and initiate protein crystallization assays.

Of the three constructs designed to express truncated forms of GLS2, the one that gave the best results in terms of protein quantity and enzymatic activity was pET28-GLS2₅₆₋₆₀₂. After elution with 450 mM imidazole, several fractions were obtained that showed an intense band on SDS-polyacrylamide gels corresponding to the recombinant protein, and some of them had a fairly high specific enzyme activity of approximately 112 U/mg (Fig. 3.1).

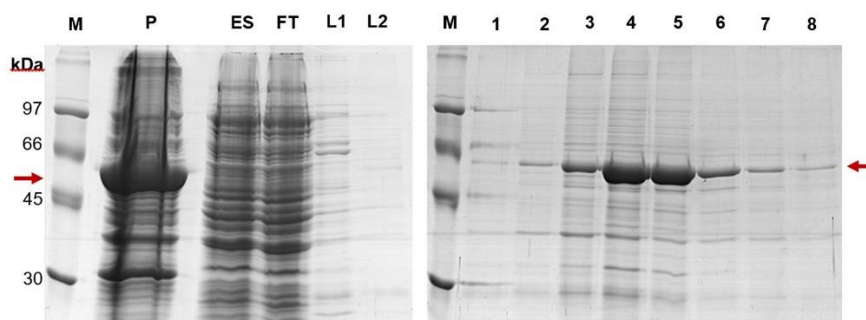


Figure 3.1. Purification of GLS2₅₆₋₆₀₂ by IMAC affinity chromatography. The analysis by SDS-PAGE electrophoresis and Coomassie blue staining of the different fractions obtained in the scale-up of the expression and purification process is shown. M: molecular mass marker; P: insoluble fraction after sonication and centrifugation; ES: soluble extract; FT: fraction not retained in the column (flow-through); L1 and L2: 75 mM and 100 mM imidazole washes, respectively; lanes 1-8: fractions from the 450 mM imidazole elution.

Regarding the yield of our GLS2₅₆₋₆₀₂ expression and purification protocol, we were unable, after performing numerous tests, to significantly increase the amount of recombinant protein expressed in *E. coli* to levels compatible with the implementation of crystallization protocols for the protein. A loss of soluble protein occurred when its concentration was increased by ultrafiltration (results not shown), which prevented additional purification procedures to be carried out in order to obtain the protein with a higher degree of purity, an essential requirement for obtaining protein crystals. Therefore, taking into account the protein instability shown by the ThermoFluor assays, its tendency to aggregate, and its low purity and concentration, we decided to use a heterologous eukaryotic expression system for the production of recombinant human GLS2.

3.2. Recombinant human GLS2 expression in eukaryotic system

In order to increase the amount of recombinant protein and its purity, we chose the truncated protein GLS2₅₆₋₆₀₂ for heterologous production in a eukaryotic system: insect cells infected with recombinant baculovirus. We also decided to express the full sequence protein. Unlike the protein produced in bacteria, GLS2₅₆₋₆₀₂ expressed in insect cells was very stable, as demonstrated by the ThermoFluor assay, with a T_m of 78 °C in 0.1 M HEPES buffer, pH 8 and 0.5 M NaCl. This allowed us to obtain almost 0.2 mg of a highly purified protein from 5×10^8 cells, after two IMAC affinity chromatography and one exclusion size chromatography (Fig. 3.2).

Summary

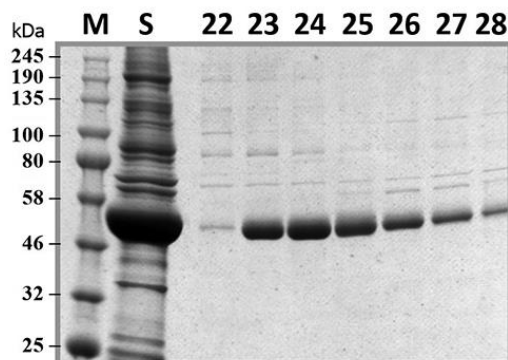


Figure 3.2. Purification of GLS₂₅₆₋₆₀₂ by exclusion size chromatography. *M*: molecular mass marker; *S*: soluble extract; 22-28: eluted fractions with purified recombinant protein.

3.3. Structural and kinetic characterization of GLS₂₅₆₋₆₀₂.

The molecular mass of the native GLS₂₅₆₋₆₀₂ protein was estimated by size exclusion chromatography using a Sephacryl S-200 HR column, calibrated with molecular mass markers from 12 to 200 kDa. A molecular mass for GLS2 of 212 kDa, consistent with a tetrameric state of aggregation, was calculated.

The recombinant protein purified from insect cells showed Michaelis-Menten kinetics, with a K_m for Gln of 2 mM. On the contrary, the enzyme expressed in bacteria showed an allosteric behavior, with an $[S]_{0.5}$ of 6 mM and a Hill index close to 8 (Fig. 3.3).

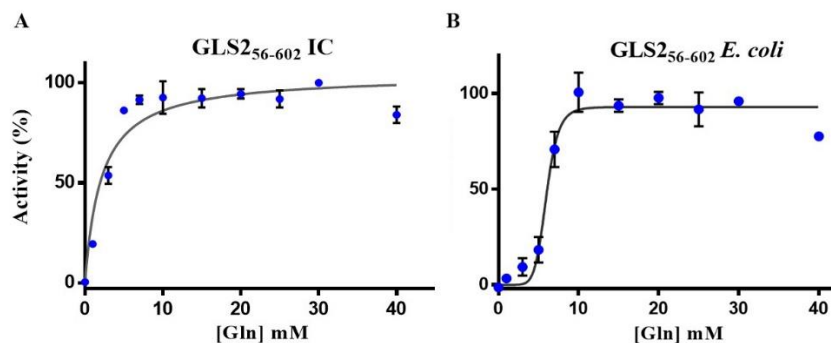


Figure 3.3. Kinetic behaviour of recombinant GLS₂₅₆₋₆₀₂ expressed and purified from insect cells (A) and bacteria (B).

For the protein crystallization assays, a total of 3840 different conditions spread over 40 commercial plates were tested, including PEGs-I_qiagen, Classics-Suite_qiagen, Salt-Grid_hampton (Hampton Research), PACT_MD, JCSG_MD, ProPlex_MD, Morpheus_MD, Wizard_I+II_rigaku (Molecular Dimension), and JBS-classic-1_jena (Jena Bioscience). In addition to different plates with different precipitating solutions, various concentrations of purified protein were also tested: for GLS2 complete sequence, concentrations of 1.3, 3.3 and 5.5 mg/mL were used, and in the case of the GLS₂₅₆₋₆₀₂ form, the concentrations evaluated were 1, 1.84, 1.88 and 7.7 mg/mL. With one of the conditions tested, 0.1 M Tris-HCl, pH 8 and 1.6 M lithium sulfate, protein microcrystals

were clearly obtained, as shown in Fig. 3.4, but due to technical problems in handling them, they could not be diffracted.

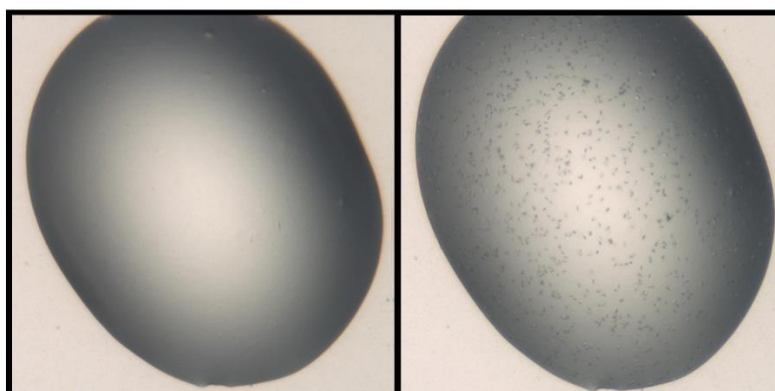


Figure 3.4. GLS256-602 microcrystals produced at 20°C under condition H03-2 of the commercial ProPlex_MD plate: 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 and 1.6 M lithium sulfate. The protein concentration was 1.84 mg/mL. Image taken 48 h (left) and after 63 days (right), where the appearance of protein microcrystals is clearly observed.

We conducted a study of the interaction of GLS2 with GIP (glutaminase-interacting protein) using the bilayer interferometry technique. A dissociation constant, K_D , equal to 77 nM was calculated (Fig. 3.5).

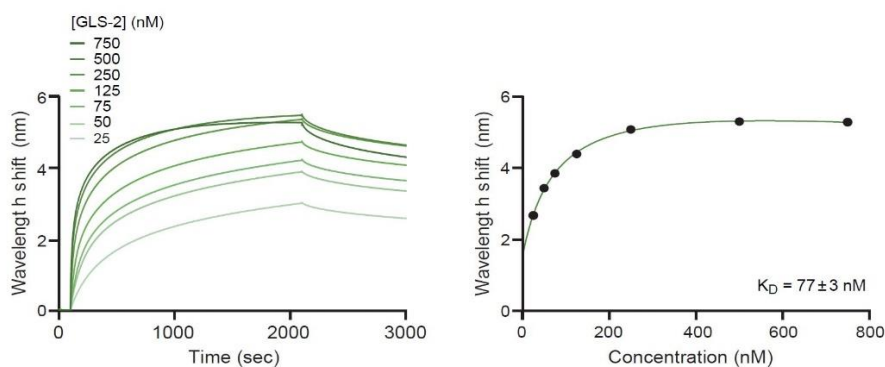


Figure 3.5. Graphs corresponding to the sensorgram section of the GLS2-GIP binding (left) and calculation of the K_D (right).

Finally, we carried out a study with an Orbitrap analyzer of the post-translational modifications present in the recombinant protein. A chymotryptic peptide was identified that, in the mass spectrum (Fig. 3.6), showed its fourth residue modified with acetylhypusine (K332 of the complete GLS2 sequence) (López de la Oliva *et al.*, 2020). Currently, the only protein known to contain the amino acid hypusine is eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) (Park, 2006). This posttranslational modification could be relevant for GLS2 nuclear targeting and/or function.

Summary

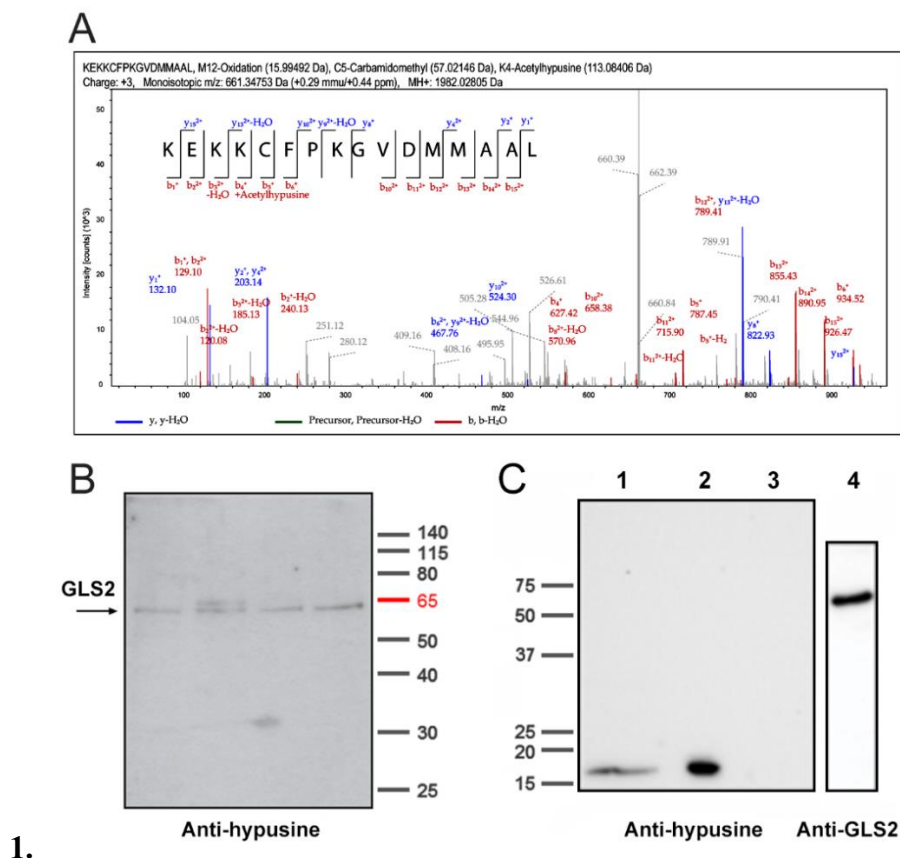


Figure 3.6. Characterization of the post-translational modification of the recombinant GLS2 protein by acetylhypusine. (A) Representative mass spectrum of a GLS2 chymotryptic peptide with post-translational modification by acetylhypusine. The peptide KEKKCFPKGVDDMM AAL (from amino acid 329 to 344 of the GLS2 sequence) appears with a +3 charge and a monoisotopic m/z ratio of 661.34753 Da (+0.29 mmu/+0.44 ppm). MH^+ : 1982.02805 Da, including C-5 carbamidomethyl (57.02 Da), M-12 oxidation (15.99 Da) and K4-acetylhypusine (113.08 Da). (B) Validation of GLS2 hypusination by western immunoblotting using an antihypusin-specific polyclonal antibody. (C) Positive and negative control of hypusination. Total mouse brain and rat prefrontal cortex extracts (20 μ g total protein per sample) were used as positive control, revealing a band of hypusinated eIF5A protein at approx. 17 kDa (lanes 1 and 2). The purified recombinant protein GLS256-602 expressed in *E. coli* was used as a negative control.

II. PROTEOMIC ANALYSIS

3.4. Subcellular localization of GLS2 in tumor cells

As previously mentioned, our group has published studies on the nuclear localization of GLS2 in the mammalian brain, both in neurons (Olalla *et al.*, 2002) and in astrocytes (Cardona *et al.*, 2015). The next step was to study the possible nuclear localization of GLS2 in human tumor cells and thus be able to elucidate the functions of the protein not related to its catalytic activity. To characterize the nuclear localization of GLS2 in tumor cells, we carried out a first experimental approach by carrying out immunocytochemical assays in human cancer cell lines (glioblastoma, neuroblastoma,

hepatocellular carcinoma). The results showed a predominant mitochondrial labeling, while only a small proportion of cells showed nuclear labeling.

A large number of experimental evidence suggests that GLS2 may play a role as a tumor suppressor, causing a reversion of the transformed phenotype in cancer cells and showing higher levels of expression in quiescent and differentiated cells, while it is usually repressed in a high number of tumors (Márquez *et al.*, 2015). Given that our initial hypothesis also associated the nuclear function of GLS2 with changes in transcriptional regulation, which would cause an anti-proliferative effect and greater differentiation of cancer cells, we used two tumor cell models with a greater import of GLS2 to the nucleus: human cancer cell lines treated with differentiation agents (phorbol ester PMA) and human glioblastoma lines that overexpressed GLS2. Both models showed an increase in the cell population in the G2/M phase, together with a decrease in the S and G0/G1 phases. They also showed a lower proliferative rate, which correlated with the increased expression of GLS2 shown by both cell models (Figs. 4.39 and 4.40, PhD Thesis). The higher level of expression of GLS2 was accompanied by an increase in the levels of p53 and p21, as well as a decrease in the levels of c-Myc. All of these results support the notion that GLS2 acts as a tumor suppressor in certain types of cancer. Therefore, we decided to perform a quantitative proteomic analysis in GBM cells with regulated expression of GLS2.

3.5. Quantitative proteomic analysis of LN229-GLS2 glioblastoma cells

As stated in the introduction, GBMs are among the types of cancer that repress GLS2 expression in their malignant transformation program. There is a broad consensus that establishes that in glioblastoma multiforme grade IV, the most malignant brain tumor, there is a repression of GLS2 and an induction of the expression of GLS isoenzymes (Majewska *et al.*, 2019). This fact, together with the results detailed in the previous section, led us to carry out a quantitative proteomic analysis of a glioblastoma line that stably overexpressed the GLS2 isoenzyme, LN229-GLS2(+) (Fig. 3.7).

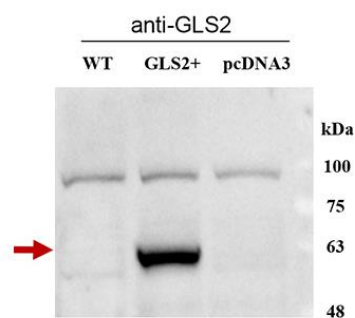


Figure 3.7. Western immunoblot of LN229 glioblastoma cell lines used in proteomic analysis. 20 μ g of total cellular protein from each sample was loaded per well: wild-type LN229 (WT), LN229-GLS2 (GLS2+), and LN229-pcDNA3 (empty vector). Samples were developed using primary anti-GLS2 antibody.

Using mass spectrometry and several bioinformatic tools, we analyzed the proteomic profile of the GBM line LN229-GLS2. A total of 3082 proteins were identified

Summary

for a false positive rate (FDR) of less than 0.01 (high confidence). Of these, 300 were considered repressed (LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 abundance ratio ≤ 0.6) and 186 overexpressed (LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 abundance ratio ≥ 1.5) for a p value less than 0.05.

Each of the lists of differentially expressed proteins (repressed or overexpressed) were analyzed with the STRING database. Thus, protein-protein interaction networks were obtained (Figs. 4.45 and 4.47, PhD Thesis). Next, a functional enrichment analysis of both networks was performed using the ClueGo application in the Cytoscape software, for the following three categories of gene ontology: molecular functions, cellular components, and biological processes.

To analyze each of the categories separately and confirm the results obtained with ClueGO, further functional enrichment of the repressed and overexpressed proteins was performed using the FunRich software (Fig. 4.49, PhD Thesis). For repressed proteins, functional enrichment corresponded to the following terms or annotations: 1) biological processes: negative regulation of transcription mediated by RNA polymerase II, positive regulation of DNA-dependent transcription and cell division; 2) cellular components: cytosol, nucleoplasm, nucleus and extracellular vesicular exosome; 3) molecular functions: mainly the term protein binding was obtained. For overexpressed proteins, the most significant terms in the functional analysis were: 1) biological processes: glycolysis; 2) cellular components: cytosol, extracellular vesicular exosome, and membrane; 3) molecular functions: protein binding.

For the determination of the central and most important proteins, the protein-protein interaction network was built in STRING and analyzed with Cytoscape, obtaining a result of 319 nodes and 833 connections between nodes for the repressed proteins. The result of selecting the nodes with the highest degree and centrality identified 29 nodes and 328 connections. The enrichment using the KEGG database (Fig. 4.50-C) showed that the most important pathways were: cell cycle, p53 signaling pathway and progesterone-mediated oocyte maturation. On the other hand, in the REACTOME database, the routes highlighted as most important were: kinesins, G1 phase of mitosis and G1/S transition, cell cycle checkpoint, and FOXO-mediated transcription of oxidative, metabolic, and neuronal stress genes.

In the same way, differentially overexpressed proteins were analyzed by generating a protein-protein interaction network with 204 nodes and 453 junctions between nodes, built in the STRING database, and 10 proteins were considered central with Cytoscape. Enrichment in the pathways collected in the KEGG database resulted in the following terms: glycolysis/gluconeogenesis, central carbon metabolism in cancer, and focal adhesion. In the case of the REACTOME database, the following pathways were obtained: rRNA modification in the nucleus and cytosol, Rho GTPase cycle, self-degradation of the E3 ubiquitin ligase COP1, and translational elongation in eukaryotes.

4. DISCUSSION

4.1. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF GLS2

The expression and purification of the recombinant human GLS2 (isoenzyme GAB) has been achieved in two heterologous systems: prokaryotic (*E. coli*) and eukaryotic (insect cells infected with recombinant baculovirus). The major aim of the protocol described here for getting human recombinant GLS2 was protein crystallization and further structural studies for the determination of the 3D protein structure, a goal that has not been yet achieved for the GLS2 human protein. Our research team described the expression of GLS2 protein (GAB isoform) in bacterial systems (Campos-Sandoval *et al.*, 2003). However, the protein was mostly insoluble, appearing in inclusion bodies, and catalytically inactive. The capacity of aggregation of GA proteins was previously detailed in pioneer works performed by Dr. Norman P. Curthoys' group. They described the expression and purification of two truncated forms of the rat GLS isoenzyme named KGA (one protein lacking the amino acids coded by exon 1 and another truncated protein formed only by exons 2-14). Both truncated forms showed full enzymatic activity, whereas an inactive soluble enzyme was always obtained after expression of the full-length protein (Kenny *et al.*, 2003). Taking these results into account, we performed a bioinformatic analysis to discover non-structured regions in the GLS2 amino acid sequence, which may serve as aggregation regions avoiding proper protein folding, as well as a prediction of the protein stability *versus* the amino acid sequence of the human protein. A non-structured region was detected mostly by the amino acids of exon 1; thus, we decided to express truncated versions of the GLS2 protein lacking most of the amino acids presented in exon 1. Actually, these truncated protein forms were those showing the best data in terms of soluble enzymatic activity and protein yields in the two heterologous systems (bacteria and insect cells) studied in this PhD Thesis.

The requirements for protein crystallization are quite stringent in terms of purity and protein amounts (Rubio, 2003). Proteins must be isolated with a level of purity ≥ 95 % and at least 20-25 mg of purified protein are required to fulfill the huge amount of different crystallization trials needed, at two different temperatures: typically, 4 °C and 20-25 °C. Our group first reported the isolation and purification of a functional human GLS2 employing the first baculovirus systems that were developed at that time (Campos-Sandoval *et al.*, 2007). However, neither the protein yield nor the lysis buffer employed (containing TX-100 as detergent) were suitable for implementation of crystallization trials. A strategy to increase the chances of protein crystallization is the evaluation of the homogeneity and thermal stability of the pure protein. We achieved that goal by using the thermal shift analysis or ThermoFluor assay, which is based in the reversible binding of a fluorescent probe, SYPRO Orange, to the protein. The probe emits fluorescence only after binding to hydrophobic regions of the protein, which are not exposed in the native state of the protein. When temperature is raised, the protein denatures and the probe binds to the protein allowing an increase of the fluorescence. The curve obtained by plotting the probe fluorescence versus the temperature allowed us to follow the process of protein denaturation and determination of the melting temperature, T_m , which is defined as the temperature at which the protein is half-denatured (50 % denaturation).

The highest T_m found for the pure GLS2₅₆₋₆₀₂ protein isolated from bacteria was 45 °C, despite of the numerous formulations checked for protein stability with the ThermoFluor assay. Moreover, most denaturation curves showed anomalous forms which also suggested protein instability. In sharp contrast, the full-length GLS2 and GLS2₅₆₋₆₀₂

Summary

proteins, expressed and purified from baculovirus systems, showed more stable curves. After checking a great number of media, both proteins shown the highest stability in a buffer composed by 50 mM HEPES, pH 7.5 and 500 mM NaCl. Accordingly, media and mobile phases for chromatography were modified by using formulations similar to this optimum medium. Then, both purified proteins were submitted to thermal shift analysis: we obtained T_m values of 61 °C and 78 °C for the full-length and truncated (GLS2₅₆₋₆₀₂) proteins, respectively. These values were considerably higher than the T_m previously obtained for the *E. coli* GLS2₅₆₋₆₀₂ protein, which strongly suggests that these proteins isolated from eukaryotic expression systems are far more stable than those isolated from bacteria. Furthermore, the higher T_m of the truncated form (17 °C of difference) also deserves some comments. This result suggests that removal of most amino acids encoded by exon 1 significantly increases the stability of the protein, in agreement with the previous bioinformatic analysis performed. On the other hand, it is worth mentioning that this protein was stored at -80 °C for months without showing any appreciable degradation or loss of enzymatic activity.

Next, we focused our experimental work in the crystallization of the purified GLS2₅₆₋₆₀₂ protein isolated from eukaryotic cells. To achieve that goal, we had the great opportunity of establishing a collaboration with Prof. José A. Márquez, a renowned scientist and a world leader in the field of protein crystallization. He runs the High Throughput Crystallization Facility, HTX lab, at the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Grenoble (France). Prof. Márquez has developed a semiautomatic methodology for crystallization and recollection of protein crystals. A robot performs the setup of all the crystallization plaques. Using this platform, we checked almost 4.000 different crystallization media, varying buffers, pH, precipitant agents and temperatures. The only condition where we got microcrystals of GLS2 protein was in a medium composed by 0.1 M Tris-HCl, pH 8 and 1.6 M Li₂SO₄. This composition makes sense because there are a few publications dealing with the crystallization of the GLS isoenzymes, where the precipitant agent is Li₂SO₄ and the buffer BIS-Tris propane at pH 7 (Thangavelu *et al.*, 2014; Ramachandran *et al.*, 2016). Nevertheless, the pH of 8 for the crystallization of the GLS2 protein is in accordance with the optimal pH for enzymatic activity shown by mammalian GAs (Campos *et al.*, 1998). Additional trials in order to obtain bigger crystals suitable for X-ray diffraction were unsuccessful in the time frame of this PhD Thesis. Actually, a great increase in protein concentration was ineffective because we reached the unstable oversaturated region where precipitation, instead of crystallization, takes place.

In order to facilitate new crystallization trials in the next future, we reasoned that a protein complex formed between GLS2 and its interacting protein partner GIP may be more stable and easy to crystallize than the GLS2 protein alone. In the path to obtain GLS2-GIP crystals, we first characterize the binding of both proteins using the bio-layer interferometry (BLI) technique. We obtained a K_D of 77 nM for the interaction, which was much lower than the K_D previously reported for the binding of GIP with the octapeptide (KENLESMV-COOH), corresponding to the C-terminus of GLS2 (Banerjee *et al.*, 2008). Obviously, this result indicates that the complex GIP-GLS2 is further stabilized by other interactions apart from those located at the C-terminus of GLS2. The data also support the notion that the complex is very stable and, thus, suitable for crystallization trials, as an alternative to the crystallization of the GLS2 protein alone. The GIP protein is small (about 16 kDa of molecular mass); hence, the complex would be not too big for crystallization purposes. Unfortunately, time limitations preclude us of

finishing this task during the framework of the PhD Thesis; further work will be needed in the near future for completion of this goal.

The final chapter in the functional characterization of GLS2 was a kinetic assay to assess the behavior shown by the enzyme against its substrate, Gln, and its main activator, Pi. The kinetic characterization was done for both truncated GLS2₅₆₋₆₀₂ proteins, isolated from bacteria and baculovirus systems. The curve of initial velocities vs Gln concentrations showed a completely different pattern: the GLS2 from eukaryotic cells presents a Michaelis-Menten kinetic, with a K_M value of 2 mM, whereas the protein from bacteria shows an allosteric behavior and a $[S]_{0,5}$ value of 6 mM. Both proteins showed a low-dependence for the activator Pi, which is characteristic of GLS2 isoenzymes: maximal activities were obtained at low Pi values (50 mM), while GLS isoenzymes need 150 mM Pi for maximal activations. Surprisingly, the affinity for the substrate Gln is high, at the level of GLS isoenzymes, and much better than the typical values usually shown by GLS2 isozymes. Certainly, removal of most amino acids of exon 1 clearly has a profound effect in the binding affinity of the substrate Gln.

The structural information of the GLS2 protein expressed in eukaryote was completed with an evaluation of potential posttranslational modifications, which might be relevant for the subcellular targeting or functional properties of this GA protein. GLS2 isoform is a protein that shuttles in and out of the nucleus without having a classical nuclear export signal or nuclear localization signal required for transportation via exportin/importin pathways (Olalla *et al.*, 2002). Therefore, we looked for specific posttranslational modifications on the GLS2 protein as a putative selection mechanism for nuclear import and/or function. Hypusination of human recombinant GAB was identified by mass spectrometry and validated by immunoblot analysis. In eukaryotic cells, this rare posttranslational modification has been only found in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), which plays a key role in cell proliferation and survival (Park, 2006). The hypusine residue is essential for interaction of eIF5A with specific nucleotide sequences of mRNAs during translation and also for its nucleocytoplasmic shuttling (Xu & Chen, 2001). The hypusine-modified lysine in the GAB primary structure (K-332) is located in an unfolded segment of the protein, a short turn of 9 residues connecting two alpha helices in a sequence highly enriched in polar amino acids (KKCFPKGVD), which strongly suggest that this hypusinated lysine is exposed to the external medium. Interestingly, the exposed hypusine of eIF5A becomes essential for interaction with exportin Xpo4 allowing its nucleocytoplasmic shuttling (Aksu *et al.*, 2016). Thus, the exposed hypusine residue might be a structural determinant needed for nuclear import of GLS2 through nuclear transport receptors or for specific interaction with nucleotides required in a putative transcriptional regulatory role, although further experiments will be needed to assess the functional relevance of this PTM in the GLS2 protein expressed in human cancer cells, as well as the role of the hypusination enzyme machinery in cancer growth and proliferation.

4.2. PROTEOMIC ANALYSIS

Sound experimental evidence has been recently published supporting a non-enzymatic role of GLS2 isoenzymes in cancer (López de la Oliva *et al.*, 2020). This fact, along with the nuclear localization of GLS2 in the cell nuclei of mammalian brain (Olalla *et al.*, 2002; Cardona *et al.*, 2015), prompted us to determine whether or not GLS2 can be translocated to the cell nuclei in human cancer cell lines. By using a combined approach

Summary

of immunocytochemistry and fluorescence microscopy of EGFP-tagged GLS2, we were able to demonstrate nuclear localization of GLS2 (López de la Oliva *et al.*, 2020). However, the nuclear concentration of GLS2 in HCC HepG2, GBM T98G and neuroblastoma SH-SY5Y cancer cells, under basal conditions, is very low compared with the mitochondrial pool of this isoform. Therefore, we next tried to search for conditions which may enhance the nuclear accumulation of GLS2 and to ascertain whether or not this increased nuclear translocation is associated with the reversion of the malignant phenotype and inhibition of cell proliferation. Induction of differentiation of HepG2 and SH-SY5Y cells with PMA increases the nuclear translocation of GLS2 in both cell types at early incubation times. Moreover, upregulation of GLS2 was also evident in mitochondria; hence, the tumor suppressive effects elicited by GLS2 overexpression might involve mitochondrial and nuclear contributions.

Our current work further suggests a causative link between GLS2 expression and tumor suppression. Of interest, our results indicate that induction of GLS2 expression in GBM cells also affects the regulation of tumor suppressor genes and oncogenes. Notably, active p53 was upregulated in T98G-GAB cell nuclei, whilst c-Myc, known to be negatively regulated by p53, was significantly downregulated in T98G-GAB whole cell extracts. Induction of p53 was also noted in the GBM cell line transfected with the vector alone, whereas p21 was barely detected in the GBM cell lines analyzed. A similar result was obtained in PMA-treated SH-SY5Y cells, where GLS2 overexpression was paralleled by marked increases of active p53 and the anti-proliferative cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in cell nuclei. Thus, increased nuclear translocation of GLS2 associates with inhibition of proliferation and reversion of the transformed phenotype. An increased nuclear accrual of GLS2 occurred in parallel with the inhibition of proliferation of human cancer cells. The antiproliferative response was induced either by differentiation agents (PMA in SH-SY5Y and HepG2 cells) or by overexpression of GLS2 (T98G-GAB cells). Interestingly, FACS analysis of cell populations consistently detected a stop of the cell cycle at the G2/M stage coincident with the increased nuclear translocation of GLS2. In addition, cell cycle arrest at G2/M was paralleled by upregulations of active p53 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21, whereas oncogene c-Myc was simultaneously downregulated. It is well known that p21 induction occurs in cells that undergo p53-dependent cell cycle arrest or apoptosis, because the p53-p21 axis is a central pathway for cell cycle control and tumor suppression. Thus, it is tempting to speculate that nuclear GLS2 participates in the growth-arrest program preventing unlimited cell proliferation, which may explain why certain tumors (e.g. gliomas, hepatomas and lung cancers) showed the opposite behavior: silencing of GLS2 and upregulation of GLS isoforms to keep active their proliferative program.

In order to obtain a global view of changes induced in tumor cells' proteome after expression of the GLS2 protein, we decided to perform a quantitative proteomic study to get protein profiles in the GBM cell line LN229, stably-transfected with the whole open-reading frame of GLS2 (LN229-GLS2). The wild-type cell line transfected with the empty vector (LN229-pcDNA3) was always used as a control. The GBM LN229 cells are highly tumorigenic and have a mutated TP53 (Ishii *et al.*, 1999).

The differentially expressed proteins (3082) were divided in two groups: downregulated hits (300 proteins, abundance ratio LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 ≤ 0.6 , $p \leq 0,05$) and upregulated hits (186 proteins, abundance ratio LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 $\geq 1,5$, $p \geq 0,05$). Then, a bioinformatic pipeline was implemented for data mining of the omics results, including STRING for the determination of the protein-protein

interaction networks. We selected three categories of gene ontology (GO): molecular functions, biological processes and cellular components. A total of 84 functional groups were obtained for the interaction networks of downregulated hits, including: mitosis and cell cycle, chromosome organization, organelle location, sarcolemma, mitotic huse, cadherine unions, actin filaments, cytoskeletal protein complexes, cell-cell unions and regulation of proteolysis. However, after performing a functional enrichment analysis in terms of gene ontology, we mostly obtain functional terms associated to the cell cycle and cellular adhesions. On the other hand, the most significant ontological terms for the upregulated hits were: catabolism of carbohydrates, proteasome complex, ficolin-1 enriched granules, signaling pathway of the type C lectin receptor, focal adhesion, hemostasis, regulation of protein polymerization, lysosome regulation and microtubule polymerization. A functional enrichment analysis in terms of gene ontology was done with ClueGO; then, the main functional terms were reduced to the proteasome complex, ficolin-1 enriched granules and regulation of protein polymerization.

At the light of these results, we discussed the main hits with altered expression and their corresponding protein networks and functional categories involved, in order to ascertain the molecular mechanisms underlying the reversion of the transformed phenotype induced in GBM LN229 cells after GLS2 expression. GLS2 seems to act as a tumor suppressor eliciting an anti-proliferative response, in agreement with the key proteins found repressed in our proteomic study, which are widely known to be involved in cancer growth, proliferation, metastasis and invasiveness. However, GLS2 was not able to fully reduce or reverse the levels of many overexpressed proteins found in the dataset of upregulated hits, with the exception of the glycolytic pathway.

5. CONCLUSIONS

- 1) Functional human GLS2 protein (truncated GAB isoenzyme) produced in eukaryotic expression systems is more stable than its counterpart produced in prokaryotic systems. This fact suggests that some posttranslational modifications might be essential for the maintenance of its native structure and/or full functionality.
- 2) The GLS2 protein expressed in baculovirus systems is posttranslationally modified by acetylhyposine at the lysine residue 332. The significance of this modification is currently unknown: further work will be needed to ascertain its involvement in the protein's nuclear translocation and functional properties.
- 3) An experimental setup in baculovirus systems has been developed for the expression and purification of the whole and truncated GLS2 proteins. The truncated form, starting at residue 56, is fully functional, oligomerizes forming a tetramer, shows a great specific activity with Michaelis-Menten kinetics and recognizes with great affinity the PDZ protein GIP. On the other hand, its protein counterpart purified from bacteria shows enzymatic activity but with an allosteric behavior.
- 4) A crystallization medium was optimized after checking almost four thousand formulation conditions at two different temperatures. Protein microcrystals of GLS2 were finally obtained in a buffer 0.1M Tris-HCl, pH 8.0 with 1.6 M lithium sulfate. In this

Summary

medium, we expect to get bigger crystals suitable for X-ray diffraction in the short term, once that this goal was shown to be out of the time frame of this PhD Thesis.

5) Immunocytochemistry and subcellular fractionation studies of GLS2 in human cancer cells gave consistent results demonstrating nuclear and mitochondrial locations, with the latter being predominant. GLS2 expression and nuclear accrual notably increased by treatment of SH-SY5Y cells with PMA and it correlated with cell cycle arrest at G2/M, upregulation of tumor suppressor p53 and p21 protein. A similar response was obtained by overexpression of GLS2 in T98G glioma cells, including downregulation of oncogene c-Myc. Our studies provide strong evidence for a tumor suppressor role of GLS2 in certain types of cancer.

6) Employing a proteomics platform with an Orbitrap analyzer, we performed a quantitative proteomic analysis of human glioma cells overexpressing the GLS2 protein. The main hits and interacting networks obtained were ascribed to proteins involved in cell cycle, cellular adhesion, migration, protein degradation and glycolysis. GLS2 seems to be mostly engaged in cell cycle arrest, due to the large percentage of downregulated proteins involved in key aspects of the cell cycle. In contrast, most of the overexpressed proteins confirmed the maintenance of some pathways related to GBM and its malignancy. Combination of these data with metabolomics studies will be essential to elucidate the anti-proliferative response elicited by GLS2 expression in human glioma cells.

1. Introducción	1
1.1. Los sellos distintivos del cáncer	3
1.2. Reprogramación metabólica del cáncer	5
1.3. Metabolismo de Gln	11
1.4. Isoenzimas de Glutaminasa	15
1.5. El papel de glutaminasa en cáncer	18
1.6. Inhibidores de glutaminasa	23
1.7. Estructuras cristalinas de glutaminasas	25
1.7.1. Estructuras cristalinas de GLS	25
1.7.2. Estructuras cristalinas de GLS2	30
2. Objetivos	35
3. Materiales y Métodos	39
3.1. Cuantificación de proteínas	41
3.2. Electroforesis desnaturizante de proteínas	41
3.3. Inmunotransferencia western	42
3.4. Medida de actividad GA	43
3.4.1. Método a punto final	43
3.4.2. Método a tiempo real	44
3.5. Cultivo y almacenamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i>	45
3.6. Transformación de cepas de <i>E. coli</i>	45
3.6.1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas	45
3.6.2. Preparación de células competentes	46
3.6.3. Transformación de células competentes	46
3.7. Aislamiento y manipulación de DNA	46
3.7.1. Aislamiento de DNA plasmídico	46
3.7.2. Digestión de DNA plasmídico con endonucleasas de restricción	47
3.7.3. Electroforesis de DNA	47
3.7.4. Purificación de fragmentos de DNA	48
3.7.5. Subclonación de fragmentos de DNA	48
3.8. Expresión heteróloga de GLS2 en <i>E. coli</i>	48
3.8.1. Síntesis de los plásmidos de expresión	48
3.8.2. Inducción de la expresión de GLS2 recombinante	51

Índice

3.8.3. Purificación de GLS2 recombinante mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC)	51
3.9. Expresión heteróloga de GLS2 en células de insecto	52
3.9.1. Cultivo de células de insecto Sf21	53
3.9.2. Síntesis de los plásmidos de transferencia	53
3.9.3. Preparación de los bácmidos de GLS2	54
3.9.4. Obtención de la primera generación del virus (V_0)	56
3.9.5. Comprobación de la expresión de la proteína GLS2 recombinante	57
3.9.6. Obtención de la segunda generación del virus (V_1)	57
3.9.7. Optimización de la expresión de GLS2 en células de insecto	57
3.10. Purificación de GLS2 recombinante expresada en células de insecto	58
3.10.1. Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC)	58
3.10.2. Cromatografía de exclusión molecular (SEC) o filtración en gel	59
3.11. Ensayo de desplazamiento térmico o Termofluor (Thermal Shift Assay/Thermofluor)	60
3.12. Placas de cristalización	61
3.13. Expresión y purificación de GIP (Glutaminase-Interacting Protein)	64
3.14. Purificación de GLS2, producida en células de insecto Sf9, mediante cromatografía de afinidad en columna de GIP	64
3.15. Interferometría de biocapa (BLI)	65
3.16. Cultivo de líneas celulares de cáncer humano	68
3.17. Fraccionamiento subcelular	68
3.18. Análisis proteómico de líneas de glioblastoma que sobreexpresan GLS2	68
3.18.1. Extracción y purificación de las proteínas celulares	68
3.18.2. Digestión proteica en gel y extracción de los péptidos	69
3.18.3. Análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS)	70
3.18.4. Análisis de datos para la identificación de proteínas	71
3.18.5. Cuantificación relativa sin marcaje (label-free quantification, LFQ) para análisis de expresión diferencial	71
3.18.6. Análisis funcional de datos	72

3.18.7. Análisis de redes y rutas metabólicas	72
4. Resultados	75
I. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GLS2	77
4.1. Expresión heteróloga de GLS2 en <i>E. coli</i>	77
4.1.1. Diseño de las construcciones, expresión y purificación	77
4.1.2. Estabilidad de la proteína GLS2 ₅₆₋₆₀₂ expresada en bacterias: ensayo Termofluór	84
4.2. Producción heteróloga de GLS2 ₅₆₋₆₀₂ en células de insecto infectadas con baculovirus	87
4.2.1. Generación de virus recombinantes	87
4.2.2. Purificación de las proteínas GLS2 producidas en células de insecto	91
4.3. Caracterización estructural GLS2 ₅₆₋₆₀₂ expresada de insecto	95
4.3.1. Estimación de la masa molecular de la proteína GLS2 ₅₆₋₆₀₂	95
4.3.2. Estabilidad de la proteína GLS2 ₅₆₋₆₀₂ : ensayo termofluór	98
4.3.3. Cristalización de la proteína GLS2. Rastreo (Screening) de las condiciones de cristalización	102
4.3.4. Caracterización cinética de GLS2 ₅₆₋₆₀₂ expresada en bacterias y en células de insecto	107
4.3.5. Caracterización de la interacción GLS2-GIP por interferometría de bicapa (BLI)	110
4.3.6. Caracterización de modificaciones postraduccionales en GLS2	113
II. ANÁLISIS PROTEÓMICO	117
4.4. Localización subcelular de GLS2 en células tumorales	117
4.5. Análisis proteómico cuantitativo de células de glioblastoma LN229-GLS2	122
4.5.1. Expresión ectópica de GLS2 en la línea LN229 de GBM humano	122
4.5.2. Perfil proteómico de LN229-GLS2	123
4.5.3. Análisis de enriquecimiento funcional	126
4.5.3.1. Resultados de ontología génica (GO)	127
4.5.3.2. Resultados del análisis de las rutas implicadas en las bases de datos KEGG y REACTOME	134

Índice

5. Discusión	141
I. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GLS2	143
II. ANÁLISIS PROTEÓMICO	155
6. Conclusions	165
7. Bibliografía	169
ANEXOS	199
Anexo I	201
Anexo II	208
Anexo III	232

1. Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.1. Los sellos distintivos del cáncer

Con el propósito de avanzar en la comprensión lógica de la transformación tumoral, Hanahan y Weinberg (2000) propusieron que, durante este proceso, las células inicialmente normales van adquiriendo progresivamente una serie de capacidades funcionales, que dictarán el fenotipo maligno. Estas capacidades serían compartidas por quizás todos los tipos de tumores humanos y, en su conjunto, constituyen un principio organizador que ayuda a comprender la notable diversidad de las enfermedades neoplásicas. En esencia, dichas capacidades serían las siguientes:

- autonomía en las señales de crecimiento: las células tumorales son capaces de autoestimularse continuamente, sin necesidad de factores de crecimiento procedentes de otras células, mediante la sobreexpresión de receptores de membrana, a veces con actividad constitutiva, como la variante truncada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII) (Thomas & Weihua, 2019), o por la activación constitutiva de componentes de las rutas de señalización citoplasmáticas, que provoca, por ejemplo, un exceso de señal a través de la ruta PI3K-AKT (*Phosphatidylinositol-3-kinase-Protein kinase B*) (Yuan & Cantley, 2008).
- insensibilidad a las señales antiproliferativas: para poder dividirse, la incipiente célula tumoral debe interrumpir la vía de la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (RB), a través de la cual se canalizan las señales antiproliferativas. En un exhaustivo análisis del genoma y transcriptoma de glioblastomas primarios, se encontró que aproximadamente el 80 % de los tumores presentaba alteraciones de la vía de RB, entre las que se encontraban la delección homocigota o mutación del gen de RB, y la amplificación de los genes de ciclinas y CDK (quinasas dependientes de ciclinas), que actúan inhibiendo RB (*The Cancer Genome Atlas Research Network*, 2008).
- evasión de la apoptosis: una de las estrategias más frecuentes de las células tumorales para evadir la muerte celular es la pérdida de función del supresor tumoral TP53, que actúa como factor de transcripción de un gran número de genes implicados en reparación del DNA, parada del ciclo celular y apoptosis. (Hernández-Borrero & El-Deiry, 2021). Así mismo, la pérdida en numerosos

Introducción

tumores del supresor tumoral PTEN, una fosfatasa de fosfolípidos de inositol que revierte la reacción de la PI3K, puede mitigar la apoptosis al activarse la ruta PI3K-AKT, que promueve la supervivencia celular (Papa & Pandolfi, 2019).

- *inmortalidad replicativa*: las células premalignas que pierdan las funciones TP53 y RB y consigan expresar niveles significativos de telomerasa, que es la enzima responsable del mantenimiento de la longitud de los telómeros, adquirirán un potencial replicativo ilimitado, es decir, serán inmortales (Shay & Wright, 2005).
- *inducción de la angiogénesis*: en este proceso, del que depende la progresión del tumor, juega un papel clave la hipoxia. En la fase pre-vascular, las células tumorales sometidas a condiciones de hipoxia van a comenzar a secretar el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), encargado de encender el “interruptor” angiogénico: al activar el receptor 2 del VEGF (VEGFR2), expresado en las células endoteliales de los vasos sanguíneos vecinos, se iniciará la angiogénesis tumoral (Baeriswyl & Christofori, 2009; De Palma *et al.*, 2017).
- *invasión y metástasis*: tarde o temprano, la célula tumoral abandona la masa primaria del tumor y coloniza órganos distantes en el organismo. En este proceso, conocido como cascada metastásica, tienen gran importancia la pérdida de la adhesión célula-célula y los cambios en la interacción con la matriz extracelular, que posibilitan a la célula maligna disociarse de la masa del tumor y adquirir un fenotipo móvil (Chaffer & Weinberg, 2011). Una molécula clave en dicha adhesión es la E-cadherina, que en numerosos carcinomas se pierde parcial o completamente, una evidencia de su papel supresor de la invasión y metástasis (van Roy & Berx, 2008).

Una década después, estos mismos autores añadieron dos nuevos rasgos distintivos de las células malignas: la reprogramación del metabolismo energético celular y la evasión del sistema inmune. Adicionalmente, dos importantes características capacitadoras facilitan la adquisición de estos rasgos: la mutación e inestabilidad genómica y la inflamación promovida por el tumor (Fig. 1.1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

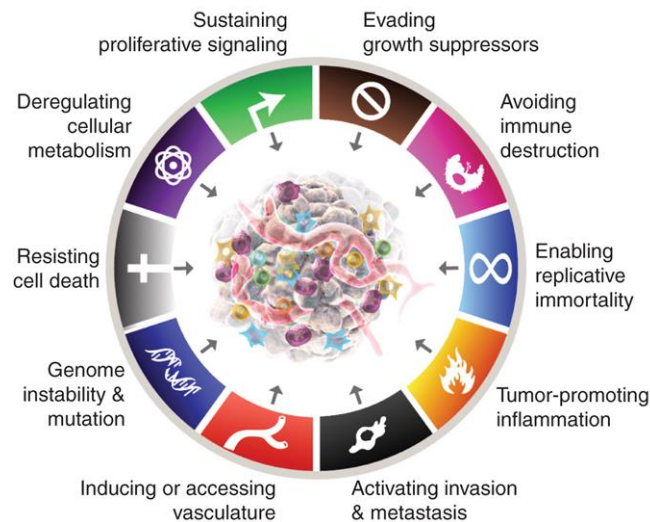


Figura 1.1. Las ocho capacidades adquiridas (*hallmarks*) del cáncer (autonomía en las señales de crecimiento; insensibilidad a las señales antiproliferativas; evasión de la apoptosis; inmortalidad replicativa; inducción de la angiogénesis; invasión y metástasis; evasión de la destrucción por el sistema inmune; reprogramación del metabolismo energético), junto con dos características capacitadoras (mutación e inestabilidad del genoma; inflamación promovida por el tumor), según Hanahan y Weinberg (imagen para usos educativos a disposición de los lectores, tomada de Hanahan, 2022).

1.2. Reprogramación metabólica del cáncer

El metabolismo tumoral es una de las áreas más antiguas de investigación en biología tumoral, anticipándose al descubrimiento de los oncogenes y genes supresores tumorales en aproximadamente 50 años. Los principios básicos de la regulación del metabolismo energético se descifraron a finales de los años 50 del siglo pasado, con los trabajos de Warburg, Lehninger, Krebs, Chance, Petersen, Weinhouse y Vaupel, entre otros (Scheffler, 1999; Weinhouse, 1956). Desde los últimos 15 años, hemos asistido a un renacimiento de los estudios del metabolismo del cáncer, después de haber sido ignorados durante muchos años en favor de estudios ómicos, más en boga, de genómica funcional y proteómica. Actualmente, el metabolismo del cáncer está recuperando el centro de atención y representa uno de los tópicos de mayor interés en biología tumoral y en la investigación clínica. Paradójicamente, este renovado interés ha estado provocado, fundamentalmente, por los importantes resultados derivados de los estudios de cancerómica, que están permitiendo identificar nuevas dianas y mecanismos moleculares

Introducción

que subyacen a la proliferación celular de los tumores. De este modo, la cancerómica está ayudando a poner de nuevo el foco en los estudios metabólicos, que están recuperando su estatus preeminente en la investigación del cáncer (Márquez *et al.*, 2015).

Esta área de investigación se basa en el principio de que las actividades metabólicas están alteradas en las células tumorales en relación con las células normales, y que estas alteraciones favorecen la adquisición y mantenimiento de las propiedades malignas. Debido a que algunas de las características metabólicas alteradas se encuentran de forma recurrente en muchos tipos de cáncer, la reprogramación del metabolismo se consideró un sello distintivo del cáncer en la segunda reformulación de este concepto por Hanahan y Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011).

Las células normales de los tejidos, generalmente en estado quiescente, captan nutrientes que emplean mayoritariamente para obtener energía, mediante un proceso que implica la oxidación progresiva de sus átomos de carbono. En condiciones aeróbicas, la glucosa es convertida en piruvato a través de la ruta glucolítica. Posteriormente, el piruvato es oxidado completamente en el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), generando poder reductor que utiliza la cadena de transporte de electrones mitocondrial para la producción de ATP, proceso este denominado fosforilación oxidativa (OXPHOS). Cada molécula de glucosa que se oxida completamente puede generar hasta 36 moléculas de ATP (Vander Heiden *et al.*, 2009).

En cambio, las células tumorales experimentan un fenómeno de reprogramación metabólica, dirigido por la activación de oncogenes, la pérdida de supresores tumorales y la desregulación de rutas de señalización tróficas como PI3K-AKT, que resultan en una mayor captación de nutrientes para abastecer las vías energéticas y biosintéticas, y en una inducción de rutas metabólicas que soportan la tumorogénesis (Boroughs & DeBerardinis, 2015). Es decir, estas células se desarrollan y progresan por adquisición de programas metabólicos diferentes a los que ejecutan sus homólogas normales. Este fenómeno, que contribuye a establecer y mantener el fenotipo tumoral, incluye las siguientes características: captación desregulada de glucosa y aminoácidos; uso de modos oportunistas de adquisición de nutrientes; empleo de intermediarios de la glucólisis/ciclo TCA para biosíntesis y para producción de NADPH; aumento de la demanda de nitrógeno; alteraciones en la regulación génica controladas por el metabolismo e

interacciones metabólicas con el microambiente tumoral (Pavlova & Thompson, 2016). El efecto neto de estos cambios en el metabolismo de las células tumorales es la producción de biomasa para permitir su crecimiento y proliferación.

El fisiólogo alemán Otto Warburg, en la década de 1920, fue el primero en describir la conexión entre el metabolismo alterado y la tumorigénesis: observó que las células tumorales proliferantes presentaban un elevado consumo de glucosa, en comparación con los tejidos normales; además, la glucosa era convertida preferentemente en lactato, incluso con un suministro adecuado de oxígeno (actualmente se sabe que este fenómeno no es exclusivo de las células tumorales, sino que se produce en todas las células de mamíferos con rápida proliferación). Warburg achacó este efecto, actualmente conocido como efecto Warburg o glucólisis aeróbica, a una disfunción mitocondrial en las células tumorales y sugirió que ésta era la causa primaria del cáncer (Warburg, 1956). Si bien es cierto que en algunos tumores la capacidad respiratoria mitocondrial está reducida, la mayoría presenta mitocondrias intactas completamente funcionales (Vaupel & Mayer, 2012). La pregunta es: ¿qué ventajas ofrece a las células tumorales el cambio a un metabolismo mucho menos eficiente para la generación de ATP que la OXPHOS? Una hipótesis ampliamente aceptada es que la glucólisis aeróbica permite la acumulación de intermediarios glucolíticos que se desvían hacia la síntesis de *novο* de nucleótidos, ácidos grasos y aminoácidos no esenciales, necesarios para mantener la proliferación de estas células (Fig. 1.2). Además, la glucosa no es sólo fuente de estos intermediarios, sino también de poder reductor en forma de NADPH, requerido para muchas de estas reacciones (Lunt & Vander Heiden, 2011). Al convertir el exceso de piruvato en lactato, se evita la acumulación de NADH en el citosol y se reduce la producción de ATP, que actúa como regulador negativo de la glucólisis. El resultado sería un flujo glucolítico continuo, que permite la generación de dichos intermediarios biosintéticos (Pavlova & Thompson, 2016).

La expresión de isoenzimas específicas de las células tumorales provoca cambios en los flujos metabólicos que permiten su reprogramación metabólica. Así, por ejemplo, la isoenzima M2 de la piruvato quinasa (PK), una variante obtenida por ajuste, ha sido identificada recientemente como una enzima clave para el efecto Warburg en cáncer (Mazurek, 2011) (Fig. 1.2). La isoenzima PKM2 puede existir en una forma tetramérica, muy activa, que es responsable de la producción de energía por vía glucolítica, así como

Introducción

en una forma dimérica, de baja actividad, que permite la canalización de los carbonos de la glucosa en procesos biosintéticos (i.e. ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos grasos) vía arriba del piruvato (Fig. 1.2). De este modo, la proliferación celular se regula mediante el control del metabolismo.

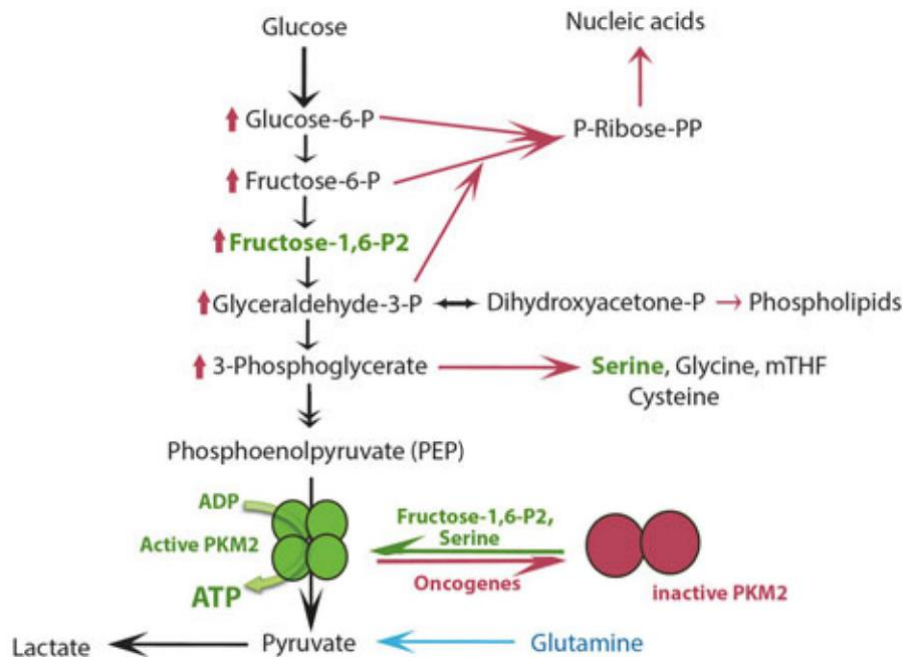


Figura 1.2. Regulación de la proliferación celular mediante el control del metabolismo: el ejemplo de la isoenzima PKM2. Mediante la regulación de la PK entre sus dos formas alternativas, tetramérica (muy activa) y dimérica (poco activa), el flujo glucolítico se puede ralentizar, evitando que más carbonos de la glucosa acaben en piruvato/lactato y aumentando los intermediarios glucolíticos ricos en energía que, a su vez, son cabeza de síntesis de importantes macromoléculas y precursores (imagen tomada de Gupta *et al.*, 2015).

Diversas rutas de señalización, activadas por oncogenes e implicadas en el crecimiento y proliferación celular, juegan un papel directo en el cambio del metabolismo tumoral hacia la glucólisis aeróbica. La activación de AKT/PKB favorece este cambio al aumentar la actividad de la enzima glucolítica hexoquinasa 2 (HK2) y el tráfico de los transportadores de glucosa (GLUT/SLC2) a la membrana plasmática e, indirectamente, mediante la activación y estabilización de varios factores de transcripción, como c-Myc y el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) (Hoxhaj & Manning, 2020). Estos, a su vez, activan la expresión de los transportadores GLUT, de las enzimas glucolíticas HK2 y fosfofructoquinasa (PFK), de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) -que inactiva

a la piruvato deshidrogenasa (PDH) mediante fosforilación- y de la lactato deshidrogenasa (LDHA) (Schiliro & Firestein, 2021). Además, en muchos tumores, la pérdida de función de la fosfatasa PTEN (antagonista de la actividad AKT) y de TP53 (que reprime la expresión de los transportadores GLUT y de HK2) contribuye a este cambio en el metabolismo (Liang *et al.*, 2013; Aquila *et al.*, 2020).

En relación con la mitocondria, la visión prevalente en los estudios recientes sobre metabolismo tumoral es que la mayoría de las células cancerosas son capaces de realizar la respiración celular (cadena respiratoria + OXPHOS), pero la velocidad de la OXPHOS está reducida por un aumento dramático de la glucólisis y producción de lactato. La observación de Warburg de que los tumores muestran una alta tasa de consumo de glucosa ha sido validada en muchos cánceres humanos empleando la tomografía de emisión de positrones (PET), que utiliza un análogo radiactivo de glucosa para monitorizar su entrada en los tumores y en el tejido adyacente sano (DeBerardinis y Chandel, 2016). No obstante, numerosos estudios han demostrado que la gran mayoría de células tumorales tienen la capacidad para producir energía a través de la oxidación de la glucosa; esto es, el proceso por el cual los carbonos derivados de la glucosa entran en el TCA y son oxidados a CO₂, produciendo ATP mediante OXPHOS. El metabolismo mitocondrial es necesario para la proliferación del cáncer y para la tumorigénesis (Weinberg *et al.*, 2010; Martínez-Reyes *et al.*, 2016) (Fig. 1.3). De este modo, a pesar de las altas tasas glucolíticas, la mayor parte de las células cancerosas generan la mayoría de su ATP a través de la función mitocondrial, con la única excepción de los tumores que poseen mutaciones en enzimas implicadas en la respiración mitocondrial (por ejemplo, succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarato hidratasa (FH)) (Zu & Guppy, 2004). No obstante, células que poseen mutaciones en SDH o FH aún dependen del metabolismo mitocondrial, gracias a un remodelado metabólico que les permite suministrar los intermediarios del TCA y las especies reactivas de oxígeno (ROS), ambos necesarios para la proliferación celular (Sullivan *et al.*, 2013; Lussey-Lepoutre *et al.*, 2015; Cardaci *et al.*, 2015; Mullen *et al.*, 2012).

Introducción

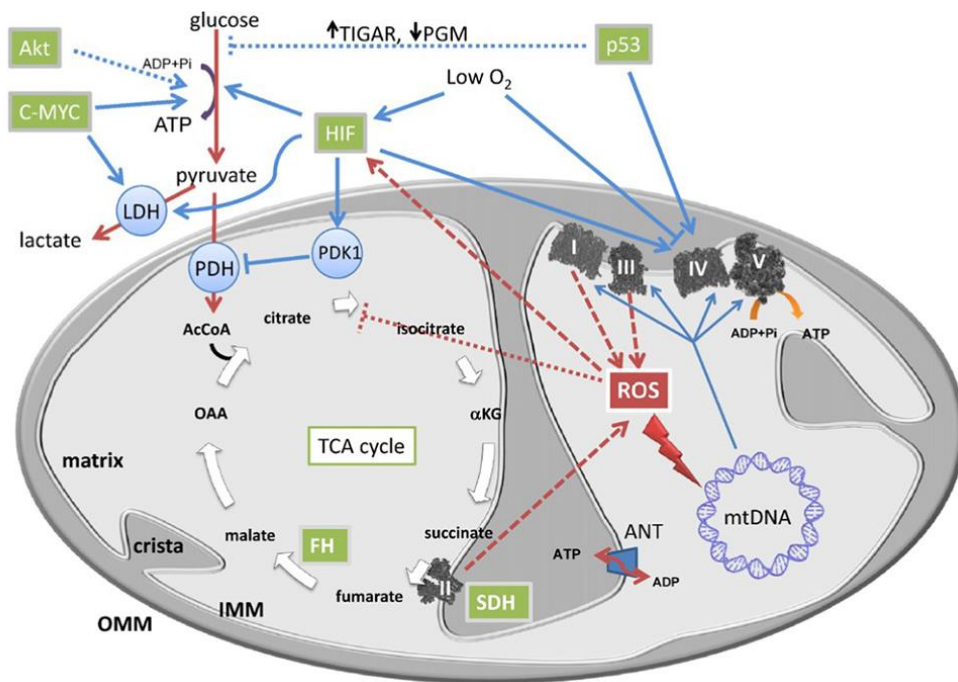


Figura 1.3. La mitocondria como diana para múltiples sucesos de reprogramación metabólica. Las principales perturbaciones metabólicas de las células tumorales son inducidas por la reprogramación genética y los cambios en el entorno. La activación de los oncogenes Akt y MYC y la pérdida del gen supresor tumoral TP53 están entre los sucesos más frecuentes en cáncer. Además, todos los tumores sólidos están expuestos al estrés oxidativo y la hipoxia y, de aquí, a la activación de HIF. Estos cambios frecuentes en las células tumorales disparan un dramático cambio metabólico desde la OXPHOS hasta la glucólisis. En ciertos tipos tumorales, lesiones genéticas directas del DNA mitocondrial (mtDNA) o bien de enzimas mitocondriales codificadas por el DNA nuclear (SDH o FH), pueden así mismo abolir OXPHOS en cáncer. Abreviaturas: IMM: membrana mitocondrial interna; OMM: membrana mitocondrial externa; mtDNA: DNA mitocondrial (imagen tomada de Frezza & Gottlieb, 2009).

El ciclo TCA también es una fuente esencial de intermediarios biosintéticos: el citrato, procedente de la condensación del oxalacetato (OAA) con acetil coenzima A (AcCoA), se utiliza para la síntesis de ácidos grasos y colesterol, mientras que el OAA y el α -cetoglutarato (α -KG) se desvían a la síntesis de aminoácidos no esenciales (Fig. 1.4). Por lo tanto, es crucial para la célula tumoral disponer de vías adicionales que repongan el OAA, un proceso denominado anaplerosis (Cheng *et al.*, 2011). Muchas células tumorales emplean un ciclo TCA donde la mayor parte del AcCoA procede de la glucosa, mientras que la glutamina (Gln) actúa como principal sustrato anaplerótico mediante un proceso denominado glutaminólisis (indicado con flechas marrones en Fig.

1.4). De hecho, se ha acuñado el término “adición a Gln” para reflejar la fuerte dependencia que muestran las células de muchos tipos de cáncer por este aminoácido, una consecuencia de la reprogramación metabólica dirigida por oncogenes (Wise *et al.*, 2008).

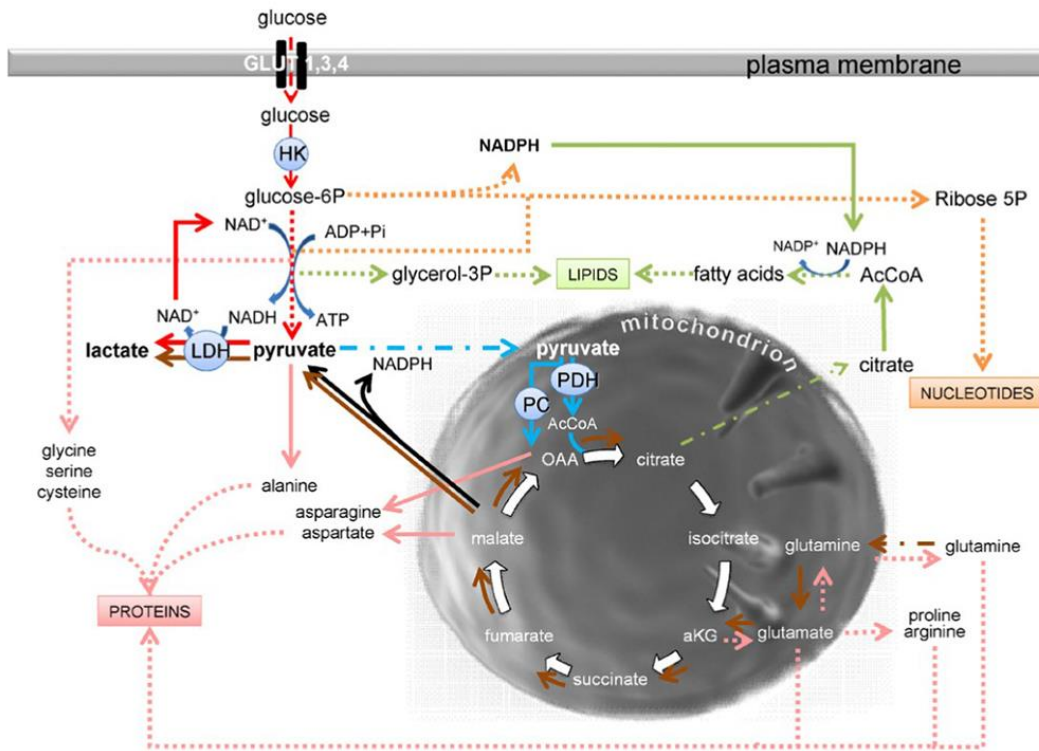


Figura 1.4. La mitocondria como una encrucijada para rutas catabólicas y anabólicas en células normales y tumorales. La glucosa y la Gln son importantes precursores de carbono que se metabolizan para la generación de energía y precursores anabólicos. Las rutas metabólicas implicadas están indicadas con un código de colores: glucólisis, rojo; ciclo TCA, blanco; síntesis de aminoácidos no-esenciales, rosa; ruta de las pentosas fosfato y síntesis de nucleótidos, naranja; síntesis de ácidos grasos y lípidos, verde; oxidación de piruvato en la mitocondria, azul; glutaminólisis, marrón; reacción de la enzima málica, negro. Las flechas continuas indican una reacción de un solo paso; las flechas con líneas discontinuas y puntos indican transporte a través de membranas, mientras que las flechas con puntos discontinuos indican reacciones con múltiples etapas (tomado de Frezza & Gottlieb, 2009).

1.3. Metabolismo de la Gln

Adolf Hans Krebs, en 1935, fue el primero que estudió el metabolismo de la Gln en animales, destacando la importancia de mantener la homeostasis de este aminoácido

Introducción

(Krebs, 1935). La Gln está considerada como un aminoácido condicionalmente esencial y es el más abundante en sangre y músculo, proporcionando una fuente estable de nitrógeno y carbono para la biosíntesis de lípidos, proteínas y nucleótidos (Márquez *et al.*, 2016). Por ejemplo, la Gln proporciona nitrógeno para la biosíntesis de asparagina y, además, actúa como factor de intercambio para la incorporación a la célula de aminoácidos menos abundantes. El transporte de Gln extracelular al interior de la célula está mediado por un total de 14 transportadores, clasificados en 4 familias. Algunos de ellos también regulan la salida desde el interior celular de Gln mediante un mecanismo de antiporte, en el que otros aminoácidos, como leucina, son importados al interior celular mediante el transportador SLC7A5 (Bhutia *et al.*, 2016). Por otro lado, en microambientes deficientes en nutrientes, la Gln es adquirida a partir de proteínas extracelulares mediante un proceso de macropinocitosis (mecanismo de endocitosis que se produce mediante la remodelación de una zona amplia de la membrana plasmática), seguida de degradación lisosomal.

Un número considerable de estudios llevados a cabo en la segunda mitad del siglo XX confirmaron que la Gln es un importante combustible respiratorio para la mayoría de los tumores (Kvamme & Svenneby 1960; Kovacevic & Morris 1972). De acuerdo con estos estudios, al comparar el metabolismo de la Gln de las células tumorales con el de las células no transformadas del mismo origen, se demostró que la tasa de consumo de este aminoácido era considerablemente más rápida por parte de los tumores: por ejemplo, en hepatocitos humanos frente a células de hepatoma (Souba 1993), y en fibroblastos de riñón de rata frente a células de fibrosarcoma de rata (Fischer *et al.*, 1998).

La enzima glutaminasa (GA, EC 3.5.1.2) convierte la Gln en Glu, que a su vez es transformado en α -KG a través de dos conjuntos de enzimas, la glutamato deshidrogenasa (GLUD) y las aminotransferasas. El α -KG entra en el ciclo TCA y puede servir para proporcionar energía a la célula. La Gln también sirve como una fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos a través de la carboxilación reductora del α -KG, que se convierte en citrato mediante la isocitrato deshidrogenasa (IDH), en sentido contrario del ciclo. Este citrato da lugar a AcCoA, precursor para la síntesis de lípidos (Yoo *et al.*, 2008). El metabolismo de la Gln también es esencial para el control de la homeostasis redox. No solo genera glutamato (Glu) para la síntesis de glutatión reducido (GSH), sino también poder reductor, a través de la reacción de la enzima málica, que convierte el malato procedente del α -KG en piruvato y NADPH (Son *et al.*, 2013) (Fig. 1.5).

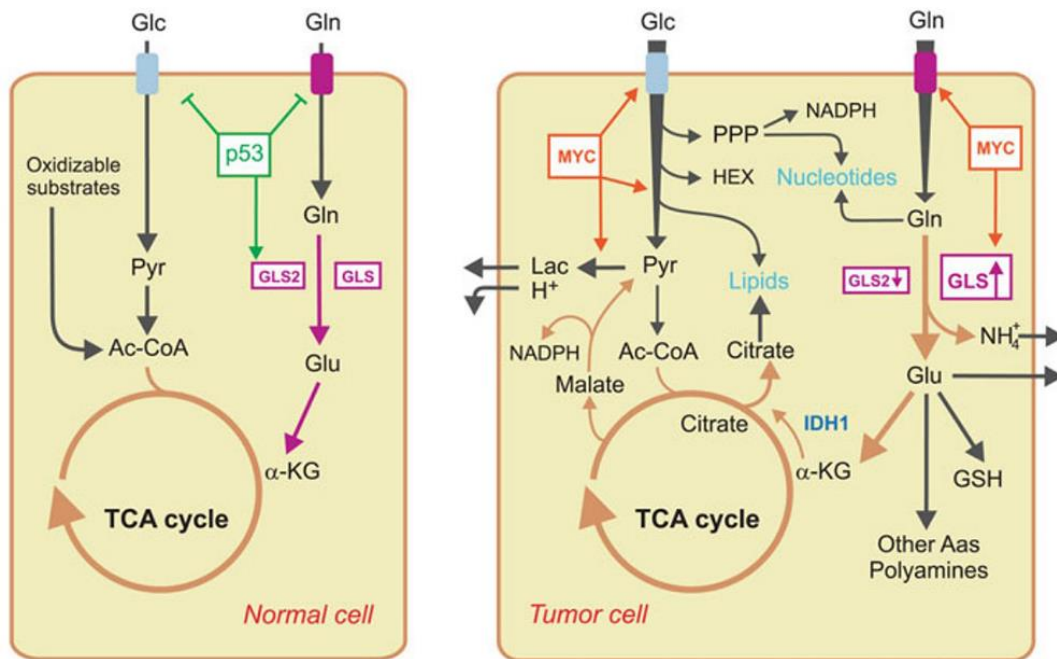


Figura 1.5. Principales cambios en las rutas metabólicas relacionadas con la Gln tras la transformación maligna. En células normales, no proliferantes (panel izquierdo), el metabolismo de la glucosa y de la Gln están balanceados, existe un gen supresor tumoral p53 funcional, permitiendo así un ciclo TCA completo acoplado a la producción de piruvato desde la glucólisis. La expresión de las isoenzimas GA (GLS y GLS2) se mantiene en valores normales homeostáticos en el tejido en cuestión, mientras que el Glu mitocondrial se emplea para generación de energía mediante la incorporación del α -KG al ciclo TCA. La reprogramación metabólica de las células cancerosas con el oncogén Myc desregulado (panel derecho) incluye aumentos en la captura celular de glucosa y Gln, así como sobreexpresión de GLS y represión de GLS2. La glucosa se metaboliza a piruvato en la glucólisis, rindiendo 2 moléculas de ATP. El piruvato puede ser oxidado en el ciclo TCA o convertido en lactato cuando los niveles de O_2 son bajos o durante la glucólisis aerobia. La oxidación parcial de la Gln a piruvato y lactato (glutaminólisis) sirve como una ruta alternativa para la generación de ATP y para reponer los intermediarios del TCA. El exceso de Glu y amonio generado por el aumentado catabolismo de la Gln a través de la GA se transporta fuera de la célula (con relevancia en el importe de otros nutrientes, como aminoácidos esenciales). El Glu también se emplea para la síntesis de GSH, poliaminas y aminoácidos. La Gln también puede convertirse en la fuente principal para la síntesis de lípidos al ser convertida en citrato por la carboxilación reductora del α -KG por isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1). La reacción de la enzima málica, una de las etapas de la glutaminólisis, produce NADPH que también se necesita para la síntesis de lípidos. Además, los nitrógenos amido y amino de la Gln se emplean para la síntesis de nucleótidos, junto con el fosforribosil pirofosfato (PPP) a partir de la glucosa, a través de las reacciones de la ruta de las pentosas fosfato.

Introducción

Finalmente, la glucosa y la Gln también alimentan la ruta biosintética de las hexosaminas (HEX/HBP), regulando así el estado nutricional celular (tomado de Márquez *et al.*, 2015).

Recientemente se ha demostrado que, independientemente de su uso metabólico, Gln promueve la proliferación celular. En este sentido, STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) es un factor de transcripción que se activa por Gln extracelular, además de activar otros factores de transcripción como HIF-1, mTOR y c-Myc. STAT3 media en los efectos de Gln relacionados con la proliferación en células tumorales. Gln podría activar los receptores de la superficie celular que controlan la fosforilación de STAT3, promoviendo la proliferación celular y consecuentemente, manteniendo una alta actividad metabólica Gln (Cacace *et al.*, 2017).

mTORC1 regula el metabolismo de la Gln por represión de la expresión del regulador transcripcional SIRT4, un inhibidor de GLUD (Csibi *et al.*, 2013). Por otro lado, la glutaminólisis y los niveles celulares de α -KG activan mTORC1, promoviendo el crecimiento celular e inhibiendo la autofagia (Durán *et al.*, 2012).”

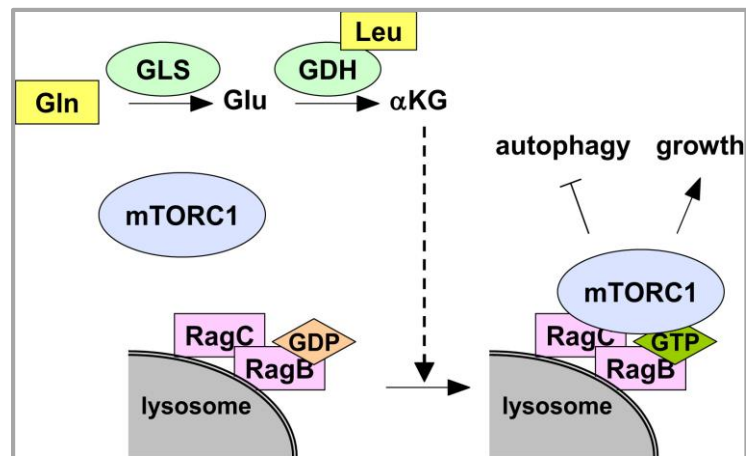


Fig. 1.6. Modelo propuesto para la regulación de mTORC1. Al activar la glutaminólisis mediante el aumento de Gln y leucina (Leu), se produce un aumento de la actividad de mTORC1. Figura tomada de Durán *et al.*, 2012.

1.4. Isoenzimas de Glutaminasa

La enzima glutaminasa (GA) cataliza el primer paso de la glutaminólisis, transformando Gln en Glu y amonio. En la especie humana, la GA aparece en forma de cuatro isoenzimas codificadas por dos genes diferentes: el gen *GLS*, localizado en el cromosoma 2 y que codifica dos isoformas, KGA y GAC (Márquez *et al.*, 2009) y el gen *GLS2*, localizado en el cromosoma 12 (Aledo *et al.*, 2000) y que codifica otras dos isoformas, LGA y GAB (Matés *et al.*, 2013). El gen *GLS* humano está compuesto por 19 exones (Fig. 1.7). Existen dos transcritos diferentes de este gen: KGA, que contiene los exones 1-14 y 16-19 (Nagase *et al.*, 1998; Holcomb *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 2002) y fue aislado originalmente de riñón y el transcrito GAC, que contiene los primeros 15 exones y fue clonado por primera vez de células de cáncer de colon (Elgadi *et al.*, 1999).

El gen *GLS2* (Fig. 1.7) está compuesto por 18 exones (Pérez-Gómez *et al.*, 2003), siendo el transcrito GAB la forma canónica, constituido por los exones del 1 al 18. Mediante clonación molecular se obtuvo por primera vez el cDNA completo de *GLS2*, a partir de una línea celular de cáncer de mama (Gómez-Fabre *et al.*, 2000). El transcrito LGA carece del exón 1 (Martín-Rufián *et al.*, 2012), siendo la variante más corta. La generación de este transcrito se debe a la existencia de un sitio de inicio de la transcripción, alternativo al de GAB, al final del intrón 1 del gen *GLS2*. La proteína LGA se caracterizó por primera vez en hígado de rata (Smith & Watford, 1990; Chung-Bok *et al.*, 1997).

Introducción

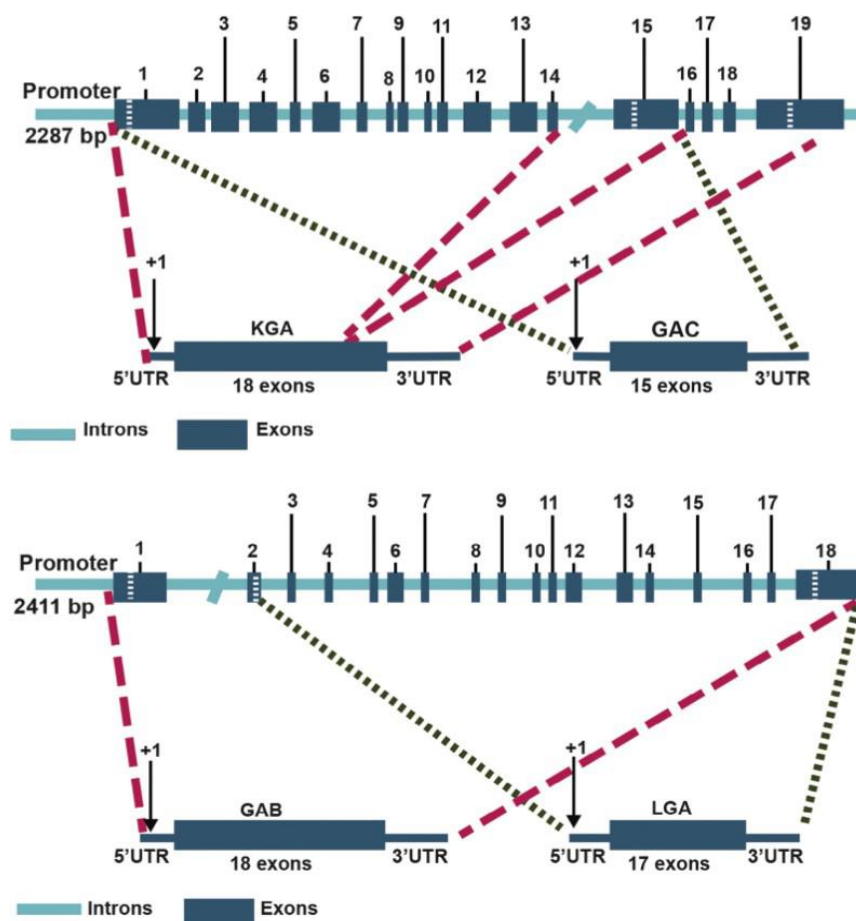


Figura 1.7. Estructura genómica de los genes *GLS* y *GLS2* humanos. Se señala con una línea de puntos roja y negra los exones involucrados en la generación de los distintos transcritos GA (tomado de Campos-Sandoval *et al.*, 2015).

A pesar de estar localizados en cromosomas diferentes, los genes *GLS* y *GLS2* comparten gran parte de su secuencia. Las principales diferencias se encuentran en los exones 1 y 18, además del exón adicional exclusivo del gen *GLS*. La secuencia codificada por el exón 1 contiene la señal de importe a la mitocondria, mientras que en el exón 18, que codifica la región C-terminal, es donde se encuentra la secuencia de reconocimiento del dominio PDZ, exclusiva de las isoenzimas *GLS2* (Olalla *et al.*, 2001) (Fig. 1.8).

El transcrito KGA codifica una proteína de 669 residuos, con una masa molecular teórica de 73.5 kDa. El transcrito GAC codifica una proteína de 598 residuos, con una masa teórica de 65.5 kDa. Ambas proteínas son idénticas excepto en la región C-terminal, donde KGA abarca los residuos 551-669 y GAC los residuos 551-598 (Anexo III). El

mRNA de GAB codifica una proteína de 602 residuos, con una masa molecular teórica de 66.3 kDa, mientras que el de LGA codifica una proteína más corta, de 565 aminoácidos, y con una masa molecular teórica de 62.5 kDa. La isoforma LGA carece de los residuos que codifica el exón 1 de GLS2, que se corresponden con los primeros 61 residuos de la isoforma GAB. En cambio, posee 24 residuos adicionales en la región N-terminal que se corresponde con un primer exón alternativo (Martín-Rufián *et al.*, 2012). Además del dominio GA, presente en todas las isoenzimas, las variantes KGA, LGA y GAB comparten un dominio N-terminal plegado en un conjunto de 4 hélices similares a una mano EF y un dominio C-terminal con 3 repeticiones de ankirina. Estas regiones están compuestas por 33 residuos y son secuencias de interacción proteína-proteína muy conservadas en proteínas importantes (reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, etc.) y entre especies (Pasquali *et al.*, 2017). En la parte N-terminal se encuentra la presecuencia putativa de importe a la mitocondria de las GA de mamíferos (Gómez-Fabre *et al.*, 2000), si bien la isoenzima LGA no muestra una clara secuencia consenso de importe mitocondrial (Smith & Watford, 1990). Sólo GLS2 contiene la secuencia consenso de interacción con el dominio PDZ (Olalla *et al.*, 2001), que está compuesta por los últimos 4 residuos en la región C-terminal, ESMV (Fig. 1.8). En la región C-terminal de KGA, después de las repeticiones de ankirina, existe un motivo denominado KEN (Lys-Glu-Asn) reconocido por la E3 ubiquitin ligasa, que interviene en el marcaje por ubiquitinación de las proteínas diana para su posterior degradación en el proteasoma (Colombo *et al.*, 2010).

Introducción

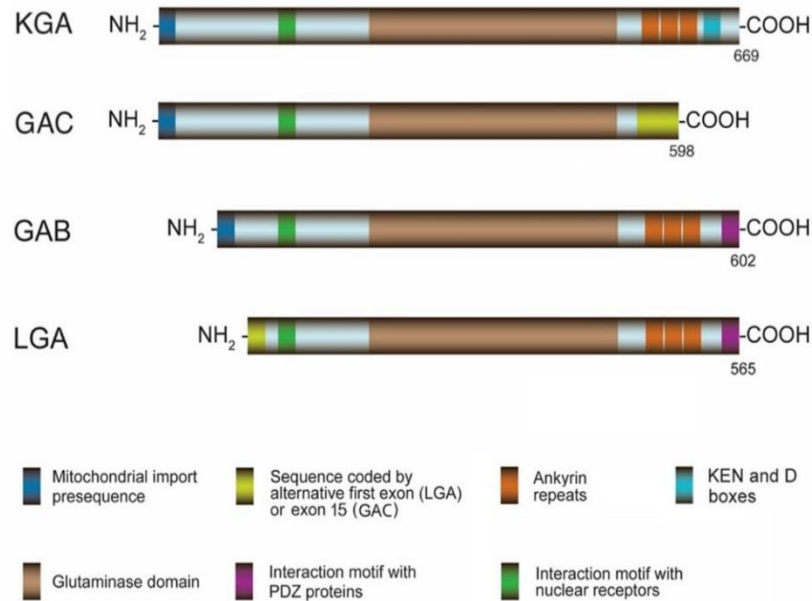


Figura 1.8. Isoformas proteicas de GA humana codificadas por los genes *GLS* y *GLS2*. Se destacan los principales dominios y motivos identificados por análisis de secuencia: señal de importe a mitocondria (no se encuentra en la isoforma LGA), motivo de interacción con receptores nucleares, dominio GA, repeticiones de ankirina (no se encuentra en la isoforma GAC), motivo de interacción con proteínas con dominio PDZ (exclusivo de *GLS2*) y motivos KEN y D (exclusivos de KGA). Imagen tomada de Márquez *et al.*, 2016.

1.5. El papel de glutaminasa en cáncer

La desregulación de la expresión de las isoformas GA es una característica de la transformación neoplásica de muchos tipos de tumores. Recientes evidencias experimentales apuntan a que las isoenzimas GLS y GLS2 podrían desempeñar un papel opuesto en cáncer. Nuestro grupo de investigación fue el primero en apuntar estas diferencias, señalando que GLS se relacionaba con tumorigénesis y malignidad, mientras que la expresión de GLS2 estaba asociada con estados celulares quiescentes o diferenciados (Pérez-Gómez *et al.*, 2005). De este modo, una alta expresión de GLS está asociada con un mal pronóstico en muchos tipos de cáncer, como hepatocarcinoma celular (HCC), cáncer de ovario, osteosarcoma, cáncer de colon y mama, por lo que GLS podría ser diana terapéutica para estos tipos de cáncer (Saha *et al.*, 2019). Un descubrimiento clave de nuestro grupo fue la reversión del fenotipo maligno y la pérdida de la capacidad tumorigénica de las células de tumor ascítico de Ehrlich después de regular a la baja el

mensajero de GLS con tecnología antisentido (Lobo *et al.*, 2000). Estudios posteriores en los que la expresión de GLS se redujo con RNA interferente confirmaron la importante función de estas isoenzimas en cáncer (Gao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Por el contrario, GLS2 está reprimida en glioblastoma, HCC y cáncer de colon (Martín-Rufián *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). No obstante, la función de GLS2 en cáncer parece ser contexto-dependiente, puesto que también se ha descubierto su sobreexpresión en ciertos tipos de tumores, como cáncer de mama luminal (Lukey *et al.*, 2019) y cánceres ginecológicos (Xiang *et al.*, 2013) (Fig. 1.9).

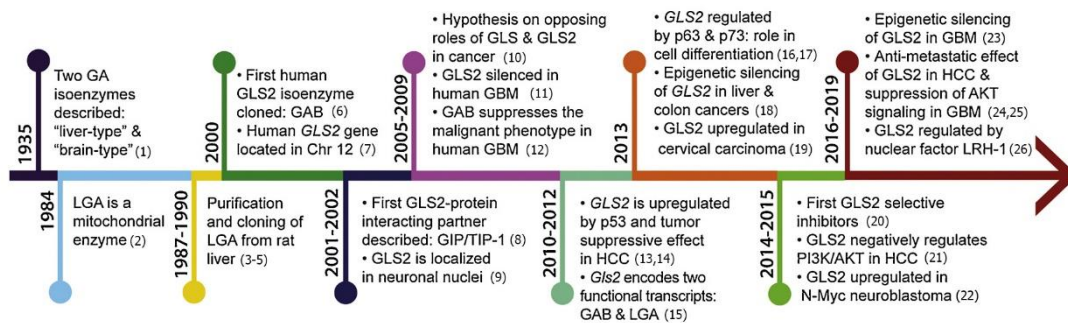


Figura 1.9. Línea del tiempo de los hitos en la historia de las isoenzimas GA GLS2 para elucidar sus funciones en el crecimiento celular, supervivencia, diferenciación y proliferación. Se destacan las evidencias más relevantes que apoyan una segregación de funciones en biología tumoral entre las isoformas GLS y GLS2. Otros descubrimientos significativos con relación a GLS2 en tejidos de mamíferos, particularmente a sus funciones en hígado, no se indican. GBM, glioblastoma; HCC: carcinoma hepatocelular; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa. Referencias en la imagen: 1) Krebs, 1935; 2) McGivan *et al.*, 1984; 3) Heini *et al.*, 1987; 4) Smith & Watford, 1988; 5) Smith & Watford, 1990; 6) Gómez-Fabre *et al.*, 2000; 7) Aledo *et al.*, 2000; 8) Olalla *et al.*, 2001; 9) Olalla *et al.*, 2002; 10) Pérez-Gómez *et al.*, 2005; 11) Szeliga *et al.*, 2005; 12) Szeliga *et al.*, 2009; 13) Hu *et al.*, 2010; 14) Suzuki *et al.*, 2010; 15) Martín-Rufián *et al.*, 2012; 16) Giacobbe *et al.*, 2013; 17) Velletri *et al.*, 2013; 18) Zhang *et al.*, 2013; 19) Xiang *et al.*, 2013; 20) Lee *et al.*, 2014; 21) Liu *et al.*, 2014; 22) Xiao *et al.*, 2015; 23) Szeliga *et al.*, 2016; 24) Kuo *et al.*, 2016; 25) Majewska *et al.*, 2019; 26) Xu *et al.*, 2016. Esquema tomado de Matés *et al.*, 2020.

Introducción

El oncogen c-Myc regula la expresión de muchos genes implicados en el metabolismo de Gln, como GLS, GLUD, glutamina sintetasa (GLUL) y aminotransferasas (Fig. 1.10). Myc promueve el aumento en el importe de Gln uniéndose directamente al promotor de los genes de los transportadores de Gln SLC1A5 y SLC7A5/SLC3A2 (Nicklin *et al.*, 2009). En células de linfoma P-493 B, c-Myc promueve la expresión de GLS mediante la represión transcripcional de miR-23a y miR-23b (Gao *et al.*, 2009), que son también reprimidos por NF- κ B (Rathore *et al.*, 2012). El factor de transcripción c-Jun también regula la expresión del gen GLS uniéndose directamente al promotor. Este hecho se observó mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIPs), empleando células de cáncer de mama MDA-MB-231, que expresan altos niveles de GLS y c-Jun (Lukey *et al.*, 2016).

Existen muchas rutas de señalización que regulan la expresión de GLS a través de c-Myc, como por ejemplo la ruta GSK3 α/β (glucógeno sintasa quinasa-3) en células de carcinoma escamoso de pulmón, donde se han observado altos niveles de la proteína GSK3 α/β fosforilada (baja actividad). Este hecho aumenta la estabilidad de los factores de transcripción c-Myc y c-Jun y, por tanto, la expresión de GLS (Momcilovic *et al.*, 2018). Por otro lado, la ruta mTORC1/S6K1 controla los niveles de GLS mediante la expresión de c-Myc dependiente de eIF4B. La proteína quinasa S6K1 controla positivamente GLS por el incremento de la eficiencia de la traducción de Myc, fosforilando el factor de iniciación de la traducción eucariota eIF4B (Csibi *et al.*, 2014).

La señalización del conjunto de quinasas RAF/MEK/ERK mediada por el factor de crecimiento epidermal (EGF) incrementa la actividad de GLS. Esta activación es dependiente de su fosforilación, ya que la inhibición de quinasas o la expresión de la fosfatasa PP2A elimina completamente la actividad de KGA (Thangavelu *et al.*, 2012). La señalización por Rho GTPasas eleva también la actividad de GLS vía NF- κ B (factor nuclear kappa B) en células de cáncer, promoviendo su fosforilación (Wang *et al.*, 2010). En un estudio realizado en cáncer de pulmón, se observó que la isoenzima GAC posee un residuo de serina (Ser314) que es un sitio de fosforilación clave para su actividad. Esta fosforilación está regulada por PKC ϵ , una isoforma de la proteína quinasa C (Han *et al.*, 2018). Otra quinasa que interacciona con las isoenzimas GLS es la ERK5 (*Extracellular signal-related kinase 5*), de las familias de las MAPK (*Mitogen activated protein kinases*). La interacción ERK5-GLS se ha relacionado con una posible regulación de los

niveles de expresión de GA y de su actividad catalítica (Guillén Pérez, 2021). Adicionalmente, se han descrito otras modificaciones postraduccionales, aparte de fosforilación, que también regulan GLS. La acilación es una modificación de un residuo de lisina que incluye acetilación, malonilación, succinilación, glutarilación, miristoilación y palmitoilación. Estas modificaciones están reguladas por una familia de desacilasas dependientes de NAD⁺ denominadas sirtuinas. SIRT5 estabiliza GLS por desuccinilación de lisina 164 (K164), protegiendo a GLS de la ubiquitinación y su posterior degradación (Greene *et al.*, 2019).

GLS podría estar también regulada por un RNA no codificante de cadena larga (lncRNA) llamado CCAT2 (*Colon cancer-associated transcript 2*), que interacciona con el complejo CFIm (*Cleavage Factor 1, small subunit*) y da lugar a una expresión preferencial de la variante GAC (Redis *et al.*, 2016).

La hipoxia intratumoral es una propiedad característica en muchos tipos de cáncer. Las células se adaptan a la hipoxia activando factores inducibles por hipoxia (HIF). Concretamente, HIF-1 α activa la expresión del gen *GLS* y la síntesis de la enzima (Xiang *et al.*, 2019).

Numerosos estudios han demostrado que GLS2 está regulada de forma diferente a GLS (Fig. 1.10). GLS2 es diana de p53 (Hu *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010), p63 (Giacobbe *et al.*, 2013) y p73 (Velletri *et al.*, 2013). Como factor de transcripción, p53 se une a la secuencia consenso de unión de DNA que está situada en la región del promotor de GLS2 y, bajo diferentes condiciones, es capaz de iniciar la transcripción de GLS2. Tanto p63 como p73 (miembros de la familia de p53) actúan de la misma forma en la regulación de GLS2. Además, GLS2 es directamente activada, a nivel transcripcional, por N-Myc en células de neuroblastoma (Xiao *et al.*, 2015).

Introducción

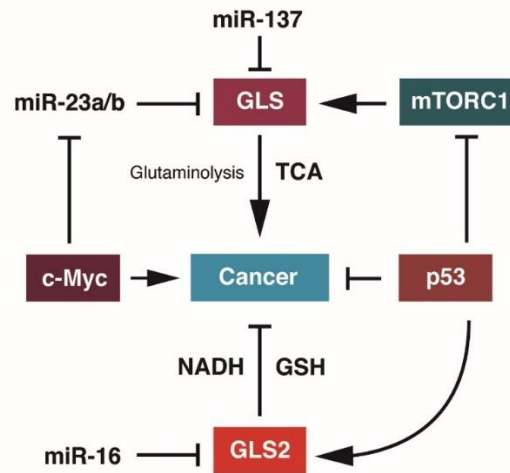


Figura 1.10. Las isoenzimas GLS y GLS2 pueden tener funciones opuestas en cáncer. Las isoenzimas GLS están sobreexpresadas en muchos tipos de cáncer, mientras que la prevalencia de isoformas GLS2 parece relacionada con estados celulares más diferenciados. De hecho, GLS se activa por mTORC-1 facilitando así la síntesis de macromoléculas y la obtención de energía a través de la glutaminólisis y el ciclo TCA. Por otra parte, GLS2 es una diana de p53 con un papel importante en el metabolismo energético y la defensa antioxidante a través de los niveles de GSH y NADH. Por consiguiente, mientras que el oncogén c-Myc regula GLS a través de los microRNAs miR-23a y miR-23b, GLS2 está regulada por varios factores supresores tumorales de la familia p53. Además, GLS y GLS2 están silenciados por miR-137 y miR-16, respectivamente. miR: microRNA; mTORC-1: mammalian target of rapamycin complex 1; NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido. Esquema tomado de Matés *et al.*, 2018.

En líneas celulares de glioblastoma, GLS2 se encuentra silenciada por hipermetilación de su promotor. Interesantemente, la transfección estable con el cDNA de la isoenzima GAB disminuyó la proliferación y migración en las líneas de glioma T98G y U87MG (Szeliga *et al.*, 2009). Igualmente, es reseñable que la sobreexpresión de GLS2 en las líneas LN229, U87 y T98G de GBM humano provocó, aparte de una reversión del fenotipo transformado, la represión de la ruta PI3K/AKT, que suele estar activada en GBM (Majewska *et al.*, 2019). De acuerdo con estos resultados en GBM, la expresión ectópica de GLS2 en HCC también regula negativamente la vía de señalización PI3K/AKT, activada en numerosos tumores y que juega un papel fundamental en promover el crecimiento del tumor, proliferación y supervivencia (Liu *et al.*, 2014). GLS2 podría reducir la fosforilación de AKT en los residuos de Ser473 y Thr308, produciendo una disminución en su actividad. Por el contrario, en cáncer de mama, GLS2 está

sobreexpresada en el subtipo luminal (Lukey *et al.*, 2019), debido a la unión al promotor del factor de transcripción GATA3, considerado un regulador crítico de la diferenciación luminal en cáncer de mama (Asselin-Labat *et al.*, 2006).

1.6. Inhibidores de glutaminasa

L-DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucine), azaserina y acivicina son antibióticos que actúan como inhibidores de GAs y amidotransferasas, que compiten irreversiblemente con Gln (Magill *et al.*, 1957). Estos inhibidores son análogos del sustrato y, por consiguiente, se unen al centro activo compitiendo con el sustrato Gln. Son citotóxicos y con alta eficiencia antitumoral, aunque presentan baja especificidad, lo que ha impedido su progreso en ensayos clínicos. En 2016 se diseñaron unos profármacos basados en la estructura de DON, donde se protegieron los grupos amino y carboxilato para aportar la suficiente estabilidad química y poder realizar ensayos biológicos. Estos ensayos se llevaron a cabo en modelos murinos de glioblastoma, proporcionando una posible alternativa a DON para pacientes con GBM (Rais *et al.*, 2016). El compuesto más estable, JHU083, es el que ha tenido mayor impacto en la respuesta inmune y regresión tumoral.

Más recientemente, se han comenzado a descubrir nuevos inhibidores de isoenzimas GA, denominados alostéricos, que no se unen a su centro activo sino en regiones que impiden la oligomerización y, por ende, la activación de las GAs. Los principales inhibidores alostéricos de GA son análogos estructurales de BPTES (bis-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il) etil sulfuro) y del compuesto 968 (5-(3-bromo-4-(dimetilamino)fenil)-2,2-dimetil-2,3,5,6-tetrahidrobenzo[a]fenantridin-4(1H)-ona, una benzofenantridina permeable a las células). La optimización de estos compuestos para la obtención de análogos más específicos y estables fue posible gracias a la determinación de las estructuras cristalinas de los complejos enzima-inhibidor para las isoenzimas GLS (DeLaBarre *et al.*, 2011; Thangavelu *et al.*, 2012; ver Tabla 1.1). El inhibidor BPTES se ha mostrado muy eficaz en tumores experimentales y en líneas celulares de cáncer en cultivo (revisado en Matés *et al.*, 2019). Igualmente, en terapias combinadas mostró un gran efecto antitumoral: así, la inhibición de GLS con BPTES frenó el crecimiento celular y sensibilizó las células T de leucemia linfoblástica aguda a la terapia con inhibidores de NOTCH1 (*Neurogenic locus notch homolog protein 1*) (Herranz *et al.*, 2015). Sin embargo, BPTES presenta poca estabilidad metabólica y potencia de inhibición, así como una baja solubilidad, por lo que uno de sus análogos, el compuesto CB-839, que presenta

Introducción

mayor biocompatibilidad, es el único que está actualmente en ensayos clínicos en combinación con otras terapias. En un estudio reciente llevado a cabo en células de cáncer de mama, se encontró que el compuesto 968 preferentemente inhibe a GLS2 en el subtipo luminal (Lukey *et al.*, 2019). Sólo se conoce otra serie de inhibidores específicos de GLS2, las alquil benzoquinonas, aisladas de la planta *Ardisia virens* (Lee *et al.*, 2014). En células HCC (HepG2) se consiguió inhibir la actividad GA empleando varios compuestos de esta serie y el que mostró mayor capacidad de inhibición fue AV-1. El compuesto V-9302 es un derivado de GPNA (L- γ -glutamyl-p-nitroanilida), un antagonista de un transportador de Gln (Esslinger *et al.*, 2005), que inhibe la absorción de este aminoácido. A pesar de haber demostrado su eficacia mediante la atenuación del crecimiento del tumor en modelos murinos (Schulte *et al.*, 2018), en líneas celulares donde se silenció el transportador SLC1A5 no se demostró efecto alguno o sensibilidad a este compuesto (Bröer *et al.*, 2018).

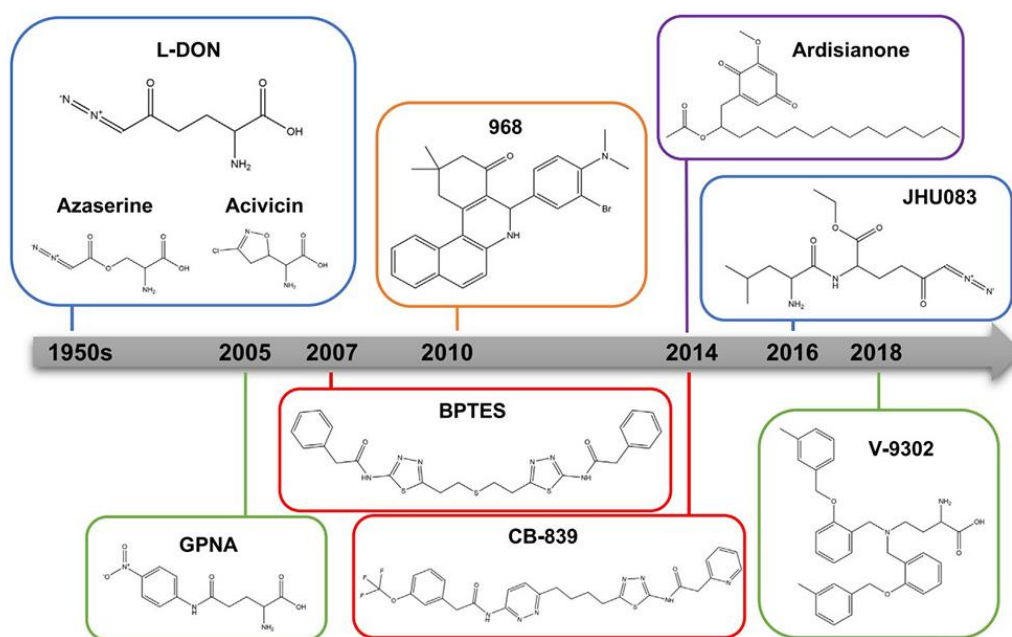


Figura 1.11. Estructuras químicas de los inhibidores más representativos de GA. Los compuestos denominados profármacos se encuentran dentro de los recuadros azules (DON, azaserina, acivicina y JHU083). Los inhibidores alostéricos de GA se encuentran dentro de los recuadros rojos y naranja (BPTES, CB-839 y 968). El compuesto natural ardisianona está dentro del recuadro púrpura y aquellos inhibidores relacionados con la absorción de Gln se encuentran dentro del recuadro verde. Imagen tomada de Yang *et al.*, 2021.

1.7. Estructuras cristalinas de glutaminasas

Actualmente hay publicadas en el repositorio PDB (*Protein Data Bank*) 42 estructuras de GAs. De ellas, sólo dos corresponden a estructuras de las isoformas GLS2, ya que la gran mayoría pertenecen a isoenzimas GLS. En la Tabla 1.1, al final de esta sección, se muestran las estructuras cristalinas de GAs de mamífero actualmente disponibles, además de los ligandos junto con los que gran parte de ellas han sido cristalizadas.

1.7.1. Estructuras cristalinas de GLS

Un grupo de investigación de Singapur publicó un total de 8 estructuras cristalinas del centro catalítico de GLS, aunque una de ellas había sido depositada en PDB algunos años antes (PDB: 3CZD) (Thangavelu *et al.*, 2012). En esta publicación, reportaron la estructura del dominio catalítico de la KGA humana (3VOY) y complejos de la proteína con su sustrato (L-Gln; 3VP0), su producto (L-Glu; 3CZD), BPTES (3VOZ) y compuestos derivados de este inhibidor (véase Tabla 1.1).

La estructura del centro catalítico de KGA tiene dos dominios. El dominio I corresponde a los residuos Ile22-Pro281 y Cys424-Leu533 y el dominio II está formado por los residuos Phe282-Thr423. Tanto la L-Gln como el L-Glu están unidos al sitio activo, mediante numerosos puentes de hidrógeno, con residuos altamente conservados en los homólogos de la isoenzima KGA.

BPTES es un potente inhibidor de KGA (Robinson *et al.*, 2007) pero no de las isoformas de GLS2. Según Thangavelu y colaboradores, la estructura cristalina del complejo KGA-BPTES reveló la unión del inhibidor a una cavidad alostérica formada por Leu321, Phe322, Leu323 y Tyr394, además de los residuos Phe318 y Asn324, que interaccionan con el motivo fenilacetamida de la cadena lateral del inhibidor y Glu325, que interacciona con la parte alifática (Thangavelu *et al.*, 2012). La unión de BPTES induce cambios conformacionales en los principales residuos del bucle (*loop*) Glu312-Pro329, esencial en la estabilización de la cavidad catalítica, generando una conformación estable e inactiva. Se diseñaron 3 compuestos derivados del inhibidor BPTES y se determinó la estructura cristalina de cada complejo KGA-inhibidor (3VP2, 3VP3, 3VP4), resultando un mecanismo de inhibición similar al descrito para BPTES, aunque la potencia de inhibición fue menor. La especificidad del inhibidor por KGA y no por

Introducción

isoenzimas GLS2 se debió a que los residuos Phe318 y Phe322 son exclusivos de KGA, como se puede comprobar en la Fig. 1.13.

El estudio de la estructura cristalina de la isoforma GAC completa, unida a su producto, con y sin BPTES (DeLaBarre *et al.*, 2011), describe una conformación tetramérica con una molécula de Glu en el sitio activo (PDB: 3UNW). Esta estructura representa una conformación no activa y es probable que BPTES estabilice esta conformación. La molécula de BPTES interactúa con una región del *loop* comprendida entre los residuos 320-327 y los residuos 386-399 de la zona intermedia dímero-dímero. La región formada por los residuos 315-320 parece ser una región crítica para la unión de BPTES, que podría mediar en los cambios conformacionales entre la forma unida al sustrato y la forma unida al producto. Por tanto, dos moléculas de BPTES se unen a la región intermedia del tetrámero de GAC (Fig. 1.12), bloqueando la estructura en una conformación no activa (PDB: 3UO9).

En 2016, se publicó la estructura cristalina del complejo formado entre el centro catalítico de KGA y el inhibidor trans-CBTBP (PDB: 5JYP), molécula que tiene la misma simetría que BPTES e idénticas interacciones con la isoenzima KGA (Ramachandran *et al.*, 2016). El compuesto CB-839 es un inhibidor análogo a BPTES, que es capaz de bloquear el consumo de Gln en algunas líneas tumorales que no son capaces de metabolizarla por otras vías alternativas (Gross *et al.*, 2014). En la estructura cristalina del complejo formado por el centro catalítico de KGA y CB-839 (PDB: 5JYO) se demostró que la interacción del inhibidor con la proteína se produce en la misma cavidad de unión alostérica, como sucede con BPTES y sus análogos. Las estructuras cristalinas que existen actualmente en el repositorio PDB de los complejos GAC/KGA con análogos de BPTES difieren principalmente en la fuerza de los enlaces de hidrógeno que se establecen entre el inhibidor y los residuos de la proteína (Huang *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2021).

En los primeros estudios estructurales de GA se había visto que la presencia de fosfato inorgánico (Pi) inducía una oligomerización, originando la estructura tetramérica activa de la proteína (Godfrey *et al.*, 1977; Morehouse *et al.*, 1981). Gracias a la determinación de la estructura cristalina de GAC unida a Pi (PDB: 3SS4), se comprobó que en la conformación tetramérica existe un ion Pi por cada monómero (Fig. 1.12), incluido dentro de un sitio activo altamente positivo y estableciendo un contacto polar

con Ser291, Asn340 y Tyr471. Por tanto, Pi sería un activador alostérico que induciría cambios conformacionales en el *loop* de activación, que comprende los residuos 320 al 327 (Li *et al.*, 2016). En la estructura cristalina de GAC unida a Glu, la cadena lateral γ -carboxilato del aminoácido establece una interacción polar con Ser291 y Tyr471 (Cassago *et al.*, 2012), por lo que el Pi compite con Glu por los mismos residuos del sitio catiónico activo de la enzima, promoviendo la eliminación de producto durante el ciclo catalítico y evitando así la inhibición de GLS por acumulación de producto. Además, la unión de Pi hace que se produzca un aumento de la afinidad del sustrato por la enzima (Nguyen *et al.*, 2021).

Como comentamos anteriormente, DON es un inhibidor análogo a Gln, que inhibe la isoenzima KGA por unión directa al sitio activo (Shapiro *et al.*, 1979), aunque es poco selectivo ya que inhibe otras enzimas que tienen como sustrato Gln (Ortlund *et al.*, 2000; Pinkus *et al.*, 1977). La estructura cristalina del complejo KGA-DON (PDB: 4O7D) mostró que el inhibidor se une covalentemente a Ser286 en el sitio activo de KGA (Thangavelu *et al.*, 2014). El ataque nucleofílico de la cadena lateral de Ser286 sobre DON elimina un grupo diazo (N_2) y lleva a la formación del complejo.

Finalmente, las estructuras cristalinas de GAC unida a Gln, con y sin Pi, donde un residuo de tirosina (Tyr466) del sitio activo ha sido mutado por triptófano (PDB: 7SBM y 7SBN), permitieron aportar una nueva visión de la relación estructural que existe entre la unión de sustrato a la enzima y la activación por Pi (Nguyen *et al.*, 2022). Existe una región que actúa como “puerta” y que cubre la cavidad del sitio activo de la enzima. Esta región presenta los residuos Tyr249, Ile250 y Pro251. Tras analizar la estructura cristalina del complejo GAC(Y466W)-Gln, se observó que el residuo Tyr249 se encontraba en diferentes conformaciones dentro de cada dímero de GAC. Este hecho resultó en dos conformaciones diferentes en la estructura de la proteína, una abierta y otra cerrada. En ausencia de activador, GAC se encuentra como una pareja de dímeros asimétricos en los que cada monómero estaba ocupado por Gln. Uno de los dímeros presentó una conformación cerrada y otro una conformación abierta. Sin embargo, en presencia de Pi, la estructura cristalina mostró un tetrámero con una molécula de Gln unida a cada monómero en una conformación cerrada y de distribución simétrica.

Introducción

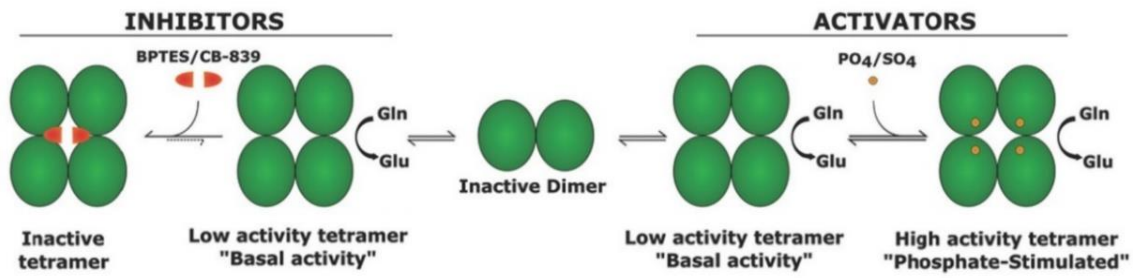


Figura 1.12. Esquema representativo de la transición dímero-tetrámero como resultado de la interacción con activadores e inhibidores. Imagen tomada de Stalneck *et al.*, 2017.

GAB	-----MRSMK-----ALQKALS RAGSHCGR	20
LGA	-----	0
KGA	MMRLRGSGMLRDLLLRSPAGVSATL RRAQPLVTL CRRPRGGGRPAAGPAAARLHPWGG	60
GAC	MMRLRGSGMLRDLLLRSPAGVSATL RRAQPLVTL CRRPRGGGRPAAGPAAARLHPWGG	60
GAB	GGWGHPSRSPLL-----GGVRRHHLSE---AAQ---G-RETPH-----S	53
LGA	-----ML-----QKEEQV---AVLR---P-HFPPH-----S	19
KGA	GGWPAEPLARGLSSSPSEILQELGKGSTHPQPGVSPPAAPAAPGPKDGPGETDAFGNSEG	120
GAC	GGWPAEPLARGLSSSPSEILQELGKGSTHPQPGVSPPAAPAAPGPKDGPGETDAFGNSEG	120
	* : . *	
GAB	HQPQH QDHDSSESGMLSR LGDLLFYTIAEGQERIP IHKFTTALKATGLQTS DPRLRDCMS	113
LGA	L---PPNSDSSSESGMLSR LGDLLFYTIAEGQERIP IHKFTTALKATGLQTS DPRLRDCMS	76
KGA	KELVASGENKIKQGLLPSLEDLLFYTIAEGQEKIPVHKFITALKSTGLRTSDPRLKECMD	180
GAC	KELVASGENKIKQGLLPSLEDLLFYTIAEGQEKIPVHKFITALKSTGLRTSDPRLKECMD	180
	. : . : * * *	
GAB	EMHRVVQESSGGLLDRDLFRKCVSSNIVLLTQAFRRK FVIPDFE EFTGHVDRIFEDVKE	173
LGA	EMHRVVQESSGGLLDRDLFRKCVSSNIVLLTQAFRRK FVIPDFE EFTGHVDRIFEDVKE	136
KGA	MLRLTLQTTSDGVMLDKDLFKKCVQSNIVLLTQAFRRK FVIPDFMSFTSHIDELYESAKK	240
GAC	MLRLTLQTTSDGVMLDKDLFKKCVQSNIVLLTQAFRRK FVIPDFMSFTSHIDELYESAKK	240
	: : . *	
GAB	LTGGKVAAYIPQLAKSNPDLWGVSLCTVDGQRHSVGH TKIPFCLQSCVKPLTYAISTL	233
LGA	LTGGKVAAYIPQLAKSNPDLWGVSLCTVDGQRHSVGH TKIPFCLQSCVKPLTYAISTL	196
KGA	QSGGKVADYIPQLAKFSPDLWGVSVCTVDGQRHSTGDTKVPFCLQSCVKPLKYAIAVNDL	300
GAC	QSGGKVADYIPQLAKFSPDLWGVSVCTVDGQRHSTGDTKVPFCLQSCVKPLKYAIAVNDL	300
	* *	
GAB	GTDYVHKFVKGEP SGLRYNKL SLNEEGIPHNPMVNAGAI VVSSLIKMDCNKAEKFDVFLQ	293
LGA	GTDYVHKFVKGEP SGLRYNKL SLNEEGIPHNPMVNAGAI VVSSLIKMDCNKAEKFDVFLQ	256
KGA	GTEYVHRYVKGEP SGLRFNKLFLNEDDKPHNPMVNAGAI VVTSLIKQGVNNAEKFDYVMQ	360
GAC	GTEYVHRYVKGEP SGLRFNKLFLNEDDKPHNPMVNAGAI VVTSLIKQGVNNAEKFDYVMQ	360
	* *	
GAB	YLNKMAGNEYMGFSNATFQSEKETGDRNYAIGYYLKEKKCFPKGVDMMAALDLYFQLCSV	353
LGA	YLNKMAGNEYMGFSNATFQSEKETGDRNYAIGYYLKEKKCFPKGVDMMAALDLYFQLCSV	316
KGA	FLNKMAGNEYVGFSNATFQSERESGDRNFAIGYYLKEKKCFPEGDMVGILDYFQLCSI	420
GAC	FLNKMAGNEYVGFSNATFQSERESGDRNFAIGYYLKEKKCFPEGDMVGILDYFQLCSI	420
	* *	
GAB	EVTCESSVMAATLANGGICPITGESVLSAEAVRNTLSLMHSCGMDFSGQFAFHVGLPA	413
LGA	EVTCESSVMAATLANGGICPITGESVLSAEAVRNTLSLMHSCGMDFSGQFAFHVGLPA	376
KGA	EVTCESSVMAATLANGGFCPITGERVLSPEAVRNTLSLMHSCGMDFSGQFAFHVGLPA	480
GAC	EVTCESSVMAATLANGGFCPITGERVLSPEAVRNTLSLMHSCGMDFSGQFAFHVGLPA	480
	* *	
GAB	KS AVSGAILLVV PNVGM MCLSPPLDKLGNSHRGTSFCQKLVSLFNFNHNYDNLRHCAKRL	473
LGA	KS AVSGAILLVV PNVGM MCLSPPLDKLGNSHRGTSFCQKLVSLFNFNHNYDNLRHCAKRL	436
KGA	KSGVAGGILLVVPNVGM M CWS PPLDKMGNSVKGIHFCHDLVSLCNFNHNYDNLRHFAKLL	540
GAC	KSGVAGGILLVVPNVGM M CWS PPLDKMGNSVKGIHFCHDLVSLCNFNHNYDNLRHFAKLL	540
	* *	
GAB	DPRREGAEIRNKTVNLLFAAYS GDVSALRRFALSAMDMEQKDYSRTALHVAAAE GHIE	533
LGA	DPRREGAEIRNKTVNLLFAAYS GDVSALRRFALSAMDMEQKDYSRTALHVAAAE GHIE	496
KGA	DPRREGDQRVKSVINLLFAAYTGDVSALRRFALSAMDMEQORDYSRTALHVAAAE GHVE	600
GAC	DPRREGDQRHSFGP-LDYESLQQLA-LKETVWKKVSPESNE-----DIST	585
	* *	
GAB	VVKFLIEACKVNPFAKDRWGNIPDDAVQFNHLEVVKLLQDYQDSYTLSETQAEAAAAL	593
LGA	VVKFLIEACKVNPFAKDRWGNIPDDAVQFNHLEVVKLLQDYQDSYTLSETQAEAAAAL	556
KGA	VVKFLIEACKVNPFPKDRWNNTPMDEALHFGHHDVFKILQEYVQVYTPQGSDNGKENQT	660
GAC	TVVYRMESLGEKS-----	598
	* *	
GAB	SKENLESMV	602
LGA	SKENLESMV	565
KGA	VHKNLDGLL	669
GAC	-----	598

Figura 1.13. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las isoformas de GLS y GLS2. Se indican con flechas los residuos Phe318 y Phe322 de GLS, que se alinean con los residuos Tyr251 y Ser255 de GLS2, respectivamente. Asterisco (*): posiciones donde hay un residuo completamente conservado; dos puntos (:): residuos con propiedades similares; un punto (.): residuos con propiedades poco similares o completamente diferentes.

Introducción

1.7.2. Estructuras cristalinas de GLS2

La mayor parte de las estructuras cristalinas publicadas actualmente corresponden a GLS y sus variantes KGA y GAC. Existen numerosos estudios destacando el papel proliferativo y tumorigénico de GLS en cáncer, despertando mayor interés como diana terapéutica. La determinación de la estructura de la enzima permite entender el mecanismo de acción de inhibidores y el diseño de nuevos análogos de mayor especificidad. GLS2 ha sido mayoritariamente descrita como supresor tumoral, aunque recientemente se ha publicado su papel tumorigénico en cáncer de mama luminal (Lukey *et al.*, 2019). No existe aún ninguna estructura 3D completa de las isoenzimas GLS2 de mamíferos, variantes GAB y LGA. Recientemente, se han descrito dos estructuras parciales de GLS2, aunque bastante truncadas: los dominios de ankirina de la región C-terminal y el dominio catalítico GA.

La estructura cristalina del dominio catalítico de GLS2 (PDB: 4BQM) fue depositada en la base de datos PDB en 2013 y publicada en 2021 (Ferreira *et al.*, 2021). En esta publicación, se describe la región comprendida entre el residuo Ile154 y Gly497, que es común para las isoformas LGA y GAB (Figs. 1.8 y 1.13). Como ya se mencionó anteriormente, la estructura cristalina de GLS contiene una región que cubre el sitio activo, a modo de tapa (*lid*), y que puede encontrarse en distintas conformaciones. En la conformación cerrada, el residuo Tyr249 se encuentra dispuesto hacia dentro del sitio activo. En el caso de GLS2 el residuo equivalente es Tyr183, que se encuentra dirigido hacia fuera de la cavidad del sitio activo. Otra característica que distingue la estructura de GLS2 es el único aminoácido diferente que posee en el sitio catalítico: en la posición 225 de GLS2 hay una serina (Ser) y en GLS una lisina (Lys). Para GLS2, el *loop* de activación se encuentra en la región Leu249-Ser255 y, como se comentó anteriormente, hay dos posiciones de GLS2, Tyr251 y Ser255, que son diferentes en GLS, Phe318 y Phe322, únicos residuos diferentes en el *loop* de activación entre las dos isoformas (Figs. 1.12 y 1.14).

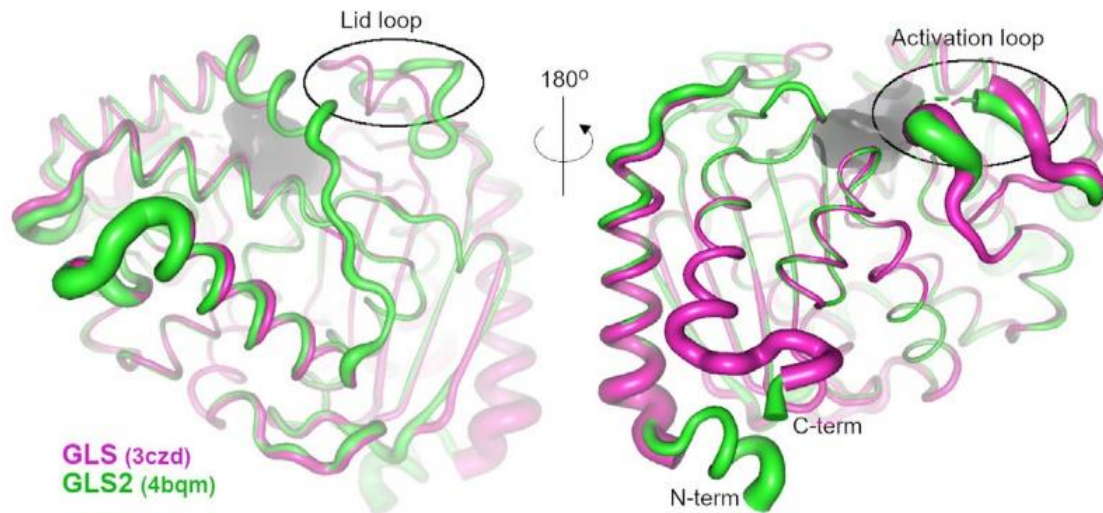


Figura 1.14. Superposición de la estructura cristalina de GLS (PDB: 3CZD) sobre GLS2 (PDB: 4BQM). Se muestran los bucles (*loops*) de activación, la tapa (*lid*) y las diferencias de conformación. Imagen tomada de Ferreira *et al.*, 2021.

Pasquali y colaboradores determinaron la estructura cristalina de la región de ankirina del extremo C-terminal de GLS2 (PDB: 5U0K), donde se encuentra el motivo de reconocimiento del dominio PDZ que permite la interacción de GLS2 con otras proteínas como GIP (Olalla *et al.*, 2001). La estructura cristalina mostró 3 repeticiones de ankirina (ANK1, ANK2 y ANK3) similares a las descritas para KGA, con una variación en la horquilla β que une ANK1 y ANK2 y en las hélices α interior y exterior de ANK2 (Fig. 1.15). Comparando con la secuencia consenso de las repeticiones ANK1 y ANK3, el motivo TPLH localizado al principio de la hélice α interior de la secuencia canónica no se corresponde con la secuencia de GLS2, la hélice interna de ANK1 es media vuelta más larga y carece del giro β de la típica hélice interna de las repeticiones ANK canónicas. Además, una histidina de ANK3 es sustituida por un residuo de aspartato y ANK2 contiene un residuo extra (Lys543). Finalmente, la hélice exterior de ANK3 es una vuelta más larga que la canónica (Pasquali *et al.*, 2017).

Introducción

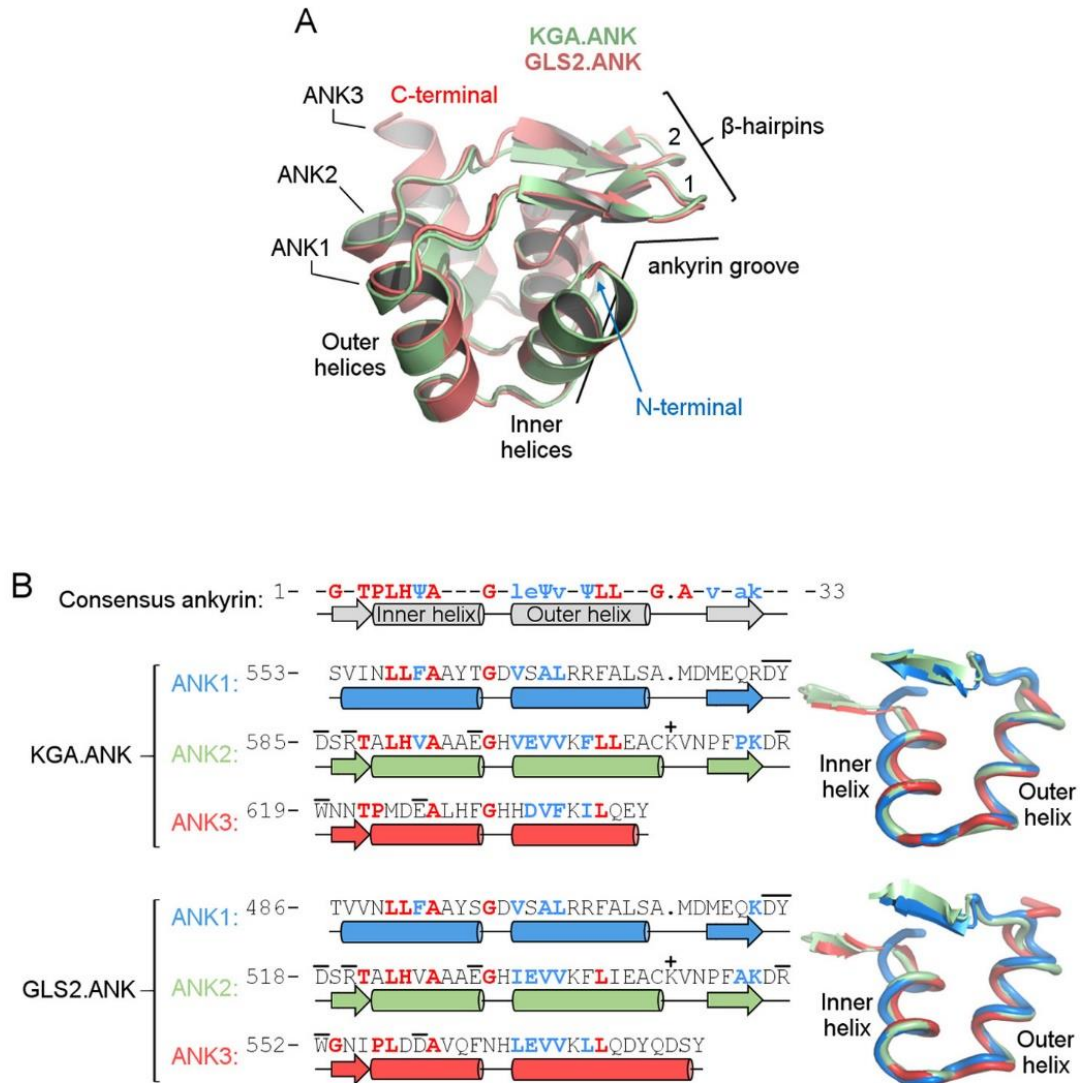


Figura 1.15. Representación estructural de las repeticiones de ankirina de GLS y GLS2. (A) Superposición de las estructuras de las repeticiones de ankirina (ANK1, ANK2 y ANK3) de GLS2 (rojo) y KGA (verde). (B) Alineamiento de secuencia aminoacídica con la secuencia consenso. A la derecha aparece una representación con las principales diferencias estructurales siguiendo el mismo código de colores establecido en el alineamiento. Imagen tomada de Pasquali *et al.*, 2017.

Tabla 1.1. Estructuras cristalinas de las enzimas GA de mamíferos publicadas actualmente en la base de datos RCSB PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank*). NP: estructuras no detalladas en una publicación. Todas las estructuras son de GAs humanas, excepto las indicadas con (m) que son de ratón.

PDB ID	Isoforma GA	Residuos	Resolución (Å)	Ligando	Fecha entrada	Referencia
3CZD	GLS	221-533	2.4	L-Glu	01/07/2008	Thangavelu <i>et al.</i> , 2012
3SS3	GAC (m)	128-603	2.42	-	11/01/2012	Cassago <i>et al.</i> , 2012
3SS4	GAC (m)	128-603	2.85	Fosfato	11/01/2012	Cassago <i>et al.</i> , 2012
3SS5	GAC (m)	128-603	2.8	L-Glu	11/01/2012	Cassago <i>et al.</i> , 2012
3UNW	GAC	71-598	2.56	L-Glu	07/12/2011	DeLaBarre <i>et al.</i> , 2011
3UO9	GAC	71-598	2.3	L-Glu, BPTES	07/12/2011	DeLaBarre <i>et al.</i> , 2011
3VOY	GLS	221-533	2.2	-	13/06/2012	Thangavelu <i>et al.</i> , 2012
3VOZ	GLS	221-533	2.4	BPTES	13/06/2012	Thangavelu <i>et al.</i> , 2012
3VP0	GLS	221-533	2.4	L-Gln	13/06/2012	Thangavelu <i>et al.</i> , 2012
3VP1	GLS	221-533	2.3	L-Glu, BPTES	13/06/2012	Thangavelu <i>et al.</i> , 2012
3VP2	GLS	221-533	2.7	Derivado 2 de BPTES	13/06/2012	Thangavelu <i>et al.</i> , 2012
3VP3	GLS	221-533	2.7	Derivado 3 de BPTES	13/06/2012	Thangavelu <i>et al.</i> , 2012
3VP4	GLS	221-533	2.45	Derivado 4 de BPTES	13/06/2012	Thangavelu <i>et al.</i> , 2012
4BQM	GLS2	154-479	2.18	-	10/07/2013	Ferreira <i>et al.</i> , 2021
4JKT	GAC (m)	128-603	2.77	BPTES	14/08/2013	Ferreira <i>et al.</i> , 2013
4O7D	GLS	221-533	2.3	DON	16/04/2014	Thangavelu <i>et al.</i> , 2014
5D3O	GAC	72-550	2.79	-	23/09/2015	NP
5FI2	GAC	72-598	2.5	UPGL_00009 (7d)	11/05/2016	McDermott <i>et al.</i> , 2016
5FI6	GAC	72-598	2.52	UPGL_00011 (7e)	11/05/2016	McDermott <i>et al.</i> , 2016
5FI7	GAC	72-598	2.5	UPGL_00015 (14b)	11/05/2016	McDermott <i>et al.</i> , 2016
5HL1	GAC	72-550	2.4	CB-839	24/08/2016	NP
5I94	GAC	72-598	2.98	UPGL_00019 (14d)	11/05/2016	McDermott <i>et al.</i> , 2016
5JYO	GLS	221-533	2.1	CB-839	03/08/2016	Ramachandran <i>et al.</i> , 2016
5JYP	GLS	221-533	2.74	trans-CBTBP	03/08/2016	Ramachandran <i>et al.</i> , 2016
5U0K	GLS2	485-602	2.55	-	24/05/2017	Pasquali <i>et al.</i> , 2017
5U0I	KGA	551-669	1.42	-	24/05/2017	Pasquali <i>et al.</i> , 2017
5U0J	KGA	551-669	1.72	-	24/05/2017	Pasquali <i>et al.</i> , 2017
5UQE	KGA	137-656	3.6	-	24/05/2017	Pasquali <i>et al.</i> , 2017
5W2J	GAC (m)	73-598	2.5	-	17/10/2018	Li <i>et al.</i> , 2016
5WJ6	GAC	73-598	2.44	UPGL_00004	10/01/2018	Huang <i>et al.</i> , 2018
6LOX	GLS	71-598	3.2	13b (LL202)	13/01/2021	Xu <i>et al.</i> , 2021
6UJG	GAC	72-550	3	UPGL_00012	07/10/2020	NP
6UJM	GAC	72-550	2.5	UPGL_00013	07/10/2020	NP
6UK6	GAC	72-550	2.9	UPGL_00018	07/10/2020	NP
6UKB	GAC	72-550	3	UPGL_00012	07/10/2020	NP

Introducción

6UL9	GAC	72-550	2.5	UPGL_00023	14/10/2020	NP
6ULA	GAC	72-550	2.95	UPGL_00012	14/10/2020	NP
6ULJ	GAC	72-550	2.69	UPGL_00012	14/10/2020	NP
6UMC	GAC	72-550	2.75	UPGL_00012	14/10/2020	NP
6UMD	GAC	72-550	2.7	UPGL_00012	14/10/2020	NP
6UME	GAC	72-550	2.9	UPGL_00012	14/10/2020	NP
6UMF	GAC	72-550	2.68	UPGL_00012	14/10/2020	NP
7SBM	GAC	72-598	2.8	L-Gln	02/02/2022	Nguyen <i>et al.</i> , 2022
7SBN	GAC	72-598	2.14	L-Gln	02/02/2022	Nguyen <i>et al.</i> , 2022

2. Objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

De acuerdo con los antecedentes expuestos en la Introducción, es patente que aún quedan un gran número de cuestiones de calado por descubrir en relación con las funciones de las distintas isoenzimas GA en cáncer; entre ellas, sus funciones aparentemente opuestas en la transformación maligna y cuáles son los mecanismos moleculares que las sustentan, el significado fisiológico de sus modificaciones postraduccionales y de sus interacciones con proteínas PDZ y BCH y, por último, pero no menos relevante, el papel desempeñado en núcleo por la isoenzima GLS2. A estas cuestiones de carácter básico, hay que sumar otra sumamente importante de carácter traslacional: el desarrollo de nuevos fármacos isoenzima-específicos dirigidos a GA, con mayor eficacia anti-tumoral y propiedades farmacológicas mejoradas que las que exhiben los desarrollados hasta la fecha.

A la vista de estos antecedentes, nos planteamos los siguientes objetivos en esta Memoria:

1. Purificación y cristalización de la proteína GLS2 (isoenzima de GAB) para la determinación de su estructura nativa, con el fin de facilitar el futuro diseño de fármacos específicos que repriman su actividad en aquellos tumores en los que GLS2 está correlacionada con tumorigénesis.
2. Caracterización estructural (modificaciones postraduccionales), funcional (cinética, interactores) y cristalización de las proteínas GLS2 purificadas.
3. Análisis proteómico cuantitativo de líneas celulares de glioblastoma para inferir mecanismos subyacentes al efecto antiproliferativo inducido por la sobreexpresión de GLS2.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. Materiales y Métodos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3.1. Cuantificación de proteínas

Para medir la concentración de proteína total de las muestras se usó el método de Bradford (1976), basado en el cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie G-250 después de su unión a residuos básicos y aromáticos de las proteínas. El ensayo se adaptó a volúmenes pequeños y se realizó en microplacas de 96 pocillos. Para la recta patrón se prepararon varias concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA), de 50 a 500 $\mu\text{g/mL}$. En cada pocillo se depositaron 10 μL de muestra (o de patrón), a los que se añadieron 200 μL del reactivo Bradford (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, Bio-Rad) a una dilución 1:5. Las muestras se analizaron por triplicado. La microplaca se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Microplate Reader 680, Bio-Rad). La concentración de proteína de las muestras se calculó por interpolación en la recta patrón de BSA.

Alternativamente, se empleó el método del ácido bicinconínico (BCA) cuando las muestras contenían algún tipo de detergente. Este método se basa en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino por los enlaces peptídicos de las proteínas (reacción de Biuret) y la formación de un complejo de color púrpura Cu^{+1} -BCA, con una fuerte absorbancia a 562 nm (Smith *et al.*, 1985).

3.2. Electroforesis desnaturizante de proteínas

Las proteínas se separaron mediante electroforesis desnaturizante en presencia de SDS (SDS-PAGE) en geles pequeños de poliacrilamida, según el método de Laemmli (1970). Las soluciones empleadas se indican en el Anexo I. Se utilizaron geles separadores con un porcentaje total de acrilamida $T = 10\%$ ó 15% (siendo $T = \text{g de acrilamida} + \text{g de bisacrilamida}/100 \text{ mL de disolución}$) y un porcentaje de bisacrilamida $C = 3.3\%$ (siendo $C = \text{g de bisacrilamida}/\text{g de acrilamida} + \text{g de bisacrilamida}$). El gel concentrador se preparó con un porcentaje de $T = 5\%$.

Las muestras de proteínas se mezclaron con tampón de carga de electroforesis y se desnaturizaron durante 5 min a $95\text{ }^\circ\text{C}$. Se cargaron 20 μg de proteína total por pocillo en el caso de extractos celulares o de tejidos, o 40 ng si la muestra a separar era proteína purificada. Los marcadores de masa molecular empleados fueron: *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad), con proteínas estándar de 10 a 250 kDa; *GangNam-*

Materiales y Métodos

STAIN Prestained Protein Ladder (iNtRON Biotechnology), con proteínas estándar de 10 a 245 kDa; y *Amersham Low Molecular Weight Calibration kit* (GE Healthcare), con proteínas estándar de 14 a 97 kDa. La electroforesis se llevó a cabo con el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). El análisis se inició a 20 mA/gel en el gel concentrador y se continuó a 30 mA/gel en el gel separador. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining solution*, Bio-Rad). El gel se bañó en esta solución durante 40 min y a continuación se destiñó con varios cambios de solución desteñidora. Los geles se documentaron con un densitómetro GS-800 (Bio-Rad).

3.3. Inmunotransferencia western

Una vez finalizada la separación de las proteínas mediante electroforesis desnaturalizante, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Amersham Protran 0.45* μm (GE Healthcare) durante 1 h a 100 V, empleando un sistema de transferencia húmeda *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad). Las soluciones empleadas se indican en el Anexo I. Las proteínas transferidas se tiñeron con el colorante reversible rojo Ponceau S y se destiñeron a continuación con varios lavados con agua destilada.

Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario a las membranas, estas se bloquearon con tampón de bloqueo (BSA 3 % (p/v) o leche en polvo desnatada 5 % (p/v) en tampón TTBS, según el anticuerpo empleado) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se introdujeron en tubos de 50 mL y se incubaron con anticuerpo primario (Tabla 3.1) diluido en tampón TTBS con BSA 3 %, durante toda la noche a 4 °C y con agitación orbital. Al día siguiente, se lavaron tres veces con tampón TTBS, durante 10 min cada vez. Después, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 3.1) en tampón TTBS con BSA 3 %, durante 1 h a temperatura ambiente. Tras los lavados con tampón TTBS, se procedió al revelado de las membranas con el reactivo quimioluminiscente *SuperSignal West Pico* (Thermo Fisher Scientific). Las imágenes se registraron con el sistema *ChemiDoc MP* (Bio-Rad). Las bandas de proteínas específicas se normalizaron con el nivel de expresión de proteínas constitutivas, como GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), β -actina o TBP (*TATA binding protein*), reveladas con sus correspondientes anticuerpos.

Tabla 3.1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en este trabajo.

ANTICUERPO PRIMARIO	ESPECIE	DILUCIÓN	PROVEEDOR
Anti-GLS2	Conejo (policlonal)	1:2000	Abcam, ab113509
Anti-GLS2	Conejo (policlonal)	1:2000	Obtenido en el laboratorio
Anti-hipusina	Conejo (policlonal)	1:500	Sigma-Aldrich, ABS1064-I
Anti-fosfo-p53 (Ser15)	Conejo (policlonal)	1:1000	Cell Signaling Technology, 9284
Anti-COX IV	Conejo (policlonal)	1:3500	Abcam, ab16056
Anti-c-Myc	Conejo (monoclonal [Y69])	1:1000	Abcam, ab32072
Anti-p21	Ratón (monoclonal, [SX118])	1:500	BD Pharmigen, 556430
Anti-TBP	Ratón (monoclonal [1TBP18])	1:1000	Abcam, ab818
Anti-β-actina	Ratón (monoclonal, C4)	1:500	Sigma-Aldrich, MAB1501
Anti-GAPDH	Ratón (monoclonal [mAbcam 9484])	1:500	Abcam, ab9484
Anti-6x-His Tag, conjugado a HRP	Ratón (monoclonal)	1:500	Invitrogen, MA1-21315-HRP
Anti- FLAG	Ratón (monoclonal [M2])	1:500	Sigma-Aldrich, F3165
ANTICUERPO SECUNDARIO	CONJUGADO A	DILUCIÓN	PROVEEDOR
Anti-IgG de conejo (H+L)	HRP	1:80000	Sigma-Aldrich, A0545
Anti-IgG de ratón (H+L)	HRP	1:50000	Sigma-Aldrich, A9044

3.4. Medida de actividad GA

3.4.1. Método a punto final

El ensayo empleado para la medida de la actividad glutaminasa (GA) se basó en el descrito por Lund (1985), que cuantifica por el método del punto final el Glu formado en la reacción de la GA con la ayuda de la enzima auxiliar GLUD (glutamato deshidrogenasa, EC 1.4.1.2). Las reacciones son las siguientes:



Materiales y Métodos

Este método se adaptó para la medida de la actividad enzimática de la GLS2 recombinante purificada en microplacas transparentes de poliestireno de 96 pocillos (*Microplate 96-well, flat bottom*, Greiner), según el protocolo descrito por Huang y colaboradores (2018). En cada pocillo se depositaron 20 μL de solución 1 (K_2HPO_4 300 mM, EDTA 0.5 mM, Tris-acetato 130 mM, pH 8.6), 20 μL de Gln 40 mM y, por último, 10 μL de la muestra a analizar, diluida en tampón TE (Tris-acetato 50 mM, EDTA 0.2 mM, pH 8.6). Para el blanco, se sustituyó la muestra por un volumen equivalente de tampón TE. Tras incubar la mezcla a 37 °C durante 10 min, la reacción de la GA se detuvo con 5 μL de HCl 2.4 M. Entonces, se procedió con la segunda reacción añadiendo a cada pocillo 200 μL de solución 2 (GLUD 7.5 U, Tris-HCl 130 mM, hidrazina 200 mM, NAD^+ 1.79 mM, pH 9.4) e incubando durante 1 h a 37 °C. El incremento en la concentración de NADH debido a la oxidación del Glu se determinó midiendo el incremento de absorbancia (ΔAbs) a 340 nm con un espectrofotómetro para microplacas (Eon, BioTek Instruments) y la actividad enzimática se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Actividad enzimática (U/mL)} = \frac{\Delta\text{Abs} \cdot V_f \cdot 10^6}{6220 \cdot l \cdot V_m \cdot t}$$

siendo ε (NADH) = 6220 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; V_f , el volumen total (L) de la segunda reacción; V_m , el volumen (mL) de muestra empleado para la primera reacción; t , el tiempo de incubación (min) de la reacción catalizada por la GA y l , el paso óptico (cm). La actividad específica (U/mg) resultó de dividir la actividad enzimática por la concentración de proteína (mg/mL) de la muestra.

3.4.2. Método a tiempo real

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la GLS2, se midió el incremento de la fluorescencia del NADH en tiempo real en un lector de microplacas (FL600, BioTek Instruments), siguiendo el protocolo publicado por Stalneckner y colaboradores (2015), con algunas modificaciones. En una microplaca negra de poliestireno de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) se depositaron 101 μL de GLS2 purificada, a una concentración de 0.5 μM en tampón TE. Para el blanco, se sustituyó la muestra de proteína por un volumen equivalente de tampón TE. Se añadieron 24 μL de una solución que contenía GLUD y NAD^+ a la concentración necesaria para obtener 10 U/mL y 2 mM, respectivamente, en el volumen final de la reacción. Finalmente, se

añadieron 125 μL de una mezcla de Gln y K_2HPO_4 a la concentración necesaria para que quedaran a 20 mM y 50 mM, respectivamente, en el volumen final de la reacción.

El fluorímetro se precalentó a 37 °C y se seleccionaron las longitudes de onda de excitación (340 nm) y de emisión (460 nm). El intervalo cinético de medida fue de 10 s y el tiempo total de reacción fue de 10 min.

3.5. Cultivo y almacenamiento de cepas de *Escherichia coli*

Las diferentes cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo se cultivaron en medio líquido LB (Luria-Bertani). Para la obtención de colonias aisladas, las bacterias se cultivaron en placas Petri con medio LB-agar. La composición de los medios usados se indica en el Anexo I.

Las bacterias transformadas con plásmidos se cultivaron en medio LB o LB-agar con antibiótico de selección (ampicilina o kanamicina), a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Para la expresión de proteínas recombinantes, las bacterias transformadas se cultivaron en medio líquido 2xYT con el antibiótico correspondiente a la concentración indicada.

Las células se almacenaron a -80 °C en medio LB con glicerol 15 % (v/v).

3.6. Transformación de cepas de *E. coli*

3.6.1. Cepas de *E. coli* utilizadas

- DH5 α : empleada para el aislamiento y purificación de DNA plasmídico. Esta cepa presenta la mutación recA1, que reduce la posibilidad de que se produzca recombinación indeseada en el DNA clonado; además, carece de endonucleasa I, lo que mejora la calidad del DNA purificado.
- BL21: se usó para la expresión de proteínas con el vector pQE-31. Esta cepa carece de la proteasa Lon y de la proteasa de membrana externa OmpT, que pueden degradar proteínas durante la purificación.

Materiales y Métodos

- BL21(DE3): se utilizó para la expresión de proteína recombinante con los vectores pET. Esta cepa lleva un lisógeno del bacteriófago DE3 que contiene el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor inducible lacUV5.

3.6.2. Preparación de células competentes

Para poder introducir un vector plasmídico en *E. coli* (transformación) es necesario inducir un estado de competencia en las células. Para ello, se inocularon 3 mL de medio LB con una colonia procedente de una placa de cultivo y se incubaron toda la noche con agitación (200 rpm) a 37 °C. Al día siguiente, se inocularon 50 mL de medio LB con 200 µL del precultivo anterior. Este nuevo cultivo se incubó con agitación a 37 °C hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm entre 0.4 y 0.6. Las bacterias se recolectaron mediante centrifugación a 2500 g durante 5 min a 4 °C y se dispersaron en 15 mL fríos de MgCl₂ 100 mM. Tras centrifugar de nuevo en las mismas condiciones, las bacterias se dispersaron en 15 mL fríos de CaCl₂ 100 mM y se incubaron en hielo durante 30 min. Tras una última centrifugación, el precipitado bacteriano se dispersó en 3 mL fríos de CaCl₂ 100 mM con glicerol al 15 % (v/v) y se dividió en alícuotas de 500 µL, que se congelaron inmediatamente en nieve carbónica. Las células competentes se guardaron a -80 °C hasta su uso.

3.6.3. Transformación de células competentes

Para la transformación de las bacterias con un plásmido de interés, se añadieron 20 ng de este a 100 µL de la suspensión de células competentes (previamente descongeladas en hielo) y se incubaron durante 25 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 2 min, tras lo cual se dejaron enfriar en hielo durante 3 min. A continuación, se les añadió 1 mL de LB a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C durante 45 min con agitación. Se sembraron en placas de LB-agar que contenían el antibiótico de selección correspondiente para cada plásmido y se incubaron a 37 °C hasta el día siguiente.

3.7. Aislamiento y manipulación de DNA

3.7.1. Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se realizó a partir de cultivos saturados (incubación a 37 °C con agitación, durante toda la noche) de colonias aisladas

de células DH5 α , transformadas con el plásmido de interés. Al día siguiente, se procedió a la extracción y purificación del DNA plasmídico con el kit de miniprep *QIAprep* (QIAGEN), según las recomendaciones del fabricante.

La concentración del DNA purificado se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro UV-visible (*NanoDrop 2000c*, Thermo Fisher Scientific). Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de doble hebra. El cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm se empleó para analizar la pureza de la preparación. Se consideró una preparación de buena pureza aquella con un cociente comprendido entre 1.7 y 1.9.

3.7.2. Digestión de DNA plasmídico con endonucleasas de restricción

Para la digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción, se usaron 0.5-2 μg de plásmido y 5 unidades de enzima, en un volumen de 20 μL . La reacción se incubó durante 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. En el caso de digestiones dobles, se empleó un tampón de reacción compatible con las dos enzimas utilizadas.

3.7.3. Electroforesis de DNA

Los plásmidos digeridos con enzimas de restricción y los fragmentos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8 % (p/v). El tampón utilizado en la preparación del gel fue TAE 1x (ver Anexo I). Una vez fundida la agarosa en tampón TAE 1x en un microondas, se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50 $^{\circ}\text{C}$, se le añadió solución del fluoróforo *RedSafe 20000x* (iNtRON Biotechnology) hasta una concentración final de 1x y se dejó gelificar sobre el soporte para geles.

Las muestras se prepararon añadiendo tampón de carga de DNA 6x (ver Anexo I) hasta una concentración final de 1x. Como marcador de masa molecular se utilizó *MassRuler High Range DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific), con fragmentos de 1500 a 10000 pares de bases. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 50 V durante 10 min y luego se aumentó a 100 V, hasta que se observó la correcta separación de las bandas, que se visualizaron y registraron con el sistema *ChemiDoc*.

Materiales y Métodos

3.7.4. Purificación de fragmentos de DNA

Las bandas de interés en el gel de agarosa se visualizaron con luz ultravioleta (366 nm) y se cortaron con una hoja de bisturí estéril. El DNA se extrajo y se purificó con el kit E.Z.N.A Gel Extraction (Omega Bio-tek), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA se eluyó con 30 μ L de agua libre de nucleasas.

Para estimar la concentración de las muestras, se prepararon varias diluciones de estas y se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. En el mismo gel, se cargaron 5 μ L de marcador *MassRuler High Range DNA Ladder*. Con el programa ImageJ (National Institutes of Health), se midió el área de cada banda del patrón de DNA y se obtuvo la relación lineal entre cantidad de DNA (ng) e intensidad de fluorescencia. La concentración de cada fragmento de DNA se estimó por interpolación de su intensidad de fluorescencia en la recta patrón.

3.7.5. Subclonación de fragmentos de DNA en plásmidos

Para subclonar fragmentos de DNA (insertos) en vectores plasmídicos, se empleó la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific). Se usaron 50 ng de vector y dos relaciones molares de inserto: plásmido (1:1 y 3:1), en un volumen de reacción de 10 μ L. La reacción de ligación se incubó a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se transformaron bacterias de la cepa DH5 α y se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico correspondiente. De cada placa, se seleccionaron varias colonias al azar y se sembraron en medio LB con antibiótico para purificar el DNA plasmídico. Se comprobó la presencia del inserto mediante digestión de los plásmidos con enzimas de restricción y posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa.

3.8. Expresión heteróloga de GLS2 en *E. coli* y purificación

3.8.1. Síntesis de los plásmidos de expresión

La estrategia para la subclonación de la secuencia codificante de la GLS2 humana en vectores de expresión se basó en la generación de sitios de restricción a ambos lados de dicha secuencia, mediante la técnica de PCR con cebadores provistos de un sitio de restricción. Como molde para las reacciones de PCR se utilizó el clon de cDNA AF110330 de la isoenzima GAB humana, obtenido en nuestro laboratorio a partir de células de la línea de cáncer de mama humano ZR75-1 (Gómez-Fabre *et al.*, 2000) y

subclonado en el vector pGEM-T-Easy (Invitrogen). El cDNA completo consta de 2408 pb, con un marco abierto de lectura de 1806 pb que codifica una proteína de 602 residuos, con una masa molecular teórica de 663 kDa (Gómez-Fabre *et al.*, 2000). La enzima empleada en las reacciones de PCR fue la KlenTaq polimerasa del kit Advantage cDNA Polimerasa de alta fidelidad (Clontech). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ L, con los siguientes componentes: dNTPs, 200 μ M; molde, 50 ng; Advantage DNA *polymerase mix* 1x; cebador sentido (FW), 80 nM; cebador antisentido (RV), 80 nM.

Para obtener GLS2 recombinante con actividad enzimática, se expresaron tres formas truncadas de la proteína (ver Anexo III), cuyas secuencias codificantes se subclonaron en vectores pET (Novagen). En estos vectores, la transcripción de la secuencia codificante de interés está bajo el control del promotor T7, derivado del promotor ϕ 10 del bacteriófago T7. Las distintas GLS2 truncadas se obtendrían como proteínas de fusión que presentarían en su extremo N-terminal una etiqueta de seis residuos de histidina (6xHis), para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC, *immobilized-metal affinity chromatography*) y, a continuación, una secuencia de escisión reconocida por la proteasa trombina:

- GLS2₆₂₋₄₈₃: carece del exón 1 (residuos 1-61) y de los exones 15-18 (residuos 484-602); masa molecular teórica de la proteína recombinante: 48.8 kDa (46.5 kDa GLS2₆₂₋₄₈₃ + 2.3 kDa etiqueta 6xHis y secuencia de escisión por trombina).
- GLS2₅₆₋₆₀₂: carece de los primeros 55 residuos (la mayor parte del exón 1); masa molecular teórica de la proteína recombinante: 62.8 kDa (60.5 kDa GLS2₅₆₋₆₀₂ + 2.3 kDa etiqueta 6xHis y secuencia de escisión por trombina).
- GLS2₇₃₋₆₀₂: carece de los primeros 72 residuos (exón 1 y parte del exón 2); masa molecular teórica de la proteína recombinante: 60.8 kDa (58.6 kDa GLS2₇₃₋₆₀₂ + 2.3 kDa etiqueta 6xHis y secuencia de escisión por trombina).

Se diseñaron los siguientes cebadores (sitios de restricción en **negrita**; primer codón de la secuencia codificante (en cebadores FW) y codones de parada (en cebadores RV) subrayados):

A. FW 56: 5'-**CATATG** CCG CAG CAC CAG GAT C-3'

B. FW 62: 5'-**CATATG** GAT TCA TCA GAA AGT GGC ATG CTG-3'

Materiales y Métodos

C. FW 73: 5'-CATATG GGT GAT TTG CTC TTT TAC ACT ATT GC-3'

D. RV 483: 5'-GCGGCCGC TTA CCG AAT TTC TGC CCC TTC-3'

E. RV 602: 5'-GCGGCCGC TCA TAC CAT GCT TTC TAA G-3'

Las parejas de cebadores fueron: A y E para GLS2₅₆₋₆₀₂; B y D para GLS2₆₂₋₄₈₃; y C y E para GLS2₇₃₋₆₀₂. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial: 94 °C, 1 min; 30 ciclos: 94 °C durante 30 s y 68 °C durante 3 min; extensión final: 68 °C, 3 min.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa, se purificaron y se ligaron en el vector pGEM-T-Easy, como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, se liberaron mediante digestión con las correspondientes enzimas de restricción y se subclonaron en los vectores pET digeridos previamente con las mismas enzimas. La secuencia codificante de GLS2₇₃₋₆₀₂ se subclonó en los sitios *NdeI* y *NotI* del vector pET-15b; las secuencias codificantes de GLS2₅₆₋₆₀₂ y GLS2₆₂₋₄₈₃ se subclonaron en los mismos sitios del vector pET-28b. En la Fig. 3.1 se muestra el esquema de una de estas construcciones.

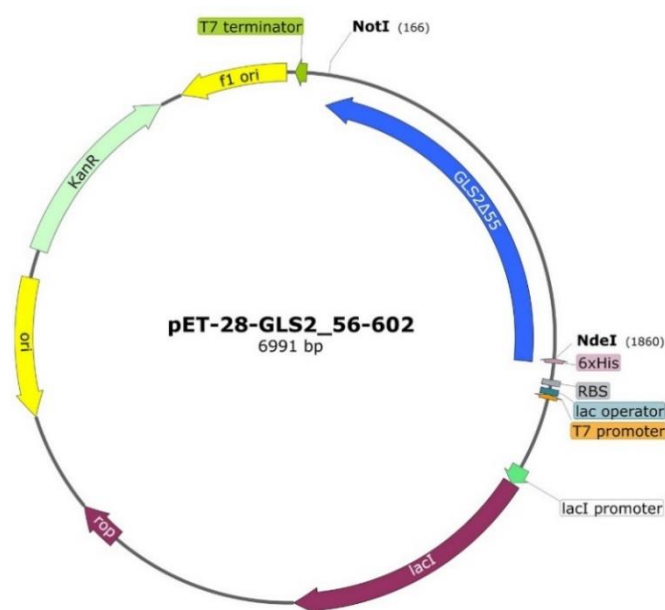


Figura 3.1. Plásmido pET-28b con la secuencia codificante de una de las formas truncadas de GLS2 (56-602), para su expresión en *E. coli*. *KanR*: gen que confiere la resistencia a kanamicina; *RBS*: sitio de unión al ribosoma; *6xHis*: secuencia que codifica la etiqueta de seis residuos de histidina que permite la purificación por cromatografía IMAC; *ori*: origen de replicación; *rop*: gen que codifica la proteína rop, que mantiene un bajo número de copias del

plásmido; *T7 promoter*: promotor para la RNA polimerasa del bacteriófago T7; *NdeI* y *NotI*: sitios de restricción elegidos para la subclonación del inserto GLS2₅₆₋₆₀₂.

3.8.2. Inducción de la expresión de GLS2 recombinante

Con cada una de las construcciones descritas en el apartado anterior, se transformaron bacterias de la cepa BL21(DE3). Se inoculó medio LB-kanamicina (50 µg/mL) con una colonia individual procedente de una placa fresca y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación (200 rpm). Al día siguiente, se inoculó con este precultivo un volumen mayor de medio de cultivo (relación 1:100), conteniendo kanamicina a una concentración de 50 µg/mL. Se probaron cuatro medios (ver Anexo I) para la expresión de GLS2 recombinante en bacterias:

- medio LB, para inducción con IPTG.
- medio 2xYT, para inducción con IPTG.
- medio ZYP-5052, para autoinducción (Studier, 2014).
- medio ZYM-5052 con trazas de metales, para autoinducción metálica (Studier, 2014).

Se probaron varias concentraciones de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), agente químico y análogo estructural no metabolizable de la alolactosa, que se une al represor del operón *lac* e induce la expresión del gen. La temperatura a la que se llevó a cabo la expresión fue otra variable importante que se chequeó.

3.8.3. Purificación de GLS2 recombinante mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Tras la expresión de cada una de las formas truncadas de GLS2 en *E. coli*, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 8000 g durante 15 min a 4 °C y las células se dispersaron en tampón de lisis (ver Anexo I), al que se había añadido un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete, EDTA-free Protease Inhibitor*, Roche). Para 1 L de cultivo, las bacterias se lisaron mediante sonicación durante 10 min, aplicando pulsos de ultrasonido de 10 s cada uno, con una amplitud del 40 %, separados por 10 s de reposo. Cuando el volumen de cultivo fue menor, se redujo el tiempo total de sonicación. El lisado

Materiales y Métodos

se centrifugó a 20000 g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido (extracto soluble) se pasó por un filtro de 0.45 µm (Sartorius).

Para preparar la fase estacionaria, se empaquetaron 3 mL (para 1 L de cultivo) de resina *Chelating Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) en una columna de cromatografía *Econo-column* (Bio-Rad). Se lavó con agua, para eliminar todo el etanol 20 % que contenía como medio de conservación, y se pasaron dos volúmenes de columna (CV) de NiCl₂ 0.1 M. A continuación, la resina se lavó con 5 CV de agua, para eliminar todo el níquel libre, y se equilibró con 5 CV de tampón de lisis. Todo el procedimiento posterior se llevó a cabo en una cámara fría a 4 °C (para evitar la desnaturalización de la proteína). Se utilizó una bomba peristáltica para mantener un flujo continuo de 1 mL/min. El extracto soluble se recirculó dos veces por la columna, tras lo cual se lavó con un mínimo de 5 CV de tampón de lisis y, posteriormente, con 2 CV de tampón de lavado 1 (L1) y 2 CV de tampón de lavado 2 (L2) (ver Anexo I). Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con un tampón que contenía imidazol 450 mM, y se recogieron fracciones de 1 mL. Alícuotas de todos los pasos de la purificación se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE para monitorizar el proceso.

3.9. Expresión heteróloga de GLS2 en células de insecto

Para producir la proteína GLS2 humana en cultivos de células de insecto, empleando el sistema de expresión basado en baculovirus, se siguieron los siguientes pasos:

- establecimiento del cultivo de células Sf21.
- síntesis de los vectores de transferencia con la secuencia codificante de GLS2 completa y trunca.
- transformación de bacterias que contienen un DNA modificado de baculovirus (bácmido) con el vector de transferencia, para que ocurra la transposición.
- aislamiento del bácmido que contiene la secuencia codificante de GLS2.
- transfección de células de insecto Sf21 con el bácmido GLS2.
- obtención de virus recombinantes.
- optimización de la expresión de GLS2 en células Sf21.

3.9.1. Cultivo de células de insecto Sf21

Las células de insecto Sf21 (derivadas del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*) se cultivaron en suspensión en medio Sf-900 II (Thermo Fisher Scientific) sin suero. Se emplearon matraces Erlenmeyer, con una proporción volumen de medio/volumen del matraz siempre por debajo de 1/4, y se mantuvieron con agitación constante en un incubador, sin intercambio de gases, a 27 °C. La densidad del cultivo estuvo siempre entre 0.5×10^6 y 4×10^6 células/mL. Para disponer de una reserva de células con bajo número de pases, estas se preservaron en viales de congelación, a una densidad de 1.5×10^7 células/mL, en nitrógeno líquido. Las células en cultivo se recolectaron por centrifugación (1000 g, 5 min) y se les añadió medio de criopreservación, compuesto por volúmenes iguales de medio condicionado de cultivo y medio fresco, con DMSO 7.5 % (v/v). La suspensión celular, a la densidad indicada, se pasó a viales de congelación, que se mantuvieron entre 24 y 48 h a -80 °C. Transcurrido este tiempo, se introdujeron en un contenedor de nitrógeno líquido. Para iniciar un nuevo cultivo, el contenido de un criovial se descongeló rápidamente (1-2 min) y se añadió a 25 mL de medio Sf-900 II atemperado a 27 °C.

3.9.2. Síntesis de los plásmidos de transferencia

Para la expresión de GLS2 en células de insecto se usó el sistema de expresión de baculovirus MultiBac, basado en el fenómeno de transposición Tn7 (Berger *et al.* 2004). Se diseñaron dos construcciones con la secuencia codificante de GLS2 empleando el vector de transferencia pFastBac1: una de ellas con la secuencia codificante completa (pFastBac1-GLS2₁₋₆₀₂), y otra con la secuencia truncada de GLS2₅₆₋₆₀₂ (pFastBac1-GLS2₅₆₋₆₀₂). Estos dos plásmidos de transferencia fueron sintetizados y optimizados para expresión en células de insecto por el Servicio de Expresión de Proteínas Recombinantes de GenScript. En el vector pFastBac1, la transcripción de la secuencia codificante de interés está bajo el control del promotor del gen de poliedrina del baculovirus. En ambas construcciones, la GLS2 recombinante se producirá con una etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal (Fig. 3.2).

Materiales y Métodos

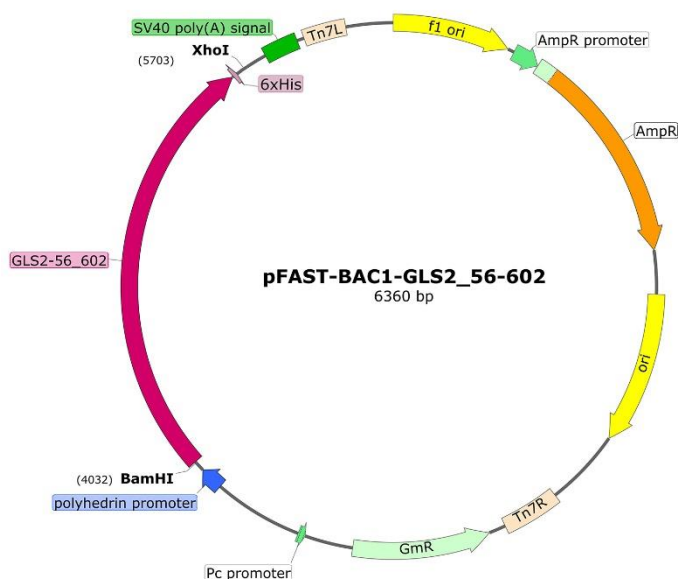


Figura 3.2. Plásmido pFastBac1 con la secuencia codificante de GLS2₅₆₋₆₀₂. *AmpR*: gen que confiere resistencia a ampicilina; *GmR*: gen que confiere resistencia a gentamicina; *6xHis*: secuencia que codifica la etiqueta de seis residuos de histidina, para la purificación por cromatografía IMAC; *ori*: origen de replicación; *Tn7L/R*: sitios de transposición.

3.9.3. Preparación de los b́acmidos GLS2

Con el sistema MultiBac, la secuencia codificante de la proteína de interés (GLS2), presente en el plásmido de transferencia, se integra mediante transposición Tn7 en un genoma modificado del baculovirus, mantenido como un b́acmido en una cepa especial de *E. coli*. En este trabajo, se empleó la cepa DH10EMBacY, que porta un derivado del b́acmido MultiBac denominado EmBacY. Este nuevo b́acmido contiene la secuencia codificante de YFP (*Yellow fluorescent protein*) bajo el control del promotor de poliedrina (al igual que el gen de interés), lo que permite monitorizar fácilmente el título del virus y la expresión de la proteína de interés. Esta cepa también posee un plásmido auxiliar que expresa una transposasa Tn7 (Fig. 3.3).

Para la producción del b́acmido GLS2, se transformaron 100 μ L de células DH10EmBacY competentes con 100 ng de plásmido de transferencia. Tras añadir el plásmido, las células se incubaron en hielo durante 20 min y, a continuación, se sometieron a un choque térmico de 42 $^{\circ}$ C durante 45 s. Después, se incubaron en hielo durante 2 min y se les añadieron 400 μ L de medio LB sin antibióticos. Se incubaron a 37 $^{\circ}$ C, con agitación, durante toda la noche para favorecer la integración del gen de interés

en el b́acmido. Al d́a siguiente, se sembraron en placas de LB-agar con kanamicina, tetraciclina, gentamicina, IPTG y Blu-Gal (ver Anexo I) y se incubaron a 37 °C durante la noche.

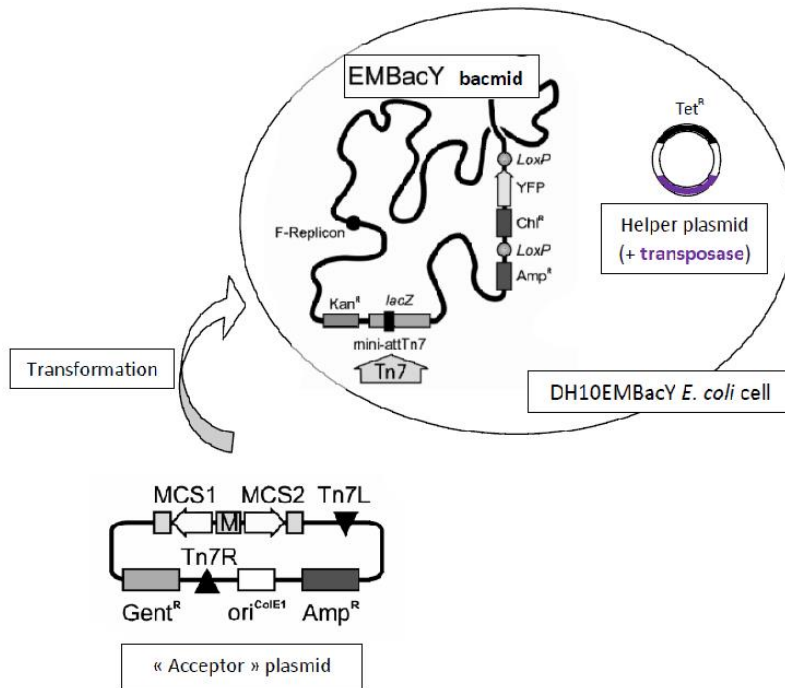


Figura 3.3. Formaci3n del b́acmido recombinante GLS2 por transposici3n. MCS: sitio de clonaci3n m3ltiple; Tn7L/R: sitios de transposici3n; AmpR, GentR, KanR, TetR: genes que confieren resistencia a ampicilina, gentamicina, kanamicina y tetraciclina, respectivamente; YFP: secuencia codificante de YFP (*Yellow fluorescent protein*); lacZ: gen que codifica el p3ptido α de la β -galactosidasa.

Debido a que el sitio de transposici3n Tn7 del b́acmido est3 insertado en un gen *lacZ α* (que codifica el p3ptido α de la β -galactosidasa), la integraci3n con 3xito del *cassette* de expresi3n permite el cribado azul/blanco de los recombinantes positivos en las citadas placas. Aquellas colonias que hayan perdido la actividad β -galactosidasa, como consecuencia de la integraci3n por transposici3n del gen de inter3s, mostrar3n un fenotipo blanco.

Los transformantes positivos se volvieron a sembrar en una nueva placa para validar su fenotipo; adem3s, se seleccion3 una colonia azul como control. Al d́a siguiente, se seleccionaron dos clones de cada construcci3n y se purificaron los b́acmidos

Materiales y Métodos

recombinantes con el kit de miniprep QIAprep (QIAGEN), según las recomendaciones del fabricante.

3.9.4. Obtención de la primera generación del virus (V_0)

Para obtener los baculovirus recombinantes, se transfectaron células Sf21 con los bácmidos purificados. En placas de 6 pocillos, se sembraron 0.5×10^6 células por pocillo, en un volumen de 3 mL de medio Sf-900 II sin suero. A continuación, se mezclaron 100 μL de medio de cultivo con 10 μL de agente de transfección *X-tremeGENE* (Sigma), en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Al tubo que contenía todo el DNA bácmido recombinante extraído previamente, se le adicionaron 200 μL de medio y se añadieron a la mezcla de transfección. Finalmente, se dispensaron 150 μL de la disolución resultante sobre cada pocillo (muestra y duplicado), gota a gota. Al mismo tiempo, se establecieron dos pocillos control: uno contenía células no transfectadas y otro sólo medio de cultivo. De esta forma, se preparó una placa para cada plásmido (Fig. 3.4). Las placas se incubaron a 25 °C y en oscuridad durante 72 h.

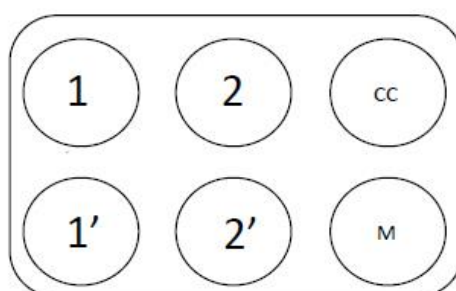


Figura 3.4. Placa para la transfección de células Sf21 con el bácmido GLS2. Los pocillos 1 y 1' corresponden al clon 1 y los pocillos 2 y 2' al clon 2 de un mismo bácmido. CC: pocillo control que contiene células sin transfectar. M: pocillo control sólo con medio de cultivo, sin células.

Tras 72 h de incubación, las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia para observar la expresión de la proteína YFP. Cuando el número de células fluorescentes por pocillo fue mayor de 200, se recogió el medio de cultivo, que contenía la primera generación del virus (V_0), y se conservó a 4 °C protegido de la luz. A continuación, se añadieron a cada pocillo 3 mL de medio de cultivo fresco. Las placas se mantuvieron a 25 °C, en oscuridad durante 48-60 h.

3.9.5. Comprobación de la expresión de la proteína GLS2 recombinante

Dos días después de la obtención del virus V_0 , se analizó la expresión de GLS2 en las placas de 6 pocillos. Para ello, las células se lavaron con tampón PBS (ver Anexo I) frío y se despegaron de cada pocillo de forma mecánica, añadiendo 500 μ L de PBS para recogerlas en un tubo de 1.5 mL. A continuación, se lisaron mediante sonicación (*Vibra-cell VCX 750*, SONICS) durante 10 s y con el 30 % de amplitud. Los lisados se centrifugaron a 16000 g durante 3 min y se separaron sobrenadante y precipitado.

A las muestras de sobrenadante y precipitado de cada clon y al control se les añadió tampón de carga de electroforesis y se calentaron durante 5 min a 95 °C. Las proteínas se separaron por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida, conteniendo un gradiente del 4-12% de T (*Novex Tris-Glycine*, Invitrogen), y se tiñeron posteriormente con azul de Coomassie.

3.9.6. Obtención de la segunda generación del virus (V_1)

Inmediatamente después de recolectar los virus de bajo título V_0 , se amplificaron en matraces Erlenmeyer que contenían 25 mL de suspensión de células Sf21 a una densidad de 0.5×10^6 células/mL. Se añadieron 3 mL de V_0 y las células se contaron cada 24 h. La aparición y el aumento del número de células fluorescentes en estas muestras se monitorizaron depositando 100 μ L del cultivo en una placa de 96 pocillos y observándola en el microscopio bajo un filtro de fluorescencia. Cuando el valor de la densidad celular no mostró variación con respecto al día anterior (DPA: *Day after Proliferation Arrest*), el cultivo se centrifugó a 1000 g durante 10 min y el sobrenadante, que contenía los virus amplificados (generación V_1), se conservó a 4 °C protegido de la luz. Se añadió medio fresco al precipitado celular y se mantuvo en cultivo. Se recogieron muestras de 10^6 células cada 24 h y se evaluaron mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE e inmunotransferencia western.

3.9.7. Optimización de la expresión de GLS2 en células de insecto

Tras detectar las primeras células fluorescentes en el cultivo infectado con el stock vírico V_1 , se recogieron alícuotas de 10^6 células cada 24 h. Las alícuotas se dispersaron en 500 μ L de PBS frío, se sonicaron (como se indicó anteriormente) y se centrifugaron a 14000 g durante 10 min. A continuación, se determinó la fluorescencia de estas muestras

Materiales y Métodos

utilizando 100 μ L de cada sobrenadante, que se depositaron en una placa negra de 96 pocillos (BD Falcon) y analizaron en un fluorímetro *Spark multimode reader* para placas de 96 pocillos (Tecan), empleando una longitud de onda de excitación de 513 nm y una longitud de onda de emisión de 529 nm. Con los resultados de la medida de fluorescencia cada 24 h, se elaboró una curva donde se representaron los valores de fluorescencia frente al tiempo. La fase meseta de la curva indicó el máximo de fluorescencia y el tiempo apropiado para la recolección de las células. Este resultado se comparó con el análisis de la expresión de GLS2 recombinante mediante inmunotransferencia western, realizado con las alícuotas recogidas cada 24 h y utilizando un anticuerpo frente a la etiqueta 6xHis (Tabla 3.1) a una dilución 1:500 en TTBS + leche desnatada 3 % (p/v).

Para determinar la cantidad óptima de virus V_1 que debíamos añadir al cultivo, se prepararon cultivos de 25 mL de volumen a una densidad celular de 0.5×10^6 células/mL. A cada cultivo, se le añadió un volumen de virus diferente para determinar la multiplicidad de la infección (MOI, número de partículas virales que infectan una célula). Se monitorizaron los cultivos, se realizaron las medidas de fluorescencia y se detectó la presencia de GLS2 mediante inmunotransferencia western siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

3.10. Purificación de GLS2 recombinante expresada en células de insecto

Las células infectadas se recogieron por centrifugación a 1000 g durante 15 min y se conservaron a -80 °C hasta su uso. En la purificación de las proteínas recombinantes GLS2, de secuencia completa y truncada, se emplearon las mismas etapas de aislamiento, que consistieron en una cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) y una cromatografía de exclusión molecular (SEC) o filtración en gel. Ambas columnas se acoplaron a un sistema de cromatografía *AKTApriime* (GE Healthcare).

3.10.1. Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Para la purificación por IMAC, todos los tampones (ver Anexo I) se prepararon con agua desionizada, se filtraron con filtros de 0.45 μ m y se desgasificaron. El precipitado celular se descongeló en hielo y se dispersó en tampón de lisis frío, al que se le añadieron inhibidores de proteasas. La suspensión celular se sonicó con tres ciclos de pulsos de 10 s, manteniendo entre ellos 10 s de reposo, con una amplitud del 40 %. Se observó la opacidad del lisado y, en caso necesario, se repitieron los ciclos de sonicación.

La muestra se centrifugó durante 40 min a 40000 g y 4 °C. El sobrenadante se decantó con cuidado y se filtró con un filtro de 0.45 µm.

En esta cromatografía empleamos una columna de 5 mL de volumen de lecho (*HisTrap HP*, GE Healthcare). La columna se lavó y equilibró según las especificaciones del fabricante y, a continuación, se cargó la muestra a un flujo de 1 mL/min. La columna se lavó con tampón de lisis a 1 mL/min y se mantuvo este lavado hasta que la línea del cromatograma (absorbancia a 280 nm) volvió a la línea base. Posteriormente, se realizó un gradiente con tampón de elución del 0 al 18%, seguido de una etapa isocrática al 18% hasta que la absorbancia volvió a la línea base de nuevo. En ese punto, se volvió a restablecer el gradiente con el tampón de elución hasta alcanzar el 100 %, recogándose fracciones de 1 mL que se analizaron mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Las bandas se revelaron por tinción con azul de Coomassie y los geles se documentaron con un sistema *ChemiDoc*. Aquellas fracciones que contenían la proteína GLS2 con mayor grado de pureza se combinaron y se concentraron por ultrafiltración, empleando filtros Amicon Ultra-15 de 30 kDa de límite de exclusión.

3.10.2. Cromatografía de exclusión molecular (SEC) o filtración en gel

Para la cromatografía de exclusión molecular se usó una columna de 120 mL de volumen de lecho (*Sephacryl S-200 High Resolution HiPrep 16/60*, GE Healthcare), capaz de resolver proteínas entre 5 y 250 kDa de masa molecular. La columna se calibró con marcadores de masa molecular entre 12 y 200 kDa (Sigma). Se emplearon dos equipos de cromatografía diferentes, el sistema *ÅKTAprime* y el sistema *BioLogic* (Bio-Rad). El agua, etanol 20 % y tampón SEC (ver Anexo I) se filtraron y se desgasificaron. La columna se lavó y equilibró siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La muestra, procedente de la primera cromatografía, se concentró hasta aproximadamente 500 µL y se introdujo en el equipo FPLC, empleando un inyector de muestra con un bucle (*loop*) de 1 mL. El flujo se mantuvo constante a 0.5 mL/min. Se recogieron fracciones de 500 µL y se analizaron mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, como en el paso anterior. Posteriormente, la muestra purificada se utilizó para montar placas de cristalización o, alternativamente, se conservó a -80 °C hasta su uso. Las fracciones de mayor pureza se combinaron y concentraron hasta un volumen de, aproximadamente, 100 µL. La concentración de la muestra se determinó en un

Materiales y Métodos

espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* midiendo la absorbancia a 280 nm. Asumimos que 1 unidad de absorbancia = 1 mg/mL y realizamos una normalización o corrección de la línea base a 340 nm.

3.11. Ensayo de desplazamiento térmico o Termofluor (*Thermal Shift Assay/Thermofluor*)

Con el fin de optimizar los componentes de las disoluciones y fases móviles en la purificación de GLS₂₅₆₋₆₀₂, se realizó el ensayo Termofluor con la proteína purificada disuelta en distintas concentraciones salinas y en tampones a diferentes concentraciones y pH. Este ensayo se basa en el incremento de la fluorescencia producido cuando un agente fluorescente (*SYPRO Orange*) interacciona con las zonas hidrófobas expuestas de la proteína, a medida que esta va desplegando su estructura terciaria (desnaturalización) como consecuencia del aumento progresivo de la temperatura (Fig. 3.5).

Se preparó una solución de *SYPRO Orange* 9.5x (Invitrogen) en 2.01 mL de tampón HEPES 100 mM pH 7.5 y NaCl 150 mM. Para calcular el volumen de proteína necesario para alcanzar una concentración final de 10 µM en el ensayo en cada pocillo, se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_{proteína} = \frac{400 \times MW_{proteína} \times 10^{-3}}{C_{proteína}}$$

donde $V_{proteína}$ es el volumen de proteína para cada pocillo en µL, $MW_{proteína}$ es la masa molecular de la proteína en kDa y $C_{proteína}$ es la concentración de la proteína en mg/mL. En cada pocillo, se añadió primero el tampón de ensayo y, seguidamente, la proteína, de tal forma que el volumen final fuese de 20 µL. Posteriormente, se añadieron 21 µL de la solución de *SYPRO Orange* 9.5x y se selló la placa de PCR con una lámina transparente (Bio-Rad). Se seleccionaron los parámetros del termociclador para qPCR (*Mx3005P*, Stratagene): longitudes de onda de excitación/emisión: 492/568 nm, 1 min de fase meseta, incrementos de 1 °C, temperatura de comienzo de 25 °C, 72 ciclos (Mariaule *et al.*, 2014).

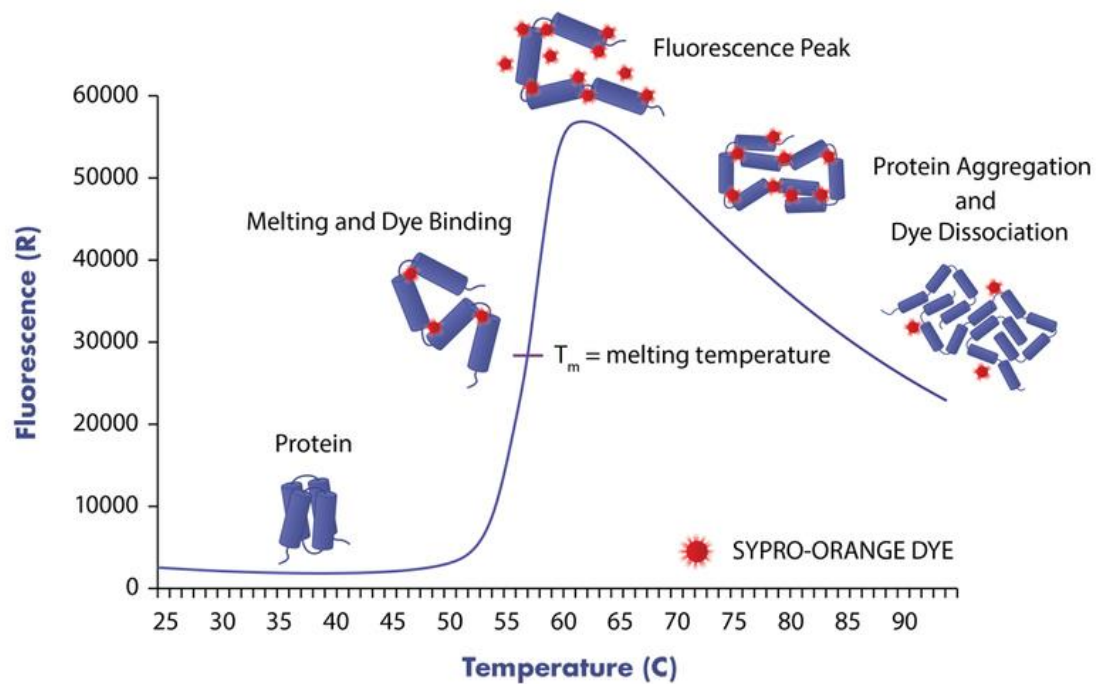


Figura 3.5. Esquema del ensayo Termofluor. Se mide la temperatura a la que la proteína se encuentra desnaturalizada al 50 % (temperatura de fusión, T_m). Imagen obtenida de <https://www.reactionbiology.com/services/biophysical-assays/thermal-shift-assay-tsa>.

3.12. Placas de cristalización

Los ensayos de cristalización se llevaron a cabo en el servicio de cristalización de proteínas del *High Throughput Crystallization Lab (HTXL)* del *European Molecular Biology Lab (EMBL)*, ubicado en Grenoble (Francia) y bajo la supervisión del Dr. José A. Márquez, un experto a nivel mundial en cristalización y caracterización de proteínas. Mediante la técnica de difusión de vapor en gota asentada (*sitting drop*) para la cristalización de proteínas, y empleando un robot Mosquito-LCP (TTP Labtech), las muestras de proteína pura se colocaron en placas de 96 pocillos, en diferentes condiciones. En cada pocillo se colocaron un máximo de tres gotas compuestas por diferentes proporciones muestra:solución precipitante (Fig. 3.6) (Cipriani *et al.*, 2012; Márquez & Cipriani, 2014). Se probaron diferentes variables: concentración de proteína, pH, concentración de los componentes de la solución precipitante, y aditivos y temperatura (4°C o 20°C).

Materiales y Métodos

A

Sitting drops protocols						
Set up	Standard	2 ratios		3 ratios		
Ratio	1:1	1:1	2:1	1:3	1:1	3:1
Sample	100nl	100nl	100nl	50nl	100nl	150nl
Precipitant	100nl	100nl	50nl	150nl	100nl	50nl

B

Figura 3.6. Tabla de las proporciones muestra:solución precipitante (<https://htxlab.embl.fr>) (A) y esquema de la técnica de cristalización por evaporación en gota asentada (*sitting drop*) (B). Se representa el proceso de equilibrio, mediante la fase vapor, de la gota asentada en la placa, que contiene la proteína, con el reservorio de mayor volumen que contiene sólo la solución precipitante. La concentración de agente precipitante (ppt) en la gota es menor, por lo que en el sistema estanco la presión de vapor del agua es mayor en la gota. Esto provoca su evaporación y condensación en la solución precipitante, hasta que se alcanza el equilibrio cuando la osmolaridad de la gota es igual a la del reservorio. Se produce entonces la disminución del volumen de la gota, aumentando así la concentración de la proteína significativamente hasta llegar a la zona de sobresaturación (Deller & Rupp, 2014).

Las placas de cristalización comerciales empleadas fueron *PEGs-I_Qiagen* (bajas concentraciones de sales en polietilenglicol (PEG) 3350 y un rango amplio de PEGs de distintas masas moleculares a diferentes pH), *Classics-Suite_Qiagen* (sales y soluciones precipitantes a altas concentraciones en un rango de pH entre 4.6-8.5), *Salt-Grid_Hampton* (fosfato sódico y potásico a un pH entre 5.0-8.2) (Hampton Research), *PACT_MD* (diferentes concentraciones de PEG e iones a pH entre 4.0-9.0), *JCSG_MD* (varis concentraciones de PEG y sales, polialcoholes y compuestos orgánicos, ácidos orgánicos neutralizados y un rango de pH 4.0-10.0), *ProPlex_MD* (PEGs de alta y media masa molecular a bajas concentraciones y en un rango de pH desde 4.0-8.5), *Morpheus_MD* (contiene aditivos de baja masa molecular como monosacáridos, halógenos, ácidos carboxílicos, etc., además de cuatro grupos de agentes precipitantes y tampones como HEPES, MOPS, Tris, etc.), *Wizard_I+II_rigaku* (sales de sodio, calcio, litio y zinc, tampones usados comúnmente como HEPES, CHES, Tris, etc., en un rango de pH 4.0-10 y soluciones precipitantes más empleadas como PEGs, sulfato de amonio, polialcoholes y sales de sodio y potasio) (Molecular Dimension) y *JBS-classic-I_Jena*

(concentraciones de PEGs de diferente masa molecular como precipitante, en un rango de pH entre 4.6-9.0) (Jena Bioscience). Además, se diseñó una placa no comercial para probar diferentes condiciones, ajustadas como resultado de ensayos preliminares.

Tras los resultados aportados por las 40 placas comerciales y teniendo en cuenta las condiciones de cristalización publicadas en la bibliografía (PDB, Protein Data Bank) para las isoenzimas GLS y GLS2, se diseñaron 48 condiciones para un volumen final del pocillo de 200 μ L (Fig. 3.7).

En la línea A, se estableció un incremento en la concentración de sulfato de litio desde 1.4 M hasta 2 M, desde el pocillo A1 hasta el A12, mientras que se mantuvieron constantes los demás componentes de la solución precipitante: DMSO 3 % y BIS-Tris propano 0.1 M, pH 7. La fila B fue una réplica de A. En las líneas C y D, se estableció la misma formulación que en A, pero se suprimió el DMSO. En las líneas E y F se mantuvo la formulación de las líneas C y D, excepto el tampón, que fue Tris 0.1 M, pH 8.0. Por último, en las líneas G y H se mantuvieron constantes PEG 3350 25 % (p/v) y Tris 0.1 M, pH 8.0, mientras que se incrementó la concentración de cloruro sódico de 0.2 M hasta 1 M, en los pocillos G/H1 hasta G/H12.



Figura 3.7. Esquema de la distribución de cada componente de la disolución precipitante en una placa de 96 pocillos.

Las imágenes de las gotas dentro de los pocillos de cada placa se recopilaron de forma automática (sistema RockImager, Formulatrix Inc.), siguiendo el calendario establecido (2 días, 4 días, 8 días, 20 días, 34 días, 63 días y 88 días). Todas las imágenes

Materiales y Métodos

se pudieron revisar en la plataforma CRIMS (*Crystallographic Information Management System*, www.crimms-project.eu).

3.13. Expresión y purificación de GIP (*Glutaminase-Interacting Protein*)

La GIP, una proteína de la familia PDZ, fue identificada por nuestro grupo como proteína que interacciona con la isoenzima GAB (codificada por el gen *GLS2*) mediante la técnica de doble híbrido en levaduras (Olalla *et al.*, 2001). Para la expresión de GIP, la secuencia codificante de la proteína se insertó en el vector pQE-31 (Aledo *et al.*, 2001), que posee un promotor T5 inducible por IPTG. Se procedió con la misma metodología de transformación y cultivo de la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, ya descrita anteriormente (apartados 3.6.3 y 3.8.2), con la excepción del antibiótico de resistencia empleado que, en este caso, fue ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Para la inducción de la expresión se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se incubó a 30 °C durante 5 h. Las bacterias se recolectaron por centrifugación y se dispersaron en tampón A (ver Anexo I). La muestra se sometió a 10 ciclos de sonicación en hielo, que consistieron en 10 s de pulso ultrasónico y 10 s de reposo. Se centrifugó a 25000 g durante 40 min y el sobrenadante se filtró. La purificación se realizó mediante cromatografía IMAC, con un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM para la elución. Se recogieron fracciones de 1 mL y se evaluaron mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

3.14. Purificación de GLS2, producida en células de insecto Sf9, mediante cromatografía de afinidad en columna GIP

La interacción que se produce entre el extremo C-terminal de GLS2 y el dominio PDZ de GIP nos permitió purificar la proteína GLS2, expresada en la línea Sf9 de células de insecto, sin ninguna etiqueta fusionada a su secuencia aminoacídica. La proteína GIP purificada se concentró hasta 5 mL mediante ultrafiltración, como se ha descrito anteriormente, y se dializó (*SnakeSkin Dialysis Tubing*, Thermo Fisher Scientific) frente a 5 L de tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3), durante 36 h y con un cambio de tampón a las 24 h. Se pesó la cantidad de resina de afinidad (*CNBr-activated Sepharose 4B*, GE Healthcare) necesaria para obtener un volumen de columna de 2 mL y se procedió a la unión covalente de GIP a la resina activada, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En nuestro grupo, se había descrito anteriormente la expresión y purificación de la proteína recombinante GLS2 (isoenzima GAB) (Campos-Sandoval *et al.*, 2007), en células de insecto mediante el sistema *Bac-N-Blue* (Invitrogen). Empleando baculovirus de alto título, se infectaron cultivos en suspensión de células de la línea Sf9 (derivadas de *Spodoptera frugiperda*). Después de 4 días de cultivo a 27 °C y en agitación, las células se recolectaron por centrifugación y se conservaron a -80 °C.

Para la purificación de la proteína se introdujeron algunas modificaciones en el protocolo original. A un total de 6×10^8 células se les añadieron 20 mL de tampón de lisis Sf9 (ver Anexo I) y se sonicaron en hielo, empleando ciclos de 10 s de sonicación y 10 s de reposo, durante 6 min. El extracto celular total obtenido se centrifugó a 25000 g y 4 °C durante 40 min y, posteriormente, el sobrenadante (extracto soluble) se filtró con filtros de 0.45 μm .

Todo el proceso de purificación se llevó a cabo en una cámara fría a 4 °C. El extracto soluble se recirculó dos veces por la columna de afinidad que contenía la proteína GIP. Posteriormente, se lavó con 5 CV de tampón de lisis y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl desde 150 mM hasta 1M. Se recogieron un total de 40 fracciones de 1 mL, que se analizaron mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Tras desteñir los geles, se seleccionaron aquellas fracciones de mayor pureza, se concentraron y la muestra resultante se conservó a -80 °C.

3.15. Interferometría de biocapa (BLI)

Mediante la técnica BLI se pudo determinar la afinidad de la interacción entre GLS2 y GIP. Esta técnica óptica se basa en la medida de patrones de interferencia entre ondas de luz. En esta metodología se emplea un biosensor, que está compuesto por una fibra óptica en cuya punta hay dos capas: una capa interna de referencia y una capa externa biocompatible. Cuando un haz de luz blanca llega a la punta de fibra óptica, es reflejado en cada capa y las ondas difractadas interfieren constructiva o destructivamente a diferentes longitudes de onda. Hay un desplazamiento de la longitud de onda ($\Delta\lambda$) entre ambas ondas. Este patrón de interferencia se recoge en un detector y los resultados se representan en un sensorgrama a tiempo real. La capa externa es sensible a variaciones en el grosor de su superficie (por ejemplo, con la unión de un ligando), lo que produce un cambio en la reflexión de la luz (Fig. 3.8).

Materiales y Métodos

Para caracterizar la interacción GLS2-GIP por BLI, se emplearon muestras purificadas de las dos proteínas recombinantes. En el caso de GLS2, se empleó la proteína recombinante sin etiqueta 6xHis, expresada en células de insecto (Sf9) mediante baculovirus, metodología que fue diseñada anteriormente por nuestro grupo (Campos-Sandoval *et al.*, 2007).

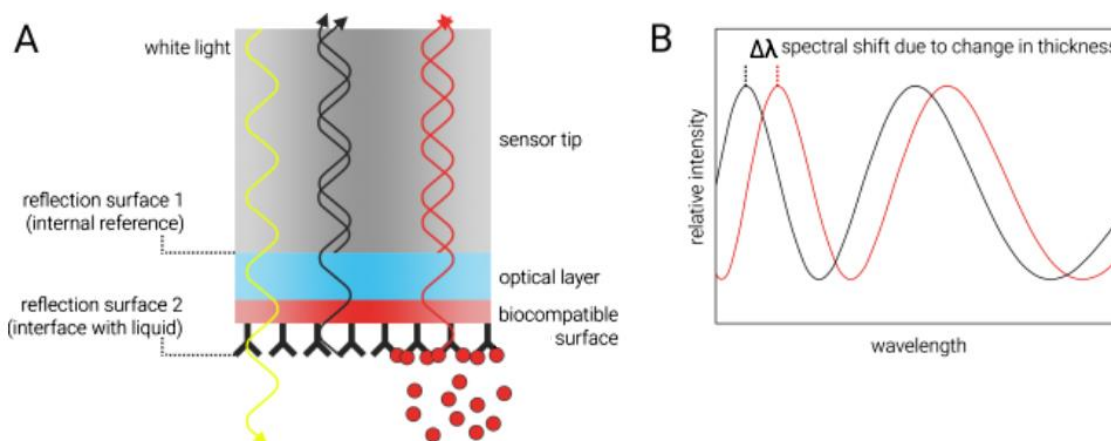


Figura 3.8. Principio de la técnica BLI. Esta técnica analiza patrones de interferencia de luz blanca que es reflejada por dos superficies (1 y 2) en el extremo del sensor (A). Cada reflexión da lugar a interferencias constructivas o destructivas que varían con la longitud de onda. La unión de moléculas a la superficie externa provocará un cambio en el espectro de interferencia (B). Imagen tomada de www.sartorius.com.

Inicialmente, la proteína GIP se unió al sensor mediante la etiqueta 6xHis. Para calcular la concentración óptima de GIP que era capaz de unirse al biosensor, se realizó un primer experimento que consistió en depositar 200 μL de tampón BLI (ver Anexo I) y 200 μL de cuatro concentraciones diferentes de GIP, en una placa de 96 pocillos. Se colocaron los biosensores Ni-NTA (Sartorius), capaces de unir proteínas recombinantes con etiquetas 6xHis, gracias a la inmovilización de grupos NTA (ácido tris-nitriloacético) cargados con níquel. La placa se introdujo en el sistema *Octet RED 96e* (fortéBIO, Pall Life Science) y, en un primer paso, se humedecieron los sensores durante 10 min en tampón BLI (equilibrado). Posteriormente, los biosensores pasaron a incubarse en los pocillos de GIP, recogiendo la variación de la longitud de onda en el detector. Como resultado, se obtuvo un sensorgrama donde se representó en el eje Y la variación de la

longitud de onda (nm) causada por la unión (*binding*) y en el eje X el tiempo (s) (Fig. 3.9). La curva de la respuesta de cada biosensor se representó por una línea independiente de distinto color.

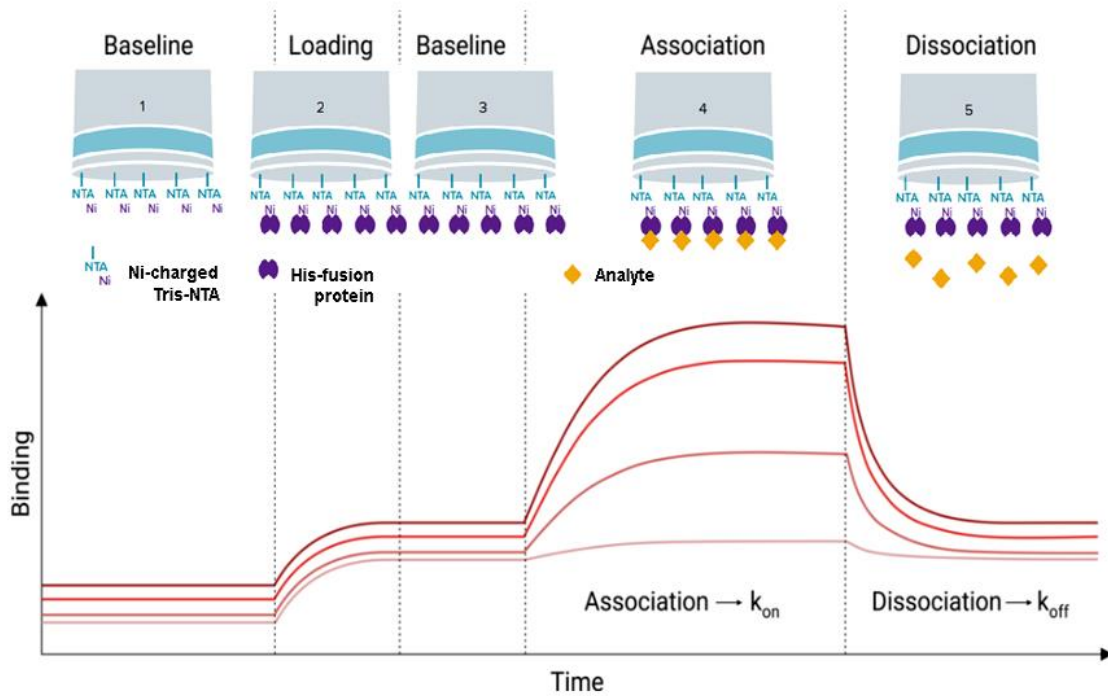


Figura 3.9. Las distintas fases en un experimento de BLI: línea base inicial (con tampón del ligando); unión del ligando (proteína con etiqueta de histidinas) a los grupos Ni-NTA; línea base con el tampón del analito; unión/asociación del analito al ligando (k_{on}); disociación de la interacción (k_{off}). Imagen tomada de www.sartorius.com.

Para determinar la constante de disociación GLS2-GIP, se realizó un segundo experimento donde se preparó una placa de 96 pocillos con un volumen de 200 μ L por pocillo. Las etapas del ensayo se llevaron a cabo de forma secuencial. En primer lugar, se equilibraron los sensores en tampón BLI durante 10 min y en este punto se estableció la línea base del sensorgrama. A continuación, se procedió a la unión de GIP (ligando) a concentración constante en todos los pocillos. Posteriormente, el biosensor se pasó a los pocillos que contenían tampón BLI para eliminar la proteína GIP no unida y se estableció una nueva línea base en el sensorgrama. Transcurridos 30 min, los sensores se incubaron en los pocillos donde se habían depositado diferentes concentraciones de GLS2 (analito)

Materiales y Métodos

y se registró la unión GLS2-GIP. Por último, el biosensor se introdujo de nuevo en tampón BLI para que se produjera la disociación entre GLS2 y GIP.

3.16. Cultivo de líneas celulares de cáncer humano

Las líneas de glioblastoma humano LN229 y T98G y la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y se cultivaron en monocapas adherentes en placas de cultivo de 100 mm (Thermo Scientific). El medio de cultivo empleado fue DMEM suplementado con suero fetal bovino 10 % (v/v), penicilina/estreptomicina 1 % y Gln 2 mM. Las placas se mantuvieron en un incubador a 37° C con atmósfera húmeda y 5 % de CO₂.

Las células se prepararon para subcultivos una vez alcanzada una confluencia en placa del 80-90 %. Para ello, se lavaron con tampón PBS y se despegaron con tripsina (Gibco), que se inactivó a continuación con la adición de medio completo.

Las células de neuroblastoma se trataron con el agente de diferenciación éster de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), a concentración 1 μM en DMSO (dimetil sulfóxido), durante 12 h y 24 h. Los controles se establecieron añadiendo DMSO a las células.

3.17. Fraccionamiento subcelular

Para extraer y separar las proteínas nucleares de las citoplasmáticas de células en cultivo se empleó el kit NE-PER *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Fisher Scientific). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Para comprobar el nivel de contaminación mitocondrial en las fracciones nucleares aisladas se empleó un anticuerpo frente a COX IV (citocromo c oxidasa o complejo IV) (Tabla 3.1).

3.18. Análisis proteómico de líneas de glioblastoma que sobreexpresan GLS2

3.18.1. Extracción y purificación de las proteínas celulares

Mediante proteómica cuantitativa, se analizaron tres líneas celulares humanas de glioblastoma: LN229-GLS2, transfectada establemente con el vector pcDNA3-GLS2-FLAG en nuestro grupo; LN229-pcDNA3, transfectada de forma estable con el vector pcDNA3 vacío; LN229-WT, línea *wild type* o silvestre.

Las células se cultivaron como se indicó anteriormente, en placas de 100 mm. Como antibiótico de selección para las células que habían incorporado el plásmido, y que expresaban la resistencia, se empleó G418 (Panreac AppliChem) a una concentración final de 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cuando alcanzaron el 70 % de confluencia, se lavaron 3 veces con PBS y se conservaron adheridas a la placa a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su procesamiento.

Cada monocapa de células se solubilizó con 500 μL de tampón RIPA (Sigma), al que se añadieron 0.2 U/ μL de nucleasa (Pierce). A continuación, las muestras se centrifugaron a 16000 g durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para eliminar los restos insolubles. La concentración de proteína de las muestras se determinó mediante el método del BCA y se normalizó a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en cada muestra.

3.18.2. Digestión proteica en gel y extracción de los péptidos

Se realizó una proteólisis asistida por gel, mezclando las muestras con una solución de monómero de acrilamida, añadiendo rápidamente persulfato amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) y TEMED (Sigma). Se dejó polimerizar durante aproximadamente 20 min y las muestras gelificadas se cortaron en cubos de 1-2 mm, que fueron tratados con CH_3CN (acetonitrilo) 50 % (v/v) en NH_4HCO_3 25 mM. Las muestras se deshidrataron y desecaron con CH_3CN , y se redujeron con DTT 10 mM en NH_4HCO_3 50 mM durante 30 min a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se eliminó el exceso de DTT; a continuación, los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína se carbamidometilaron con α -yodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 50 mM durante 20 min, a temperatura ambiente y en oscuridad. Este proceso se realizó por duplicado para cada muestra. Los trozos de gel se deshidrataron nuevamente y las proteínas se digirieron enzimáticamente, tras rehidratación con la solución de proteasa correspondiente: uno de los duplicados con tripsina (Pierce) y el otro con quimotripsina (Pierce). En ambos casos, la incubación se realizó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Los péptidos se extrajeron de los trozos de gel con CH_3CN más HCOOH (ácido fórmico) 0.1 % (v/v) a temperatura ambiente y durante 30 min. Las muestras fueron llevadas a sequedad en un concentrador de vacío (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific) y se volvieron a disolver en 50 μL de HCOOH 0.1 % (v/v). La muestra peptídica fue sonicada durante 30 min y centrifugada a 14000 g 5 min. Finalmente, se procedió a su cuantificación en un espectrofotómetro UV-visible (*NanoDrop*) y se normalizaron todas las muestras a 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con HCOOH 0.1 %, antes de transferirlas al vial de inyección.

Materiales y Métodos

3.18.3. Análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS)

Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo líquido nano, Easy nLC 1200 UHPLC, acoplado a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-*Orbitrap Q-Exactive HF-X* (Thermo Fisher Scientific). Para la adquisición y procesamiento de datos se utilizó el software *Tune 2.9* y *Xcalibur 4.1.31.9*. Los disolventes utilizados para la cromatografía fueron los siguientes: HCOOH 0.1 % (disolvente A) y HCOOH 0.1 % en CH₃CN 80 % (disolvente B). Mediante un muestreador automático termostatzado se inyectaron 2 µL de cada muestra (100 ng de la mezcla de péptidos) en una precolumna de fase inversa (*Acclaim PepMap 100*, 75 µm x 2 cm, C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) manteniendo la presión a un máximo de 980 mbar. La muestra fue eluida empleando una columna analítica de 50 cm (*PepMap RSLC C18*, 2 µm, 100 Å, 75 µm x 50 cm, Thermo Fisher Scientific). El gradiente de elución fue del 2 al 20 % de disolvente B durante 120 min, seguido de un gradiente del 20 al 35 % de disolvente B durante 30 min y, finalmente, se pasó directamente al 95 % de disolvente B, que se mantuvo durante 15 min, reequilibrando al 2 % de disolvente B. Se usó un flujo constante de 300 nL/min. Para calibrar externamente el instrumento, antes del análisis de la muestra, se utilizó la solución de calibración de iones positivos LTQ Velos ESI (Pierce, IL, EE. UU.). Además, se realizó una calibración interna en la señal del ion polisiloxano del aire ambiental (relación m/z de 445.120024). La adquisición MS se realizó en el rango 300-1750 m/z con una resolución de 120000. Utilizando un modo de adquisición dependiente de datos, los 20 iones precursores más intensos, de entre todos los iones precursores con carga de +2 a +5, se seleccionaron dentro de una ventana de 1.2 unidades m/z y se fragmentaron para obtener los espectros MS/MS (MS₂) correspondientes. Los iones fragmento se generaron en una celda de disociación por colisión de alta energía (HCD), con una primera masa fija a 110 m/z y fueron detectados en un analizador de masas Orbitrap a una resolución de 30000. Se llevó a cabo una exclusión dinámica de los iones seleccionados de 30 s, mientras que el tiempo máximo de acumulación de iones permitido, tanto en el modo MS como en el MS₂, fue de 50 ms. Se utilizó el control automático de ganancia para evitar la saturación de la trampa de iones, fijándose en 3 x 10⁶ iones y 10⁵ iones para MS y MS₂, respectivamente. Se analizaron tres réplicas técnicas de cada muestra.

3.18.4. Análisis de datos para la identificación de proteínas

Los espectros MS y MS2 se buscaron en la base de datos de proteínas SwissProt de *Homo sapiens*, versión 2017.10.25 (42,252 secuencias). Los datos brutos adquiridos se analizaron en la plataforma *Proteome Discoverer 2.3* (Thermo Fisher Scientific), usando el motor SEQUEST® HT y utilizando tolerancias de masa de 10 ppm y 0.02 Da para iones precursoros e iones fragmento, respectivamente. Se permitieron dos sitios de escisión triptica omitidos y fueron seleccionadas como enzimas la tripsina y la quimotripsina. En el programa de detección y análisis, se establecieron como modificaciones variables la oxidación de metioninas y la acetilación N-terminal, mientras que la carbamidometilación de residuos de cisteína fue establecida como modificación fija. Las coincidencias espectrales de péptidos (PSM) y las consiguientes asignaciones de proteínas se validaron utilizando el algoritmo Percolator, empleando una base de datos de proteínas invertida como señuelo y mediante la imposición de un límite estricto del 1 % de tasa de falsos positivos (*False Discovery Rate*, FDR). Las identificaciones de péptidos se agruparon en proteínas de acuerdo con la ley de parsimonia y los resultados se filtraron para contener sólo proteínas con al menos dos secuencias de péptidos distintas.

3.18.5. Cuantificación relativa sin marcaje (*label-free quantification*, LFQ) para análisis de expresión diferencial

Se realizó una LFQ utilizando la función *Minora* de *Proteome Discoverer 2.3*. Para el mapeo de vinculación de características se establecieron los siguientes parámetros: alineación del tiempo de retención máximo de 10 min con un mínimo de señal/ruido de 5. Las abundancias se basaron en las intensidades de los iones precursoros. Se realizó una normalización de las muestras basada en la cantidad total de proteína y los valores de abundancia normalizadas de cada proteína se escalaron a 100. La abundancia relativa normalizada y escalada de cada proteína se expresó como media \pm desviación estándar (SD) de las réplicas biológicas. Las proporciones de abundancia de proteínas se calcularon basándose en péptidos únicos, utilizando la media de las abundancias en cada condición. Los valores estadísticos de probabilidad p de las relaciones de abundancia se calcularon mediante un ANOVA basado en las proteínas individuales. Sólo las proteínas con $p < 0,01$ y una relación de abundancia superior a 2/1 o inferior a 1/2 para tratamiento/control se consideraron desreguladas significativamente.

Materiales y Métodos

3.18.6. Análisis funcional de datos

De la lista de proteínas obtenidas del ensayo se seleccionaron aquellas que resultaron diferencialmente expresadas según los siguientes criterios: se consideraron proteínas sobreexpresadas aquellas que tenían una ratio de abundancia LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 ≥ 1.5 , mientras que para las proteínas reprimidas la ratio de abundancia fue ≤ 0.6 , para un valor de $p < 0.05$ en ambos casos.

3.18.7. Análisis de redes y rutas metabólicas

Se efectuó un análisis bioinformático por separado de las proteínas sobreexpresadas y de las reprimidas, aunque siguiendo el mismo protocolo. La red de interacción proteína-proteína se construyó con la herramienta STRING, donde cada nodo representa una proteína y las uniones entre ellas se refieren a una interacción física y/o funcional (Szklarczyk *et al.*, 2021). Como parámetros de STRING se estableció un nivel de confianza alto (0.7), un valor FDR alto (1 %) y se seleccionó que como máximo se adicionara una capa de 20 “interactores” a la red de interacción, debido al alto número de nodos inconexos. La red de interacción se analizó utilizando el software Cytoscape v3.9.1 (Shanon *et al.*, 2003) y se determinaron aquellas proteínas (nodos) que presentaban un mayor grado de conectividad (número de conexiones) y centralidad de intermediación (el número de veces que un nodo se encuentra entre los caminos más cortos de otros nodos).

El análisis de agrupación (formación de *clusters*) de la red de interactores se llevó a cabo mediante la aplicación MCODE de Cytoscape, que divide la red de proteínas en grupos (*clusters*) de alta densidad de conexión. Se mantuvieron los parámetros establecidos por defecto. Los grupos de mayor puntuación se analizaron mediante ClueGO (Bindea *et al.*, 2009), utilizando la base de datos KEGG y REACTOME para obtener información sobre las rutas metabólicas donde pueden estar implicados.

Con la aplicación ClueGO se realizó el análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas diferencialmente expresadas, seleccionando las bases de datos de ontología génica para las categorías de procesos biológicos, función molecular y compartimentos celulares. Siempre realizamos una selección para mostrar aquellas rutas con un valor de p menor o igual a 0.05, calculado mediante el test exacto de Fisher y estableciendo la corrección de Benjamini-Hochberg para evitar falsos positivos (FDR). Por otro lado, el valor estadístico de Kappa define las conexiones entre nodos de la red, además de asociar

términos similares dentro de los grupos funcionales. Este parámetro tiene un valor de entre 0 y 1 y establece el número de proteínas que tienen en común dos términos o nodos. Otro factor a tener en cuenta es la redundancia de términos, que se evitó aplicando la fusión de términos ontológicos.

Además de las herramientas bioinformáticas descritas, se empleó adicionalmente el software FunRich (*Functional Enrichment Analysis*) (Fonseka *et al.*, 2021) bajo parámetros estadísticos similares (p menor a 0.05 y corrección de Benjamini-Hochberg para falsos positivos (FDR)). Se realizaron análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. Resultados



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GLS2

4.1. Expresión heteróloga de GLS2 en *E. coli*

4.1.1. Diseño de las construcciones, expresión y purificación

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, empleamos diferentes vectores de expresión para producir proteínas GLS2 humanas en sistemas procariotas (*E. coli*), dadas sus evidentes ventajas metodológicas. Utilizando vectores pET, se consiguió expresar las formas precursora y “madura” (sin el péptido putativo de importe a la mitocondria, residuos 1-14) de GLS2, pero con un bajo rendimiento de proteína soluble y sin actividad enzimática detectable (Campos *et al.*, 2003). Se decidió, por tanto, producir otras formas truncadas de la proteína con vectores pET, con la finalidad principal de obtener suficiente GLS2 soluble y activa para realizar estudios cinéticos e iniciar ensayos de cristalización de la proteína.

En primer lugar, se realizó un análisis de la estructura primaria de la proteína con la herramienta bioinformática FoldIndex (Prilusky *et al.*, 2005), que predice las regiones desestructuradas dentro de la secuencia aminoacídica. Este programa detectó una región altamente desordenada en el extremo N-terminal de la proteína, desde el residuo 1 al 72. También mostró una región desordenada, aunque en menor grado, en el extremo C-terminal (residuos 579-602) (Fig. 4.1).

Para diseñar la primera construcción truncada de GLS2 (GLS2₇₃₋₆₀₂), se eliminó la secuencia codificante de la región N-terminal altamente desordenada, pero se mantuvo el extremo C-terminal, menos desordenado, para aprovechar su capacidad de interaccionar con GIP, propiedad que podría ser útil para determinados ensayos y para su purificación por cromatografía de afinidad. Esta secuencia codificante truncada se insertó en el vector pET-28b, bajo control del promotor del fago T7, produciendo una proteína de fusión con una etiqueta 6xHis y secuencia de corte por trombina en su extremo N-terminal, y con una masa molecular de 60.8 kDa.

Resultados

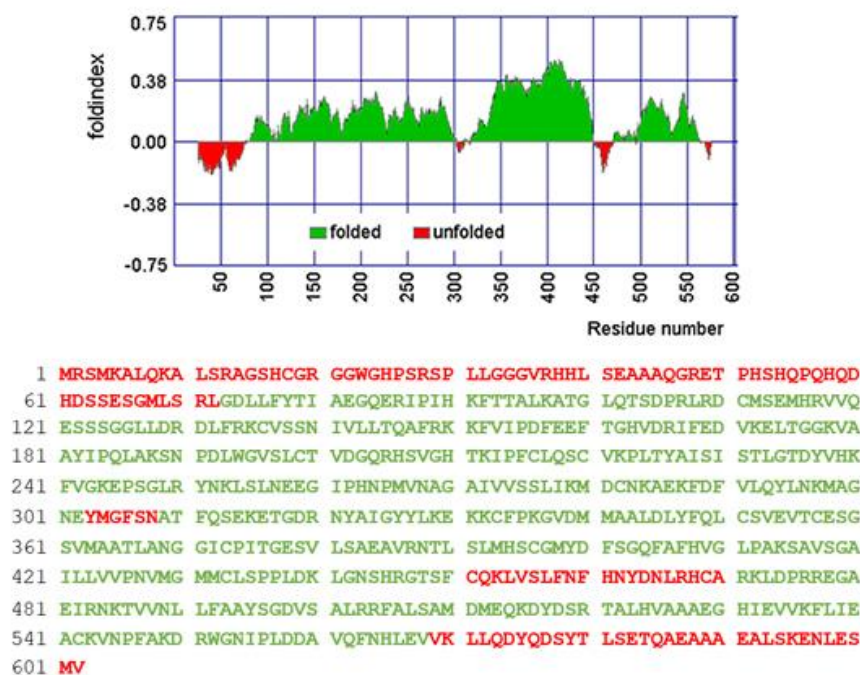


Figura 4.1. Predicción del plegamiento en la secuencia de GLS2 con la herramienta FoldIndex (<http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>). En rojo se indican las regiones desestructuradas y en verde, las regiones ordenadas.

Las bacterias BL21(DE3) transformadas con este plásmido se incubaron a 30 °C toda la noche en presencia de IPTG 1 mM, para inducir la producción de proteína recombinante. A continuación, las bacterias se lisaron con ultrasonidos y se centrifugaron para obtener un extracto soluble, que se sometió a cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC). Aunque se consiguió expresar la GLS2₇₃₋₆₀₂, la cantidad de proteína soluble purificada fue muy baja, apareciendo la mayoría en forma de cuerpos de inclusión (resultados no mostrados). Por lo tanto, se descartó dicha construcción para estudios posteriores.

Para diseñar la segunda construcción, GLS2₅₆₋₆₀₂, nos basamos en un trabajo publicado por Lee y colaboradores en 2014, donde los autores expresaban en *E. coli* esta forma truncada, equivalente a la KGA₁₂₃₋₆₆₉ (ver alineamiento en Fig. 1.12), y que mostraba actividad enzimática (Lee *et al.*, 2014). La masa molecular teórica de esta proteína, sumando la etiqueta de histidina y el sitio de corte por proteasa, sería de 62.8 kDa. Por último, mediante comparación de la secuencia de GLS2 con la de GLS, diseñamos una tercera construcción más corta, GLS2₆₂₋₄₈₃, cuya estructura primaria sería

equivalente a la de GLS₁₂₄₋₅₅₁, expresada en *E. coli* con alta actividad específica (Hartwick & Curthoys, 2012) y que produciría una proteína de masa molecular 48.8 kDa.

Una vez generados los plásmidos pET-GLS₂₅₆₋₆₀₂ y pET-GLS₂₆₂₋₄₈₃, se transformaron células BL21(DE3) y se comprobó que ambas proteínas se expresaban mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. A diferencia de la proteína GLS₂₇₃₋₆₀₂, estas dos nuevas formas truncadas se pudieron purificar por cromatografía de afinidad IMAC, obteniéndose una cantidad aceptable de proteína soluble con actividad enzimática. No obstante, un gran porcentaje de la proteína recombinante apareció, de nuevo, en forma insoluble (cuerpos de inclusión).

Para optimizar la expresión de estas dos proteínas, se estudió el efecto de distintas variables, como composición del medio de cultivo, concentración de IPTG y temperatura. Para cada condición, se recogieron muestras de bacterias antes y después de la inducción de la expresión y se solubilizaron con tampón de carga de electroforesis SDS-PAGE. Los niveles de proteína recombinante de las distintas condiciones se compararon entre sí en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie. Los resultados, que se muestran a continuación, corresponden a la producción de GLS₂₅₆₋₆₀₂.

Los medios de cultivo que se probaron fueron los siguientes: LB, 2xYT, medio de autoinducción (ZYP-5052) y medio de autoinducción con trazas de metales (ZYM-5052) (ver Anexo I). En las bacterias cultivadas en los dos primeros medios, una vez alcanzada la densidad adecuada, la producción de proteína recombinante se indujo añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM. En los medios de autoinducción, la síntesis de proteína recombinante se produce idealmente cuando se agota la glucosa. Los cultivos se incubaron a 30 °C toda la noche. Como se observa en la Fig. 4.2, el nivel de expresión de GLS₂₅₆₋₆₀₂ fue similar cuando las bacterias se cultivaron tanto en medio LB como en 2xYT; en los cultivos preparados en medio ZYP-5052, también se expresó la proteína recombinante, aunque en menor cantidad; en cambio, no se observó expresión en las bacterias que crecieron en medio de autoinducción con trazas de metales (ZYM-5052, resultado no mostrado). Por lo tanto, se prescindió del método de autoinducción para la producción de GLS2 y se seleccionó el medio 2xYT para realizar las siguientes pruebas.

Resultados

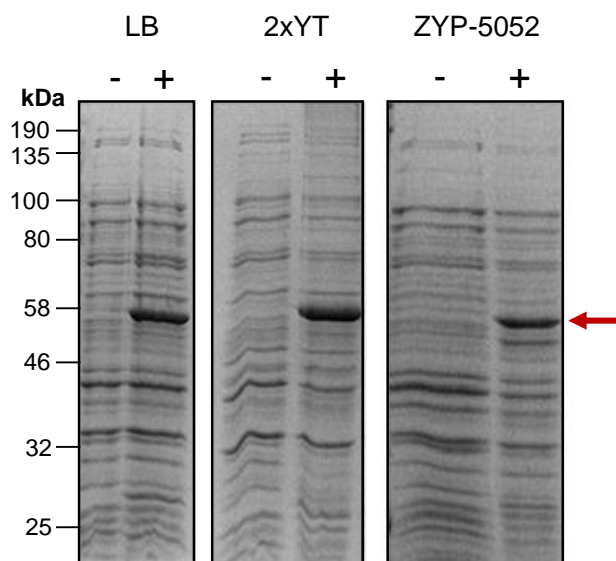


Figura 4.2. Efecto del medio de cultivo en la expresión heteróloga de GLS₂₅₆₋₆₀₂. Las bacterias BL21(DE3) transformadas con el plásmido pET-GLS₂₅₆₋₆₀₂ se cultivaron en cuatro medios distintos: LB, 2xYT, ZYP-5052 y ZYM-5052 (ver Anexo I). Al alcanzar una densidad adecuada, los cultivos se incubaron a 30 °C toda la noche. La producción de proteína recombinante en los cultivos con medios LB y 2xYT se indujo añadiendo IPTG 1 mM. Las muestras son extractos de bacterias solubilizadas con tampón de carga de electroforesis SDS-PAGE, recogidas antes (-) y después (+) de la inducción. Se observa claramente la expresión de la proteína recombinante (indicada con la flecha roja). Con el medio ZYM-5052 no hubo expresión (no mostrado en la imagen).

La siguiente variable que se chequeó fue la concentración del inductor IPTG, desde 0.1 hasta 1 mM. Sólo a partir de una concentración de 0.5 mM se observó una clara expresión de GLS₂₅₆₋₆₀₂; con una concentración de 1 mM, se obtuvieron niveles de expresión similares (Fig. 4.3). Empleando esta última concentración de IPTG, se probaron dos temperaturas de inducción, 16 y 30 °C: los niveles de expresión fueron similares en ambos casos (Fig. 4.4).

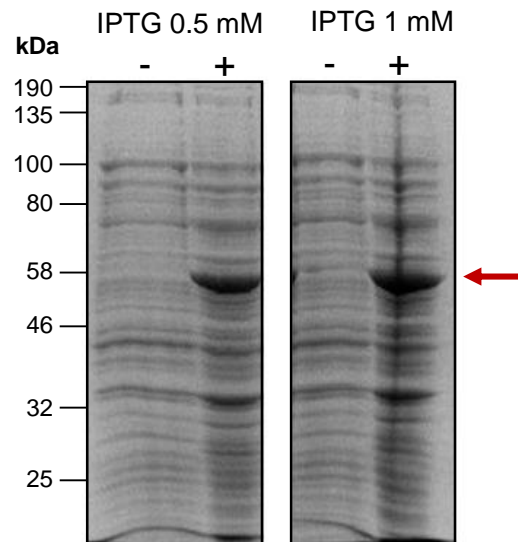


Figura 4.3. Efecto de la concentración del inductor IPTG en la expresión heteróloga de GLS₂₅₆₋₆₀₂. Los cultivos se incubaron a 30 °C toda la noche, en presencia de IPTG 0.5 ó 1 mM. Se muestra el análisis por electroforesis SDS-PAGE de extractos totales de bacterias antes (-) y después (+) de la inducción. La flecha a la derecha indica la proteína recombinante GLS₂₅₆₋₆₀₂.

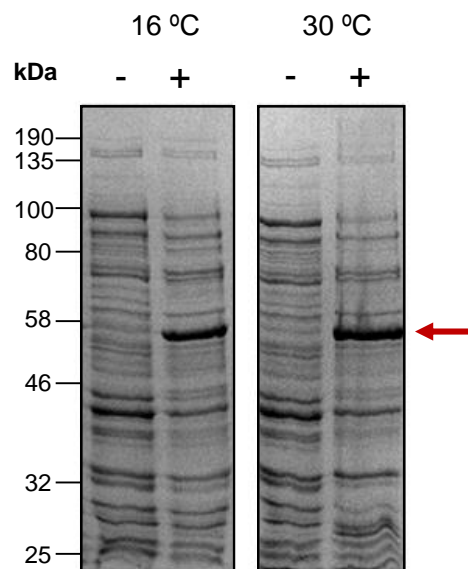
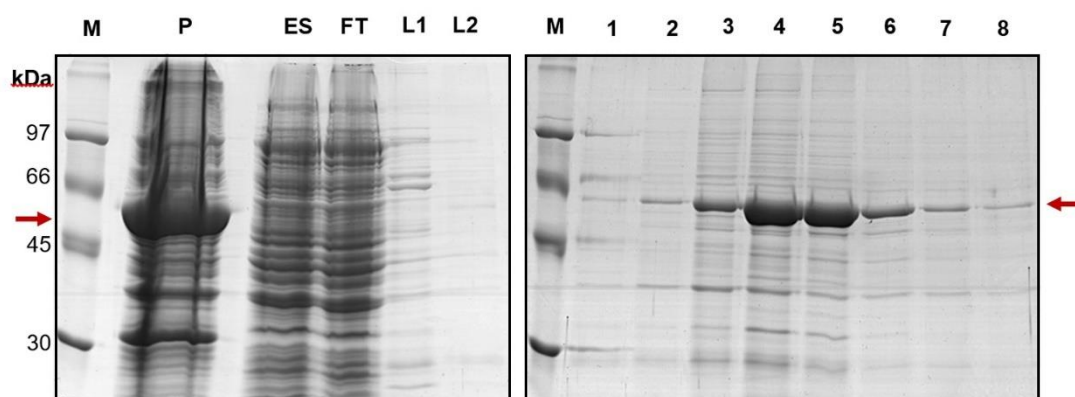


Figura 4.4. Efecto de la temperatura en la expresión heteróloga de GLS₂₅₆₋₆₀₂. Después de alcanzarse la densidad óptica deseada, los cultivos se incubaron a dos temperaturas distintas (16 ó 30 °C) en presencia de IPTG 1 mM. Se muestra el análisis por electroforesis SDS-PAGE de extractos totales de bacterias antes (-) y después (+) de la inducción. Flecha: proteína GLS₂₅₆₋₆₀₂.

Resultados

De acuerdo con los resultados expuestos, las condiciones seleccionadas para la producción de proteína recombinante GLS2₅₆₋₆₀₂ fueron: medio 2xYT e inducción a 30 °C toda la noche con IPTG 1 mM. La purificación de las proteínas truncadas se realizó basándonos en la bibliografía previa sobre purificación de GAs (Kenny *et al.*, 2003), con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio (ver Anexo I).

En los extractos solubles (ES, obtenidos después de sonicar las bacterias y centrifugar los lisados) no se observó una clara banda expresada a la masa molecular teórica de GLS2₅₆₋₆₀₂ (62.8 kDa), mediante análisis por electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. No obstante, los resultados obtenidos en los ensayos preliminares de purificación de esta proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad IMAC parecían prometedores, por lo que se optó directamente por comprobar qué rendimiento podíamos obtener con el sistema de expresión en bacterias usando un volumen mayor de cultivo (1L) para la purificación.



Fraciones	[Proteína] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Actividad específica (U/mg)
3	0.21	19.6
4	0.49	65.7
5	0.45	112.3
6	0.12	44
7	0.014	23

Figura 4.5. Purificación de GLS2₅₆₋₆₀₂ mediante cromatografía de afinidad IMAC. Se muestra el análisis por electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las distintas fracciones obtenidas en el escalado del proceso de expresión y purificación. M: marcador de masas moleculares; P: fracción insoluble tras sonicación y centrifugación; ES: extracto soluble; FT: fracción no retenida en la columna (*flow-through*); L1 y L2: lavados con imidazol 75 mM y 100 mM, respectivamente; calles 1-8: fracciones de la elución con imidazol 450 mM. En la Tabla

inferior se indican la concentración de proteína y la actividad específica GA de las fracciones con mayor cantidad de proteína recombinante. Flecha: proteína GLS2₅₆₋₆₀₂.

Como se muestra en la Fig. 4.5, este método fue bastante eficaz para purificar la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂. Tras la elución con imidazol 450 mM, se obtuvieron varias fracciones que mostraron una banda intensa en geles de poliacrilamida-SDS correspondiente a la proteína recombinante, y alguna de ellas presentó una actividad enzimática específica bastante elevada, aproximadamente 112 U/mg (Fig. 4.5).

Por último, también caracterizamos la expresión de la proteína truncada GLS2₆₂₋₄₈₃ (Fig. 4.6). Las condiciones óptimas para la expresión de GLS2₆₂₋₄₈₃ (masa molecular teórica de 48.8 kDa) fueron similares a las empleadas para la GLS2₅₆₋₆₀₂. En un experimento típico a pequeña escala, se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía IMAC, a partir de 100 mL de cultivo. Su actividad GA específica, 13 U/mg, fue notablemente inferior a la obtenida con la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂ (Fig. 4.5).

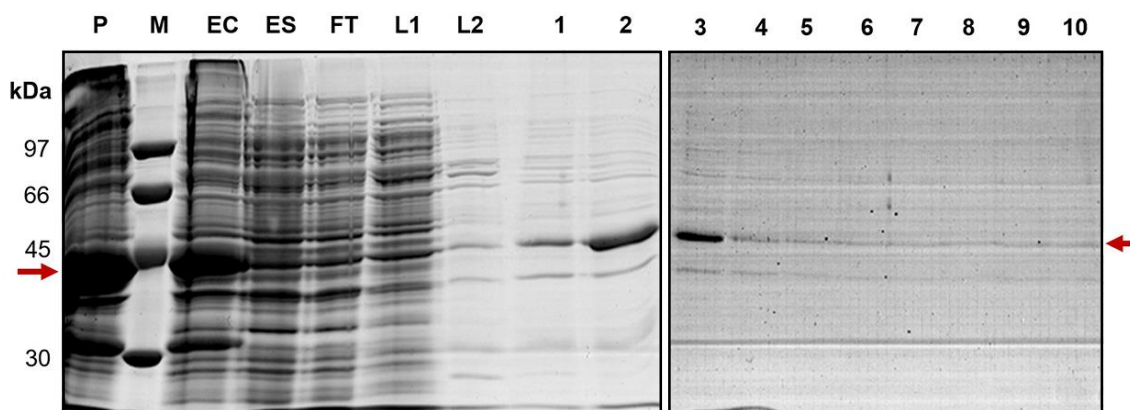


Figura 4.6. Purificación de GLS2₆₂₋₄₈₃ mediante cromatografía de afinidad IMAC. Análisis por electroforesis SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas en un experimento típico de expresión heteróloga y purificación por cromatografía IMAC de la proteína GLS2₆₂₋₄₈₃. M: marcador de masas moleculares; EC: extracto crudo (bacterias en tampón de carga de electroforesis SDS-PAGE); P: fracción insoluble tras sonicación y centrifugación; ES: extracto soluble; FT: fracción no retenida en la columna (*flow-through*); L1 y L2: lavados; calles 1-10: fracciones de la elución con imidazol donde aparece la proteína GLS2₆₂₋₄₈₃.

Resultados

4.1.2. Estabilidad de la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂ expresada en bacterias: ensayo Termofluór

Para determinar la estabilidad de la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂ producida en bacterias y purificada mediante cromatografía de afinidad IMAC, se llevó a cabo un ensayo de desplazamiento térmico o Termofluór, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Se realizó un primer ensayo en tampón HEPES 100 mM pH 7.5 y NaCl 150 mM, obteniéndose una temperatura de fusión, T_m , de 45 °C (Fig. 4.7). Este tampón se usó como referencia para comparar la estabilidad de la proteína recombinante en otras soluciones.

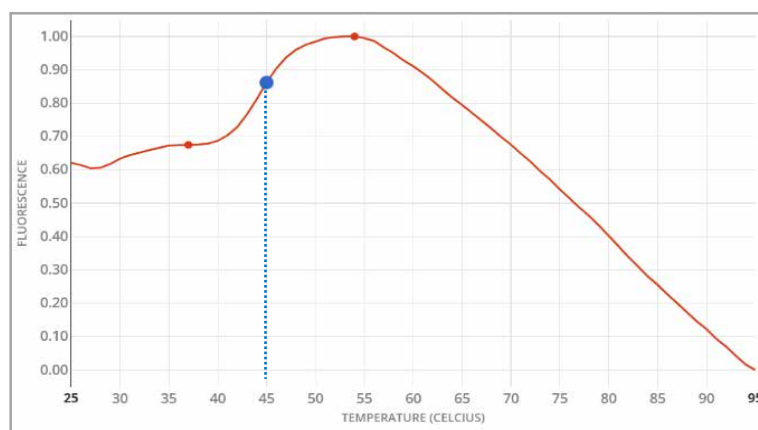
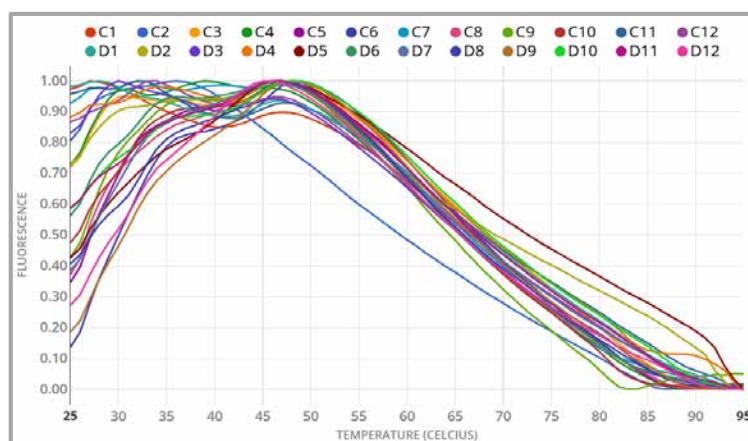


Figura 4.7. Primer ensayo Termofluór de la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂, producida en bacterias, empleando como tampón HEPES 100 mM pH 7.5 y NaCl 150 mM. La proteína recombinante purificada por cromatografía IMAC se preparó en el medio citado y efectuamos el análisis Termofluór, como se describe en Materiales y Métodos. La línea vertical azul indica la temperatura de fusión (T_m) de la proteína.

Con la proteína purificada por cromatografía IMAC, se realizaron ensayos Termofluór para determinar qué tampones eran más adecuados para la purificación y conservación de la proteína recombinante. Se evaluaron la T_m y la forma de la curva de fusión. Con la mayoría de los tampones, las curvas obtenidas eran irregulares y presentaban varios hombros, comenzando la curva de desnaturalización con valores de fluorescencia muy altos. Los valores de T_m con las soluciones tampón evaluadas no superaron nunca los 45 °C. En las Fig. 4.8 y 4.9 se muestran las curvas de fusión obtenidas con el ensayo Termofluór.



Pocillo	pH	Tampón (100 mM)	[NaCl] (mM)	T _m (°C)	Pocillo	pH	Tampón (100 mM)	[NaCl] (mM)	T _m (°C)
C1		Agua	250	N.E.	D1	7	MOPS	250	N.E.
C2	4	Citrato	250	N.E.	D2	7.3	Acetato amónico	250	N.E.
C3	4.5	Acetato sódico	250	N.E.	D3	7.5	Tris-HCl	250	N.E.
C4	5	Citrato	250	N.E.	D4	7.5	Fosfato sódico	250	N.E.
C5	6	MES	250	33	D5	8	Imidazol	250	36
C6	6	Fosfato potásico	250	36	D6	8	HEPES	250	45
C7	6	Citrato	250	N.E.	D7	8	Tris-HCl	250	N.E.
C8	6.5	BIS-Tris	250	35	D8	8	Tricina	250	40
C9	6.5	MES	250	34	D9	8	BiCINA	250	31
C10	7	Fosfato potásico	250	34	D10	8.5	BiCINA	250	31
C11	7	Fosfato potásico	250	N.E.	D11	8.5	Tris-HCl	250	N.E.
C12	7	CHES	250	N.E.	D12	9	CHES	250	N.E.

Figura 4.8. Ensayo Termofluór de GLS₂₅₆₋₆₀₂, producida en bacterias, empleando diferentes soluciones tampón con NaCl 250 mM. En la Tabla se indican los tampones correspondientes a cada curva, junto con el valor de T_m. N.E: curvas consideradas no estables.

Resultados

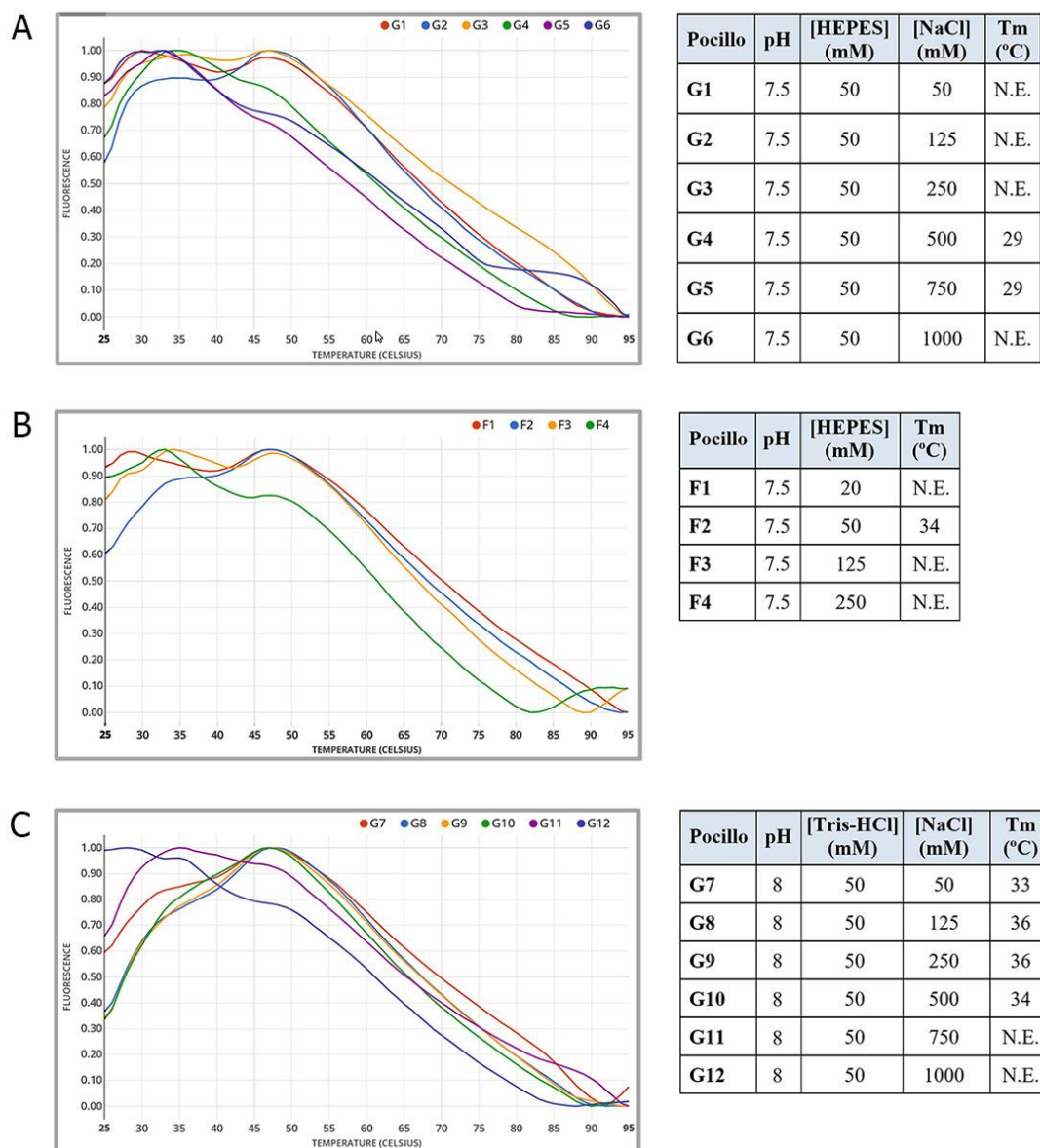


Figura 4.9. Ensayo Termofluor de GLS₂₅₆₋₆₀₂ producida en bacterias. A) Con diferentes concentraciones de NaCl en tampón HEPES 50 mM pH 7.5; B) Con diferentes concentraciones de tampón HEPES pH 7.5; C) Con diferentes concentraciones de NaCl en tampón Tris-HCl pH 8 (N.E.: no estable).

Finalmente, por lo que respecta al rendimiento de nuestro protocolo de expresión y purificación de GSL₂₅₆₋₆₀₂, tras realizar numerosos ensayos no conseguimos incrementar significativamente la cantidad de proteína recombinante GLS₂₅₆₋₆₀₂ total expresada en *E. coli* a niveles compatibles con la implementación de protocolos de cristalización de la proteína. Curiosamente, se produjo una pérdida de proteína soluble al aumentar su concentración mediante ultrafiltración (resultados no mostrados), lo que

impedía realizar procedimientos de purificación adicionales con el fin de obtener la proteína con un mayor grado de pureza, requisito indispensable para la obtención de cristales proteicos. Por tanto, teniendo en cuenta los datos de inestabilidad mostrados en las curvas de los ensayos Termofluor, la tendencia a agregar de la proteína, su mejorable pureza y la baja concentración, decidimos emplear un sistema heterólogo de expresión eucariota para la producción de GLS2 humana recombinante.

4.2. Producción heteróloga de GLS2₅₆₋₆₀₂ en células de insecto infectadas con baculovirus

Con la finalidad de aumentar la cantidad de proteína y su pureza, elegimos la proteína truncada GLS2₅₆₋₆₀₂ para su producción heteróloga en células eucariotas con el sistema Multibac, por ser la que nos permitió obtener un mayor rendimiento de las tres proteínas recombinantes expresadas en bacterias. Empleando el mismo sistema, decidimos expresar también la proteína completa, GLS2₁₋₆₀₂. Previamente, utilizando uno de los primeros sistemas de expresión heteróloga en células de insecto, muy diferente al empleado en esta Memoria, nuestro grupo obtuvo por primera vez una proteína GLS2 humana con actividad biológica (Campos-Sandoval *et al.*, 2007).

4.2.1. Generación de virus recombinantes

Para la generación de cada uno de los báculos recombinantes, se transformaron células de *E. coli* de la cepa DH10EMBacY con cada uno de los plásmidos de transferencia. La selección de los clones positivos se hizo gracias al fenotipo blanco que mostraban las colonias (Fig. 4.10).

Figura 4.10. Selección y aislamiento de clones positivos de báculos GLS2 para la proteína completa. Placa de LB-agar con Kan/Tet/Gent/IPTG/Bluo-Gal, donde se observan las colonias azules y se destacan con flechas rojas las colonias blancas. Para la forma truncada de la proteína se obtuvieron resultados similares (no mostrados).



Resultados

Debido al bajo rendimiento del proceso, sólo se consiguió un clon del báculo GLS2 para la secuencia completa y dos clones del báculo GLS2₅₆₋₆₀₂. Tras extraer el DNA de cada colonia, se transfectaron las células de insecto y se obtuvo la primera generación de los virus de bajo título (V_0) en placas de 6 pocillos, con la que se volvió a infectar cultivos en suspensión para la generación de los virus de alto título (V_1). Las alícuotas recogidas del cultivo donde se generó V_1 se visualizaron y evaluaron mediante inmunotransferencia western (Fig. 4.12), debido a que no fue posible diferenciar la banda correspondiente a la proteína GA recombinante mediante geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie (Fig. 4.11).

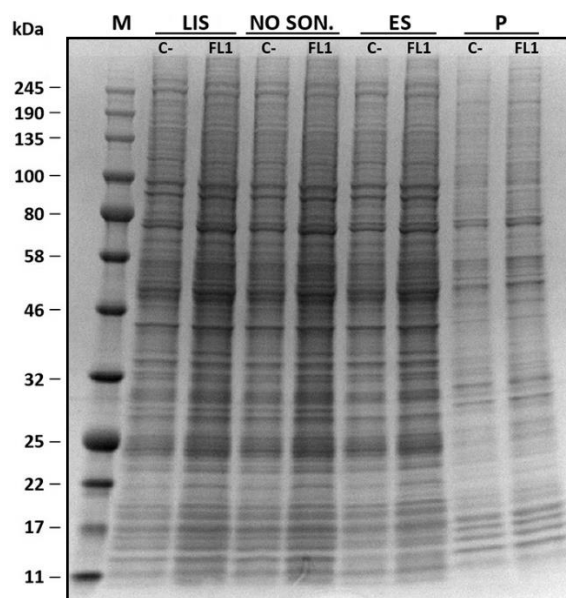


Figura 4.11. Análisis por electroforesis SDS-PAGE de extractos de células de insecto transfectadas con el báculo recombinante. Las muestras son extractos totales de las células transfectadas en placas de 6 pocillos con el báculo recombinante de la GLS2 completa (FL). Se cargaron 10 μ L de la muestra (FL1) y del control (C-, células sin transfectar). M: marcador; LIS: lisado tras sonicación; NO SON.: muestra disuelta en tampón de lisis sin sonicar; ES: fracción soluble tras centrifugación; P: fracción insoluble tras centrifugación.

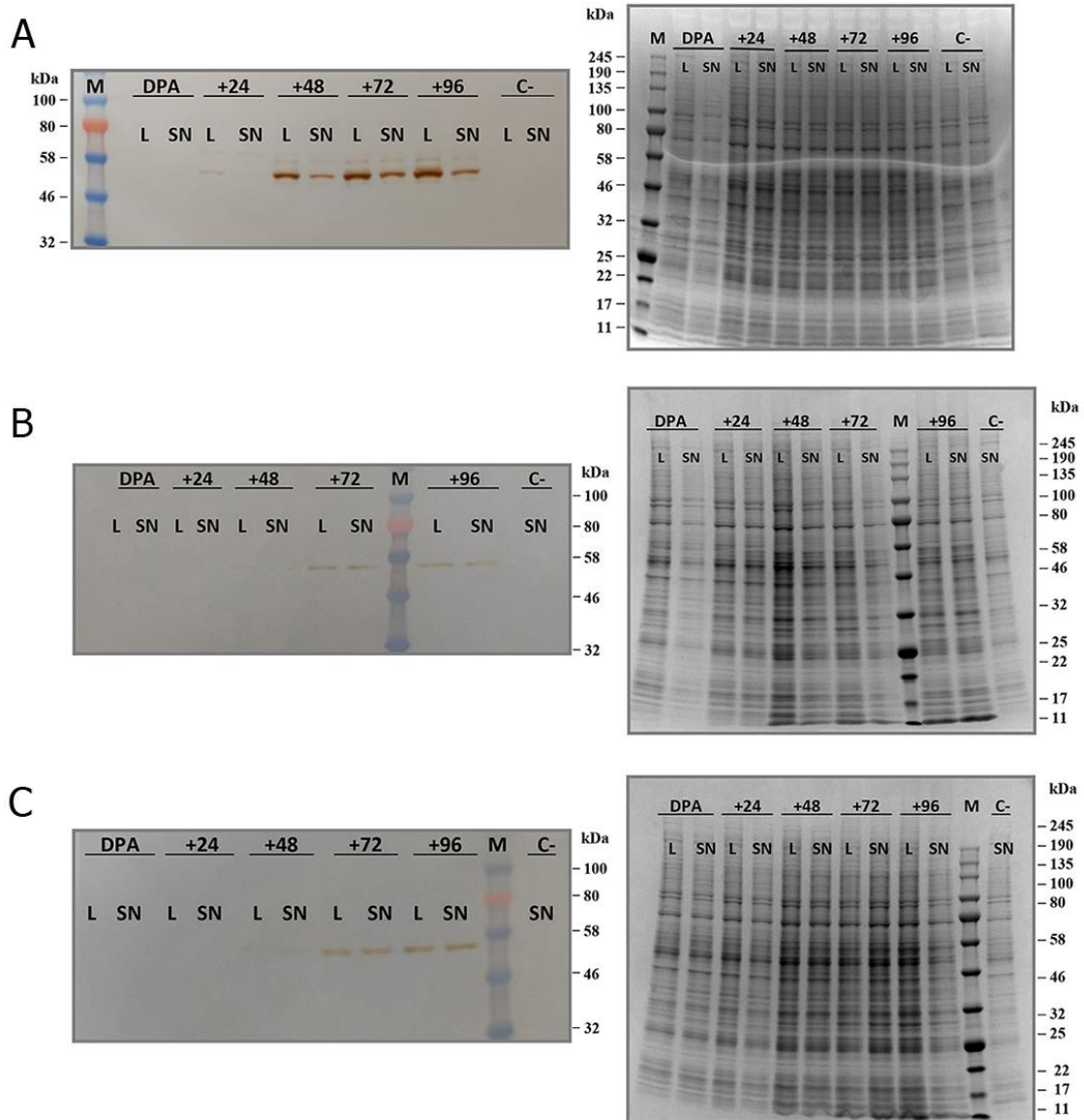


Figura 4.12. Inmunotransferencias western y geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie para las proteínas GLS2 (A), GLS2₅₆₋₆₀₂ clon 2 (B) y clon 5 (C). Las muestras son extractos de células Sf21 infectadas con la generación V₀ para producir el stock vírico de alto título V₁. Se cargaron 10 µL de cada muestra por pocillo. Las membranas se incubaron con un anticuerpo frente a la etiqueta 6xHis (MA1-21315-HRP, Invitrogen), a una dilución 1:500 en TTBS + leche desnatada al 3 %. M: Marcador; L: lisado celular obtenido mediante sonicación; SN: sobrenadante tras centrifugar el lisado celular; C-: Control negativo; DPA: muestra de células recogidas 24 h después de la parada del crecimiento (*Day After Proliferation Arrest*). El signo +, seguido de un número, indica el tiempo (h) transcurrido tras el DPA.

Resultados

La mayor expresión de ambas proteínas GLS2 (completa, GLS2₁₋₆₀₂, o truncada, GLS2₅₆₋₆₀₂), tras infectar con la primera generación del virus (V₀) de bajo título, se observó entre los días 3 y 4 tras el DPA. Resultó necesario el análisis de las muestras mediante inmunotransferencia western ya que, como se aprecia en las imágenes de la Fig. 4.12, en los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie no se aprecia claramente una banda coincidente con la esperada para GLS2.

La determinación del volumen de virus necesario para una infección óptima de las células Sf21 se realizó contando el número de células de insecto cada 24 h, en cultivos infectados con volúmenes del stock viral V₁, desde 0.4 µL hasta 28 µL. Cuando se observó la parada en el crecimiento (DPA), se continuó midiendo la fluorescencia hasta que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento o comenzó la fase de decadencia (disminución de la fluorescencia). Para concentraciones (µL V₁/10⁶ células) altas de virus, las células morían rápidamente, sin apreciarse la producción de la proteína fluorescente YFP, mientras que para concentraciones bajas de virus el periodo de incubación resultaba demasiado largo. Por consiguiente, el volumen que se estimó como óptimo para la producción de las dos proteínas GLS2 fue de 8 µL de stock vírico V₁ por millón de células, aunque este parámetro se fue ajustando a lo largo del tiempo debido a la pérdida progresiva de título del virus. En general, para la producción de la proteína se siguió el mismo control de los cultivos. En la Fig. 4.13, se muestra sólo el resultado del seguimiento del cultivo para el clon 2 de GLS2₅₆₋₆₀₂, ya que los correspondientes al clon 5 y a la proteína GLS2 completa mostraron la misma tendencia.

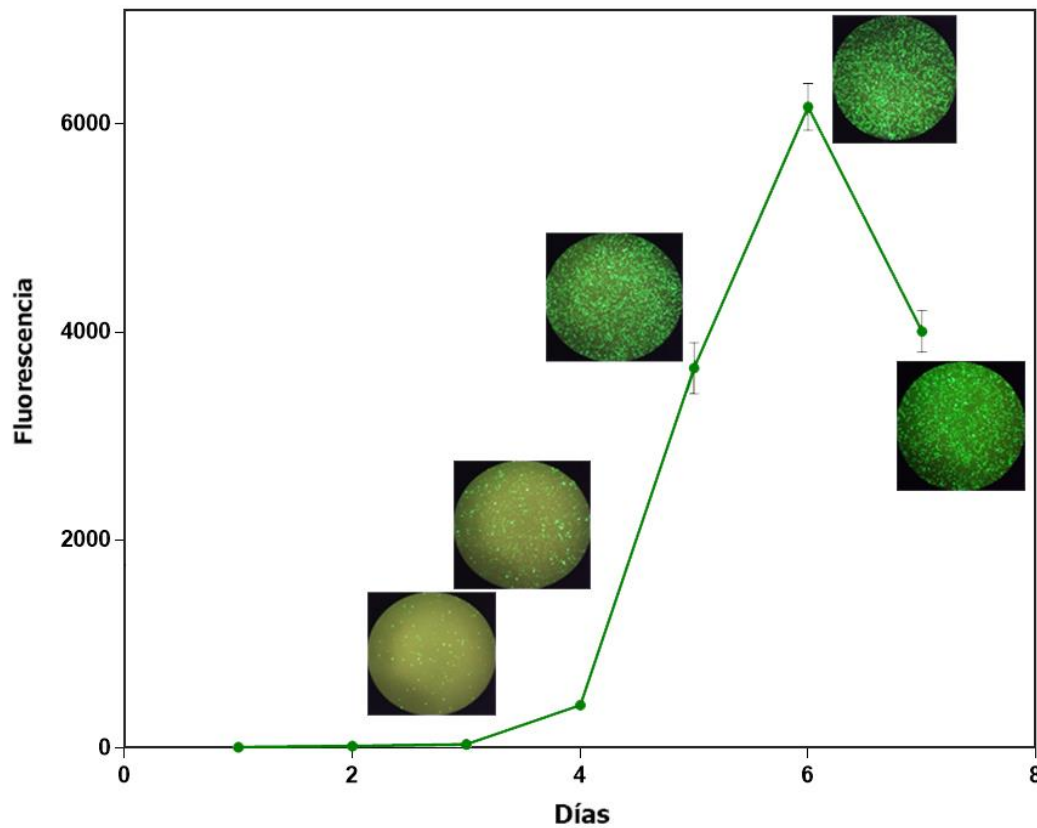


Figura 4.13. Medida de fluorescencia de YFP como indicador de la expresión de GLS2₅₆₋₆₀₂ en células de insecto. Se representan las imágenes tomadas al microscopio que muestran el incremento de la fluorescencia a lo largo del tiempo. Las imágenes se tomaron cada 24 h antes de lisar las células para proceder con la medida de fluorescencia. Cada una de las medidas se realizó por duplicado.

4.2.2. Purificación de las proteínas GLS2 producidas en células de insecto

Las dos proteínas producidas en células de insecto se purificaron siguiendo el mismo procedimiento cromatográfico; a continuación, se muestran los resultados obtenidos para la proteína trunca GLS2₅₆₋₆₀₂. En primer lugar, se procedió a realizar una cromatografía de afinidad IMAC a partir de un cultivo de células infectadas con el baculovirus recombinante que producía la proteína. Tras eluir mediante un gradiente lineal de imidazol (ver Anexo I), se evaluó la pureza de las fracciones en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie. Como se aprecia en la imagen del gel (Fig. 4.15), la proteína recombinante comienza a aparecer a partir de la fracción 18, aunque poco purificada. Analizando el gradiente lineal de elución en el cromatograma de

Resultados

IMAC (Fig. 4.14), se observó que el pico de la proteína aparecía solapado con otro de mayor tamaño. Por tanto, se calculó el porcentaje de tampón de elución (B) de cada pico y suponiendo una distribución simétrica, se determinó el porcentaje al que comenzaba a eluir el pico de mayor altura.

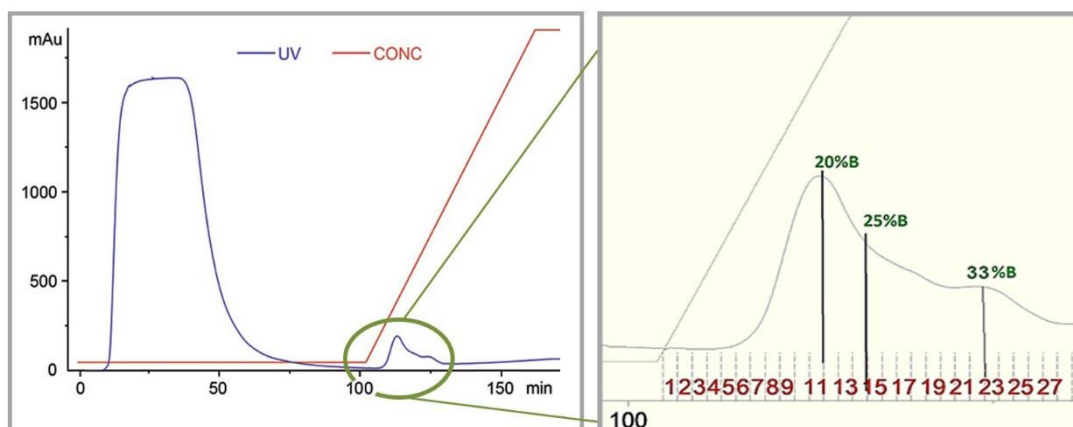


Figura 4.14. Cromatograma de la purificación por cromatografía de afinidad IMAC de GLS₂₅₆₋₆₀₂. La curva de color azul representa la absorbancia a 280 nm y la roja el gradiente lineal de elución desde 20 hasta 500 mM de imidazol. La imagen de la derecha muestra la ampliación de la sección del cromatograma donde puede verse con detalle el solapamiento de picos. Se muestran varios porcentajes de tampón de elución (B) y los números asignados a las fracciones eluidas.

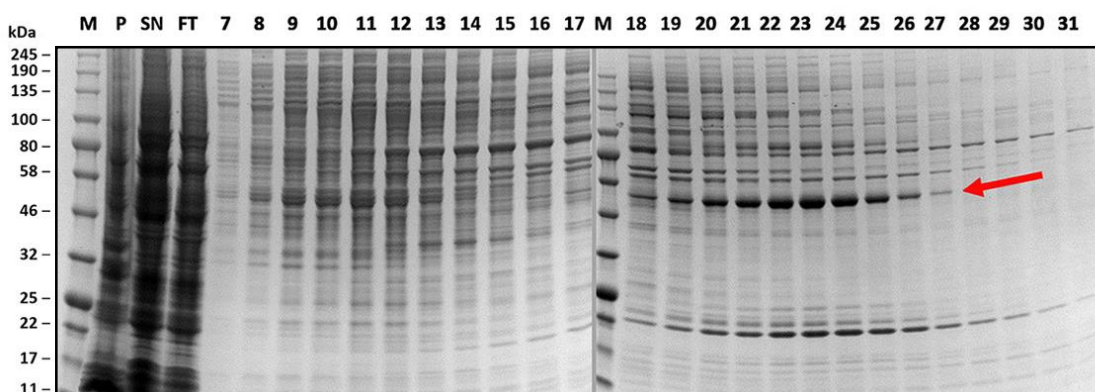


Figura 4.15. Análisis por electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad IMAC de GLS₂₅₆₋₆₀₂. Se cargaron 10 μ L de cada muestra por pocillo y se tiñeron con azul de Coomassie. Se destacan las bandas correspondientes a la proteína con una flecha roja. M: Marcador; P: Fracción insoluble; SN: sobrenadante soluble;

FT: fracción no retenida (*flow-through*). Con la flecha roja se indica la banda correspondiente a la proteína recombinante.

Se procedió a realizar una optimización del protocolo de purificación modificando el gradiente de elución, de tal forma que cuando se alcanzó un porcentaje del 10 % de la fase móvil B, se mantuvo constante hasta que la señal de absorbancia a 280 nm volvió a la línea base. En este punto, se reinició el gradiente lineal hasta alcanzar el 100 % de B. Se tomaron alícuotas de todo el proceso, que se visualizaron en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (Fig. 4.16).

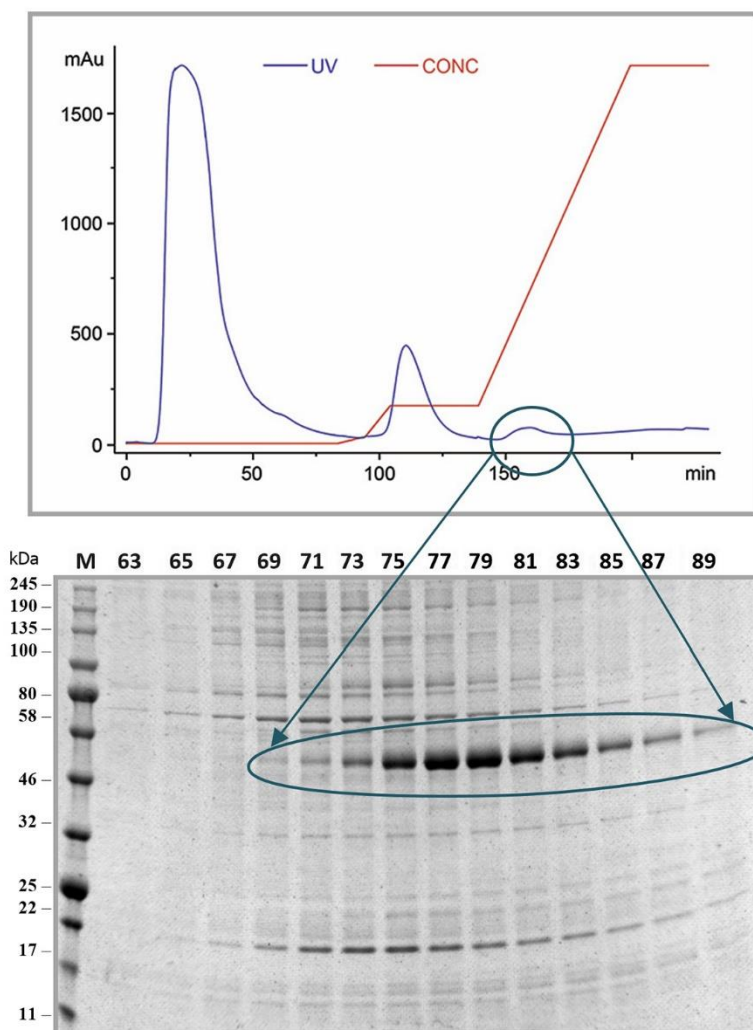


Fig. 4.16. Cromatograma de la purificación por cromatografía de afinidad IMAC de GLS2₅₆₋₆₀₂. La elución isocrática a 10 % de B, seguido por un gradiente lineal hasta el 100 % de B (línea roja), permitió separar el pico contaminante del pico GLS2₅₆₋₆₀₂. En el gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (imagen inferior) se analizan las fracciones de la cromatografía correspondientes a las eluciones de la proteína.

Resultados

Las fracciones que contenían la GLS2 más purificada se combinaron, se dializaron para reducir la concentración de imidazol y, a continuación, se destinaron a una segunda cromatografía IMAC (Fig. 4.17-A). Las fracciones más puras obtenidas en la segunda cromatografía IMAC, se colectaron y concentraron hasta 500 μL por ultrafiltración para proceder a la cromatografía de exclusión molecular como último paso de purificación (Fig. 4.18). Finalmente, se concentraron las fracciones de mayor pureza de SEC (Fig. 4.17, B) hasta un volumen de 100 μL , obteniendo una concentración de 1.84 mg/mL. Por tanto, en el caso de GLS2₅₆₋₆₀₂, a partir de 5.4×10^8 células totales (350 mL de cultivo) se obtuvieron 0.184 mg de proteína total purificada ($0.34 \mu\text{g}/10^6$ células). En el caso de GLS2 completa, a partir de 2.6×10^8 células totales (200 mL de cultivo) se obtuvieron 0.0975 mg de proteína purificada ($0.37 \mu\text{g}/10^6$ células).

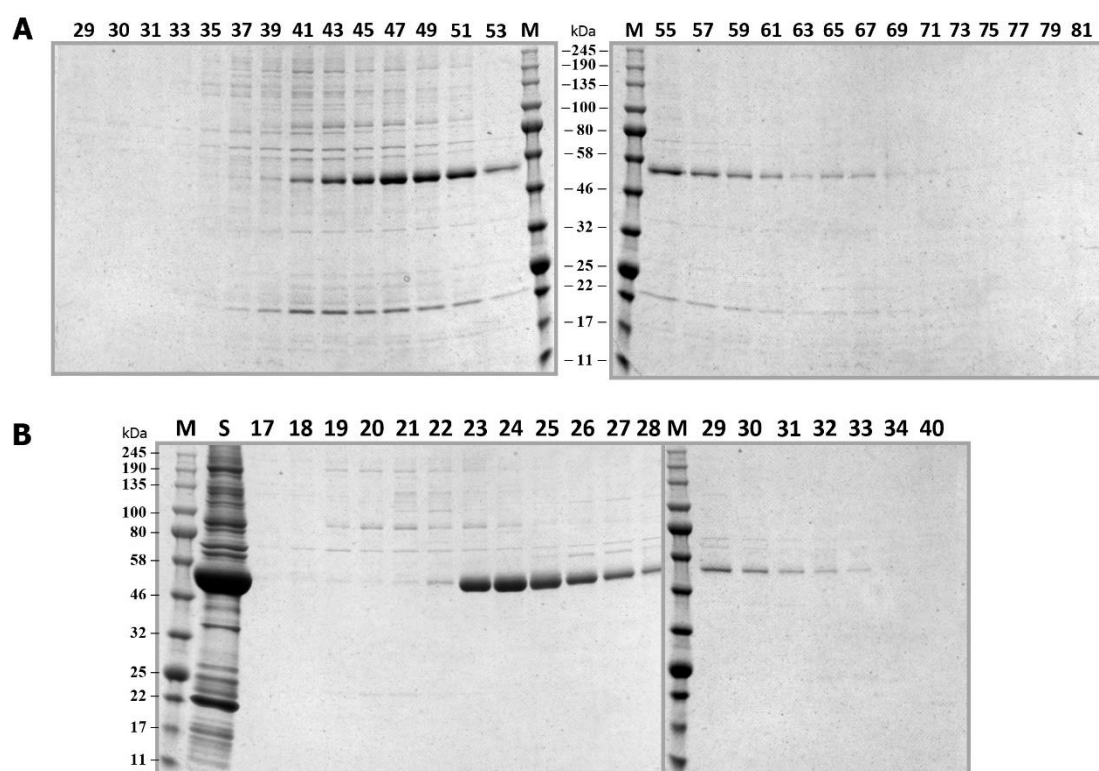


Figura 4.17. Geles de poliacrilamida-SDS teñidos con Coomassie de las fracciones más relevantes obtenidas en la segunda purificación IMAC (A) y en la posterior cromatografía de exclusión molecular (SEC) (B). M: marcador de masas moleculares. Los números indican las diferentes fracciones obtenidas en cada cromatografía.

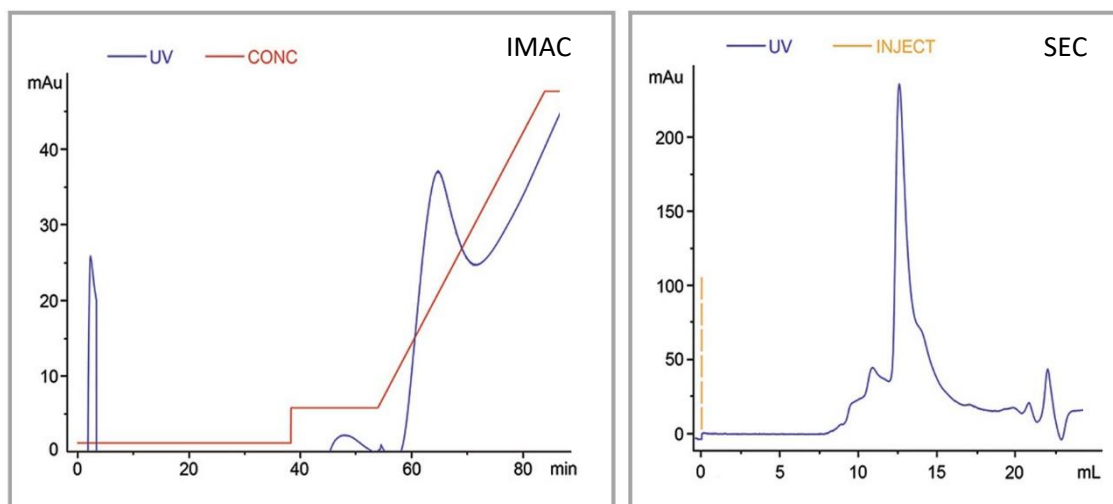


Figura 4.18. Cromatogramas del segundo y tercer paso de la purificación de GLS₂₅₆₋₆₀₂ (IMAC y exclusión molecular SEC, respectivamente). Panel izquierdo: IMAC; Panel derecho: SEC. En rojo se representa el gradiente de elución. Para la cromatografía SEC se empleó la columna HiLoad Superdex 200 pg.

4.3. Caracterización estructural de la proteína GLS₂₅₆₋₆₀₂ expresada en células de insecto

4.3.1. Estimación de la masa molecular de la proteína GLS₂₅₆₋₆₀₂

La calibración de la columna para la cromatografía de exclusión molecular (SEC) se llevó a cabo aplicando 5 calibradores (Sigma) o patrones estándar de masa molecular: citocromo c (12.4 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina (66 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y β -amilasa (200 kDa). El volumen muerto o volumen de exclusión de la columna (V_0) se determinó con el colorante azul dextrano. Se representó el logaritmo de la masa molecular (MW) de cada proteína estándar frente al cociente entre el volumen de elución (V_e) y el volumen de exclusión (V_0) (Fig. 4.19).

Resultados

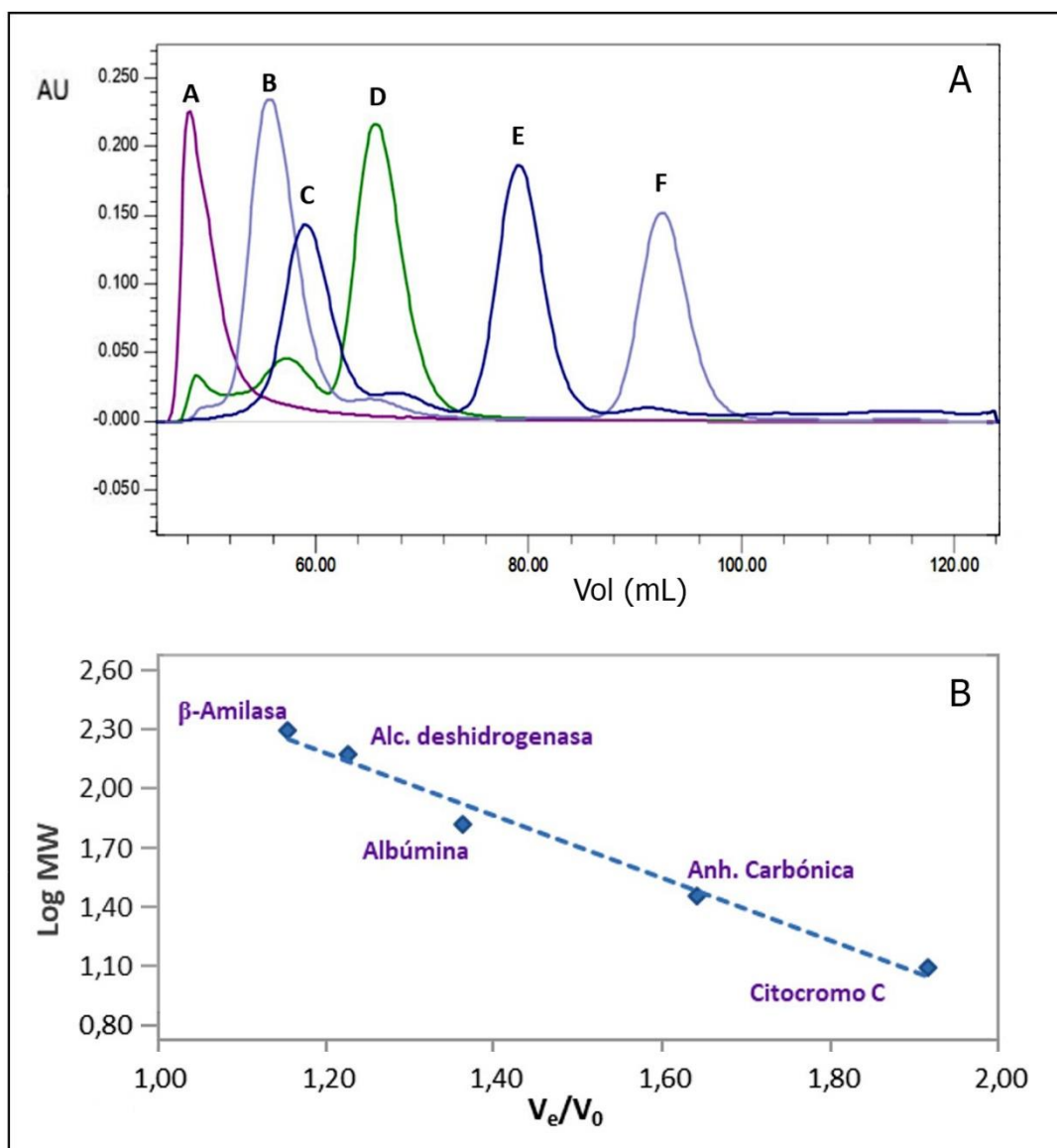


Figura 4.19. Cromatograma representativo de la elución de los estándares (A) y curva patrón ajustada (B). Se empleó una columna Sephacryl S-200 High Resolution HiPrep 16/60. A: azul dextrano; B: β -amilasa, C: alcohol deshidrogenasa, D: albúmina; E: anhidrasa carbónica; F: citocromo c.

Como se puede observar en el cromatograma de la Fig. 4.20, aparecieron dos picos de proteínas con diferente masa molecular: un agregado de gran masa molecular, con un volumen de elución dentro del volumen muerto de la columna, y un segundo pico de GLS2 con una masa molecular de aprox. 212 kDa, compatible con un estado de agregación tetramérico de GLS2. El análisis por electroforesis SDS-PAGE de las fracciones abarcadas por ambos picos (Fig. 4.21), confirmó que el primero contenía

proteínas contaminantes de elevada masa molecular, mientras que el segundo pico correspondía a GLS2.

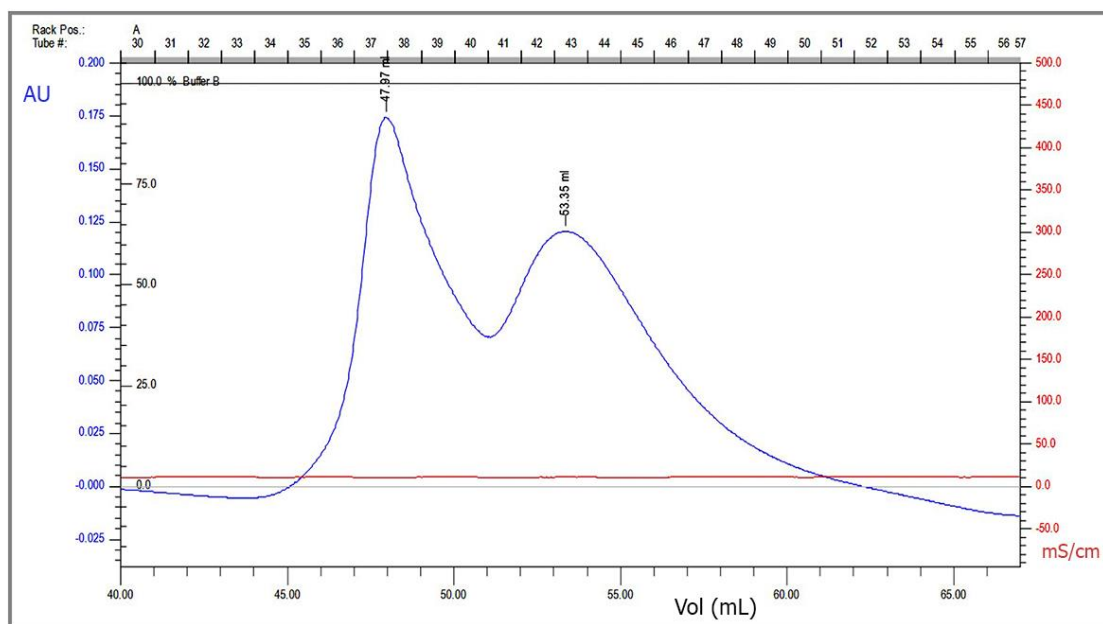


Figura 4.20. Análisis de la proteína purificada GLS2₅₆₋₆₀₂ por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Como se observa en el cromatograma, se obtuvieron dos poblaciones proteicas: un pico con V_e de 47.97 ml (dentro del volumen de exclusión de la columna) y que se corresponde con contaminantes de elevada masa molecular, y un oligómero con V_e de 53.35 ml, compatible con un estado tetramérico de GLS2. Los números de las fracciones aparecen en la parte superior del cromatograma.

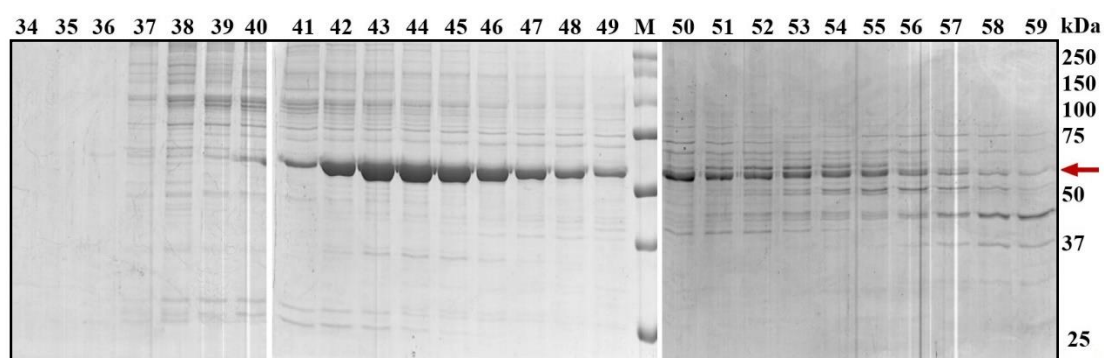


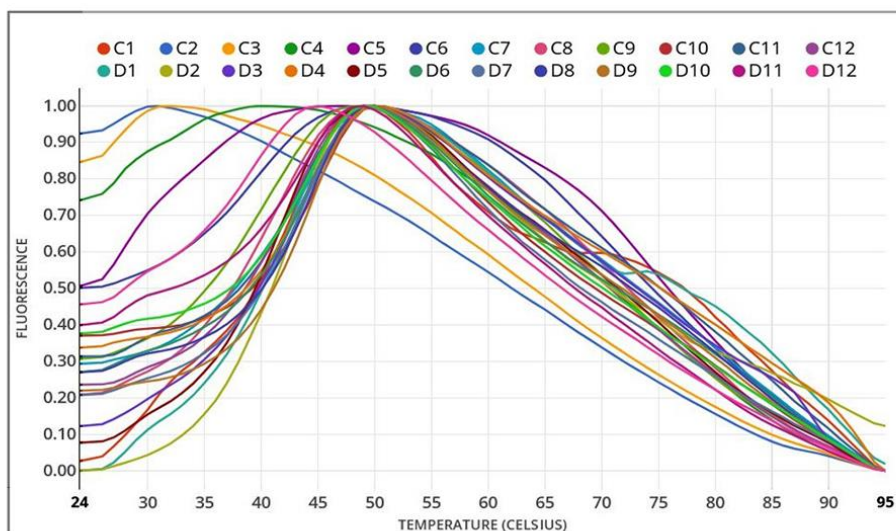
Figura 4.21. Purificación de GLS2₅₆₋₆₀₂ mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). Las fracciones 34 a 59 se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. La flecha roja en el margen derecho indica la posición de GLS2₅₆₋₆₀₂.

Resultados

4.3.2. Estabilidad de la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂: ensayo Termofluor

Antes de comenzar con los ensayos de cristalización, se realizaron varios ensayos Termofluor con la proteína truncada y la completa bajo diferentes condiciones. En las gráficas siguientes (Fig. 4.22 y 4.23), se muestran las curvas de fusión para la proteína truncada, ya que las gráficas de desnaturalización que se obtuvieron para la proteína completa fueron similares.

Para diferentes valores de pH y tampones, los valores de T_m fueron prácticamente similares en un rango de pH comprendido entre 7.0 y 8.5, con algunas excepciones como se muestra en la Fig. 4.22. En los ensayos de optimización de la concentración de NaCl en tampón HEPES 50 mM, pH 7.5, la T_m mayor aumentó en paralelo con la concentración de NaCl (Fig. 4.23). Los ensayos en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 mostraron valores de T_m parecidos, aunque aparecían algunas curvas bifásicas que indican una menor estabilidad de la proteína (Fig. 4.23). En las Tablas se detallan las temperaturas de fusión para cada condición ensayada.



Pocillo	pH	Tampón (100 mM)	[NaCl] (100 Mm)	T _m (°C)	Pocillo	pH	Tampón (100 mM)	[NaCl] (100 mM)	T _m (°C)
C1		Agua	250	40	D1	7	MOPS	250	40
C2	4	Citrato	250	N.E.	D2	7.3	Acetato amónico	250	42
C3	4.5	Acetato sódico	250	N.E.	D3	7.5	Tris-HCl	250	42
C4	5	Citrato	250	N.E.	D4	7.5	Fosfato sódico	250	43
C5	6	MES	250	33	D5	8	Imidazol	250	40
C6	6	Fosfato potásico	250	37	D6	8	HEPES	250	42
C7	6	Citrato	250	42	D7	8	Tris-HCl	250	43
C8	6.5	BIS-Tris	250	39	D8	8	<u>Tricina</u>	250	43
C9	6.5	MES	250	37	D9	8	<u>BicINA</u>	250	43
C10	7	Fosfato potásico	250	44	D10	8.5	<u>BicINA</u>	250	43
C11	7	Fosfato potásico	250	42	D11	8.5	Tris-HCl	250	39
C12	7	CHES	250	41	D12	9	CHES	250	35

Figura 4.22. Ensayo Termofluor de GLS2₅₆₋₆₀₂, producida en células de insecto, empleando diferentes tampones con NaCl 250 mM. En la Tabla se indican los tampones correspondientes a cada curva, junto con el valor de T_m. N.E: curvas consideradas no estables.

Resultados

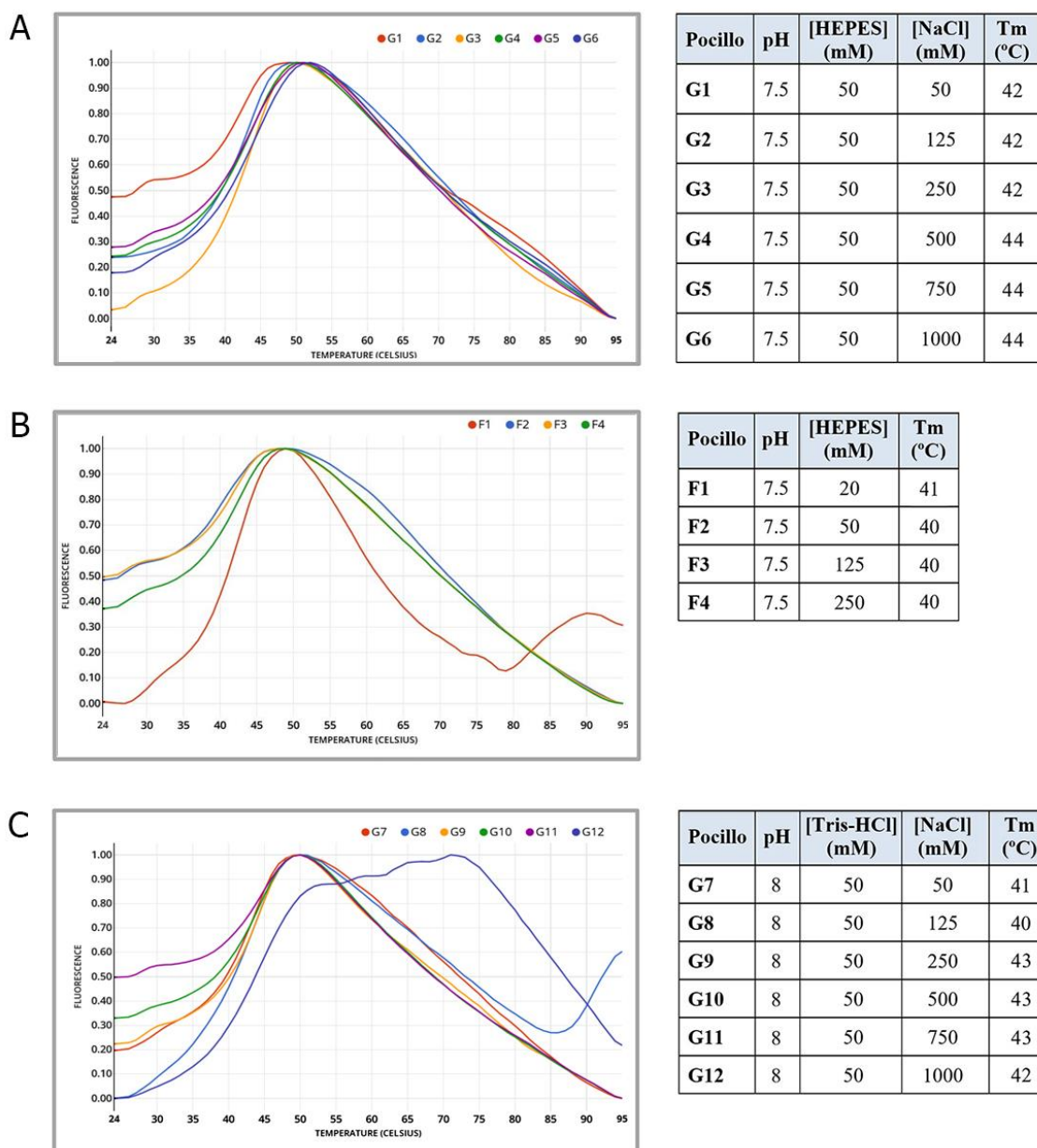
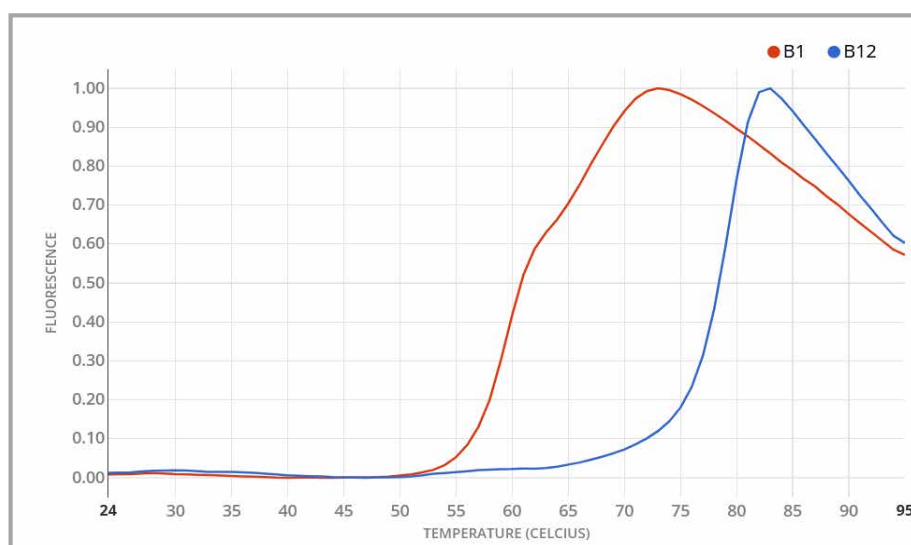


Figura 4.23. Ensayo Termofluór de GLS2₅₆₋₆₀₂ producida en células de insecto. A) Con diferentes concentraciones de NaCl en tampón HEPES 50 mM pH 7.5; B) Con diferentes concentraciones de tampón HEPES pH 7.5; C) Con diferentes concentraciones de NaCl en tampón Tris-HCl pH 8 (N.E.: no estable).

Por tanto, tomando en consideración estos resultados de estabilidad térmica, se consideró como solución más estable para la purificación y conservación de la proteína un tampón compuesto por HEPES 50 mM pH 7.5 y NaCl 500 mM. Igualmente, teniendo en cuenta estos resultados de estabilidad proteica para ambas formas GLS2, realizamos

los ajustes oportunos en las soluciones y fases móviles empleadas en el aislamiento y purificación de las proteínas GA recombinantes.

Tras el nuevo proceso de purificación modificado, explicado anteriormente, y como protocolo habitual previo a proceder con el rastreo de condiciones para la cristalización de las proteínas, de cada muestra de proteína purificada bajo las nuevas condiciones se realizó un ensayo Termoflúor estándar, con un medio compuesto por HEPES 100 mM pH 7.5 y NaCl 150 mM (Dupeux *et al.*, 2011) (Fig. 4.24).



Pocillo	Muestra	Concentración (mg/mL)	T _m (°C)
B1	FL09	5.52	61
B12	GLS2-56	1.88	78

Figura 4.24. Ensayo Termoflúor para muestras de GLS2 completa y GLS2₅₆₋₆₀₂ purificadas bajo las nuevas condiciones. Se representa como FL09 (B1, curva roja) a la proteína GLS2 completa y como GLS2-56 (B12, curva azul) a la proteína truncada.

El ensayo Termoflúor mostró un notable aumento de la estabilidad proteica, reflejado en valores superiores de T_m, tras la optimización de los medios de disolución para ambas proteínas. Además, hay que destacar que, en estas nuevas condiciones, el inicio del proceso de desnaturalización ocurría a valores de fluorescencia próximos a 0, como queda reflejado en la curva de desnaturalización térmica normalizada, lo que

Resultados

posiblemente indicaba que la proteína se encontraba completamente plegada y sin regiones hidrofóbicas expuestas a la interacción con el compuesto fluorescente (ver Materiales y Métodos).

4.3.3. Cristalización de la proteína GLS2. Rastreo (*Screening*) de las condiciones de cristalización

Se ensayaron un total de 3840 condiciones de cristalización diferentes repartidas en 40 placas comerciales, que incluían PEGs-I_qiagen, Classics-Suite_qiagen, Salt-Grid_hampton (Hampton Research), PACT_MD, JCSG_MD, ProPlex_MD, Morpheus_MD, Wizard_I+II_rigaku (Molecular Dimension) y JBS-classic-1_jena (Jena Bioscience). A partir de los resultados obtenidos con estas placas comerciales, se ajustaron las condiciones de cristalización en una placa que se preparó manualmente y que incluía 48 condiciones diferentes. Además de diferentes placas con diferentes soluciones precipitantes, también se probaron varias concentraciones de proteína purificada: para GLS2 secuencia completa, se probaron concentraciones de 1.3, 3.3 y 5.5 mg/mL; en el caso de la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂, las concentraciones evaluadas fueron 1, 1.84, 1.88 y 7.7 mg/mL.

Las visualizaciones periódicas, pocillo a pocillo, de las imágenes tomadas de las placas comerciales en la plataforma CRIMS (*Crystallographic Information Management System*), mostraron la producción de varios cristales que se sometieron a difracción de rayos X (*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF), Grenoble, Francia). Uno de los resultados obtenidos se representa en la imagen de la Fig. 4.25, donde se aprecian dos cristales a dos tiempos distintos, 48 h y 88 días, después de la siembra de la placa. La difracción por rayos X de ambos cristales identificó un punto a muy alta resolución (12.73Å) en los cuadrantes 19 al 21, típico de los cristales de sal (Fig 4.26).

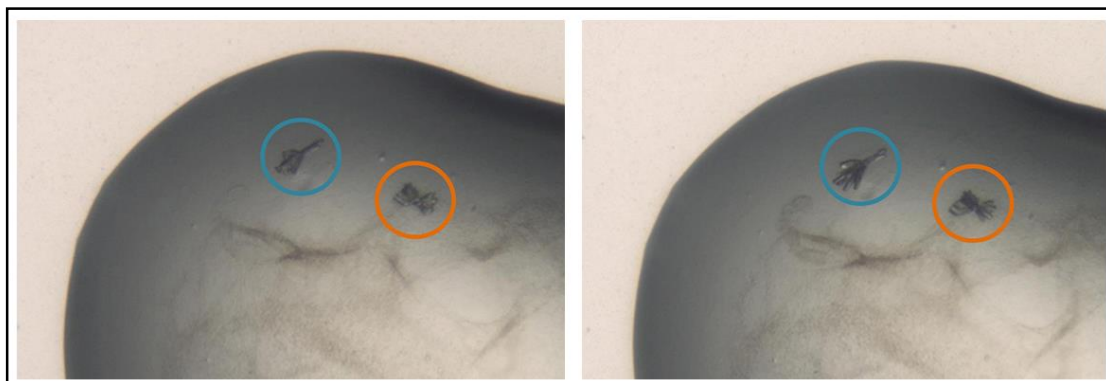


Figura 4.25. Cristales producidos a 20°C bajo la condición designada como E06-2 de la placa comercial ProPlex_MD: PEG 8000 12 % (p/v), cacodilato sódico 0.1 M y acetato cálcico 0.1 M. La concentración de GLS2₅₆₋₆₀₂ fue 1.84 mg/mL. Imagen tomada a las 48 h (izquierda) y tras 88 días (derecha) del montaje de la placa, donde se observa un aumento en el tamaño y definición de los cristales. Se destacan los cristales con un círculo azul y naranja.

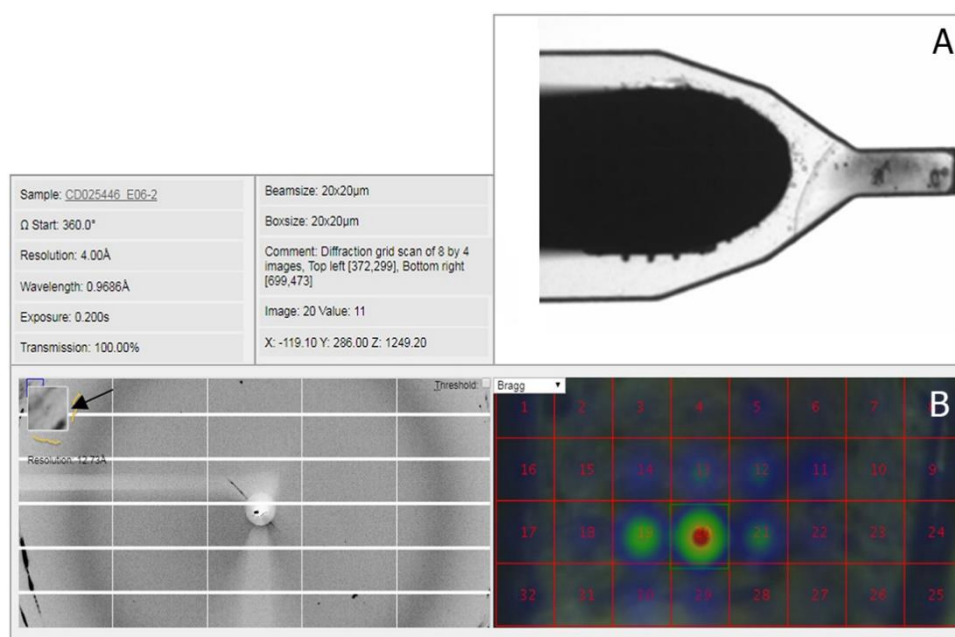


Figura 4.26. Imagen de la recolección de los cristales E06-2 (A) y patrón de difracción por rayos X (B).

En la Fig. 4.27, se aprecia la mejora en la definición del cristal y el aumento del tamaño con el tiempo de incubación de la placa, para otras condiciones diferentes (condición C10-2). Por ello, se decidió proceder a su recolección y difracción, mostrando

Resultados

un único punto en el recuadro 84 a baja resolución (5.59 Å), que podría ser proteína extremadamente desordenada u otra molécula orgánica presente en la condición de cristalización, como MES (Fig. 4.28).

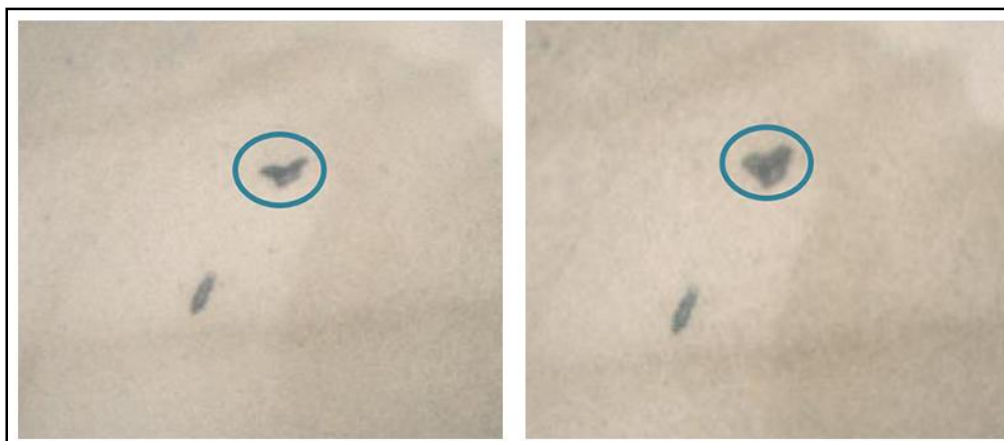


Figura 4.27. Cristales producidos a 20°C bajo la condición C10-2 de la placa comercial ProPlex_MD: sulfato amónico 0.15 M, MES 0.1 M, pH 5.5 y PEG 4000 25 % (p/v). La concentración de GLS2₅₆₋₆₀₂ fue 1.84 mg/mL. Imagen tomada a las 48 h (izquierda) y tras 88 días (derecha) del montaje de la placa.

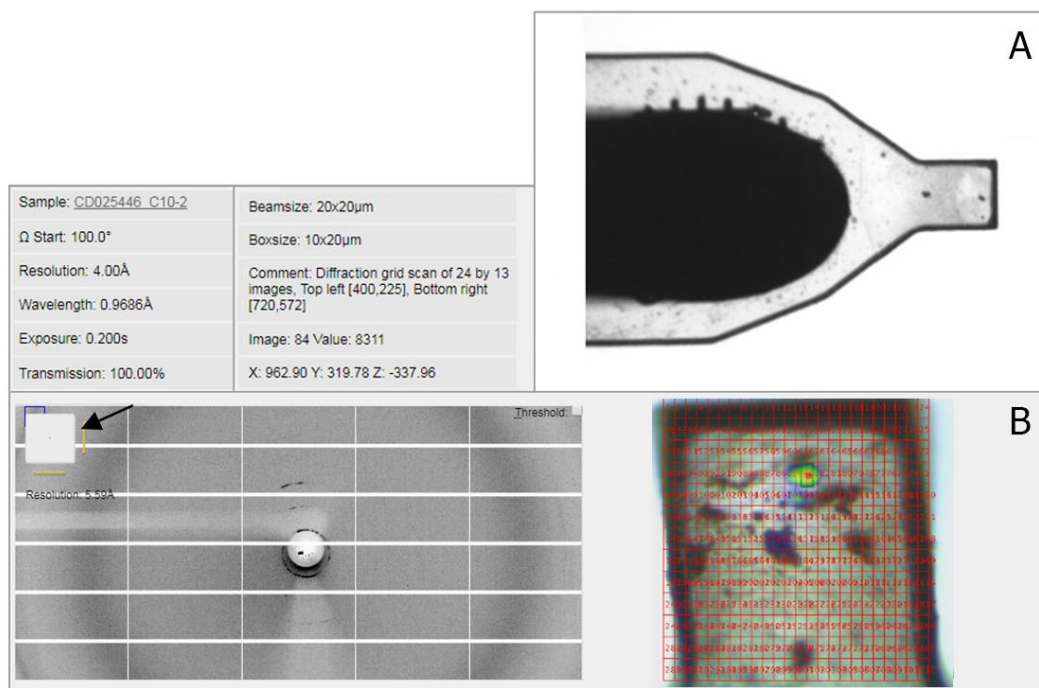


Figura 4.28. Imagen de la recolección de los cristales C10-2 (A) y patrón de difracción por rayos X (B). En este caso no se aprecia la forma del cristal tras la recolección.

El resultado esperado se obtuvo con una de las condiciones de cristalización que contenía sales de Li (H03-2). La imagen al microscopio indica claramente microcristales de proteína, como se muestra en la imagen de la Fig. 4.29, que son muy diferentes a los cristales salinos. Desgraciadamente, en la recolección de los microcristales, se produjo un problema técnico que provocó la contaminación con hielo, como se puede observar en la imagen de la Fig. 4.30. Por ello, en la difracción de estos cristales sólo se aprecia un punto en el recuadro 207 a una resolución de 4.16 Å muy presumiblemente cristal proteico, pero que no se pudo determinar de forma categórica por el error en el aspirado de los cristales y la contaminación.

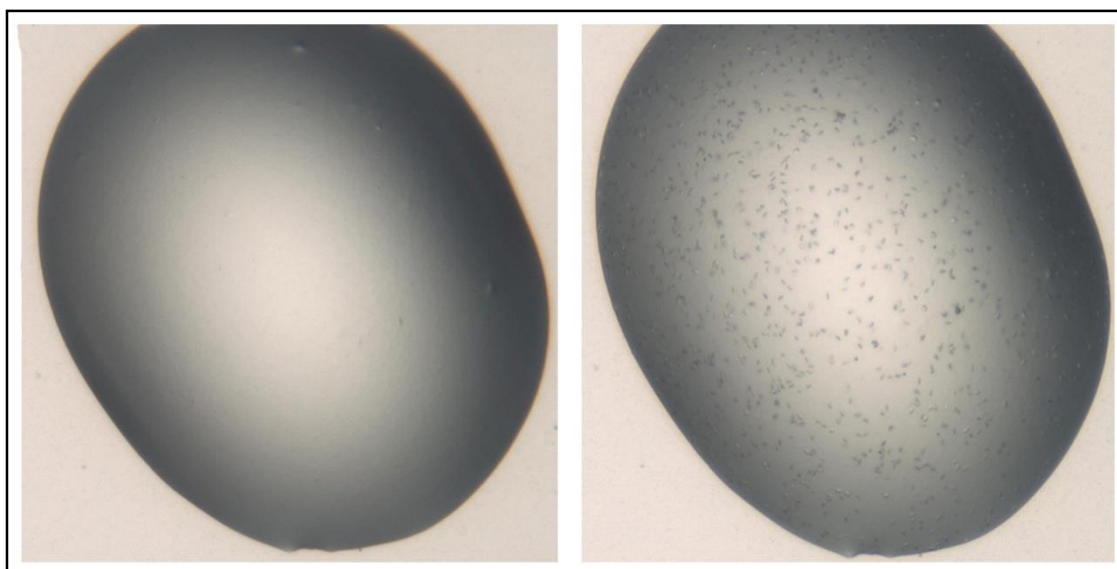


Figura 4.29. Microcristales de GLS2₅₆₋₆₀₂ producidos a 20°C bajo la condición H03-2 de la placa comercial ProPlex_MD: Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 y sulfato de litio 1.6 M. La concentración de proteína fue 1.84 mg/mL. Imagen tomada a las 48 h (izquierda) y tras 63 días (derecha) del montaje de la placa, donde se observa claramente la aparición de microcristales proteicos.

4.3.4. Caracterización cinética de GLS₂₅₆₋₆₀₂ expresada en bacterias y células de insecto

Para la caracterización cinética de la proteína GLS₂₅₆₋₆₀₂ expresada en *E. coli* y en células de insecto se tuvieron en cuenta dos variables: la concentración saturante de su sustrato, L-Gln, y la concentración del activador fosfato inorgánico (Pi). Se realizaron medidas de actividad GA en placas de 96 pocillos a tiempo real, midiendo la fluorescencia producida por el producto (NADH) de la segunda reacción acoplada (GLUD), empleando una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 460 nm, tal y como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados de las medidas mostraron curvas de valores de fluorescencia (eje Y) a lo largo del tiempo (eje X). Para el cálculo de la velocidad inicial de la reacción enzimática, se tomaron los puntos de la gráfica donde la pendiente era mayor, a tiempos iniciales de reacción, y se ajustaron mediante una regresión lineal. La pendiente de la recta ajustada se consideró la velocidad inicial de la reacción.

Para determinar la concentración apropiada de Pi se emplearon 3 concentraciones del activador: baja (5 mM), media (50 mM) y alta (150 mM). Manteniendo constante cada concentración de Pi, se realizaron un total de 5 medidas para 5 concentraciones diferentes de Gln: 0, 5, 10, 30 y 50 mM. Tras calcular la velocidad inicial de cada reacción enzimática, se representaron los porcentajes de actividad enzimática frente a la concentración de Gln (Fig. 4.31). La concentración de Pi 50 mM resultó ser suficiente para la actividad de las dos enzimas, no apreciándose diferencias entre 50 y 150 mM. El ajuste (línea continua) obedeció a una cinética alostérica sigmoideal para la proteína producida en bacterias, mientras que se obtuvo una cinética de Michaelis-Menten para la proteína producida en eucariotas (Fig. 4.31).

Resultados

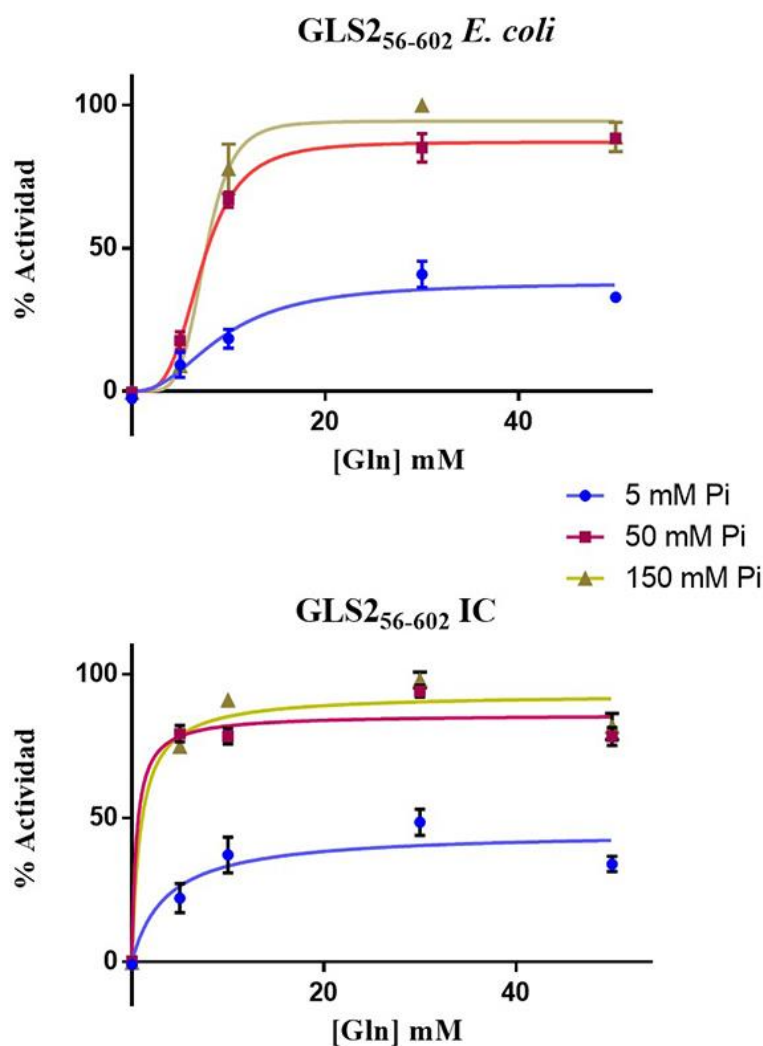


Figura 4.31. Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática GA (expresada como % de actividad) frente a la concentración de Gln para la proteína GLS₅₆₋₆₀₂ producida en *E. coli* (panel superior) y en células de insecto (IC, panel inferior). La concentración de fosfato 50 mM resultó ser suficiente para la actividad de las dos enzimas, no apreciándose diferencias significativas entre 50 y 150 mM. Se realizaron un mínimo de dos réplicas de cada ensayo y en cada gráfica se muestra el valor medio \pm desviación estándar de la media de cada velocidad inicial. El ajuste (línea punteada) obedeció a una cinética alostérica sigmoideal para la proteína producida en procariontas, mientras que se obtuvo una cinética de Michaelis-Menten para la producida en eucariotas. Ambos ajustes se realizaron utilizando el software GraphPad Prism.

Para calcular las constantes cinéticas de ambas proteínas recombinantes y su dependencia de la concentración de sustrato (Gln), se midió la actividad GA en tiempo real durante 10 min, con concentraciones de Gln desde 1 mM hasta 40 mM. La

concentración de Pi se mantuvo constante a 50 mM y se calcularon las velocidades iniciales para cada concentración de Gln de la misma forma que en el ensayo anterior.

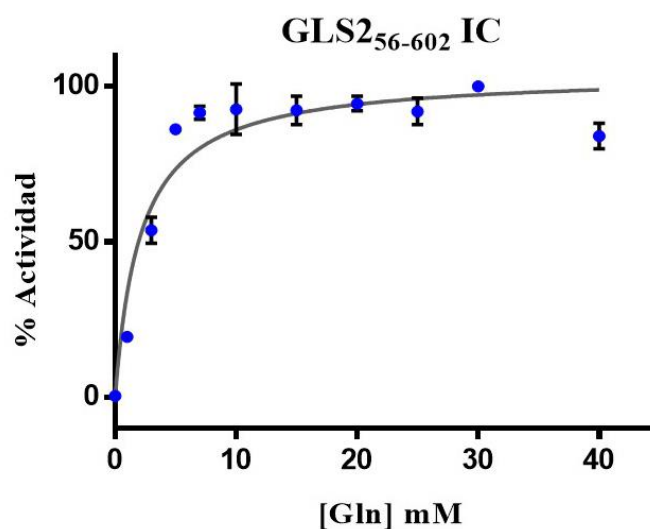


Figura 4.32. Gráfica que representa la velocidad inicial de reacción enzimática de la proteína recombinante GLS₂₅₆₋₆₀₂ expresada en células de insecto (expresada como % de actividad) frente a la concentración de Gln. Se muestran los valores medios \pm desviación estándar de la media de dos ensayos independientes.

La gráfica (Fig. 4.32) de la proteína GLS₂₅₆₋₆₀₂ purificada de células de insecto, se ajustó a una cinética de Michaelis-Menten en GraphPad Prism 6, obteniendo una constante de Michaelis-Menten, K_m , de 2.09 ± 0.45 mM. Por el contrario, para la proteína recombinante producida en procariontas, la curva resultante al representar la velocidad inicial frente a la concentración de Gln se ajustó a una cinética alostérica sigmoidal (Fig. 4.33), resultando una $[S]_{0.5}$ de 5.98 ± 0.22 mM y un índice de Hill (n) de 7.98 ± 1.68 .

Resultados

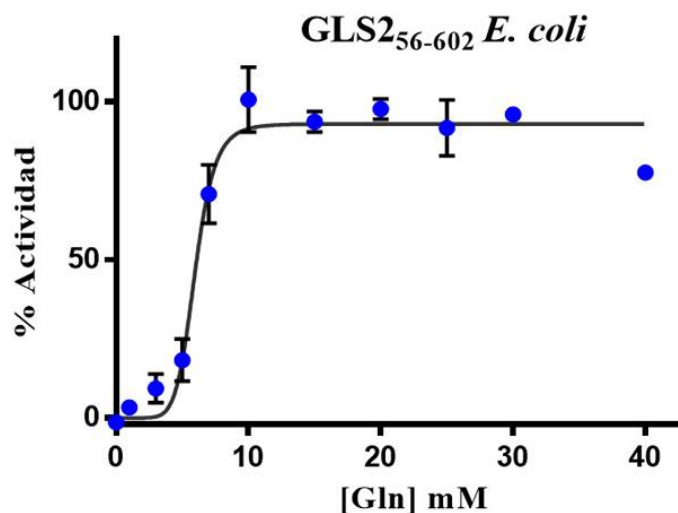


Figura 4.33. Gráfica de velocidad inicial (expresada como % de actividad) frente a la concentración de sustrato para la proteína recombinante producida en *E. coli*. La gráfica se ajustó en GraphPad Prism 6 y se muestran los valores medios \pm desviación estándar de la media de dos ensayos independientes.

4.3.5. Caracterización de la interacción GLS2-GIP por interferometría de biocapa (BLI)

Como se expuso en la sección de Materiales y Métodos, nuestro grupo llevó a cabo un ensayo genético de doble híbrido en levadura con el objetivo de encontrar proteínas que pudieran interactuar con GA. Este rastreo genético se implementó en una genoteca de cDNA de cerebro humano, empleando como cebo la región C-terminal de la isoenzima GAB humana (Olalla *et al.*, 2001). Se aislaron dos proteínas que contenían un dominio PDZ (PSD95/Dlg/ZO1): α -1-sintrofina (SNT) y GIP. La unión del dominio PDZ de GIP a una secuencia consenso corta de 4 residuos (ESMV), de la región C-terminal de GAB, pudo cuantificarse mediante la medida de la constante de disociación (K_D). En un estudio realizado en colaboración con el grupo de la Dra. S. Mohanty (Banerjee *et al.*, 2008), se diseñó un péptido que contenía la región C-terminal de GAB (KENLESMV-COOH) y mediante análisis por RMN y espectroscopía de fluorescencia se determinó un valor de la K_D de 1.66 μ M. Al tratarse de la unión de un octapéptido a la proteína GIP, este resultado muestra solo una información parcial sobre la afinidad de unión entre GAB

y GIP, por lo que decidimos calcular la constante de disociación empleando la proteína completa GLS2, sin ninguna etiqueta de afinidad, y la tecnología BLI.

Para realizar el ensayo, se estimó en primer lugar la concentración máxima de GIP (ligando de GLS2) necesaria para saturar el biosensor. Para ello, se emplearon 4 concentraciones diferentes de la proteína GIP purificada: 0.5, 1, 2.5 y 10 μM (Fig. 4.34).

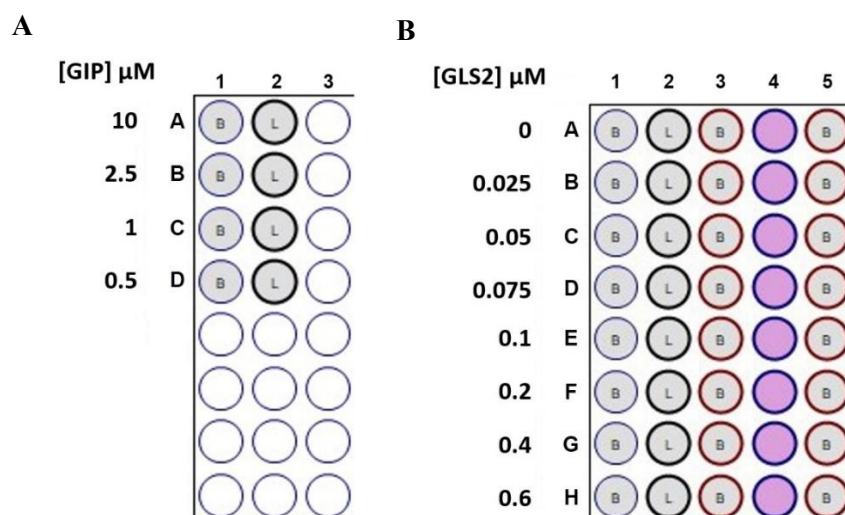


Figura 4.34. Ensayo de interferometría de biocapa (BLI) para la caracterización de la interacción GIP-GLS2. A: Distribución de la placa de 96 pocillos para el cálculo de la concentración saturante de GIP. B: Distribución de la placa de 96 pocillos para el cálculo de la constante de disociación GIP-GLS2. La columna 4 con pocillos de color rosa contenía ocho concentraciones diferentes (una por pocillo) de la proteína GLS2 recombinante completa producida en células de insecto (Sf9) y purificada mediante columna de afinidad GIP. Pocillos B: tampón BLI; Pocillos L: contienen el ligando (GIP).

En la Fig. 4.35, se observa el sensorgrama obtenido al realizar el ensayo de saturación del biosensor con GIP. Se representa el incremento de la longitud de onda a lo largo del tiempo, diferenciando por colores los 4 sensores empleados para las 4 concentraciones diferentes de ligando. Como se puede apreciar en el sensorgrama, la saturación se alcanza a una concentración mínima de 1 μM de GIP (curva roja), siendo prácticamente estable a las concentraciones mayores de GIP. La concentración de 0.5 μM (curva verde) no llegó a alcanzar un nivel de saturación estable en el tiempo de unión establecido.

Resultados

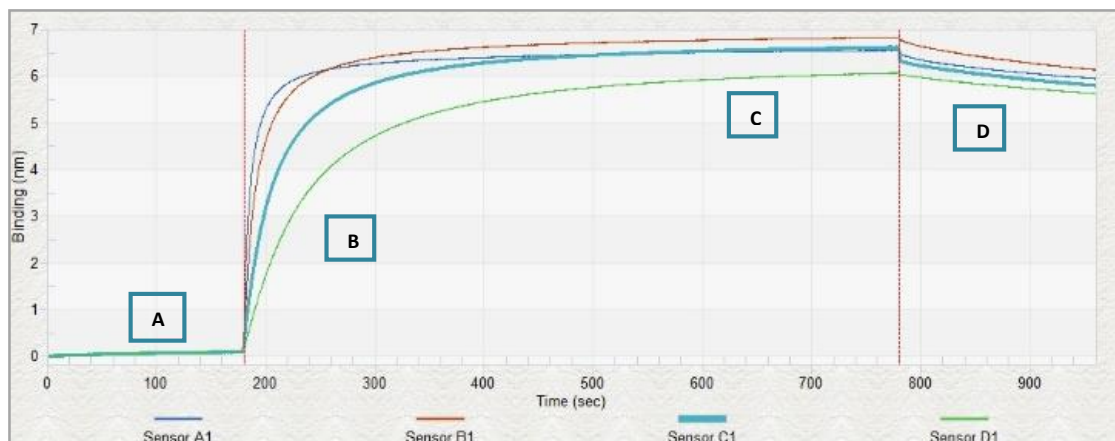


Figura 4.35. Sensorgrama que representa el incremento de la longitud de onda a lo largo del tiempo en la unión de GIP al biosensor. A: equilibrado; B: unión de GIP al biosensor; C: saturación; D: lavado.

Tras seleccionar la concentración de GIP de $1 \mu\text{M}$ como la concentración de ligando apropiada para la saturación del sensor, se procedió a determinar la constante de disociación (K_D) GLS2-GIP. Para ello, se utilizaron 8 concentraciones diferentes de GLS2, desde 0.025 hasta $0.6 \mu\text{M}$. En la Fig. 4.36 se representa el sensorgrama correspondiente, donde se muestran 6 etapas claramente diferenciadas:

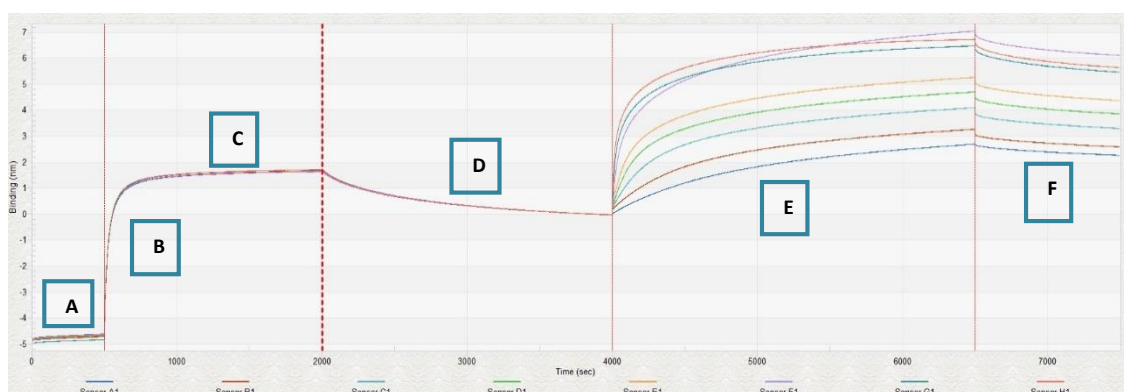


Figura 4.36. Sensorgrama que muestra la variación de longitud de onda con el tiempo durante todo el experimento de seguimiento de la interacción GIP-GLS2. Las diferentes etapas indicadas son: etapa A, equilibrado; etapa B, unión del ligando a los biosensores; etapa C, saturación de los puntos de unión; etapa D, nuevo equilibrado del biosensor; etapa E, unión GLS2-GIP bajo diferentes concentraciones de GLS2; etapa F, disociación.

Para cada concentración de GLS2 se calculó el valor de la respuesta máxima. Estos valores se representaron y ajustaron mediante una regresión no lineal usando GraphPad Prism9 (Fig. 4.37), aplicando la ecuación *One site-Total binding*:

$$Y = \frac{B_{max} * X}{(K_D + X) + NS * X + Background}$$

Donde B_{max} es la unión específica máxima (nm), K_D es la constante de equilibrio de disociación (μM), NS es la pendiente de la unión no específica (nm/ μM) y *background* es la cantidad de uniones no específicas. En nuestro caso, el *background* fue automáticamente sustraído, por lo que este valor fue 0. Se realizaron dos réplicas del experimento, resultando un valor de $K_D = 77 \pm 3$ nM (Fig. 4.37).

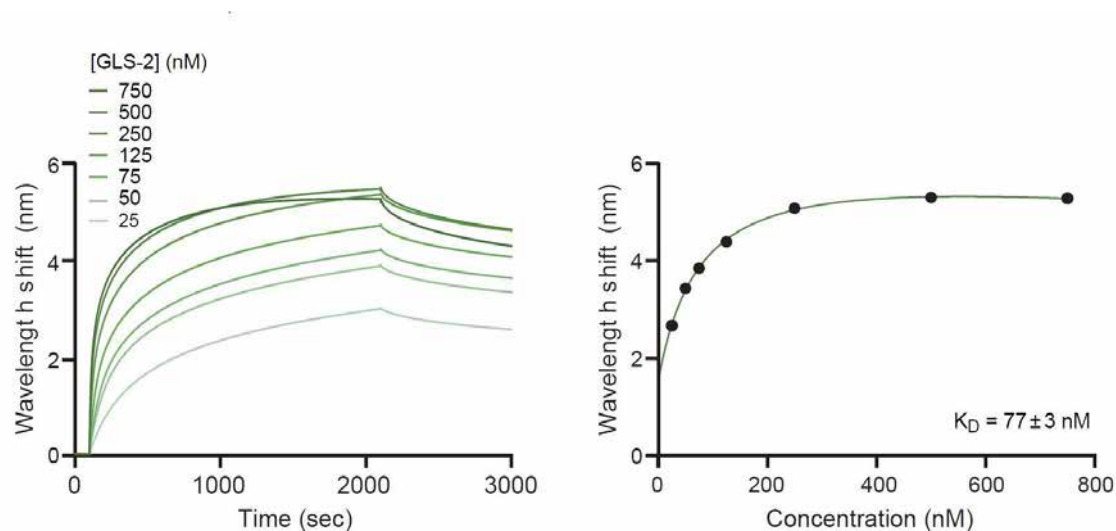


Figura 4.37. Gráficas correspondientes al tramo del sensorgrama de unión GLS2-GIP (izquierda) y cálculo de la K_D (derecha).

4.3.6. Caracterización de modificaciones postraduccionales en GLS2

En un estudio publicado por nuestro grupo (Olalla L. *et al.*, 2002) se describió el hallazgo de la localización nuclear de GLS2 en cerebro de mamíferos (rata y mono). En

Resultados

esta publicación, se indicaba que GLS2 se importaba al núcleo sin tener una señalización clásica nuclear a través de las vías de exportación/importación. Por este motivo, planteamos como hipótesis la posibilidad de la existencia de modificaciones postraduccionales que justificasen este mecanismo. Para ello, se empleó la proteína GLS2 completa purificada de células de insecto Sf9, que no poseía la etiqueta de afinidad 6xHis para evitar posibles alteraciones en su procesamiento postraducciona. Esta GLS2 completa se purificó por cromatografía de afinidad, empleando la proteína PDZ GIP como ligando de afinidad, como nuestro grupo ha descrito anteriormente (Campos-Sandoval *et al.*, 2007). La proteína pura se digirió con tripsina y quimotripsina y se procedió a realizar el ensayo de LC-MS/MS, empleando un analizador Orbitrap. Se identificó un péptido quimotriptico que, en el espectro de masas (Fig. 4.38-A), mostró su cuarto residuo modificado con acetilhipusina (K332 de la secuencia completa de GLS2) (López de la Oliva *et al.*, 2020). La hipusina, [Nε-(4-amino-2-hidroxi-butil)lisina], es un derivado de la lisina, que se produce a través de dos reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas desoxihipusina sintasa (EC 2.5.1.46) y desoxihipusina hidrolasa (EC 1.14.99.29) (Park, 2006). La primera enzima cataliza la degradación de la poliamina espermidina y la transferencia de su grupo 4-aminobutil a un residuo de lisina de la proteína diana, generándose desoxihipusina. La segunda enzima hidroxila la desoxihipusina para formar hipusina.

La hipusinación es una modificación postraducciona inusual, por lo que para su confirmación se procedió a realizar una inmunotransferencia western empleando un anticuerpo antihipusina (Nishiki *et al.*, 2013), que reveló una banda de aproximadamente 63 kDa (Fig. 4.38-B y C). Para la inmunotransferencia western, se emplearon alícuotas de las mismas fracciones de proteína GLS2 purificada que se destinaron para el análisis por espectrometría de masas. Hasta el momento, la única proteína conocida que contiene el aminoácido hipusina es el factor de iniciación a la traducción de eucariota 5A (eIF5A) (Park, 2006), por lo que como control positivo se usaron extractos totales de cerebro de ratón y cortex prefrontal de rata. Como control negativo, se usó la proteína recombinante GLS2₅₆₋₆₀₂ expresada en *E. coli* y purificada, ya que la maquinaria postraducciona de las bacterias es incapaz de producir este tipo de modificaciones.

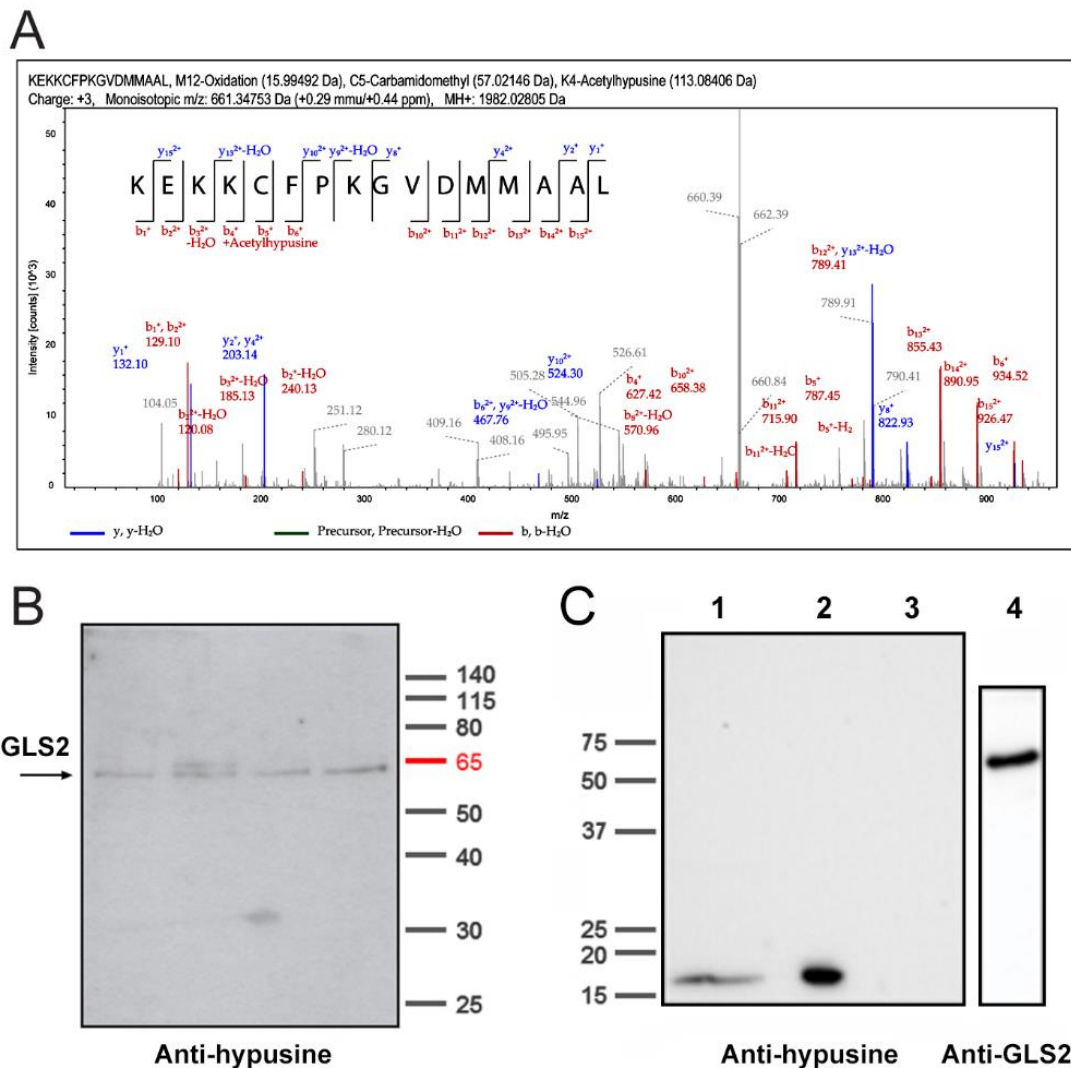


Figura 4.38. Caracterización de la modificación postraduccional de la proteína recombinante GLS2 por acetilhipusina. (A) Espectro de masas representativo de un péptido quimotriptico GLS2 con la modificación postraduccional por acetilhipusina. El péptido KEKKCFPKGVDMMAAL (desde el aminoácido 329 al 344 de la secuencia de GLS2) aparece con carga + 3 y con una relación m/z monoisotópica de 661.34753 Da (+0.29 mmu/+0.44 ppm). MH+: 1982.02805 Da, incluyendo C-5 carbamidometil (57.02 Da), M-12 oxidación (15.99 Da) y K4-acetilhipusina (113.08 Da). (B) Validación de la hipusinación de GLS2 por inmunotransferencia western usando un anticuerpo policlonal específico antihipusina, gentilmente cedido por el Dr. R. G. Mirmira (Indiana University School of Medicine, Indianapolis). (C) Control positivo y negativo de la hipusinación. Como control positivo se emplearon extractos totales de cerebro de ratón y de corteza prefrontal de rata (20 μ g de proteína total de cada muestra), que reveló una banda de la proteína eIF5A hipusinada a aprox. 17 kDa (calles 1 y 2). Como control negativo se usó la proteína recombinante purificada GLS2₅₆₋₆₀₂ expresada en *E. coli*.

Resultados

El análisis MS/MS por espectrometría de masas se realizó fragmentando los péptidos trípticos y quimotrípticos mediante dos técnicas distintas: la disociación por colisión de alta energía (HCD) y la disociación inducida por colisión (CID). La disociación HCD permitió una mayor cobertura de secuencia que la disociación CID, dentro de un rango de cobertura del 57.6 % al 77.1 %, mientras que el número de péptidos únicos de GLS2 obtenidos en el análisis fue ligeramente mayor con la digestión con quimotripsina. La cobertura de secuencia resultante (suma de los péptidos trípticos y quimotrípticos identificados) fue del 89 % para los análisis de las muestras digeridas empleando ambas proteasas (Fig. 4.39).

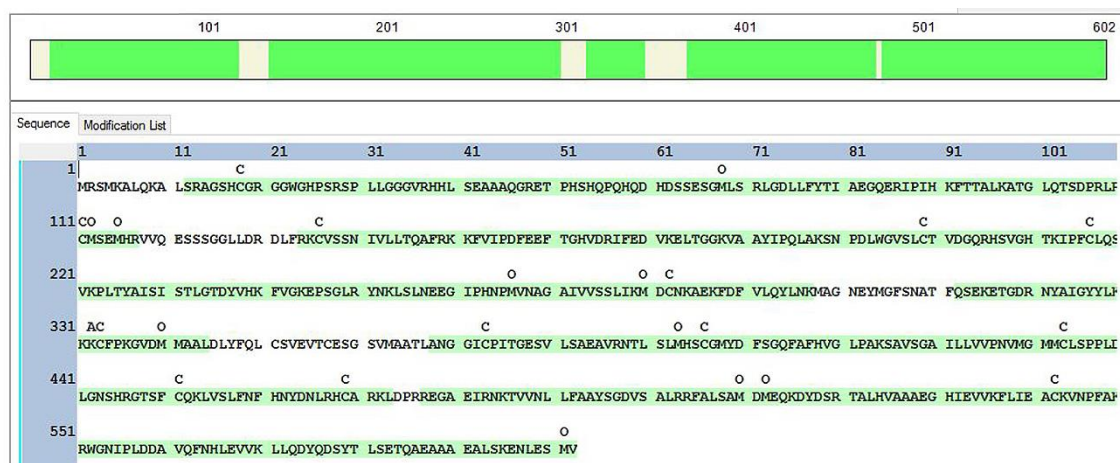


Figura 4.39. Cobertura de secuencia del análisis LC-MS/MS de la proteína GLS2 completa en un analizador Orbitrap. Se destaca en color verde los péptidos detectados en el análisis LC-MS/MS, digiriendo la proteína purificada con tripsina y quimotripsina. Se emplearon como técnicas de disociación y fragmentación HCD y CID.

II. ANÁLISIS PROTEÓMICO

4.4. Localización subcelular de GLS2 en células tumorales

Como se ha comentado anteriormente, nuestro grupo ha publicado estudios en los que se obtuvo una localización nuclear de GLS2 en cerebro de mamíferos, tanto en neuronas (Olalla et al., 2002) como en astrocitos (Cardona et al., 2015). El siguiente paso fue estudiar la posible localización nuclear de GLS2 en células tumorales humanas y poder así tratar de dilucidar las funciones de la proteína no relacionadas con la glutaminólisis; esto es, con su actividad catalítica que, aunque discutidas en numerosas publicaciones, aún no se han determinado de forma inequívoca. Para caracterizar la localización nuclear de GLS2 en células tumorales, nuestro grupo efectuó un primer abordaje experimental realizando ensayos de inmunocitoquímica en líneas celulares de cáncer humano; concretamente, en células de carcinoma hepatocelular (HepG2), neuroblastoma (SH-SY5Y) y glioblastoma (T98G). Los resultados mostraron un marcaje mayoritario mitocondrial, mientras que sólo una pequeña proporción de células presentaron marcaje nuclear (resultados no mostrados) (López de la Oliva et al., 2020).

Como mencionamos en la Introducción, un gran número de evidencias experimentales obtenidas por varios grupos de investigación, incluido el nuestro, apuntan a que GLS2 puede desempeñar un papel como supresor tumoral, provocando una reversión del fenotipo transformado en células cancerosas y mostrando mayores niveles de expresión en células quiescentes y diferenciadas, mientras que suele estar reprimida en un elevado número de tumores (véase Márquez *et al.*, 2015 para una revisión sobre el tema). Dado que nuestra hipótesis de partida también asociaba la función nuclear de GLS2 con cambios en la regulación transcripcional, que provocarían un efecto anti-proliferativo y una mayor diferenciación de las células cancerosas, nos centramos en desarrollar nuevos modelos celulares tumorales que mostrasen un mayor importe de GLS2 al núcleo. Dos modelos básicos fueron desarrollados para contrastar ese objetivo: líneas celulares de cáncer humano tratadas con agentes de diferenciación y líneas de glioblastoma humano que sobrexpresaban heterológamente GLS2. En relación al primero de los modelos, utilizamos las líneas HepG2 de HCC y SH-SY5Y de neuroblastoma, que es bien conocido que diferencian al ser tratadas con ésteres de forbol (Söderholm *et al.*, 2001), mientras que en el segundo modelo utilizamos la línea de GBM humano T98G-GAB generada por nuestro grupo, que sobreexpresa GLS2 y presenta una clara reversión

Resultados

del fenotipo transformado con pérdida de características típicas tumorales (Szeliga *et al.*, 2009).

En estos modelos estudiamos si la población de células tumorales mostraba un desplazamiento hacia etapas del ciclo celular compatibles con una menor proliferación.

De este modo, realizamos un análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en dos modelos celulares:

- células SH-SY5Y, tratadas con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) como agente diferenciador.
- células T98G-GAB, transfectadas establemente con un vector que contenía la secuencia codificante de GLS2 (isoenzima GAB).

Ambas líneas celulares mostraron un incremento de la población celular en la fase G2/M, junto con una disminución en las fases S y G0/G1, cuando se compararon con las líneas celulares controles: T98G-WT y T98G-pcDNA3 para la línea T98G-GAB y células sin tratar para SH-SY5Y (añadiendo sólo el solvente dimetilsulfóxido (DMSO), en el que se disolvió el PMA). Este estudio se acompañó de las correspondientes curvas de crecimiento para cada línea celular, que revelaron, igualmente, una menor tasa proliferativa (Fig. 4.39), que se correlacionó con el aumento en la expresión de GLS2 mostrada por ambas líneas (Fig. 4.40).

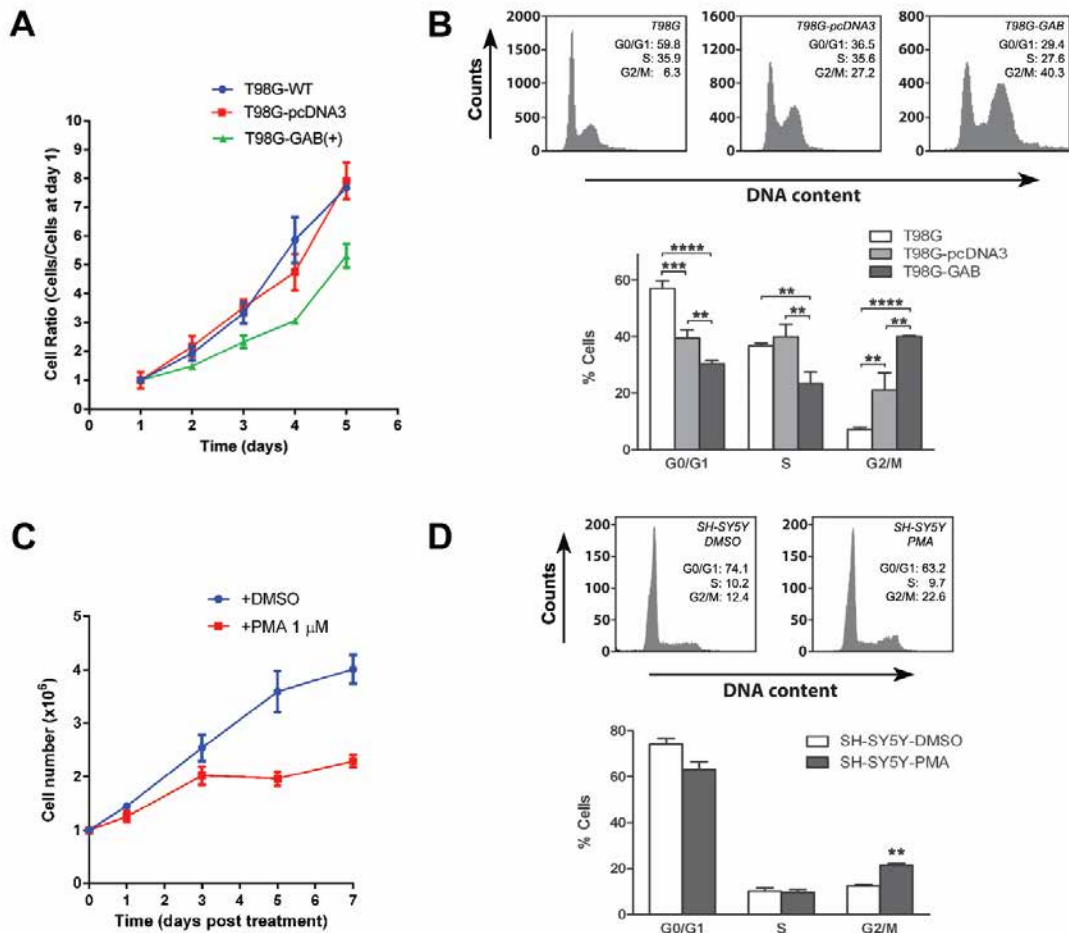


Figura 4.40. Estudios del ciclo celular en células de glioblastoma (T98G-GAB) y neuroblastoma (SH-SY5Y) humanos. (A) Se representa la curva de crecimiento celular de la línea de GBM que sobreexpresa GAB, frente a sus controles, T98G-WT y T98G-pcDNA3. (B) Análisis por citometría de flujo (FACS) de las líneas transfectadas establemente T98G-GAB y T98G-pcDNA3 y de la línea silvestre, T98G-WT. Se representa en una gráfica el porcentaje de células existente en cada fase del ciclo celular. (C) Representación de la curva de crecimiento celular de la línea de neuroblastoma, SH-SY5Y, tratada con PMA y su control, que fue la línea tratada con DMSO (disolvente del PMA). (D) Análisis del ciclo celular de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con PMA a una concentración 1 μ M, durante 24 h, frente a su control (tratamiento con DMSO). La gráfica indica el porcentaje de células existente en cada fase del ciclo celular. Imágenes tomadas del trabajo fin de máster de Marina García Frutos (2017) y del artículo López de la Oliva *et al.*, 2020.

Resultados

Por último, en los mismos modelos celulares utilizados para el estudio del ciclo celular, caracterizamos el nivel de expresión de GLS2, con particular énfasis en la fracción nuclear, así como de otros genes dianas implicados en el crecimiento, proliferación y apoptosis de las células cancerosas, con el propósito de descubrir si, efectivamente, tanto la diferenciación celular, inducida por PMA en células SH-SY5Y, como la sobreexpresión de GLS2 en la línea celular de GBM T98G-GAB, provocaban cambios significativos en la expresión de esos importantes marcadores tumorales. Para ello, la línea SH-SY5Y se trató con PMA 1 μ M durante 12 h y 24 h, tras lo que se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular para separar la fracción nuclear de la fracción mitocondrial. Se realizaron inmunotransferencias western de las fracciones nucleares, que revelaron un incremento de hasta 2,5 veces en el acúmulo de GLS2 en el núcleo de las células (Fig. 4.41-A). Así mismo, se detectó un incremento en los niveles de la proteína p53 activa y del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, p21, comparando con los controles tratados sólo con DMSO (Fig. 4.41-A).

Finalmente, también realizamos el mismo análisis de expresión proteica mediante subfraccionamiento celular e inmunotransferencia western en las líneas celulares de GBM transfectadas establemente con GLS2 (Fig. 4.41-B). En consonancia con los resultados obtenidos en las células SH-SY5Y tratadas con PMA, se observó un aumento en el nivel de GLS2 y p53 en las fracciones nucleares de T98G-GAB frente a los controles T98G-WT y T98G-pcDNA3 (Fig. 4.41-B). Además, en el caso de p53, este aumento se observó también en los extractos celulares totales, mientras que para la proteína oncogénica c-Myc se observó una menor expresión sólo en los extractos celulares totales (Fig. 4.41-C). Estos resultados fueron, así mismo, confirmados por experimentos de inmunocitoquímica en los mismos modelos celulares, donde claramente se demostró un aumento de la expresión de GLS2, tanto en mitocondria como en núcleo, inducido bien por el agente de diferenciación (PMA) o bien por la transfección estable con el cDNA que codifica la isoenzima GAB (López de la Oliva *et al.*, 2020).

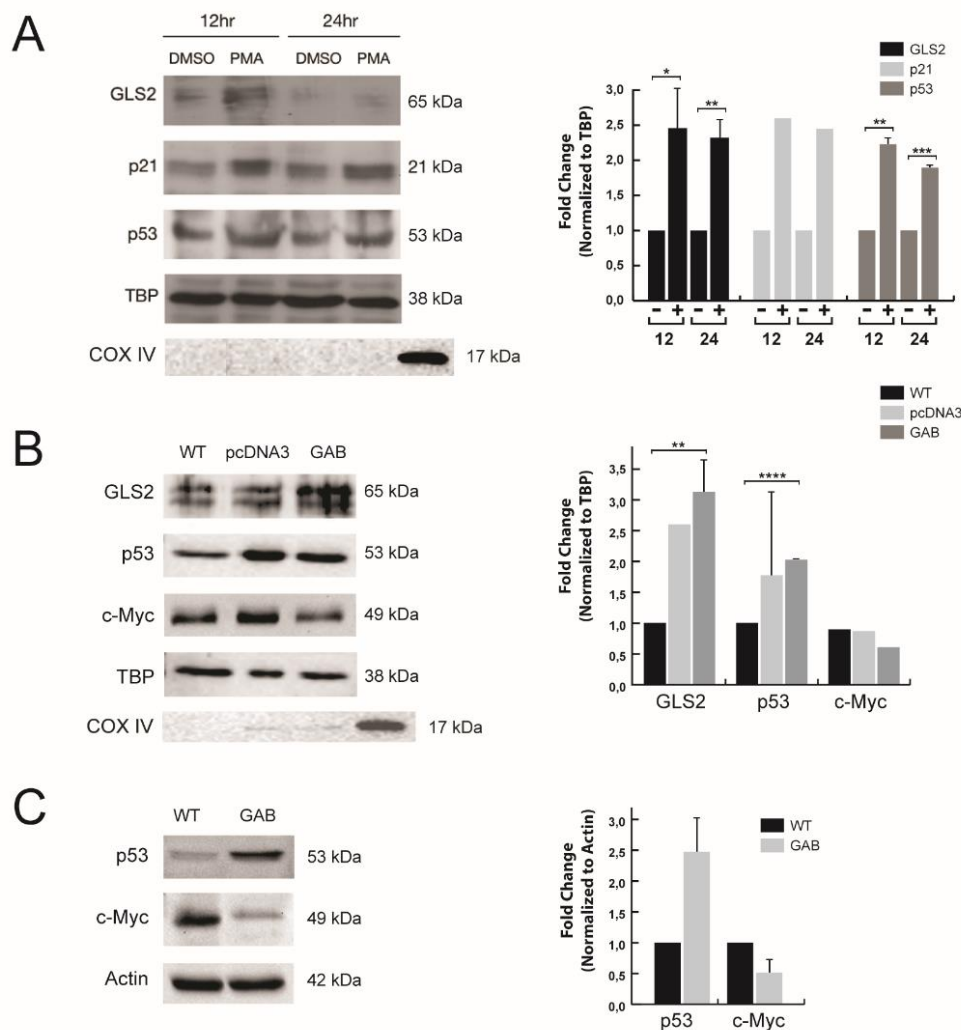


Figura 4.41. Inmunotransferencia western de las líneas de neuroblastoma SH-SY5Y y GBM T98G. (A) Inmunotransferencia western de extractos nucleares de las células SH-SY5Y tras el tratamiento con PMA a una concentración de 1 μ M y DMSO durante 12 h y 24 h. Se usaron los anticuerpos frente a GLS2, p21, p53 y TATA-binding protein (TBP) como control de carga (ver Tabla en Materiales y Métodos). Para comprobar el nivel de contaminación mitocondrial en las fracciones nucleares aisladas se empleó el anticuerpo anti-COX IV. En el panel de la derecha, se presenta el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la inmunotransferencia western normalizadas frente al control de carga. Se le dio el valor 1 a la densidad normalizada en las calles de las células control tratadas con DMSO. (B) Inmunotransferencia western empleando extractos nucleares de las líneas de glioblastoma T98G-GAB, T98G-WT y T98G-pcDNA. Se emplearon los anticuerpos frente a GLS2, p53, c-MYC y TBP como control de carga. De nuevo, se emplearon anticuerpos anti-COX IV para evaluar la contaminación mitocondrial de las fracciones nucleares. En el panel de la derecha, se presenta el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la inmunotransferencia western normalizadas frente al control de carga. Se le dio el valor 1 a la densidad normalizada en las calles de las células control T98G-WT. (C) Inmunotransferencia

Resultados

western de extractos totales de células de glioblastoma T98G-GAB y T98G-WT (línea silvestre). Se usaron anticuerpos frente a p53 y c-Myc, además de anticuerpos frente a β -actina como control de carga. En el panel de la derecha, se presenta el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la inmunotransferencia western normalizadas frente al control de carga. Se le dio el valor 1 a la densidad normalizada en las calles de las células control T98G-WT.

Todos estos resultados apoyan la noción de que GLS2 actúa como un supresor tumoral en ciertos tipos de cáncer, confirmando evidencias experimentales previas (Márquez *et al.*, 2015). En este punto, nos planteamos la necesidad de implementar aproximaciones ómicas para adquirir una visión más amplia de los posibles mecanismos que se desencadenan como consecuencia de la sobreexpresión de GLS2 en células tumorales. Por ello, se decidió realizar un análisis proteómico cuantitativo en células de GBM con expresión regulada de GLS2. Estos estudios podrían aportarnos una imagen global de los cambios inducidos por GLS2 conducentes a una reversión del fenotipo transformado, información complementaria a los resultados publicados previamente.

4.5. Análisis proteómico cuantitativo de células de glioblastoma LN229-GLS2

4.5.1. Expresión ectópica de GLS2 en la línea LN229 de GBM humano

Como se expuso en la introducción, entre los tipos de cáncer que reprimen la expresión de GLS2 en su programa de transformación maligna, se encuentran los GBMs. Existe un amplio consenso que establece que en glioblastoma multiforme grado IV, el tumor cerebral de mayor malignidad, se produce una represión de GLS2 y una inducción de la expresión de las isoenzimas GLS (Majewska *et al.*, 2019). Este hecho, junto con los resultados detallados en el apartado anterior, nos llevó a realizar el análisis proteómico cuantitativo de una línea de glioblastoma que sobreexpresaba de forma estable la isoenzima GLS2, LN229-GLS2. Empleamos como controles la línea celular transfectada con el plásmido vacío, LN229-pcDNA3 y la línea celular silvestre, LN229-WT.

Antes de someter a las muestras al análisis proteómico cuantitativo y con el fin de garantizar la sobreexpresión de GLS2 en las líneas de GBM, se realizó una inmunotransferencia western de los clones transfectados. Se emplearon anticuerpos primarios frente a GLS2 y, además, también frente al epitopo FLAG (octapéptido DYKDDDDK) que estaba incluido como etiqueta de afinidad en la proteína GLS2

sobreexpresada. Como se observa en la Fig. 4.42, uno de los clones de LN229-GLS2 obtenido previamente por nuestro grupo, denominado G12, expresaba satisfactoriamente la proteína.

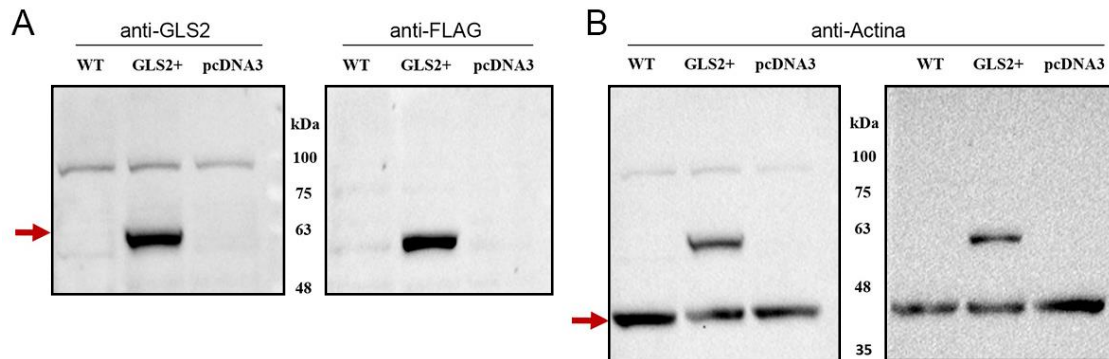


Figura 4.42. Inmunotransferencia western de las líneas celulares LN229 de glioblastoma empleadas en el análisis proteómico. Se cargaron 20 μ g de proteína celular total de cada muestra por pocillo: LN229 silvestre (WT), LN229-GLS2 (GLS2+) y LN229-pcDNA3 (pcDNA3). Panel A: muestras reveladas empleando el anticuerpo primario anti-GLS2 (Abcam), a una dilución 1:2000, para la imagen de la izquierda, y el anticuerpo primario anti-FLAG (Sigma-Aldrich) para la imagen de la derecha. Panel B: muestras reveladas con el anticuerpo primario anti- β -actina como control de carga, a una dilución 1: 500. Como anticuerpo secundario para anti-FLAG y anti-actina se empleó un anticuerpo anti-IgG de ratón a dilución 1:50000, y para anti-GLS2 se empleó como anticuerpo secundario un anti-IgG de conejo a dilución 1:80000. La dilución de todos los anticuerpos se realizó en TTBS + BSA al 3 %.

4.5.2. Perfil proteómico de LN229-GLS2

Seguidamente, mediante espectrometría de masas y haciendo uso de varias herramientas bioinformáticas, se procedió al análisis del perfil proteómico de la línea de GBM LN229-GLS2. Se identificó un total de 3082 proteínas para una tasa de falsos positivos (FDR) inferior a 0.01 (alta confianza). El total de proteínas obtenidas se representó en un gráfico volcán (*Volcano plot*), que es un diagrama de dispersión donde en el eje vertical se representa el logaritmo en base 10 del valor estadístico de probabilidad p (t de Student), y en el eje horizontal se representa el logaritmo en base 2 de la ratio de abundancia (*fold change*). Esta representación nos da una idea de aquellas proteínas (puntos del diagrama) que están significativamente expresadas o reprimidas (Fig. 4.43).

Resultados

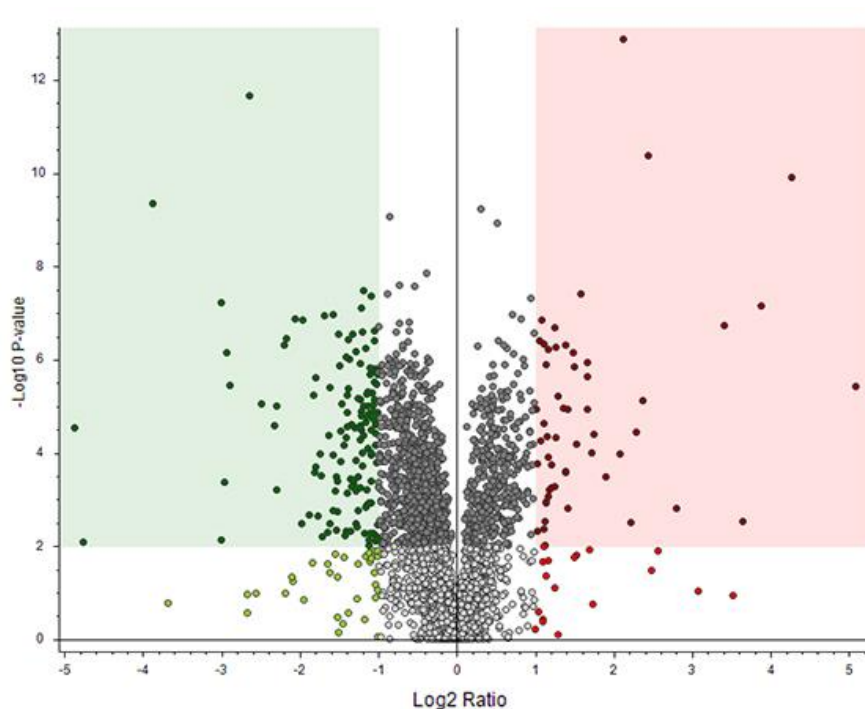


Figura 4.43. Representación de los valores de p ($-\text{Log}_{10}$) frente a la ratio (Log_2) de las proteínas de las muestras LN229-GLS2/LN229-pcDNA3. Las áreas de color verde y rojo representan aquellas proteínas que están reprimidas y sobreexpresadas, respectivamente, para un valor de $p \leq 0.01$ (la zona umbral, no significativa, se indica en blanco).

Los experimentos de espectrometría de masas se llevaron a cabo por triplicado y para comprobar la exactitud y reproducibilidad de los mismos se representó en un diagrama de cajas la abundancia de cada proteína (Log_{10}) en cada muestra, normalizado con relación al total. La abundancia representa la intensidad obtenida como suma de las intensidades de cada péptido de una proteína. Como se puede comprobar, aproximadamente el 50 % de la población se obtiene en el rango intercuartílico (medida de la dispersión estadística que se emplea para visualizar la variabilidad de la medida). Por tanto, se considera que existe poca dispersión de los resultados, ya que la distribución es simétrica alrededor de la mediana (línea negra que aparece en la mitad de las cajas) (Fig. 4.44).

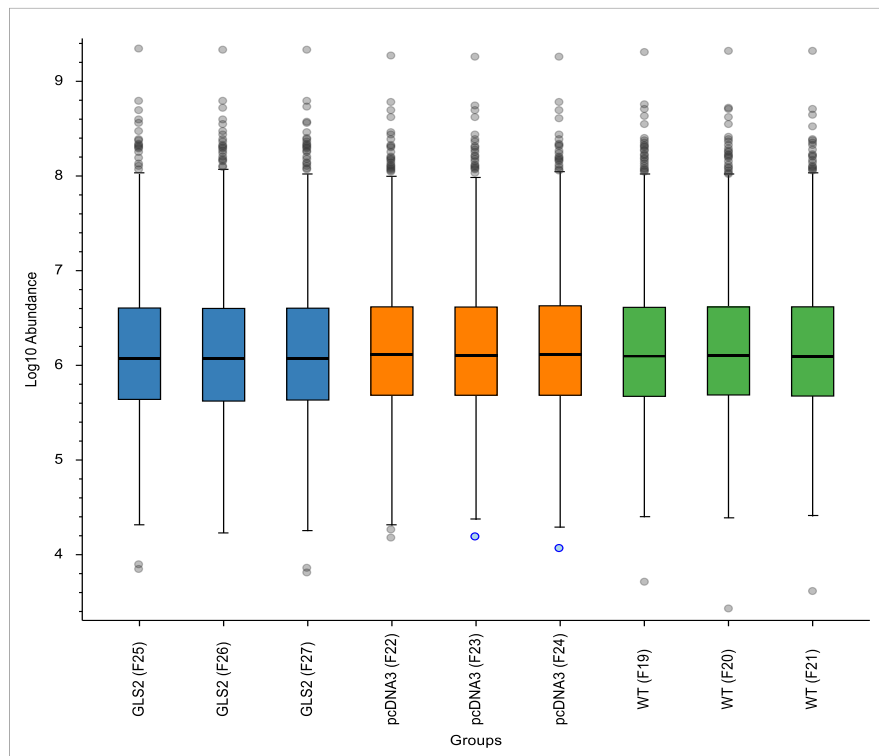


Figura 4.44. Diagrama de cajas de la abundancia de cada muestra en escala logarítmica. En azul se muestran los triplicados realizados para las muestras de LN229-GLS2, en naranja los de LN229-pcDNA3 y en verde los de LN229-WT.

Para una mejor visualización de los resultados se realizó una representación agrupada de las proteínas halladas en los análisis de las tres líneas celulares, denominada mapa de calor o *Heatmap*. Como se puede observar en la fig. 4.45, la mayor o menor abundancia normalizada de cada proteína dentro de un grupo se representa mediante una matriz de color (del rojo al verde), generando un patrón que facilita la comparación e interpretación de los resultados. Como se puede observar, existen diferencias apreciables entre el patrón de proteínas expresadas en la línea LN229-GLS2 y las líneas LN229-pcDNA3 y LN229-WT, con un patrón de bandas más parecido entre sí.

Resultados

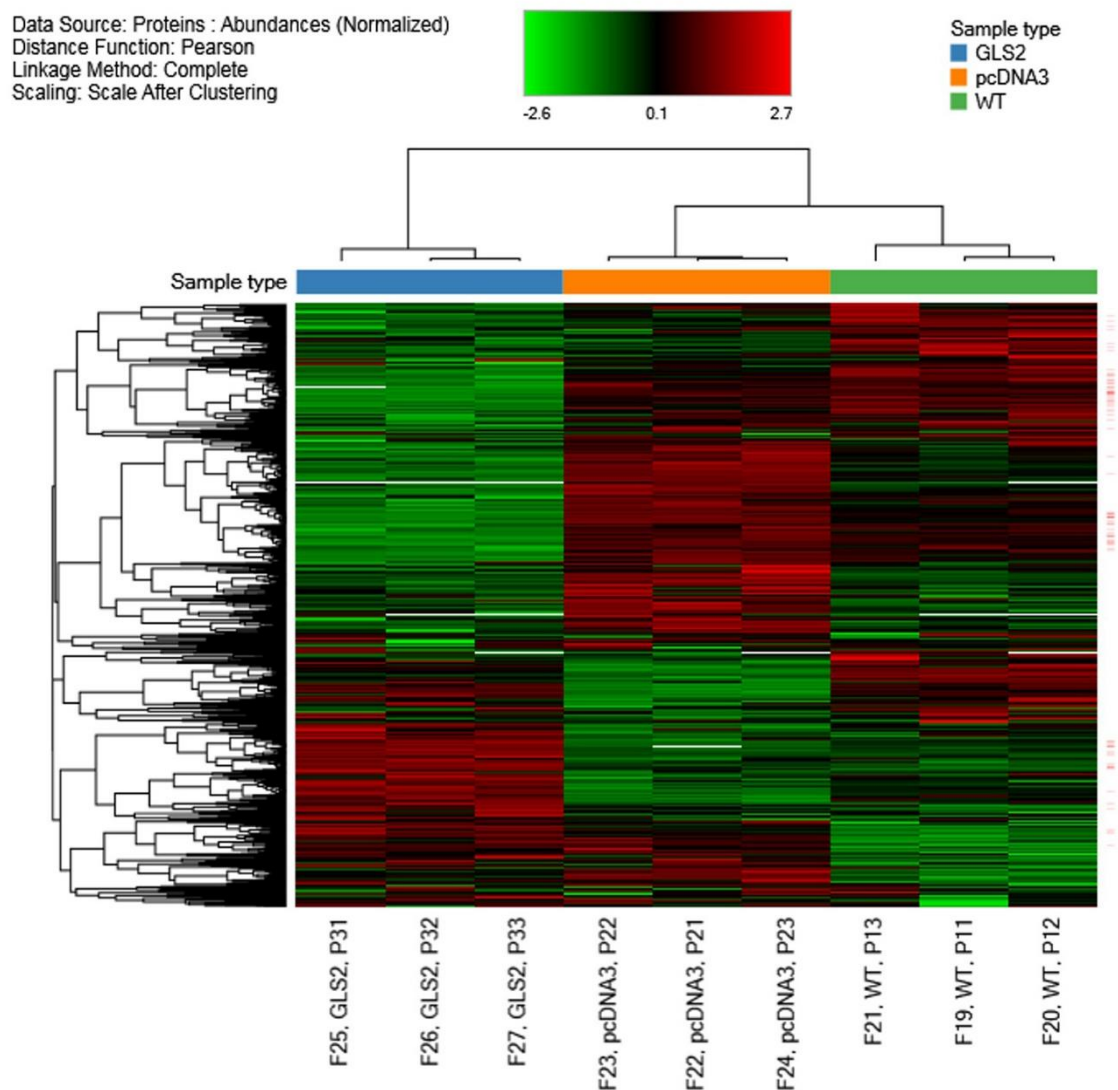


Figura 4.45. Mapa de calor (*Heatmap*) correspondiente al análisis jerárquico de agrupación (*HCA; Hierarchical Clustering Analysis*) de un total de 3082 proteínas incluidas en las muestras correspondientes a LN229-GLS2, LN229-pcDNA3 y LN229-WT. Los colores verde y rojo representan una menor o mayor abundancia, respectivamente.

4.5.3. Análisis de enriquecimiento funcional

De las 3082 proteínas identificadas, 300 se consideraron reprimidas (ratio de abundancia LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 ≤ 0.6) y 186 sobreexpresadas (ratio de abundancia LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 ≥ 1.5) para un valor de p menor a 0.05 (Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente, Anexo II).

4.5.3.1. Resultados de ontología génica (GO)

Cada una de las listas de proteínas diferencialmente expresadas por separado (utilizando la columna del nombre del gen) se llevó a la base de datos STRING (<https://string-db.org>) para su análisis. Se obtuvieron así las redes de interacciones proteína-proteína, que para las proteínas reprimidas se representa en la Fig. 4.46.

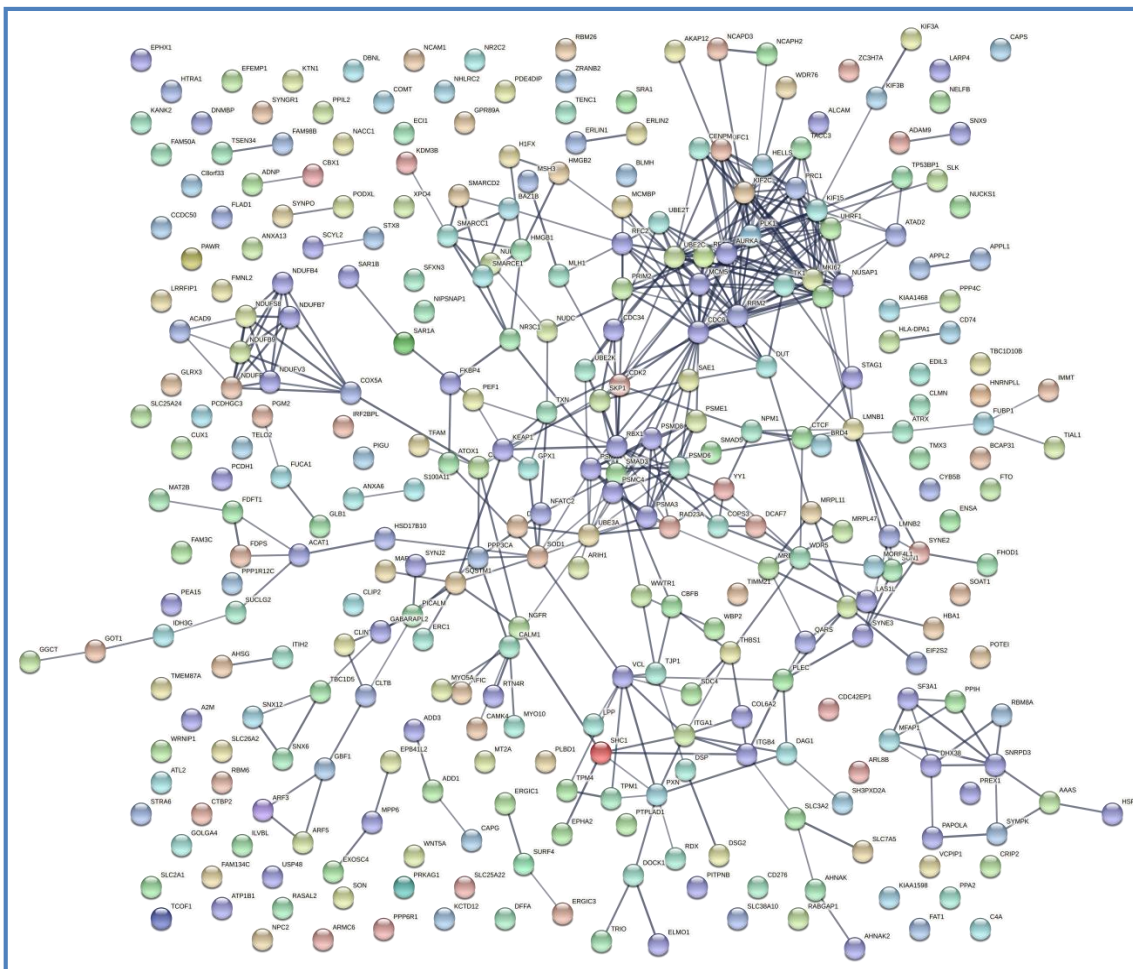


Figura 4.46. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING, correspondiente al total de las proteínas reprimidas en las células LN229-GLS2. El color de los nodos (proteínas) es aleatorio y la intensidad de la línea que une a los nodos representa el nivel de confianza de cada asociación (bajo: 0.15; medio: 0.4; alto: 0.7 y muy alto: 0.9).

Dentro del software Cytoscape y mediante la aplicación ClueGo se realizó el análisis de enriquecimiento funcional de la red de proteínas reprimidas, para las tres categorías de ontología génica (*gene ontology*, GO) siguientes: funciones moleculares,

Resultados

procesos biológicos y componentes celulares. Se obtuvieron un total de 84 grupos funcionales (Tabla suplementaria 3, Anexo II) que incluían: proceso mitótico del ciclo celular, organización de cromosomas, localización de orgánulos, sarcolema, huso mitótico, unión de cadherina, unión de filamentos de actina, unión de proteínas del citoesqueleto, unión célula-célula, regulación de la proteólisis, complejo proteico de anclaje, etc. (Fig. 4.47).

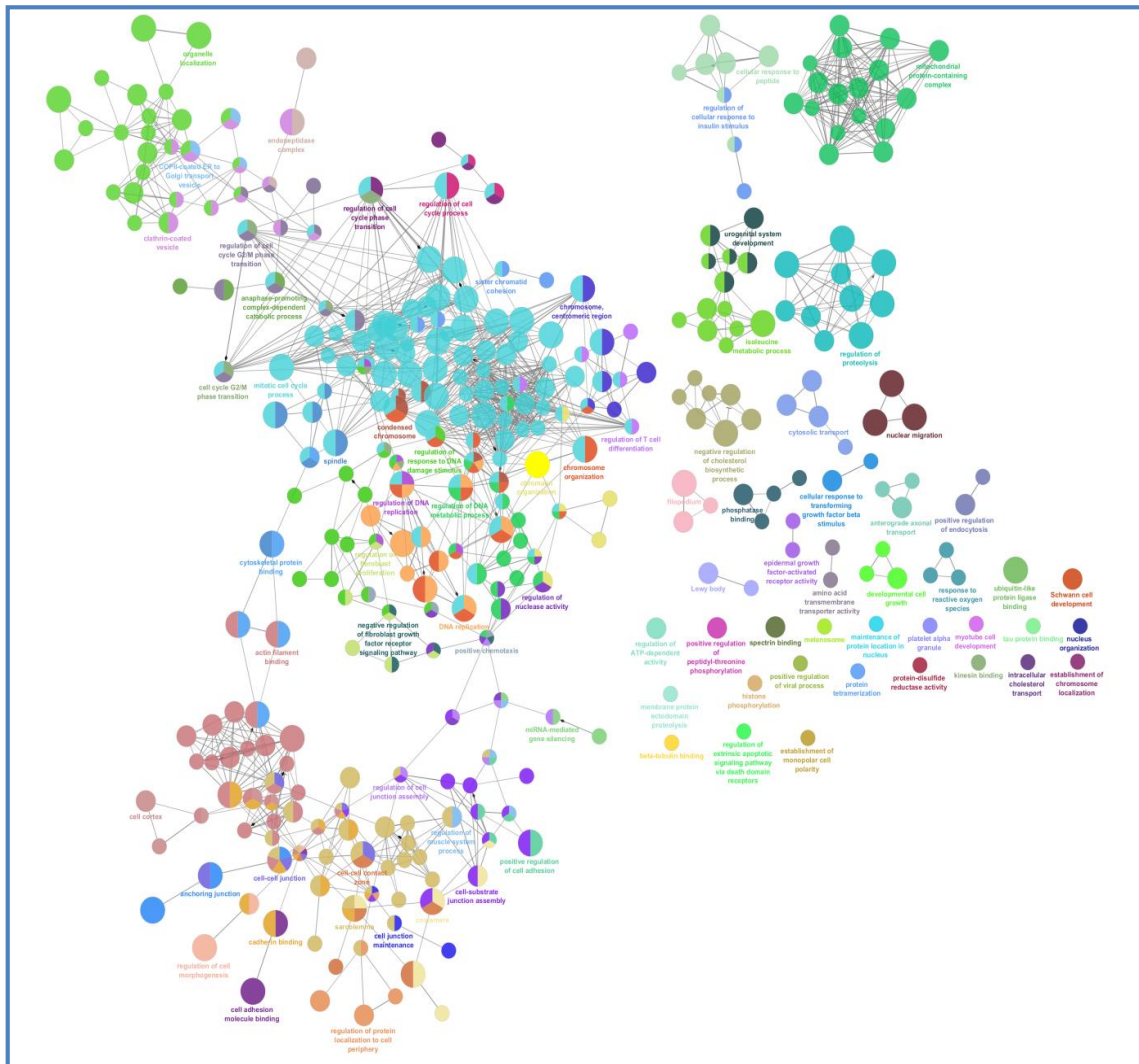


Figura 4.47. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante ontología génica para las proteínas reprimidas en las células LN229-GLS2. Cada nodo representa un término y se etiqueta el término de mayor significación dentro del grupo funcional. Los grupos están divididos por colores y aquellos que tienen más de un color indican términos que pertenecen a varios grupos.

Las proteínas diferencialmente sobreexpresadas se analizaron siguiendo el mismo protocolo que para las proteínas reprimidas (Tabla suplementaria 2, Anexo II). Su red de interacciones se muestra en la Fig. 4.48.

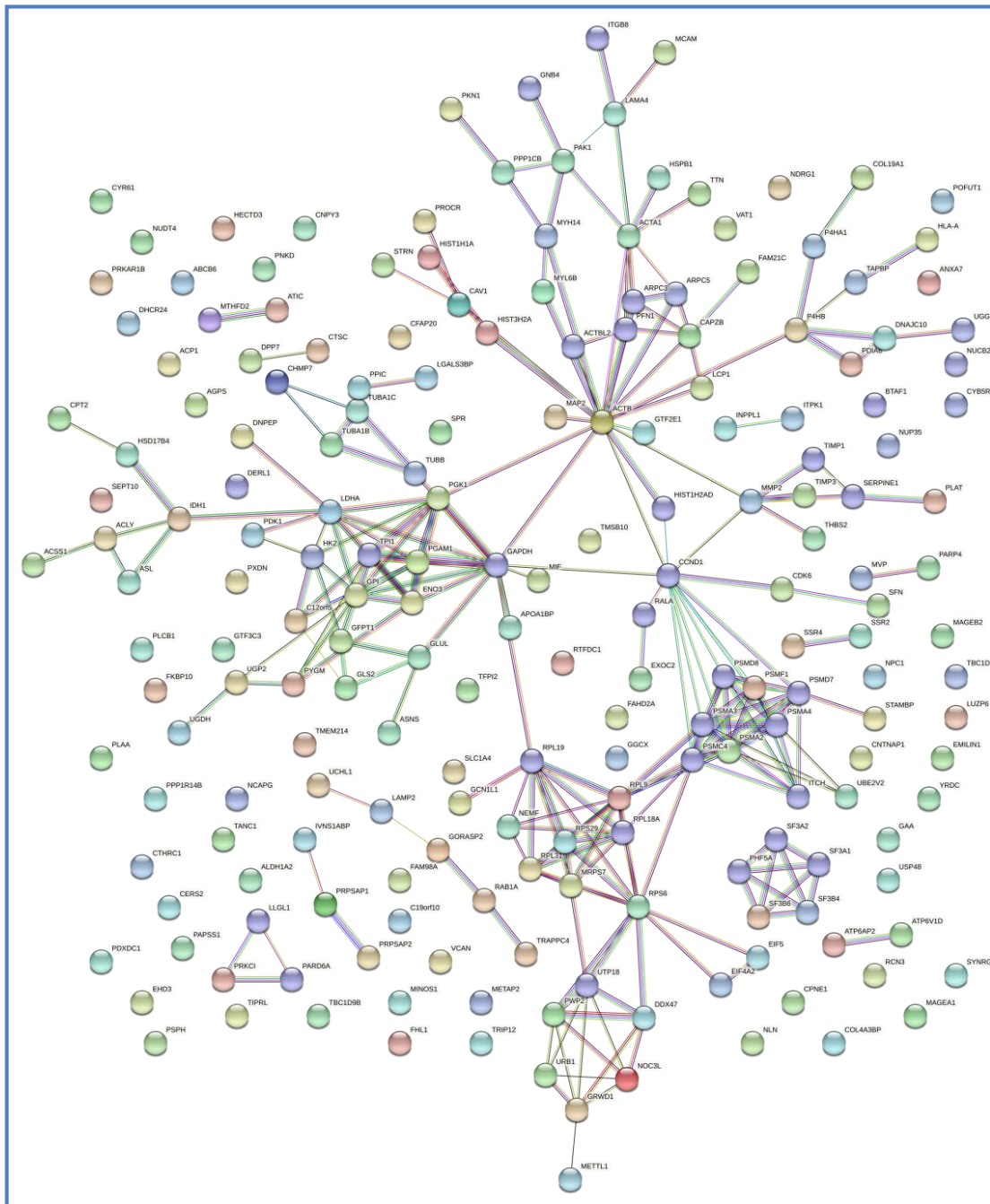


Figura 4.48. Red de interacciones proteína-proteína obtenida en la base de datos STRING correspondiente al total de las proteínas sobreexpresadas en las células LN229-GLS2. El color de los nodos (proteínas) es aleatorio y la intensidad de la línea que une a los nodos representa el nivel de confianza de cada asociación (bajo: 0.15; medio: 0.4; alto: 0.7 y muy alto: 0.9).

Resultados

Los términos ontológicos o anotaciones más significativas (Fig. 4.49) fueron: complejo del proteasoma, gránulos ricos en ficolin-1, vía de señalización estimuladora del receptor lectina tipo C, adhesión focal, proceso catabólico de carbohidratos, hemostasis, regulación de la polimerización de proteínas, complejo proteico contenido en el retículo endoplasmático, organización del lisosoma, gránulos azurófilos, regulación de la polimerización de microtúbulos, etc. (Tabla suplementaria 4, Anexo II).

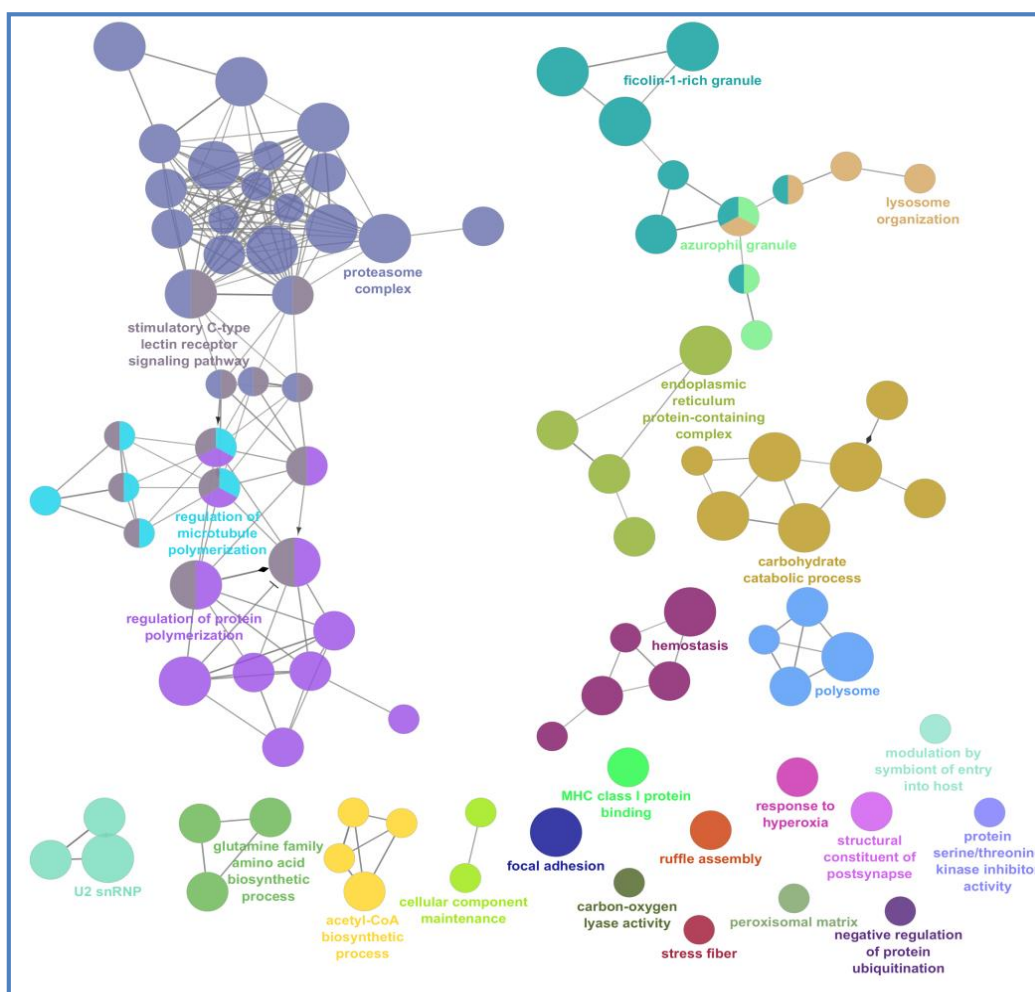
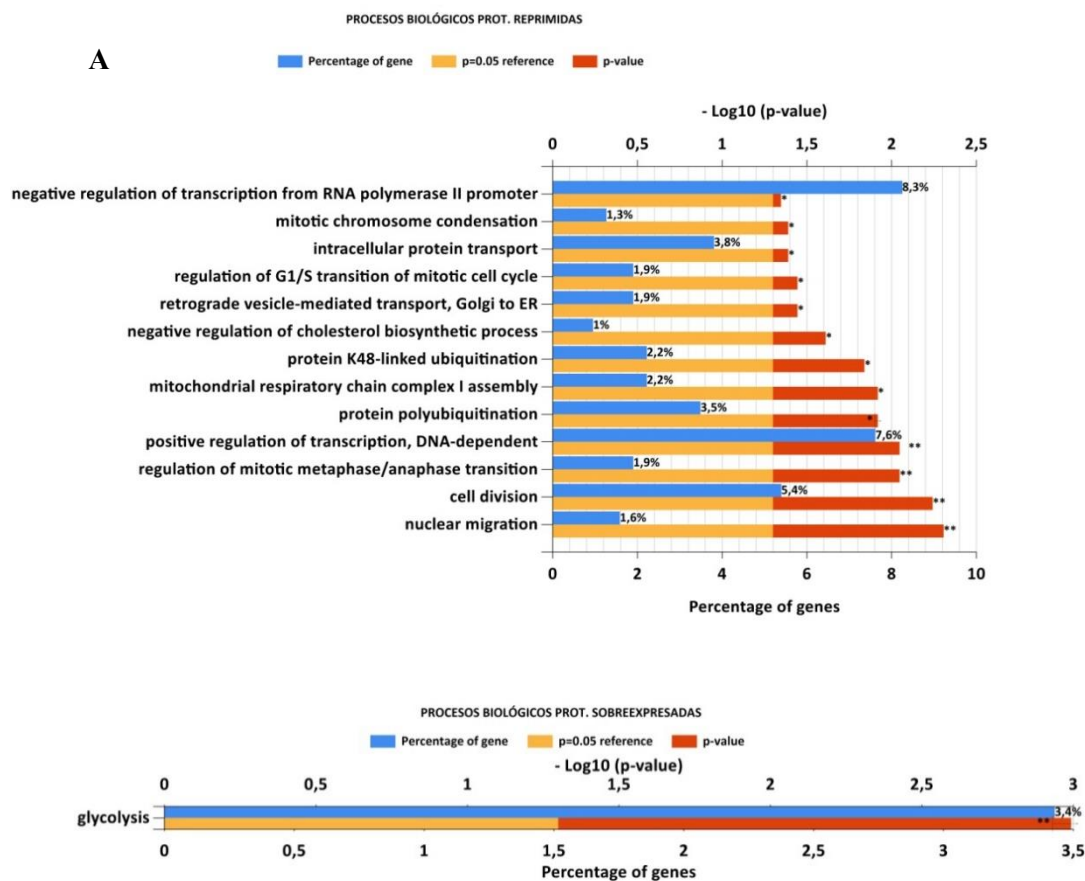


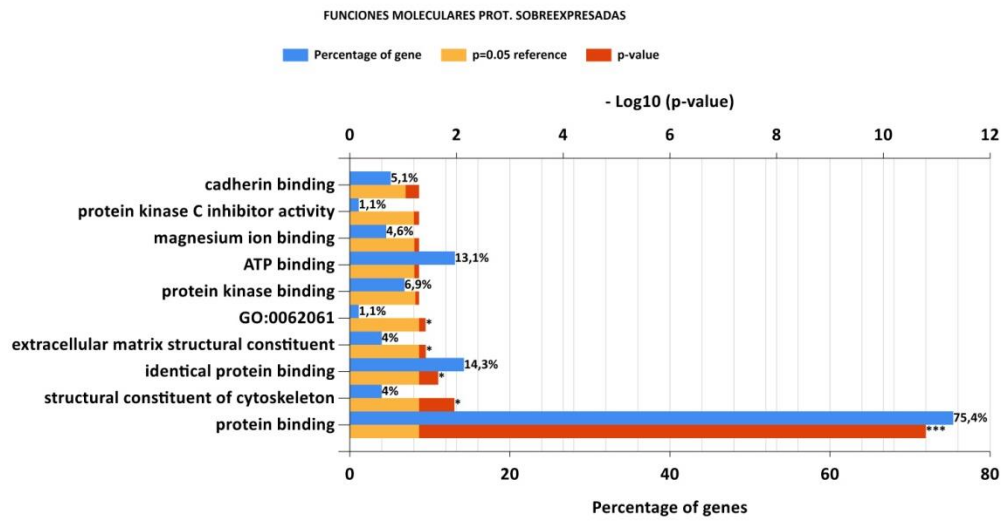
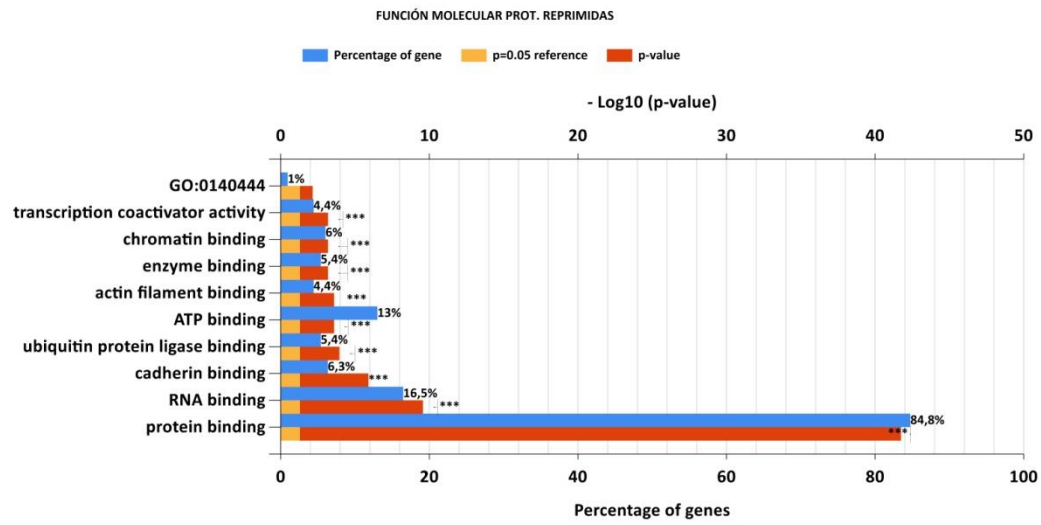
Figura 4.49. Red de distribución de los grupos funcionales categorizados mediante ontología génica para las proteínas sobreexpresadas en las células LN229-GLS2. Cada nodo representa un término y se etiqueta el término de mayor significación dentro del grupo funcional. Los grupos están divididos por colores y aquellos que tienen más de un color indican términos que pertenecen a varios grupos.

Para analizar por separado cada una de las categorías y confirmar los resultados obtenidos con ClueGO, se realizó un enriquecimiento funcional adicional de las proteínas reprimidas y sobreexpresadas mediante el software FunRich (Fig. 4.50). Para las proteínas reprimidas, el enriquecimiento funcional correspondió a los siguientes términos o anotaciones: 1) procesos biológicos: regulación negativa de la transcripción mediada por RNA polimerasa II, regulación positiva de la transcripción dependiente de DNA y división celular; 2) componentes celulares: citosol, nucleoplasma, núcleo y exosoma vesicular extracelular; 3) funciones moleculares: principalmente se obtuvo el término unión a proteínas. Para las proteínas sobreexpresadas, los términos más significativos en el análisis funcional fueron: 1) procesos biológicos: glucolisis; 2) componentes celulares: citosol, exosoma vesicular extracelular y membrana; 3) funciones moleculares: unión a proteínas.



Resultados

B



C

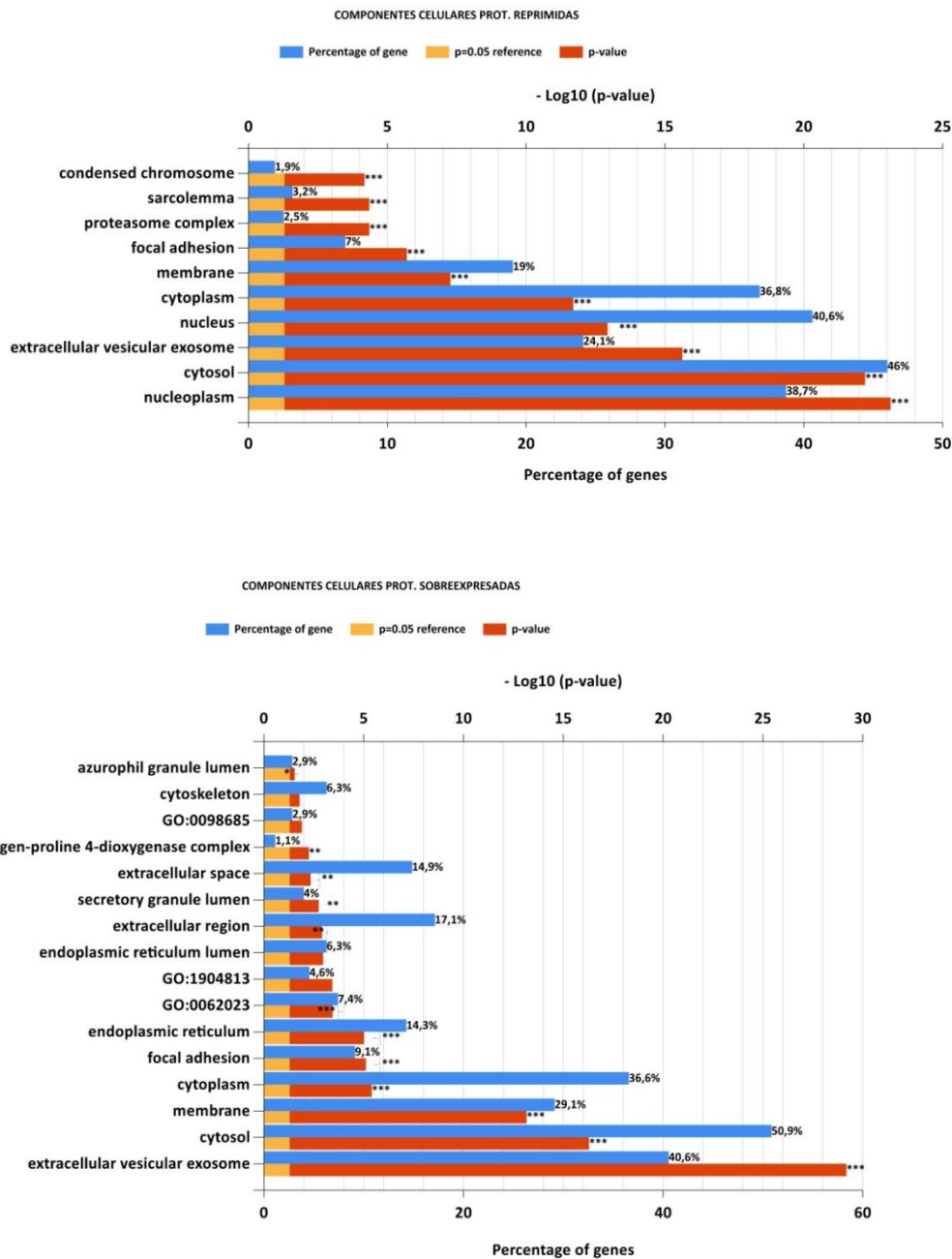


Figura 4.50. Enriquecimiento funcional de GO mediante la herramienta FunRich de las proteínas reprimidas y sobreexpresadas en las células LN229-GLS2. A, procesos biológicos; B, funciones moleculares; C, componentes celulares. GO 0140444: actividad de anclaje al citoesqueleto; GO 0062061: unión al complejo TAP; GO 1904813: gránulos ricos en ficolin-1 del lumen; GO 0062023: matriz extracelular formada por colágeno. GO 0098685: sinapsis colateral de Schaffer-CA1.

Resultados

4.5.3.2. Resultados del análisis de las rutas implicadas en las bases de datos KEGG y REACTOME

Para la determinación de las proteínas centrales y de mayor importancia, se construyó la red de interacción proteína-proteína en STRING y se analizó con Cytoscape, obteniendo un resultado de 319 nodos y 833 conexiones entre nodos para las proteínas reprimidas. El resultado de seleccionar los nodos de mayor grado y centralidad de intermediación identificó 29 nodos y 328 conexiones (Fig. 4.51-A y Tabla 4.2). Mediante el algoritmo de MCODE se identificaron tres agrupaciones, de las que dos de ellas tuvieron una alta puntuación al aplicar el algoritmo de la aplicación.

El resultado del enriquecimiento de las rutas mediante la base de datos KEGG (Fig. 4.51-C) mostró que las rutas más importantes fueron: ciclo celular (BUB1, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CDC20, CDC6, CDK1, MAD2L1, MCM2, MCM4, PLK1), vía de señalización de p53 (CCNB1, CCNB2, CDK1, RRM2) y maduración del ovocito mediada por progesterona (BUB1, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CDK1, MAD2L1, PLK1).

Por otro lado, en la base de datos REACTOME (Fig. 4.51-B) las rutas destacadas como más importantes fueron: kinesinas (KIF11, KIF15, KIF20A, KIF2C, KIFC1), fase G1 de mitosis y transición G1/S (CCNA2, CCNB1, CDC6, CDK1, MCM2, MCM4, RRM2, TOP2A), punto de control del ciclo celular (AURKB, BUB1, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CDC20, CDC6, CDK1, CENPM, KIF2C, MAD2L1, MCM2, MCM4, PLK1, UBE2C), y transcripción mediada por FOXO de genes de estrés oxidativo, metabólico y neuronal (HDAC1, NR3C1, SMAD3).

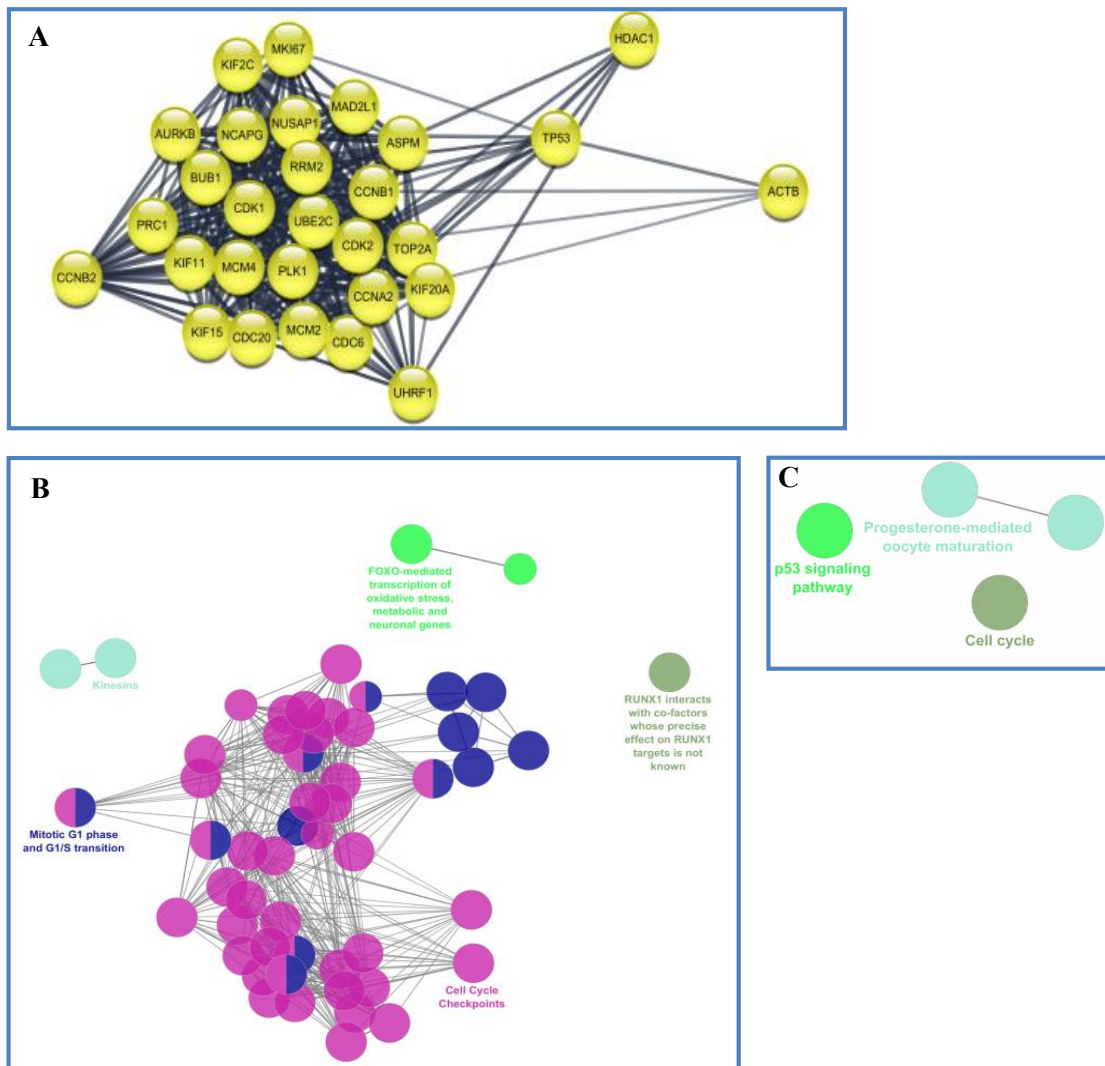


Figura 4.51. Agrupación de los nodos de mayor grado y centralidad de intermediación de las proteínas diferencialmente reprimidas en las células LN229-GLS2 (A). Enriquecimiento funcional en REACTOME (B) y KEGG (C).

Resultados

Tabla 4.2. Proteínas denominadas centrales e importantes de la línea de GBM humano LN229-GLS2, como resultado del análisis de las proteínas reprimidas.

Nombre del gen	Descripción
ACTB	Actin, cytoplasmic 1
ASPM	Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)
AURKB	Aurora- and IPL1-like midbody-associated protein 1
BUB1	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1
CCNA2	Cyclin A2
CCNB1	G2/mitotic-specific cyclin-B1
CCNB2	G2/mitotic-specific cyclin-B2
CDC20	Cell division cycle protein 20 homolog
CDC6	Cell division control protein 6 homolog
CDK1	Cell division control protein 2 homolog
CDK2	Cell division protein kinase 2
HDAC1	Histone deacetylase 1
KIF11	Thyroid receptor-interacting protein 5
KIF15	Serologically defined breast cancer antigen NY-BR-62
KIF20A	Rab6-interacting kinesin-like protein
KIF2C	Mitotic centromere-associated kinesin
MAD2L1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A
MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2
MCM4	Minichromosome maintenance complex component 4
MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G
NUSAP1	Nucleolar and spindle associated protein 1

PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
RRM2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
TOP2A	DNA topoisomerase II, alpha isozyme
TP53	Cellular tumor antigen p53
UBE2C	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme C
UHRF1	Ubiquitin-like-containing PHD and RING finger domains protein 1

Del mismo modo, se analizaron las proteínas diferencialmente sobreexpresadas mediante la generación de una red de interacción proteína-proteína de 204 nodos y 453 uniones entre los nodos, construida en la base de datos STRING, y se obtuvieron 10 proteínas (Tabla 4.3) consideradas centrales al analizar la red en Cytoscape (Fig. 4.52). Los resultados de enriquecimiento funcional en rutas de las agrupaciones identificadas por la aplicación MCODE se representan en la Fig. 4.52-A.

Resultados

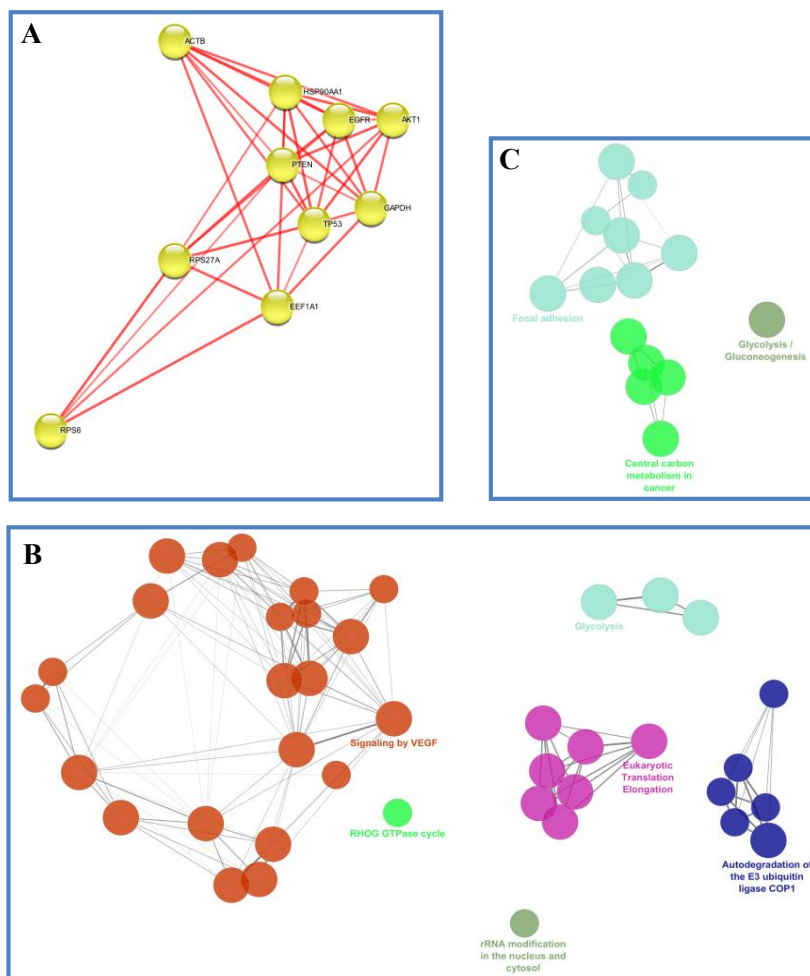


Figura 4.52. Agrupación de los nodos de mayor grado y centralidad de intermediación de las proteínas diferencialmente sobreexpresadas en las células LN229-GLS2 (A). Enriquecimiento funcional en REACTOME (B) y KEGG (C).

Finalmente, en el caso de las proteínas sobreexpresadas, el enriquecimiento en las vías recogidas en la base de datos KEGG (Fig. 4.52-C) resultó en los siguientes términos: glucolisis/gluconeogénesis (ENO3, GPI, LDHA, PGAM1, PGK1, PKM), metabolismo central del carbono en cáncer (AKT1, EGFR, PTEN, LDHA, PGAM1, PKM, TP53) y adhesión focal (ACTB, AKT1, CAV1, CDC42, EGFR, ITGB1, PTEN, RHOA, SRC).

En el caso de la base de datos REACTOME, se obtuvieron las siguientes rutas (Fig. 4.52-B): modificación del rRNA en el núcleo y citosol (DDX47, PWP2, RPS6), ciclo Rho GTPasa (CAV1, CDC42, ITGB1), autodegradación de la E3 ubiquitina ligasa COP1 (PSMA2, PSMF1, TP53), elongación de la traducción en eucariotas (EEF1A1,

RPL31, RPL9, RPS29, RPS6) y señalización por VEGF (ACTB, AKT1, CAV1, CDC42, HSP90AA1, RHOA, SRC).

Tabla 4.3. Proteínas denominadas centrales e importantes de la línea de GBM humano LN229-GLS2, como resultado del análisis en bases de datos de las proteínas sobreexpresadas.

Nombre del gen	Descripción
ACTB	Actin, cytoplasmic 1
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
EGFR	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic)
PTEN	Mutated in multiple advanced cancers 1
RPS27A	Ubiquitin carboxyl extension protein 80
RPS6	Small ribosomal subunit protein eS6
TP53	Cellular tumor antigen p53



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. Discusión



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GLS2

La expresión heteróloga de proteínas recombinantes es una tecnología esencial para la caracterización de proteínas y, junto con los nuevos avances en las estrategias de purificación por cromatografía de afinidad, son metodologías fundamentales en el catálogo de técnicas proteómicas modernas. Aunque muchos polipéptidos pueden ser expresados y purificados de forma satisfactoria en sistemas procariotas, otras proteínas necesitan sistemas de expresión eucariotas, como aquellas que requieren modificaciones postraduccionales, para producir formas funcionalmente activas. En esta Memoria, hemos conseguido la sobreexpresión y purificación de la GA GLS2 humana (isoenzima GAB) en dos sistemas heterólogos diferentes: procariota (*E. coli*) y eucariota (células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes).

De las tres construcciones truncadas de GLS2 que probamos en bacterias, la construcción GLS2₇₃₋₆₀₂ mostró muy bajo nivel de expresión, por lo que fue descartada en los primeros ensayos a pequeña escala. La eliminación de los 61 aminoácidos del exón 1, junto con los 11 primeros aminoácidos del exón 2, impidieron la obtención de una sobreexpresión proteica. Las otras dos formas truncadas, GLS2₅₆₋₆₀₂ y GLS2₆₂₋₄₈₃, si nos permitieron obtener proteína funcional con actividad enzimática soluble, aunque una notable proporción de ambas proteínas seguía apareciendo en forma insoluble. La expresión de la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂ fue optimizada variando los medios de cultivo, concentraciones del inductor IPTG y temperaturas de inducción. Las condiciones óptimas encontradas fueron: medio 2xYT e inducción a 30 °C toda la noche con IPTG 1 mM. Condiciones similares de expresión fueron seleccionadas para la expresión de la proteína truncada GLS2₆₂₋₄₈₃. Ambas proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad IMAC, que fue bastante eficaz y nos permitió obtener fracciones enriquecidas con un notable grado de purificación. No obstante, el ensayo enzimático GA determinó una actividad específica muy superior de la construcción GLS2₅₆₋₆₀₂ (112 U/mg), comparada con la obtenida para la forma truncada GLS2₆₂₋₄₈₃ (valores máximos de 13 U/mg).

La producción de proteína GLS2 humana descrita en esta Memoria estaba destinada, fundamentalmente, a la cristalización y posterior determinación de su estructura cristalina. Anteriormente, nuestro grupo de investigación consiguió la expresión de la proteína GLS2 humana de longitud completa en bacterias (Campos-Sandoval *et al.*, 2003). Sin embargo, la proteína así producida fue inactiva catalíticamente

Discusión

y mayoritariamente insoluble, formando agregados y precipitando en cuerpos de inclusión de donde era purificada. La capacidad de agregación de las proteínas GA fue también puesta de manifiesto para las isoenzimas GLS: el grupo del Dr. Curthoys, pionero en los estudios de estas isoenzimas en mamíferos, describió la expresión y purificación de dos formas truncadas de la isoenzima KGA de rata con actividad catalítica (sin el exón 1, en un caso; con los exones 2-14, en otro), mientras que fue imposible obtener actividad GA soluble cuando se expresaba la isoenzima KGA completa (Kenny *et al.*, 2003). Con estos resultados en mente, realizamos un análisis bioinformático de las regiones desestructuradas en la secuencia de la GLS2 humana, junto con un análisis de predicción de la estabilidad proteica en función de la secuencia aminoacídica. Las construcciones truncadas de GLS2, en las que se omitió la mayor parte del exón 1 (región no estructurada y potencial foco de agregación), fueron las que proporcionaron un mejor resultado de expresión en ambos sistemas heterólogos (bacterias y baculovirus), tanto en rendimiento como en actividad catalítica.

Nuestro grupo fue el primero en expresar la proteína GLS2 humana en forma funcional, utilizando los primeros sistemas de baculovirus recombinantes disponibles en la época (Campos-Sandoval *et al.*, 2007). No obstante, ni el rendimiento obtenido ni los componentes del tampón de lisis utilizado (detergente TX-100) eran adecuados para su implementación en ensayos de cristalización. Las proteínas destinadas a cristalización deben ser generadas en una cantidad y calidad alta, por lo que el paso crítico para alcanzar el objetivo propuesto es la elección de la proteína y de los procesos de purificación de esta. En concreto, se recomienda cristalizar proteínas con una pureza igual o mayor al 95%, mientras que para poder evaluar un gran número de condiciones de cristalización diferentes, a dos temperaturas (típicamente 4°C y 20-25°C), se requieren concentraciones elevadas de la proteína purificada y una cantidad mínima de aprox. 20 mg (Rubio, 2003).

Una estrategia para aumentar la posibilidad de cristalizar una proteína es evaluar su carácter monodisperso y su estabilidad térmica. Se ha comprobado que estas características biofísicas están altamente correlacionadas con un mayor orden estructural y una menor flexibilidad de la proteína, que favorecen la cristalización (Reinhard *et al.*, 2013). Por lo tanto, es conveniente encontrar un medio apropiado que establezca la proteína durante el proceso de purificación y, al mismo tiempo, evite su agregación. Uno de los métodos más empleados para hallar esas condiciones óptimas (tampones y aditivos) es el ensayo de desplazamiento térmico o Termofluór, basado en el uso de una sonda

fluorescente hidrofóbica, SYPRO Orange. La sonda sólo emite fluorescencia cuando se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas, que quedan expuestas cuando estas se desnaturalizan, lo que permite distinguir entre los estados plegado y desnaturalizado de una proteína. La curva que se obtiene al representar la fluorescencia frente a la temperatura permite seguir el proceso de desnaturalización de la proteína (Fig. 5.1). Una curva óptima presenta una forma sigmoidea, formada por un tramo inicial horizontal, con fluorescencia baja o nula, donde la proteína se encuentra totalmente plegada, seguido por una región de transición rápida hacia un estado completamente desnaturalizado, que presenta el máximo de fluorescencia. La temperatura en el punto medio de dicha transición es la temperatura de fusión, T_m , definida como la temperatura a la cual la proteína está desnaturalizada al 50% (Ericsson *et al.*, 2006). Si una proteína ya está parcialmente desplegada al inicio del ensayo, la curva comenzará con valores altos de fluorescencia, como se observa en la Fig. 5.1., lo que indica que el tampón en el que se encuentra la proteína no es óptimo.

La estabilidad de la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂, expresada en sistemas eucariota y procariota, se analizó mediante ensayos de desplazamiento térmico. En el caso de la proteína producida en bacteria, gran parte de las curvas de desnaturalización presentan un perfil con altos valores de fluorescencia al inicio y varios hombros, a diferencia de las curvas de la proteína expresada en células de insecto, que se ajustan más a una forma sigmoidea. Este resultado indica que la proteína expresada en células de insecto es más estable que la expresada en bacterias. Además, conviene resaltar que, debido a la forma anómala de muchas curvas de desnaturalización, los valores de T_m calculados para la proteína expresada en bacterias hay que tomarlos con precaución.

Discusión

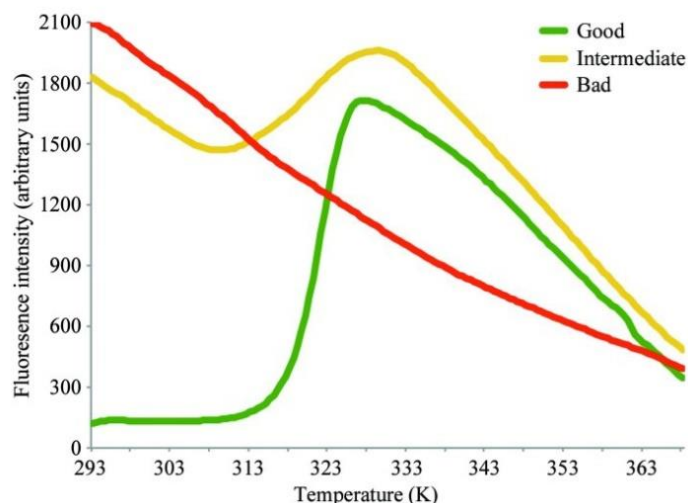


Figura 5.1. Diferentes formas de las curvas de desnaturalización en el experimento de desplazamiento térmico. Se representa en verde la curva óptima, en amarillo la curva intermedia y en rojo la curva de una proteína totalmente desnaturalizada. Imagen tomada de Reinhard *et al.*, 2013.

La temperatura de fusión de la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂, producida en bacterias, no superó nunca los 45 °C en las múltiples formulaciones de medios en las que fue analizada con el ensayo Termofluor y, además, una gran parte de las curvas de desnaturalización térmica fueron anómalas, sugiriendo inestabilidad proteica. Para las proteínas GLS2 completa y GLS2₅₆₋₆₀₂, expresadas en células de insecto, pudimos optimizar el medio donde se comportaban de forma más estable (HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM), lo que nos permitió modificar las soluciones y fases móviles empleadas en su aislamiento y purificación. Entonces, ambas proteínas purificadas fueron sometidas al ensayo Termofluor y mostraron temperaturas de fusión superiores a la GLS2₅₆₋₆₀₂ aislada de *E. coli*; en concreto, 61 °C y 78 °C para las versiones completa y trunca, respectivamente. Así mismo, hay que destacar la mayor estabilidad térmica de GLS2₅₆₋₆₀₂ en relación con la proteína GLS2 completa, que mostraron una notable diferencia (17 °C) en sus respectivas T_m . Este resultado confirma que la eliminación de la mayor parte del exón 1, región no estructurada, en el diseño de la proteína trunca GLS2₅₆₋₆₀₂ aumenta notablemente su estabilidad. Por otra parte, hay que mencionar que conseguimos una proteína estable que permitía su conservación a -80°C sin degradación apreciable durante meses de almacenamiento (resultados no mostrados).

El laboratorio de cristalización de proteínas (High Throughput Crystallization Facility, HTX lab) del Prof. José Antonio Márquez, en el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) de Grenoble (Francia), ha desarrollado una metodología semi-automatizada para la cristalización y recolección de cristales de proteína. A partir de la proteína purificada, el montaje de las placas de cristalización y la posterior manipulación de las placas se llevan a cabo de forma automática mediante un robot (ver Materiales y Métodos). A pesar de la gran cantidad de información acumulada durante décadas, la cristalización de proteínas es todavía un proceso de “ensayo y error”, debido sobre todo a las características de solubilidad impredecibles de estas macromoléculas (McPherson & Gavira, 2014). En nuestro caso, la estrategia inicial de los ensayos de cristalización fue chequear gran parte de las placas comerciales más empleadas en este tipo de ensayos, obteniendo como resultado una única condición donde se produjeron microcristales de proteína, en un medio con Tris-HCl 0.1 M, pH 8, Li₂SO₄ 1.6 M y a una concentración de proteína de 1.84 mg/mL. Existen varias publicaciones de estructuras cristalinas de isoenzimas GLS, donde la condición de cristalización óptima empleada tiene como componente precipitante el Li₂SO₄ y como solución tampón el reactivo BIS-Tris propano a pH 7 (Thangavelu *et al.*, 2014; Ramachandran *et al.*, 2016), por lo que el tampón Tris y la sal de Li podrían ser las condiciones más favorables para conseguir cristales de mayor tamaño de GLS2. Por lo que respecta al pH óptimo obtenido para la formación de cristales (pH 8), tiene sentido que sea un pH ligeramente alcalino, dado que es el pH al cual las enzimas GAs muestran la mayor V_{max} (Campos *et al.*, 1998).

En la búsqueda para obtener cristales de mayor tamaño, una de las variables que decidimos probar fue incrementar la concentración de proteína hasta una concentración de 7.7 mg/mL y, a continuación, realizar un rastreo de concentraciones de la solución precipitante, como se ha detallado en Materiales y Métodos. En este caso, se observó que al ir aumentando la concentración de agente precipitante se producían agregados, muy presumiblemente de proteína; curiosamente, a pesar de haber establecido ratios de proteína:solución de 1:2, 1:1 y 2:1, en todos los casos la condición en la que se formó mayor proporción de agregados fue aquella de ratio 1:1. Este hecho nos aporta información adicional para futuros experimentos, conociendo que, muy probablemente, la nucleación y crecimiento de los cristales se vean favorecidos en una combinación en la que la solución precipitante se encuentre en una proporción del 50 %, respecto a la solución proteica. En esta nueva serie de experimentos de cristalización, la concentración

Discusión

de proteína fue probablemente demasiado alta, alcanzándose directamente la zona más elevada de la región sobresaturada, donde ocurre precipitación en lugar de nucleación (Fig. 5.2). Hay que distinguir claramente entre ambos procesos: la precipitación es un cambio de fase donde las moléculas de proteína pasan del estado líquido al sólido de forma abrupta y desordenada, formando agregados amorfos. Por el contrario, la cristalización es un cambio de fase lento, donde las moléculas de proteína se asocian y pasan al estado sólido de forma ordenada, dando lugar a una matriz cristalina en tres dimensiones (Rubio, 2003). Los cristales de cualquier sustancia se producen a partir de una solución sobresaturada (Fig. 5.2), mediante adición ordenada de moléculas de soluto a un núcleo inicial de cristalización. La condición de sobresaturación supone que debe haber más proteína disuelta de la que acepta la solución en el punto de saturación. Ese es nuestro objetivo en la cristalización de proteínas: obtener una solución sobresaturada que genere unos pocos núcleos de cristalización sobre los que crezcan unos pocos cristales, grandes y bien ordenados. Nucleación y crecimiento de los cristales son procesos bien diferenciados (Rubio, 2003).

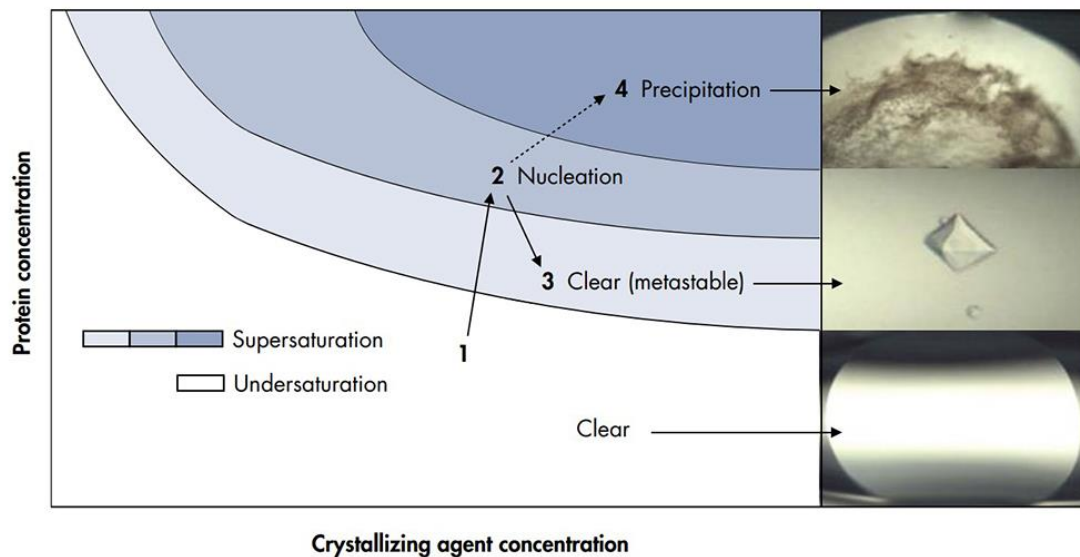


Figura 5.2. Diagrama representativo de las fases de cristalización de una proteína. Se representa la concentración de la proteína frente a la concentración del agente precipitante. La curva de saturación es la línea inferior: en cualquier punto por debajo de ella se puede seguir añadiendo proteína (1. Clear: región no saturada, no se aprecia precipitado). Por encima de ella, está la región de sobresaturación, que está compuesta por dos zonas: región metastable, donde hay crecimiento de cristales, pero no nucleación (3. Clear: Fase donde crece el cristal), y la región inestable, donde hay nucleación y crecimiento (2. *Nucleation*: Formación del primer punto de nucleación con estructura ordenada). Si se alcanzan zonas de elevada concentración en la región inestable se produce precipitación (4. *Precipitation*: Fase donde precipita la proteína formando una estructura desordenada). Figura tomada del manual técnico de Qiagen “*Critical factor for succesful protein crystallization*”.

Como una alternativa adicional, y con el fin de favorecer la formación de cristales de GLS2, se pensó en aprovechar la unión con ligandos conocidos para conseguir estabilizar la estructura de la proteína mediante la formación de un complejo. Como se ha comentado anteriormente, la proteína GIP posee un dominio PDZ que se une a una secuencia consenso situada en la región C-terminal de GLS2 (Olalla *et al.*, 2001). Se decidió determinar, mediante la técnica BLI, la K_D de la unión GLS2-GIP empleando la proteína GIP completa. La K_D obtenida, 77 nM, fue considerablemente menor que la reportada previamente para la unión GIP-octapéptido C-terminal (KENLESMV-COOH) de GLS2 (Banerjee *et al.*, 2008); concretamente, un valor 21 veces menor que el publicado anteriormente. Este resultado indicaría que en el complejo GLS2-GIP, además

Discusión

de la unión descrita, podría existir una estabilización adicional debida a la estructura nativa de GLS2.

Por consiguiente, los datos de unión y afinidad de GLS2 y GIP apoyan que el complejo estable formado por ambos podría ser muy útil como estrategia alternativa de cristalización de la GLS2 en solitario. La proteína GIP es pequeña (masa molecular de aprox. 16 kDa), por lo que no daría lugar a un complejo proteico excesivamente grande. Desgraciadamente, por limitaciones de tiempo, no fue posible comenzar los ensayos previos de cristalización del complejo GLS2-GIP, que quedan pendientes de realizar en futuros abordajes de cristalización de GLS2. La finalidad principal de la determinación estructural de GLS2 fue aportar luz a los procesos celulares en los que la proteína está implicada, además de permitir el diseño racional de fármacos específicos para esta isoenzima mediante ensayos de rastreo farmacológico más efectivos.

En esta Memoria, hemos conseguido obtener microcristales de GLS2 en un medio optimizado a pH 8 y conteniendo sulfato de litio. Así mismo, se ha confirmado la idoneidad de la interacción GLS2-GIP, como vía alternativa de cristalización a la proteína GLS2 en solitario. Queremos resaltar aquí la dificultad de la tarea acometida, como lo atestigua el hecho de que aún no se han conseguido cristales de la proteína GLS2 humana ni su estructura 3D, en claro contraste con la determinación estructural de las isoenzimas GLS, que ha sido resuelta para las dos isoformas: GAC y KGA. En relación con la GLS2 humana, hay que destacar que únicamente está publicada y recogida en la base de datos PDB la estructura cristalina del dominio GA de esta proteína, que comprende sólo los residuos Ile-154 a Gly-479 (Ferreira *et al.*, 2021).

Las proteínas truncadas GLS2₅₆₋₆₀₂ expresadas y purificadas en procariotas (*E. coli*) y eucariotas (células de insecto) fueron caracterizadas mediante análisis enzimático. La caracterización cinética de las dos proteínas truncadas GLS2₅₆₋₆₀₂ mostró un comportamiento enzimático totalmente diferente para la unión del sustrato Gln. Mientras que la proteína recombinante purificada de células eucariotas seguía una cinética hiperbólica (Michaelis-Menten), la enzima aislada de procariotas mostró un comportamiento alostérico sigmoidal. Con respecto a la dependencia de Pi, la actividad enzimática aumentó drásticamente al pasar de una concentración 5 mM a 50 mM, empleando una concentración constante de proteína de 0.5 μM. En cambio, la actividad

catalítica no presentó ningún cambio significativo al aumentar la concentración de Pi hasta 150 mM para ambas proteínas.

En un estudio publicado en 2012, Cassago y colaboradores expresaron en *E. coli* las proteínas recombinantes truncadas siguientes: KGA de rata y GAC y GLS2 de ratón. Tras realizar medidas de actividad GA de las proteínas purificadas, incrementando la concentración de Pi hasta 50 mM, se concluyó que la isoenzima LGA (una isoenzima de GLS2) es menos sensible a la activación por Pi que las isoenzimas KGA y GAC (isoenzimas GLS), empleando siempre una concentración de proteína 5 nM y con Gln 60 mM. La cinética para la proteína denominada LGA (según se describe en la publicación, esta proteína comprendía los residuos 73 al 602, por lo que es una construcción idéntica para ambas isoenzimas GLS2, GAB y LGA), muestra una tendencia ambigua, aunque parece responder a un perfil hiperbólico (Cassago *et al.*, 2012), en consonancia con nuestros resultados. Recientemente, este mismo grupo ha publicado la estructura cristalina del centro catalítico (dominio GA) de la proteína GLS2 de ratón; así mismo, incluyeron una caracterización cinética de la proteína recombinante GLS2₇₃₋₆₀₂ de ratón, expresada en *E. coli*. En este caso, la concentración máxima de proteína empleada fue mayor que en la publicación anterior y coincidió con la utilizada en nuestros estudios cinéticos (500 nM). Según sus resultados, la enzima mostró una cinética sigmoideal y un valor de $[S]_{0.5}$ para Gln dependiente de la concentración de Pi, siempre para concentraciones de proteína superiores a 50 nM (Ferreira *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta que nuestros ensayos se realizaron a tiempo real mediante medidas de fluorescencia, la cinética sigmoideal reportada por esos autores para la GLS2 de ratón resultó ser concordante con la tendencia obtenida en nuestros ensayos para la proteína GLS2₅₆₋₆₀₂, producida en bacterias y a una concentración fija de enzima, donde la $[S]_{0.5}$ disminuyó de 9.3 ± 1.8 mM a 7.5 ± 0.4 mM al aumentar la concentración de Pi desde 5 mM a 150 mM.

Nuestro grupo publicó un estudio en 2007 sobre la purificación y caracterización de GLS2 completa producida en células de insecto. La proteína es procesada dentro de la célula por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP), que elimina los primeros 38-39 aminoácidos del extremo N-terminal (Campos-Sandoval *et al.*, 2007). Esta proteína se expresó sin ninguna etiqueta de afinidad mientras que, en nuestro caso, la caracterización cinética se realizó sobre la proteína pura truncada, GLS2₅₆₋₆₀₂, con una

Discusión

etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal y expresada en un sistema de baculovirus diferente y con distintas células de insecto (Sf21 vs Sf9).

Como hemos señalado anteriormente, la proteína GLS₂₅₆₋₆₀₂ producida en células de insecto mostró una cinética de Michaelis-Menten, a diferencia de la proteína GLS2 completa, producida anteriormente por nuestro grupo en baculovirus (Campos-Sandoval *et al.*, 2007), que mostraba una cinética alostérica sigmoidal. Muy probablemente, esta diferencia se deba al propio procesamiento de la proteína, o a la diferente estructura molecular expresada en ambos casos o a un cambio en el comportamiento cinético a bajas concentraciones de enzima (Ferreira *et al.*, 2021). Las propiedades cinéticas de las isoenzimas GLS2 son diferentes dependiendo de si la enzima está asociada con la membrana mitocondrial interna o está solubilizada mediante sonicación o detergentes. La proteína asociada a membrana mostró una cinética hiperbólica, mientras que la soluble presentó una cinética alostérica sigmoidal (Curthoys & Watford, 1995). En cualquier caso, las dos proteínas GLS₂₅₆₋₆₀₂ purificadas y caracterizadas cinéticamente en esta Memoria, se comportan con un rasgo típico de las isoenzimas GLS2, en contraste con las isoenzimas GLS, esto es: una baja dependencia por el efector Pi. En cambio, los valores de K_m (2 mM) y $[S]_{0.5}$ (6 mM) obtenidos para las enzimas GLS₂₅₆₋₆₀₂ expresadas en eucariotas y procariotas denotan una alta afinidad por el sustrato Gln, un rasgo más característico de isoenzimas GLS (véase Márquez *et al.*, 2016 para una discusión detallada. Podríamos especular aquí que la falta de aminoácidos en el extremo N-terminal de las proteínas truncadas podría provocar esa incrementada afinidad por el sustrato.

Por último, dentro de la caracterización estructural y funcional que realizamos de la proteína GLS2 humana recombinante, aislada de células eucariotas, abordamos la determinación de posibles modificaciones postraduccionales con potencial relevancia en su funcionalidad. Trabajos experimentales de distintos grupos de investigación han comunicado, en los últimos años, la existencia de modificaciones postraduccionales en GAs de mamíferos, particularmente en las isoenzimas GLS. La activación de las dos isoenzimas GLS (KGA y GAC) en líneas celulares de cáncer humano está conectada con distintas rutas de señalización que implican fosforilación. De este modo, la isoforma KGA, esencial para el crecimiento y proliferación de células HEK293T y células de cáncer de mama MCF7, aumentó su actividad en ambos tipos celulares tras estimularlas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), por una ruta dependiente de fosforilación y mediada por las quinasas Raf-Mek-Erk (Thangavelu *et al.*, 2012). Reforzando esos

resultados, los mismos autores demostraron que la activación de KGA y de la proliferación celular fueron bloqueadas con inhibidores específicos de quinasas y con la fosfatasa de amplio espectro PP2A, lo que refuerza la noción de que la activación de KGA fue dependiente de fosforilación (Thangavelu *et al.*, 2012).

De forma análoga, la isoenzima GAC fue activada mediante fosforilación en fibroblastos transformados con tres diferentes Rho-GTPasas (Cdc42, Rac1 y RhoC) y en la línea celular de cáncer mamario SKBR3: se demostró que la activación de GAC ocurría por fosforilación a través de la ruta de señalización activada por NF- κ B (Wang *et al.*, 2010). Muy recientemente, otras quinasas han sido directamente implicadas en la fosforilación/regulación de isoenzimas GLS. Así, la quinasa ERK5 (*Extracellular signal-related kinase 5*), perteneciente a la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase*, MAPK), interacciona con la isoenzima KGA en células de adenocarcinoma de páncreas. Aunque no se conoce aún el residuo o residuos fosforilados por ERK5, resultados obtenidos mediante la disminución de los niveles de expresión de ERK5 (mediante RNA de interferencia, silenciamiento génico por CRISPR/Cas9 o inhibición farmacológica) apuntan a una posible regulación de los niveles de expresión y/o actividad GA: ERK5 regularía, por fosforilación, la velocidad de degradación de KGA y, de aquí, el aumento detectado en la expresión de KGA cuando se inhibe ERK5 en células de cáncer de páncreas (Guillén Pérez, 2021).

Como suele ser habitual en el campo de las GAs, se conoce mucho menos sobre las modificaciones postraduccionales de GLS2 y sus implicaciones en cáncer. No obstante, unos resultados muy interesantes se han obtenido en hígado regenerante y HCC que implican a la proteína mitocondrial GCN5L1 (*General control of amino acid synthesis 5 like 1*), que regula la proliferación y la tumorigénesis en HCC a través del metabolismo de la Gln. Igualmente, GCN5L1 juega un papel clave en la regeneración del hígado tras hepatotoxicidad. En ratones KO para GCN5L1, se activó la glutaminólisis hepática y aumentó la actividad GLS2, promoviendo así un remodelado metabólico que incrementó la actividad mTORC1 y la capacidad regenerativa del hígado en respuesta a un estrés hepatotóxico con CCl4 (Wang *et al.*, 2020). Además, la sobreexpresión de GCN5L1 inhibió la actividad GLS2 y esta regulación negativa estuvo mediada, al menos parcialmente, por acetilación de la Lys-279 de la GLS2 murina, localizada en el dominio catalítico de la enzima (Wang *et al.*, 2020). Estos mismos autores demostraron que la presencia simultánea de GCN5L1 y de GLS2, en un ensayo *in vitro* de acetilación,

Discusión

provocaba una disminución de la capacidad de formar oligómeros de elevada masa molecular por parte de GLS2, que está directamente relacionada con su activación catalítica. Más recientemente, el mismo grupo realizó estudios similares en el modelo HCC, un cáncer regulado también por GCN5L1. En este trabajo, demuestran que la acetilación mediada por GCN5L1 afecta tanto a isoenzimas GLS como a GLS2, disminuyendo tanto su actividad catalítica como su capacidad de oligomerización (Zhang *et al.*, 2022).

En esta Memoria, la caracterización de modificaciones postraduccionales en GLS2 se efectuó empleando una aproximación experimental dual: cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) e inmunotransferencias western con anticuerpos específicos de la modificación. Utilizamos la proteína GLS2 completa, expresada en sistemas de baculovirus y purificada por cromatografía de afinidad con la proteína GIP como ligando (Campos-Sandoval *et al.*, 2007). Priorizamos aquí el uso de esa proteína, que no posee ninguna etiqueta de afinidad en su estructura primaria, para distorsionar lo menos posible los potenciales mecanismos de modificación. La isoenzima GLS2 es una proteína que es enviada al núcleo (Olalla *et al.*, 2002; Cardona *et al.*, 2015; López de la Oliva *et al.*, 2020), pese a no poseer una clásica señal de exporte nuclear o de localización nuclear, que es requerida para el transporte a ese orgánulo mediante las rutas de exportina e importina (Olalla *et al.*, 2002). Por este motivo, también estábamos muy interesados en descubrir modificaciones postraduccionales en GLS2 como un posible mecanismo de importe al núcleo y/o de regulación funcional de la proteína.

Mediante el análisis LC-MS fuimos capaces de identificar una modificación por acetilhipusina en el residuo Lys-332 de la secuencia aminoacídica de GLS2. La modificación postraduccional fue validada por un ensayo ortogonal: inmunotransferencia western con anticuerpos específicos para el residuo de hipusina, utilizando la misma preparación purificada de GLS2 empleada en el análisis por espectrometría de masas. En células eucariotas, esta infrecuente modificación postraduccional sólo se ha descrito en una proteína: el factor eucariota de inicio de la traducción 5A (eIF5A), que desempeña un papel clave en la proliferación y supervivencia celular (Park, 2006). El residuo de hipusina es esencial para la interacción de eIF5A con secuencias nucleotídicas específicas de mRNAs durante la traducción, así como para su translocación entre núcleo y citoplasma (Xu & Chen, 2001).

El residuo de lisina modificado con hipusina en la estructura primaria de la isoenzima GAB, K-332, está localizado en un segmento desplegado de la proteína; concretamente, en un giro corto de 9 residuos que conecta dos hélices α contiguas en una secuencia muy enriquecida en aminoácidos polares (K*KFPKGVD), lo que sugiere que la lisina hipusinada está expuesta al medio externo. Precisamente, la hipusina expuesta en la proteína eIF5A es esencial para la interacción con la exportina Xpo4, lo que permite su influjo y eflujo núcleo-citoplasmático (Aksu *et al.*, 2016). De esta forma, el residuo de hipusina expuesto en GLS2 podría ser un determinante estructural necesario para su importe nuclear a través de receptores del transporte nuclear o, alternativamente, para su interacción específica con nucleótidos, en caso de que GLS2 desempeñe alguna función de regulador transcripcional en núcleo. Evidentemente, más experimentos son necesarios para discriminar la relevancia funcional de esta modificación postraducciona en la proteína GLS2, así como para elucidar el papel de la maquinaria enzimática de hipusinación en el crecimiento y proliferación celular.

II. ANÁLISIS PROTEÓMICO

En esta Memoria, se han detallado algunos de los resultados publicados recientemente por nuestro grupo sobre la localización nuclear de GLS2 en células tumorales (López de la Oliva *et al.*, 2020). El papel no glutaminolítico de GLS2 en células cancerosas; esto es, las funciones de GLS2 no adscritas a su actividad catalítica, es un tópico muy relevante en biología tumoral que actualmente está por esclarecer. Diseñamos varias aproximaciones experimentales para arrojar luz sobre este punto. Como detallamos en la sección de resultados, los ensayos de inmunocitoquímica en líneas celulares de cáncer humano revelaron una localización mitocondrial y nuclear de GLS2, que posteriormente fue confirmada mediante subfraccionamiento celular e inmunotransferencia western. Tras obtener estos resultados, se planteó la necesidad de realizar una aproximación experimental ortogonal, que no dependiera de anticuerpos anti-GLS2, para confirmar los resultados de localización nuclear. La transfección de células tumorales con el cDNA de la proteína GLS2 unida a diferentes etiquetas, como la proteína fluorescente EGFP y el epítipo c-Myc (resultados no mostrados, véase López de la Oliva *et al.*, 2020), permitió la validación de los resultados previos, confirmándose la localización de GLS2 en el núcleo celular.

Discusión

Las células tumorales suelen reprimir la expresión de GLS2, por lo que fue necesario encontrar las condiciones necesarias para incrementar el importe a núcleo de GLS2 en células HepG2 (HCC), en neuroblastoma SH-SY5Y y en células T89G (GBM). Mediante la inducción de la diferenciación con el agente PMA en las dos primeras líneas celulares, se observó un aumento de la expresión de la proteína en núcleo, pero también en mitocondria, por lo que el efecto anti-proliferativo inducido por la sobreexpresión de GLS2 podría adscribirse a ambas localizaciones subcelulares. Un resultado similar se encontró en el otro modelo ensayado: la línea celular T98G-GAB transfectada establemente con GLS2.

En GBM, el tumor cerebral más agresivo, la expresión de *GLS* está muy activada, mientras que la expresión del gen *GLS2* está silenciada por metilación de su promotor, donde existen regiones conocidas como islas GpC susceptibles de ser metiladas para inhibir la transcripción (Szeliga *et al.*, 2015). Previamente, se demostró que la transfección estable de GLS2 disminuía la viabilidad celular, proliferación y capacidad de migración de células de GBM humano T98G (Szeliga *et al.*, 2009). En un estudio publicado recientemente, la sobreexpresión de GLS2 en las líneas LN229, U87 y T98G de GBM humano provocó inhibición del crecimiento celular y represión de la ruta PI3K/AKT, que suele estar activada en GBM (Majewska *et al.*, 2019). Este resultado confirmaba un estudio previo en HCC, donde se demostró que la sobreexpresión de GLS2 actuaba como un supresor tumoral y que parte de esta respuesta antitumoral estaba mediada por la inhibición de la ruta PI3K/AKT (Liu *et al.*, 2014). El papel de gen supresor tumoral, ejercido por GLS2 en líneas celulares de cáncer humano, también fue apoyado por resultados de nuestro grupo obtenidos con la técnica de separación y clasificación celular (*cell sorting*). Así, evaluamos el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, tras inducir diferenciación con PMA en células de neuroblastoma SH-SY5Y o mediante la transfección estable de GLS2 en células de GBM T98G. En ambos casos, se observó un aumento de la población celular en la fase G2/M, que fue en paralelo con un incremento de la expresión de p53 activo y del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, p21. El eje p53-p21 es una vía central para el control del ciclo celular y la supresión tumoral, lo que conduce a la hipótesis de que GLS2 podría participar en núcleo en un programa de parada del crecimiento, que justificaría por qué ciertos tumores tienden a silenciar GLS2 y a sobreexpresar GLS, manteniendo así un programa de proliferación activo. Por otro lado, la sobreexpresión de GLS2 conllevó una disminución en los niveles

de proteína c-Myc y Bcl-2, así como una mayor expresión de la proteína pro-apoptótica Bid, lo que indicaría que las células sufren un proceso de apoptosis después de la parada en G2/M. Este hecho también se ha encontrado en tumores epiteliales y hematológicos tratados con agentes quimioterapéuticos selectivos de la célula tumoral (Xia *et al.*, 2000).

Para obtener una visión global de los cambios en el proteoma inducidos por la activación de la expresión de GLS2, se decidió analizar de forma cuantitativa los perfiles proteicos de la línea de GBM LN229, transfectada de forma estable con la secuencia codificante de GLS2, frente a su control: la línea LN229 transfectada con el vector de expresión vacío. Las células de la línea LN229 están mutadas en TP53 y está considerada como altamente tumorigénica (Ishii *et al.*, 1999). Se identificaron un total de 3082 proteínas diferencialmente expresadas de alta confianza que, tras aplicar unas ratios determinadas de variación significativa, quedaron reducidas a 300 proteínas infraexpresadas o reprimidas (ratio de abundancia LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 ≤ 0.6) y 186 proteínas sobreexpresadas (ratio de abundancia LN229-GLS2/LN229-pcDNA3 ≥ 1.5) ($p \leq 0.05$).

Como se detalló en Materiales y Métodos, en los ajustes de la herramienta bioinformática STRING tuvimos que modificar el parámetro de adición de interactores a la red de interacción proteína-proteína obtenida de la fuente de datos original para, de este modo, poder analizar de forma más fidedigna la distribución de interconexiones de la red. Cabe destacar que en nuestro análisis siempre se tuvo en cuenta el origen de cada proteína, haciendo una clara distinción entre las que provienen de los datos proteómicos originales y las que se adicionaron como interactores conocidos. Como se observa en la red de interacción entre proteínas diferencialmente reprimidas, obtenida en STRING (Fig. 4.46 capítulo de Resultados), existen ciertos agrupamientos de proteínas (*clusters*) en la distribución que presentan mayor densidad de nodos. Tras realizar un análisis de enriquecimiento funcional en términos de ontología génica (GO), se obtuvieron mayoritariamente términos asociados con el ciclo celular y con adhesión celular para las proteínas reprimidas (Fig. 4.47).

Algunas proteínas descritas como necesarias para el correcto mantenimiento del ciclo celular en GBM, como es el caso de HMGB1 (*High mobility group box 1*) y HMGA1 (*High mobility group protein HMG-I/HMG-Y*), aparecen reprimidas en nuestros resultados y también aparecen incluidas en el término de regulación de la

Discusión

adhesión celular. HMGB1 es una proteína estructural de cromatina, que regula la replicación del genoma y su recombinación, su transcripción a mRNA y la reparación del DNA. Además, ha sido implicada en tumorigénesis en varios tipos de cáncer y se ha demostrado su sobreexpresión en células de glioma. Se ha demostrado que la inhibición de HMGB1 puede suprimir la proliferación y la migración en células de glioma, promoviendo apoptosis (Jia *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2014). HMGA1 no tiene actividad transcripcional, pero puede modular la transcripción alterando la arquitectura de la cromatina a través de interacciones proteína-proteína y proteína-DNA. Por otro lado, también interviene en diferentes procesos biológicos como la regulación del ciclo celular, apoptosis y transformación neoplásica. Con respecto a su expresión, se ha encontrado en altos niveles en glioma, pero no así en tejido de cerebro humano normal (Pang *et al.*, 2012). Este resultado se observó también en un estudio previo de nuestro grupo, donde células tumorales transfectadas con el cDNA antisentido de KGA mostraron una disminución en la expresión de HMGA2, otro de los miembros de la familia de proteína HMG (Martín-Rufián *et al.*, 2006).

Igualmente, en los resultados relacionados con el ciclo celular, conviene resaltar que figuran como reprimidas proteínas relacionadas con algunos tipos de cáncer que, generalmente, están sobreexpresadas en GBM. Estas proteínas infraexpresadas son: Telo2 (*Telomere maintenance 2*) (Feng *et al.*, 2016), KIF15, KIF20A, KIF2C, KIF3A y KIFC1 (Kinesinas) (Rath & Kozielski, 2012), PLK-1 (*Polo-like kinase 1*) (Pezuk *et al.*, 2013), MKI67 (*Marker of proliferation Ki-67*) (Menon *et al.*, 2019), LMNB1 y LMNB2 (*Lamin B*) (Pei *et al.*, 2022), CDK2 (Quinasa dependiente de ciclina 2) (Wang *et al.*, 2016) y CALM1 (Calmodulina 1) (Azab *et al.*, 2020) (ver Tablas suplementarias 1 y 3, Anexo II).

Con respecto a los términos relacionados con adhesión celular y unión a los filamentos de actina destaca CAPG (*Macrophage-capping protein*), por aparecer fuertemente reprimida en nuestro estudio, mientras que en GBM está descrita como una proteína sobreexpresada. Esta proteína se ha demostrado que está asociada con proliferación y metástasis en GBM, además de regular la progresión de la fase G1/S del ciclo celular. CAPG es una proteína de unión a actina que modula la dinámica del citoesqueleto. Su función es proteger los extremos finales de actina, inhibiendo la polimerización de los filamentos de actina (Prescher *et al.*, 2021). La alta expresión de la proteína CAPG se ha relacionado con un incremento de la capacidad de invasión y

migración en GBM (Yun *et al.*, 2018). CAPG podría ser responsable de la formación de los complejos de adhesión, que interactúan con la matriz extracelular a través de las moléculas de integrinas, con la finalidad de alterar el comportamiento migratorio de las células tumorales.

Recientemente, se ha publicado que la quinasa PLK1 es un regulador de la mitosis celular y juega un papel importante en la biosíntesis de las células de cáncer, activando la vía de las pentosas fosfato. Por otro lado, al inhibir la vía de señalización PLK1 en células de GBM, mediante un inhibidor del receptor de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) denominado tivozab, se produce una parada del ciclo celular en G2/M (Momeny *et al.*, 2017). Además, PLK1 interactúa directamente con G6PD (Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) y la fosforila, favoreciendo la formación de su dímero activo (Fig. 6.1) e incrementando el flujo de la vía de las pentosas fosfato, y la biosíntesis de macromoléculas (Ma *et al.*, 2017). En nuestros resultados, G6PD también aparece reprimida, lo que podría apoyar esta hipótesis.

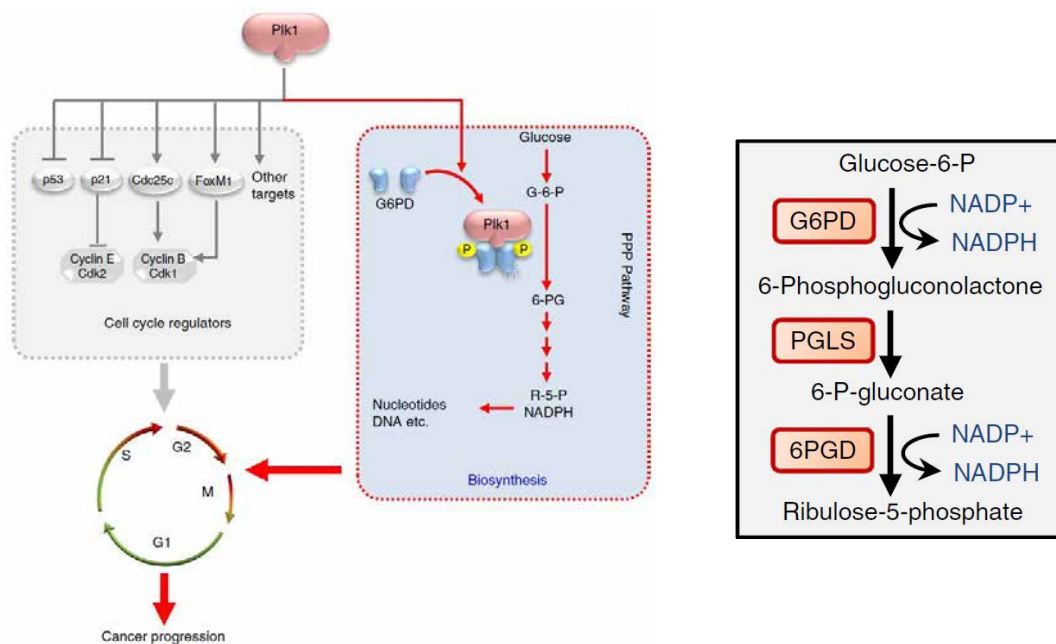


Figura 5.3. Mecanismo por el que la proteína PLK1 regula el ciclo celular y la ruta de las pentosas fosfato. Imagen tomada de Ma *et al.*, 2017.

Discusión

En relación con los términos de unión a los filamentos de actina y adhesión celular, aparecen como reprimidas las proteínas ADAM9 (*Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9*) (Chou *et al.*, 2020), ITGA1 (*Integrin subunit alpha 1*) (Mattila *et al.*, 2005), ANXA6 (Anexina A6) (Qi *et al.*, 2015), PLEC (Plectina) (Perez *et al.*, 2021), SLK (*STE20-like serine/threonine-protein kinase*) (Wang *et al.*, 2018) y WNT5A (*Wnt family member 5A*) (Yu *et al.*, 2007) (ver Tablas suplementarias 2 y 4, Anexo II). El término funcional “adhesión celular” abarca los procesos destinados a la unión o adhesión de complejos de proteínas a la membrana celular para facilitar la señalización y comunicación. Las proteínas incluidas en nuestros resultados proteómicos, encargadas de formar esos complejos, se encuentran reprimidas por lo que, en cierto modo, algunas de las vías de señalización involucradas podrían encontrarse parcial o totalmente inactivadas.

En el análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas diferencialmente sobreexpresadas, utilizando la herramienta bioinformática STRING con los parámetros detallados en Materiales y Métodos, obtuvimos una red de interacción proteína-proteína con muchos menos nodos que la red correspondiente a las proteínas reprimidas (Fig. 4.48, capítulo de Resultados), observándose una distribución de nodos agrupados. Tras realizar un enriquecimiento funcional empleando la herramienta ClueGo, se pudieron inferir los términos funcionales: complejo de proteasoma, gránulos ricos en ficolina-1, regulación de la polimerización de proteínas, etc. (Fig. 4.49, capítulo de Resultados).

El término funcional obtenido compuesto por un mayor número de proteínas fue el complejo del proteasoma, donde aparece como sobreexpresada la proteína PI31 ó PSMF1 (*Proteasome inhibitor PI31 subunit*). Su función principal es inhibir la hidrólisis de proteínas y péptidos por el proteasoma. Para realizar esta función, PI31 interacciona directamente con VCP (*Valosin-containing protein*), regulando de forma antagónica la actividad del proteasoma (Clemen *et al.*, 2015). Ambas proteínas se encuentran sobreexpresadas en nuestra lista origen, mientras que algunas de las subunidades que componen el complejo del proteasoma 26S, y que aparecen recogidas en este término funcional, no muestran expresión diferencial o están levemente reprimidas. Por tanto, estas proteínas se consideraron interactores añadidos excepcionalmente, según los ajustes iniciales impuestos en STRING. Curiosamente, la mayoría de las proteínas sobreexpresadas y enriquecidas en los términos de ontología génica (GO) son proteínas descritas como involucradas en proliferación, migración y malignidad en GBM, como,

por ejemplo: CAV1 (Caveolina 1) (Martin *et al.*, 2009), HSPB1 (*Heat shock protein family B (small) member 1*) (Ye *et al.*, 2016), CTHRC1 (*Collagen Triple Helix Repeat Containing 1*) (Liu *et al.*, 2017), ACTB (β -actina) (Guo *et al.*, 2013), CDK6 (quinasa dependiente de ciclina 6) (Li *et al.*, 2012), PXDN (Peroxidasina) (Zheng *et al.*, 2018), NPM1 (Nucleofosmina) (Holmberg *et al.*, 2015), etc. (ver Tabla suplementaria 2, Anexo II). Por otro lado, cabe destacar como proteínas sobreexpresadas TIMP3 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases-3*), EHD3 (*EH Domain Containing 3*) y FHL1 (*Four and a half LIM domains 1*), dentro de los términos funcionales relacionados con gránulos de secreción, adhesión focal y regulación del ciclo celular, que presentan funciones de inhibición de la malignidad en tumores. Así, TIMP3 es una proteína inhibidora de metaloproteinasas, que en GBM es capaz de inhibir la angiogénesis (Zerrouqi *et al.*, 2012). La proteína EHD3 está implicada en la regulación del transporte entre los endosomas y el aparato de Golgi, además de ser considerada un supresor tumoral en cerebro. En respuesta a la estimulación por el ligando EGF, se ha demostrado que EHD3 acelera la degradación de EGFR por aumento de su ubiquitinación. Además, EHD3 también regula el tráfico endosomal de EGFR, llevándolo hacia una ruta degradativa. Por tanto, en presencia de EHD3, tanto la activación de EGFR como la de ERK y AKT estuvieron significativamente inhibidas (Amessou *et al.*, 2016). Estos antecedentes podrían explicar el hecho de que EGFR aparezca reprimida en nuestros resultados. Según se ha publicado recientemente, FHL1 inhibe la proliferación en células de GBM mediante su interacción con AKT, impidiendo su fosforilación por PI3K en el residuo clave Thr308 (Li *et al.*, 2020).

La mayor agresividad de los tumores de GBM está relacionada con un aumento del metabolismo de aminoácidos. De ahí que proteínas relacionadas con el término funcional: “procesos biosintéticos de aminoácidos de la familia de Gln”, donde está incluida la proteína GLS2, aparezcan sobreexpresadas en nuestros resultados proteómicos. Algunas de ellas son: ASL (Argininosuccinato liasa), ASNS (Asparagina sintetasa) and PSPH (Fosfoserina fosfatasa).

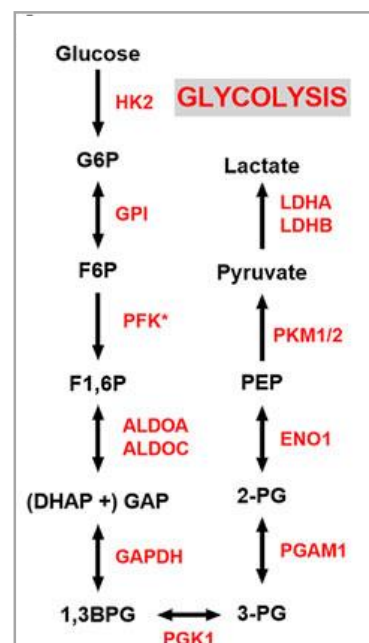
Por tanto, con respecto al análisis de enriquecimiento funcional mediante ontología génica (GO), la sobreexpresión de GLS2 en las células de la línea LN229 de GBM no consiguió revertir el carácter maligno e invasivo en los términos funcionales obtenidos en el análisis de las proteínas sobreexpresadas. En cambio, GLS2 parece

Discusión

intervenir como supresor tumoral mediante la represión de proteínas clave de la transformación maligna, que han sido previamente descritas como sobreexpresadas en GBM. Es de interés reseñar que, como se ha comentado anteriormente, GLS2 podría disminuir la actividad la vía de señalización PI3K/AKT (fuertemente activada en GBM), regulando fundamentalmente proteínas relacionadas con AKT (Majewska *et al.*, 2019).

Los términos obtenidos del enriquecimiento funcional GO mediante la aplicación FunRich confirmaron, en general, muchos de los resultados obtenidos con ClueGo. Algunos de los términos obtenidos presentaron un bajo porcentaje de proteínas, por lo que su interpretación fue ambigua y sesgada. Por ejemplo, el término funcional “regulación negativa del proceso biosintético del colesterol”, que representa un 1 % en la gráfica de procesos biológicos de las proteínas diferencialmente reprimidas (Fig. 4.50-A, capítulo de Resultados), sólo incluyó tres proteínas, de las que dos de ellas forman un complejo (ERLIN-1/ERLIN-2; *Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein*). Debemos destacar el término funcional “glucolisis”, como el único término que obtuvimos dentro del enriquecimiento funcional de las proteínas diferencialmente sobreexpresadas, perteneciente a la clasificación de ontología génica (GO) “procesos biológicos” (Fig. 4.50-A, Resultados).

Figura 5.4. Glucolisis en GBM. Hexokinasa 2 (HK2), Glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI), Fosfofructoquinasa isoforma hepática (PFKL), Aldolasa A/C (ALDOA/ALDOC), Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Fosfoglicetato quinasa 1 (PGK1), Fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM), Enolasa 1 (ENO1), Piruvato quinasa M1/2 (PKM1/2), Lactato deshidrogenasa (LDH). Las abreviaturas de los metabolitos son: glucosa 6-fosfato (G6P), fructosa 6-fosfato (F6P), fructosa 1,6-bisfosfato (F1,6P), gliceraldehído 3-fosfato (GAP), dihidroxiacetona fosfato (DHAP), 1,3-bisfosfoglicerato (1,3BPG), glicerol 3-fosfato (3-PG), glicerol 2-fosfato (2-PG), fosfoenolpiruvato (PEP). Imagen tomada de Stanke *et al.*, 2021.



En nuestro estudio de proteómica cuantitativa, aparecen como sobreexpresadas las enzimas glucolíticas HK2, GPI, PGK1, ALDOC, GAPDH, PGAM1 y LDHA (Fig. 5.4). Las demás no mostraron una expresión destacada, menos la proteína PKM1 que resultó estar reprimida y es regulada por F1,6BP. Aunque, en principio, cabría pensar que GLS2 provoca una reactivación de la glucolisis, ya de por sí muy activa en GBM, al identificarse 7 enzimas sobreexpresadas, no hay que descartar que, en realidad, se produzca una ralentización del flujo glucolítico, al existir una represión de las enzimas que controlan dos de los puntos clave de control de esta ruta. Así, la isoenzima PFKP (isoenzima PFK de plaquetas, la isoforma mayoritaria en GBM) esta reprimida. Igualmente, la isoenzima PKM1/2 está infraexpresada en las células con sobreexpresión de GLS2. Por último, el transportador de glucosa SLC2A1 está también reprimido. Por consiguiente, un efecto anti-Warburg podría estar ocurriendo en la línea celular de GBM transfectada establemente con GLS2, que contribuiría al programa anti-proliferativo inducido por GLS2. No obstante, esta hipótesis tendrá que ser contrastada por resultados de metabolómica y por medidas del flujo glucolítico en esas células.

El complejo enzimático PDH (piruvato deshidrogenasa) es la proteína que cataliza el paso de piruvato a AcCoA. En nuestro estudio, no aparece diferencialmente expresada. Sin embargo, esta proteína se inactiva mediante fosforilación por la PDK1 (piruvato deshidrogenasa quinasa) que, interesantemente, aparece con un alto valor de sobreexpresión en nuestros resultados proteómicos. La fosforilación de PDH sólo afectaría a su actividad y no, en principio, a la cantidad de proteína presente en la célula. PDK1 juega un papel clave en la regulación de la glucosa, metabolismo de ácidos grasos y homeostasis mediante la fosforilación de PDHA1 y PDHA2. Esta fosforilación inhibe la actividad de piruvato deshidrogenasa y regula el flujo de metabolitos hacia el ciclo TCA, reprimiendo la respiración aeróbica e inhibiendo la formación de AcCoA desde piruvato. Esta hipótesis se ha visto recientemente apoyada por los resultados de metabolómica de mi compañero predoctoral Juan De los Santos, quién observó una disminución en la producción de AcCoA en el mismo modelo celular utilizado en nuestro estudio proteómico, junto con concentraciones sensiblemente inferiores de citrato e isocitrato (de los Santos, J., comunicación personal).

Como podemos ver en la Tabla 4.2 del capítulo de Resultados, se establecieron como proteínas centrales dentro de la distribución de interacción proteína-proteína un total de 29 proteínas reprimidas, de las cuales TP53, MAD2L1 (*Mitotic arrest deficient*

Discusión

2-like protein 1), CDC6 (*Cell division cycle 6*), CCNA2 (Ciclina A2), BUB1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog*), AURKB (*Aurora kinase B*), ASPM (*Assembly factor for spindle microtubules*) y ACTB fueron interactores adicionales. Las proteínas se analizaron en las bases de datos KEGG y REACTOME para determinar las rutas biológicas en las que estaban enriquecidas. Como cabía esperar por los resultados anteriores, las rutas fundamentales estaban relacionadas mayoritariamente con el ciclo celular, confirmando la gran importancia que este término funcional alcanza en las células de GBM con sobreexpresión de GLS2.

Realizando el mismo análisis con las proteínas sobreexpresadas, se obtuvieron un total de 10 proteínas (Tabla 4.3 de resultados), de las que cinco de ellas eran interactores adicionales que no aparecían en la lista de resultados: AKT1, EGFR, HSP90AA1 (*Heat shock protein 90 kDa alpha family class A member 1*), PTEN y TP53. La ruta mayoritaria obtenida en este caso fue glucólisis, además de otras rutas relacionada con las características propias de GBM. Estos resultados apoyan los análisis anteriores realizados mediante GO, por lo que se podría plantear la hipótesis de que la sobreexpresión de GLS2 tendría una implicación en la parada del ciclo celular, sumándose a resultados previos discutidos en esta Memoria, además de una posible inhibición de vías de señalización relevantes en tumorigénesis como PI3K/AKT, EGFR/EFG, etc.

6. Conclusions



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusions

1. Functional human GLS2 protein (truncated GAB isoenzyme) produced in eukaryotic expression systems is more stable than its counterpart produced in prokaryotic systems. This fact suggests that some posttranslational modifications might be essential for the maintenance of its native structure and/or full activity.
2. The GLS2 protein expressed in baculovirus systems is posttranslationally modified by acetylhyposine at the lysine residue 332. The significance of this modification is currently unknown: further work will be needed to ascertain its involvement in the protein's nuclear translocation and functional properties.
3. An experimental setup in baculovirus systems has been developed for the expression and purification of whole and truncated GLS2 protein forms. The truncated form, starting at residue 56, is fully functional, oligomerizes forming a tetramer, shows a great specific activity with Michaelis-Menten kinetics and recognizes with great affinity the PDZ protein GIP. On the other hand, its protein counterpart purified from bacteria shows enzymatic activity but with an allosteric behavior.
4. A crystallization medium was optimized after checking more almost four thousand formulation conditions at two different temperatures. Protein microcrystals of GLS2 were finally obtained in a buffer 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 with 1.6 M lithium sulfate. In this medium, we expect to get bigger crystals suitable for X-ray diffraction in the short term, once this goal was shown to be out of the time frame of this PhD Thesis.
5. Immunocytochemistry and subcellular fractionation GLS2 in human cancer cells gave consistent results demonstrating nuclear and mitochondrial locations, with the latter being predominant. GLS2 expression and nuclear accrual notably increased by treatment of SH-SY5Y neuroblastoma cells with PMA and it correlated with cell cycle arrest at G2/M, upregulation of tumor suppressor p53

Conclusions

and p21 protein. A similar response was obtained by overexpression of GLS2 in T98G glioma cells, including downregulation of oncogene c-Myc. Our studies provide strong evidence for a tumor suppressor role of GLS2 in certain types of cancer.

6. Employing a proteomics platform with an Orbitrap analyzer, we performed a quantitative proteomic analysis of human glioma cells overexpressing the GLS2 protein. The main hits and interacting networks obtained were ascribed to proteins involved in cell cycle, cellular adhesion, migration, protein degradation and glycolysis. GLS2 seems to be mostly engaged in cell cycle arrest, due to the large percentage of downregulated proteins involved in key aspects of the cell cycle. In contrast, most of the overexpressed proteins confirmed the maintenance of pathways related to GBM and its malignancy. Combination of these data with metabolomics studies will be essential to elucidate the anti-proliferative response elicited by GLS2 expression in human glioma cells.

7. Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Aksu, M., Trakhanov, S., Görlich, D. (2016). Structure of the exportin Xpo4 in complex with RanGTP and the hypusine-containing translation factor eIF5A. *Nature Communications*, 7, 11952.
- Aledo, J.C., Gómez-Fabre, P.M., Olalla, L., Márquez, J. (2000). Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mammalian Genome*, 1(12), 1107–1110.
- Aledo, J.C., Rosado, A., Olalla, L., Campos, J.A., Márquez, J. (2001). Overexpression, purification, and characterization of glutaminases-interacting protein, a PDZ-domain protein from human brain. *Protein Expression and Purification*, 23(3), 411–418.
- Amessou, M., Ebrahim, A.S., Dilly, A., Joseph, M., Tabolina, M., Chukkapalli, S., Meroueh, L., Syed, J.T., Liddane, A., Lang, S.L., Al-Katib, A., Kandouz, M. (2016). Spatio-temporal regulation of EGFR signaling by the Eps15 homology domain-containing protein 3 (EHD3). *Oncotarget*, 7(48), 79203–79216.
- Aquila, S., Santoro, M., Caputo, A., Panno, M.L., Pezzi, V., De Amicis, F. (2020). The tumor suppressor *PTEN* as molecular switch node regulating cell metabolism and autophagy: implications in immune system and tumor microenvironment. *Cells*, 9(7), 1725.
- Asselin-Labat, M.L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., Lindeman, G.J., Visvader, J.E. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature Cell Biology*, 9(2), 201–209.
- Azab, M.A., Alomari, A., Azzam, A.Y. (2020). Featuring how calcium channels and calmodulin affect glioblastoma behavior. A review article. *Cancer Treatment and Research Communications* 25, 100255.
- Baeriswyl, V., Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329–337.

Bibliografía

- Banerjee, M., Huang, C., Márquez, J., Mohanty, S. (2008). Probing the structure and function of human glutaminase-interacting protein: a possible target for drug design. *Biochemistry*, 47(35), 9208–9219.
- Berger, I., Fitzgerald, D.J., Richmond, T.J. (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1583–1587.
- Bhutia, Y. D., Ganapathy, V. (2016). Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(10), 2531–2539.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W. H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091–1093.
- Boroughs, L.K., DeBerardinis, R.J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Cell Biology*, 17(4), 351–359.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Bröer, A., Fairweather, S., Bröer, S. (2018). Disruption of amino acid homeostasis by novel ASCT2 inhibitors involves multiple targets. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 785.
- Cacace, A., Sboarina, M., Vazeille, T., Sonveaux, P. (2017). Glutamine activates STAT3 to control cancer cell proliferation independently of glutamine metabolism. *Oncogene*, 36(15), 2074–2084.
- Campos, J.A., Aledo, J.C., del Castillo-Olivares, A., del Valle, A.E., Núñez de Castro, I., Márquez, J. (1998). Involvement of essential cysteine and histidine residues in the activity of isolated glutaminase from tumour cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1429(1), 275–283.

- Campos, J.A., Aledo, J.C., Segura, J.A., Alonso, F.J., Gómez-Fabre, P.M., Núñez de Castro, I., Márquez, J. (2003). Expression of recombinant human L-glutaminase in *Escherichia coli*: polyclonal antibodies production and immunological analysis of mouse tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1648(1–2), 17–23.
- Campos-Sandoval, J. A., López de la Oliva, A. R., Lobo, C., Segura, J. A., Matés, J. M., Alonso, F. J., Márquez, J. (2007). Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: affinity purification, kinetic and molecular characterization. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(4), 765–773.
- Campos-Sandoval, J.A., Martín-Rufián, M., Cardona, C., Lobo, C., Peñalver, A., Márquez, J. (2015). Glutaminases in brain: Multiple isoforms for many purposes. *Neurochemistry International*, 88, 1–5.
- Cardaci, S., Zheng, L., MacKay, G., van den Broek, N.J.F., MacKenzie, E.D., Nixon, C., Stevenson, D., Tumanov, S., Bulusu, V., Kamphorst, J.J., Vazquez, A., Fleming, S., Schiavi, F., Kalna, G., Blyth, K., Strathdee, D., Gottlieb, E. (2015). Pyruvate carboxylation enables growth of SDH-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. *Nature Cell Biology*, 17, 1317–1326.
- Cardona, C., Sánchez-Mejías, E., Dávila, J.C., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Vitorica, J., Alonso, F.J., Matés, J.M., Segura, J.A., Norenberg, M.D., Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., Gutiérrez, A., Márquez, J. (2015). Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia*, 63(3), 365–382.
- Cassago, A., Ferreira, A.P., Ferreira, I.M., Fornezari, C., Gomes, E.R., Greene, K.S., Pereira, H.M., Garratt, R.C., Dias, S.M., Ambrosio, A.L. (2012). Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1092–1097.
- Chaffer, C.L., Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559–1564.
- Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A.R., Jin, E.S., Matés, J.M., DeBerardinis, R.J. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of

Bibliografía

- tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), 8674–8679.
- Chou, C.W., Huang, Y.K., Kuo, T.T., Liu, J.P., Sher, Y.P. (2020). An Overview of ADAM9: Structure, Activation, and Regulation in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7790.
- Chung–Bok, M.I., Vincent, N., Jhala, U., Watford, M. (1997). Rat hepatic glutaminase: identification of the full coding sequence and characterization of a functional promoter. *Biochemical Journal*, 324(Pt 1), 193–200.
- Cipriani, F., Röwer, M., Landret, C., Zander, U., Felisaz, F., Márquez, J.A. (2012). CrystalDirect: a new method for automated crystal harvesting based on laser–induced photoablation of thin films. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 68(Pt 10), 1393–1399.
- Clemen, C.S., Marko, M., Strucksberg, K.H., Behrens, J., Wittig, I., Gärtner, L., Winter, L., Chevessier, F., Matthias, J., Türk, M., Tangavelou, K., Schütz, J., Arhzaouy, K., Klopffleisch, K., Hanisch, F.G., Rottbauer, W., Blümcke, I., Just, S., Eichinger, L, Hofmann, A., Schröder, R. (2015). VCP and PSMF1: Antagonistic regulators of proteasome activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(4), 1210–1217.
- Colombo, S.L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., De Leon, J., Schmitt, C.A., Boorn, L., Davis, N., Moncada, S. (2010). Anaphase-promoting complex/cyclosome–Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 18868–18873.
- Csibi, A., Fendt, S. M., Li, C., Poulogiannis, G., Choo, A. Y., Chapski, D. J., Jeong, S. M., Dempsey, J. M., Parkhitko, A., Morrison, T., Henske, E. P., Haigis, M. C., Cantley, L. C., Stephanopoulos, G., Yu, J., & Blenis, J. (2013). The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell*, 153(4), 840–854.
- Curthoys, N.P., Watford, M. (1995). Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 15, 133–159.

- De Palma, M., Biziato, D., Petrova, T.V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 17(8), 457–474.
- DeBerardinis, R.J., Chandel, N.S. (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200.
- Delgir, S., Bastami, M., Ilkhani, K., Safi, A., Seif, F., Alivand, M.R. (2021). The pathways related to glutamine metabolism, glutamine inhibitors and their implication for improving the efficiency of chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 787, 108366.
- Deller, M.C., Rupp. B. (2014). Crystallization of proteins and macromolecular complexes: past, present and future, in *eLS*, John Wiley & Sons (Chichester).
- Doncheva, N.T., Morris, J. H., Gorodkin, J., Jensen, L.J. (2019). Cytoscape StringApp: network analysis and visualization of proteomics Data. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 623–632.
- Dupeux, F., Röwer, M., Seroul, G., Blot, D., Márquez, J.A. (2011). A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography*, 67(Pt 11), 915–919.
- Durán, R. V., Oppliger, W., Robitaille, A. M., Heiserich, L., Skendaj, R., Gottlieb, E., & Hall, M. N. (2012). Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Molecular cell*, 47(3), 349–358.
- Elgadi, K. M., Meguid, R. A., Qian, M., Souba, W.W., Abcouwer, S.F. (1999). Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiological Genomics*, 1(2), 51–62.
- Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., Detitta, G.T., Dekker, N., Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry*, 357(2), 289–298.

Bibliografía

- Esslinger, C.S., Cybulski, K.A., Rhoderick, J.F. (2005). N-gamma-aryl glutamine analogues as probes of the ASCT2 neutral amino acid transporter binding site. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(4), 1111–1118.
- Feng, S.W., Chen, Y., Tsai, W.C., Chiou, H.C., Wu, S.T., Huang, L.C., Lin, C., Hsieh, C.C., Yang, Y.J., Hueng, D.Y. (2016). Overexpression of TELO2 decreases survival in human high-grade gliomas. *Oncotarget*, 7(29), 46056–46066.
- Ferreira, A.P., Cassago, A., Gonçalves Kde, A., Dias, M.M., Adamoski, D., Ascensão, C.F., Honorato, R.V., de Oliveira, J.F., Ferreira, I.M., Fornezari, C., Bettini, J., Oliveira, P.S., Paes Leme, A.F., Portugal, R.V., Ambrosio, A.L., Dias, S.M. (2013). Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28009–28020.
- Ferreira, I. M., Quesñay, J., Bastos, A.C., Rodrigues, C.T., Vollmar, M., Krojer, T., Strain-Damerell, C., Burgess-Brown, N.A., von Delft, F., Yue, W.W., Dias, S. M., Ambrosio, A.L. (2021). Structure and activation mechanism of the human liver-type glutaminase GLS2. *Biochimie*, 185, 96–104.
- Fischer, C.P., Bode, B.P., Souba, W.W. (1998). Adaptive alterations in cellular metabolism with malignant transformation. *Annals of Surgery*, 227, 627–634.
- Fonseka, P., Pathan, M., Chitti, S. V., Kang, T., Mathivanan, S. (2021). FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. *Journal of Molecular Biology*, 433(11), 166747.
- Frezza, C., Gottlieb, E. (2009). Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Seminars in Cancer Biology*, 19, 4–11.
- Gameiro, P.A., Yang, J., Metelo, A.M., Pérez-Carro, R., Baker, R., Wang, Z., Arreola, A., Rathmell, W. K., Olumi, A., López-Larrubia, P., Stephanopoulos, G., Iliopoulos, O. (2013). In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell Metabolism*, 17(3), 372–385.

- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T. C., Lee, Y. S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T., Dang, C. V. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239), 762–765.
- Gene Ontology Consortium (2021). The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D325–D334.
- Giacobbe, A., Bongiorno-Borbone, L., Bernassola, F., Terrinoni, A., Markert, E. K., Levine, A. J., Feng, Z., Agostini, M., Zolla, L., Agrò, A. F., Notterman, D. A., Melino, G., Peschiaroli, A. (2013). p63 regulates glutaminase 2 expression. *Cell Cycle*, 12(9), 1395–1405.
- Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., Deng, C., Varusai, T., Ragueneau, E., Haider, Y., May, B., Shamovsky, V., Weiser, J., Brunson, T., Sanati, N., Beckman, L., Shao, X., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Murillo, J., Viteri, G., Cook, J., Shorser, S., Bader, G., Demir, E., Sander, C., Haw, R., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., D'Eustachio, P. (2022). The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D687–D692.
- Godfrey, S., Kuhlenschmidt, T., Curthoys, P. (1977). Correlation between activation and dimer formation of rat renal phosphate-dependent glutaminase. *Journal of Biological Chemistry*, 252(6), 1927–1931.
- Gómez-Fabre, P.M., Aledo, J.C., Del Castillo-Olivares, A., Alonso, F.J., Núñez De Castro, I., Campos, J.A., Márquez, J. (2000). Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochemical Journal*, 345(Pt 2), 365–375.
- Gross, M.I., Demo, S.D., Dennison, J.B., Chen, L., Chernov-Rogan, T., Goyal, B., Janes, J.R., Laidig, G. J., Lewis, E.R., Li, J., Mackinnon, A.L., Parlatti, F., Rodriguez, M.L., Shwonek, P.J., Sjogren, E.B., Stanton, T.F., Wang, T., Yang, J., Zhao, F., Bennett, M.K. (2014). Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(4), 890–901.

Bibliografía

- Guillén Pérez, Y. (2021). Relación entre la vía de transducción de señales ERK5 y la vía glutaminolítica en cáncer. *Tesis Doctoral*. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer CSIC, Universidad de Salamanca.
- Guo, C., Liu, S., Wang, J., Sun, M. Z., Greenaway, F. T. (2013). ACTB in cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 417, 39–44.
- Gupta, V, Iqbal, M. A., Kumar, B., Bamezai, R.N.K. (2015). Pyruvate kinase M2: a metabolic tuner, in *Tumor Cell Metabolism: Patways, Regulation and Biology* (Mazurek, S. & Shoshan, M., Eds.), pp. 123–142, Springer-Verlag (Viena).
- Han, T., Zhan, W., Gan, M., Liu, F., Yu, B., Chin, Y.E., Wang, J.B. (2018). Phosphorylation of glutaminase by PKCε is essential for its enzymatic activity and critically contributes to tumorigenesis. *Cell Research*, 28(6), 655–669.
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Heini, H.G., Gebhardt, R., Brecht, A., Mecke, D. (1987). Purification and characterization of rat liver glutaminase. *European Journal of Biochemistry*, 162(3), 541–546.
- Hernández Borrero, L.J., El-Deiry, W.S. (2021). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1876(1), 188556.
- Herranz, D., Ambesi-Impiombato, A., Sudderth, J., Sánchez-Martín, M., Belver, L., Tosello, V., Xu, L., Wendorff, A.A., Castillo, M., Haydu, J.E., Márquez, J., Matés, J.M., Kung, A.L., Rayport, S., Cordon-Cardo, C., DeBerardinis, R.J., Ferrando, A.A. (2015). Metabolic reprogramming induces resistance to anti-NOTCH1 therapies in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Medicine*, 21(10), 1182–1189.

- Holcomb, T., Taylor, L., Trohkimoinen, J., Curthoys, N.P. (2000). Isolation, characterization and expression of a human brain mitochondrial glutaminase cDNA. *Molecular Brain Research*, 76, 56–63.
- Holmberg Olausson, K., Elsir, T., Moazemi Goudarzi, K., Nistér, M., & Lindström, M. S. (2015). NPM1 histone chaperone is upregulated in glioblastoma to promote cell survival and maintain nucleolar shape. *Scientific reports*, 5, 16495.
- Hoxhaj, G., Manning, B.D. (2020). The PI3KAKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 74–88.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7455–7460.
- Huang, Q., Stalneck, C., Zhang, C., McDermott, L.A., Iyer, P., O'Neill, J., Reimer, S., Cerione, R.A., Katt, W.P. (2018). Characterization of the interactions of potent allosteric inhibitors with glutaminase C, a key enzyme in cancer cell glutamine metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 293(10), 3535–3545.
- Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., Diserens, A.C., Van Meir, E.G. (1999). Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathology*, 9(3), 469–479.
- Jia, L., Song, H., Fan, W., Song, Y., Wang, G., Li, X., He, Y., Yao, A. (2020). The association between high mobility group box 1 chromatin protein and mitotic chromosomes in glioma cells. *Oncology Letters*, 19(1), 745–752.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., Tanabe, M. (2021). KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D545–D551.
- Katt, W.P., Lukey, M.J., Cerione, R.A. (2017). A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Medicinal Chemistry*, 9(2), 223–243.

Bibliografía

- Katt, W.P., Ramachandran, S., Erickson, J.W., Cerione, R.A. (2012). Dibenzophenanthridines as inhibitors of glutaminase C and cancer cell proliferation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(6), 1269–1278.
- Kenny, J., Bao, Y., Hamm, B., Taylor, L., Toth, A., Wagers, B., Curthoys, N.P. (2003). Bacterial expression, purification, and characterization of rat kidney-type mitochondrial glutaminase. *Protein Expression and Purification*, 31(1), 140–148.
- Kisner, D.L., Catane, R., Muggia, F.M. (1980). The rediscovery of DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucine), in *Cancer Chemo- and Immunopharmacology-1. Chemopharmacology* (Mathé, G. & Muggia, F.M., Eds.), pp. 258–263, Springer-Verlag (Berlin).
- Kovacević, Z., Morris, H.P. (1972). The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. *Cancer Research*, 32(2), 326–333.
- Krebs, H.A. (1935). Metabolism of amin-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochemical Journal*, 29(8):1951–1969.
- Kuo, T.C., Chen, C.K., Hua, K.T., Yu, P., Lee, W.J., Chen, M.W., Jeng, Y.M., Chien, M.H., Kuo, K.T., Hsiao, M., Kuo, M.L. (2016). Glutaminase 2 stabilizes Dicer to repress Snail and metastasis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*, 383(2), 282–294.
- Kvamme E., Svenneby, G. (1960). Effect of anaerobiosis and addition of keto acids on glutamine utilization by Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 42, 187–188.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C. J., Slusher, B.S., Zhang, H., Zimmerman, L.J., Liebler, D.C., Slebos, R.J., Lorkiewicz, P.K., Higashi, R.M., Fan, T.W., Dang, C.V. (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metabolism*, 15(1), 110–121.

- Lee, Y.Z., Yang, C.W., Chang, H.Y., Hsu, H.Y., Chen, I.S., Chang, H.S., Lee, C.H., Lee, J.C., Kumar, C.R., Qiu, Y.Q., Chao, Y.S., Lee, S.J. (2014). Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget*, 5(15), 6087–6101.
- Leu, W.J., Chang, H.S., Chen, I.S., Guh, J.H., Chan, S.H. (2021). Antileukemic natural product-induced both apoptotic and pyroptotic programmed cell death and differentiation effect. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11239.
- Li, B., He, H., Tao, B. B., Zhao, Z. Y., Hu, G. H., Luo, C., Chen, J. X., Ding, X. H., Sheng, P., Dong, Y., Zhang, L., & Lu, Y. C. (2012). Knockdown of CDK6 enhances glioma sensitivity to chemotherapy. *Oncology reports*, 28(3), 909–914.
- Li, S.Z., Hu, Y.Y., Zhao, J. L., Zang, J., Fei, Z., Han, H., Qin, H.Y. (2020). Downregulation of FHL1 protein in glioma inhibits tumor growth through PI3K/AKT signaling. *Oncology Letters*, 19(6), 3781–3788.
- Li, Y., Erickson, J.W., Stalneck, C.A., Katt, W.P., Huang, Q., Cerione, R.A., Ramachandran, S. (2016). Mechanistic basis of glutaminase activation: a key enzyme that promotes glutamine metabolism in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 20900–20910.
- Liang, Y., Liu, J., Feng, Z. (2013). The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell & Bioscience*, 3(1), 9.
- Liu, J., Li, W., Liu, S., Zheng, X., Shi, L., Zhang, W., & Yang, H. (2017). Knockdown of Collagen Triple Helix Repeat Containing 1 (CTHRC1) Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cellular Migration in Glioblastoma Cells. *Oncology research*, 25(2), 225–232.
- Liu, J., Zhang, C., Lin, M., Zhu, W., Liang, Y., Hong, X., Zhao, Y., Young, K. H., Hu, W., Feng, Z. (2014). Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 5(9), 2635–2647.

Bibliografía

- Lobo, C., Ruiz-Bellido, M.A., Aledo, J.C., Márquez, J., Núñez de Castro, I., Alonso, F.J. (2000). Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. *Biochemical Journal*, 348, 257–261
- López de la Oliva, A.R., Campos-Sandoval, J.A., Gómez-García, M.C., Cardona, C., Martín-Rufián, M., Sialana, F.J., Castilla, L., Bae, N., Lobo, C., Peñalver, A., García-Frutos, M., Carro, D., Enrique, V., Paz, J.C., Mirmira, R.G., Gutiérrez, A., Alonso, F.J., Segura, J.A., Matés, J.M., Lubec, G., Márquez, J. (2020). Nuclear translocation of glutaminase GLS2 in human cancer cells associates with proliferation arrest and differentiation. *Scientific Reports*, 10(1), 2259.
- Lukey, M.J., Cluntun, A.A., Katt, W.P., Lin, M.J., Druso, J.E., Ramachandran, S., Erickson, J.W., Le, H.H., Wang, Z.E., Blank, B., Greene, K.S., Cerione, R.A. (2019). Liver-type glutaminase GLS2 is a druggable metabolic node in luminal-subtype breast cancer. *Cell Reports*, 29(1), 76–88.e7.
- Lukey, M.J., Greene, K.S., Erickson, J.W., Wilson, K.F., Cerione, R.A. (2016). The oncogenic transcription factor cJun regulates glutaminase expression and sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy. *Nature Communications*, 7, 11321.
- Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 441–464.
- Lussey-Lepoutre, C., Hollinshead, K.E.R., Ludwig, C., Menara, M., Morin, A., Castro-Vega, L.-J., Parker, S.J., Janin, M., Martinelli, C., Ottolenghi, C., Metallo, C., Gimenez-Roqueplo, A.P., Favier, J., Tennant, D.A. (2015). Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism. *Nature Communications*, 6, 8784.
- Ma, X., Wang, L., Huang, D., Li, Y., Yang, D., Li, T., Li, F., Sun, L., Wei, H., He, K., Yu, F., Zhao, D., Hu, L., Xing, S., Liu, Z., Li, K., Guo, J., Yang, Z., Pan, X., Li, A., Shi, Y., Wang, Y., Gao, P., Zhang, H. (2017). Polo-like kinase 1 coordinates biosynthesis during cell cycle progression by directly activating pentose phosphate pathway. *Nature Communications*, 8(1), 1506.

- Magill, G.B., Myers, W.P., Reilly, H.C., Putnam, R.C., Magill, J.W., Sykes, M.P., Escher, G.C., Karnofsky, D.A., Burchenal, J.H. (1957). Pharmacological and initial therapeutic observations on 6-diazo-5-oxo-1-norleucine (DON) in human neoplastic disease. *Cancer*, *10*(6), 1138–1150.
- Majewska, E., Márquez, J., Albrecht, J., Szeliga, M. (2019). Transfection with GLS2 glutaminase (GAB) sensitizes human glioblastoma cell lines to oxidative stress by a common mechanism involving suppression of the PI3K/AKT pathway. *Cancers*, *11*(1), 115.
- Mariaule, V., Dupeux, F., Márquez, J.A. (2014). Estimation of crystallization likelihood through a fluorimetric thermal stability assay, in *Structural Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol. 1091 (Chen, Y., Ed.), pp. 189–195, Humana Press (Totowa, NJ).
- Márquez, J., Matés, J.M., Alonso, F.J., Martín-Rufián, M., Lobo, C., Campos-Sandoval, J.A. (2015). Canceromics studies unravel tumor's glutamine addiction after metabolic reprogramming, in *Tumor Cell Metabolism: Pathways, Regulation and Biology* (Mazurek, S. & Shoshan, M., Eds.), pp. 257–286, Springer-Verlag (Viena).
- Márquez, J., Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A. (2016). Glutaminases, in *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle, Advances in Neurobiology*, *13* (Schousboe, A. & Sonnewald, U., Eds.), pp. 133–171, Springer.
- Márquez, J., Tosina, M., de la Rosa, V., Segura, J.A., Alonso, F.J., Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A. (2009). New insights into brain glutaminases: beyond their role on glutamatergic transmission. *Neurochemistry International*, *55*(1–3), 64–70.
- Márquez, J.A., Cipriani, F. (2014). CrystalDirect™: a novel approach for automated crystal harvesting based on photoablation of thin films. *Methods in Molecular Biology*, *1091*, 197–203.
- Martin, S., Cosset, E. C., Terrand, J., Maglott, A., Takeda, K., & Dontenwill, M. (2009). Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of alpha(5)beta(1) integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an alpha(5)beta(1) integrin antagonist. *Biochimica et biophysica acta*, *1793*(2), 354–367.

Bibliografía

- Martínez-Reyes, I., Diebold, L.P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C.T., Mehta, M.M., Wang, T., Santos, J.H., Woychik, R., Dufour, E., Spelbrink, J.N., Weinberg, S.E., Zhao, Y., DeBerardinis, R.J., Chandel, N.S. (2016). TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. *Molecular Cell*, 61, 199–209.
- Martín-Rufián, M., Nascimento-Gomes, R., Higuero, A., Crisma, AR., Campos-Sandoval, J.A., Gómez-García, M.C., Cardona, C., Cheng, T., Lobo, C., Segura, J.A., Alonso, F.J., Szeliga, M., Albrecht, J., Curi, R., Márquez, J., Colquhoun, A., DeBerardinis, R.J., Matés, J.M. (2014). Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *Journal of Molecular Medicine*, 92(3), 277–290.
- Martín-Rufián, M., Segura, J.A., Lobo, C., Matés, J.M., Márquez, J., Alonso, F.J. (2006). Identification of genes downregulated in tumor cells expressing antisense glutaminase mRNA by differential display. *Cancer Biology & Therapy*, 5(1), 54–58.
- Martín-Rufián, M., Tosina, M., Campos-Sandoval, J.A., Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J.A., Alonso, F.J., Matés, J.M., Márquez, J. (2012). Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PloS One*, 7(6), e38380.
- Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A., de Los Santos-Jiménez, J., Márquez, J. (2020). Glutaminases regulate glutathione and oxidative stress in cancer. *Archives of Toxicology*, 94(8), 2603–2623.
- Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A., de Los Santos-Jiménez, J.L., Márquez, J. (2019). Dysregulation of glutaminase and glutamine synthetase in cancer. *Cancer Letters*, 467, 29-39.
- Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A., Márquez, J. (2018). Glutaminase isoenzymes in the metabolic therapy of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1870(2), 158–164.

- Matés, J.M., Di Paola, F.J., Campos-Sandoval, J.A., Mazurek, S., Márquez, J. (2020). Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 98, 34–43.
- Matés, J.M., Segura, J.A., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Alonso, F.J., Márquez, J. (2013). Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. *Current Molecular Medicine*, 13(4), 514–534.
- Matre, P., Velez, J., Jacamo, R., Qi, Y., Su, X., Cai, T., Chan, S. M., Lodi, A., Sweeney, S. R., Ma, H., Davis, R. E., Baran, N., Haferlach, T., Su, X., Flores, E.R., Gonzalez, D., Konoplev, S., Samudio, I., DiNardo, C., Majeti, R., Schimmer, A.D., Li, W., Wang, T., Tiziani, S, Konopleva, M. (2016). Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget*, 7(48), 79722–79735.
- Mattila, E., Pellinen, T., Nevo, J., Vuoriluoto, K., Arjonen, A., Ivaska, J. (2005). Negative regulation of EGFR signalling through integrin- α 1 β 1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nature Cell Biology*, 7(1), 78–85.
- Mazurek, S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(7):969–980.
- McDermott, L.A., Iyer, P., Verneti, L., Rimer, S., Sun, J., Bobby, M., Yang, T., Fioravanti, M., O'Neill, J., Wang, L., Drakes, D., Katt, W., Huang, Q., Cerione, R. (2016). Design and evaluation of novel glutaminase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(8), 1819–1839.
- McGivan, J.D., Bradford, N.M., Verhoeven, A.J., Meijer, A.J. (1984). Liver glutaminase, in *Glutamine metabolism in mammalian tissues* (Häussinger, D. & Sies, H., Eds.), pp. 122–137, Springer–Verlag (Berlin).
- McPherson A, Gavira JA. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 70(Pt 1), 2–20.

Bibliografía

- Menon, S.S., Guruvayoorappan, C., Sakthivel, K.M., Rasmi, R.R. (2019). Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica Chimica Acta*, 491, 39–45.
- Mlecnik, B., Galon, J., & Bindea, G. (2018). Comprehensive functional analysis of large lists of genes and proteins. *Journal of Proteomics*, 171, 2–10.
- Momcilovic, M., Bailey, S.T., Lee, J.T., Fishbein, M.C., Braas, D., Go, J., Graeber, T. G., Parlati, F., Demo, S., Li, R., Walser, T.C., Gricowski, M., Shuman, R., Ibarra, J., Fridman, D., Phelps, M.E., Badran, K., St John, M., Bernthal, N.M., Federman, N., Yanagawa, J., Dubinett, S.M., Sadeghi, S., Christofk, H.R., Shackelford, D.B. (2018). The GSK3 signaling axis regulates adaptive glutamine metabolism in lung squamous cell carcinoma. *Cancer Cell*, 33(5), 905–921.e5.
- Momeny, M., Moghaddaskho, F., Gortany, N.K., Yousefi, H., Sabourinejad, Z., Zarrinrad, G., Mirshahvaladi, S., Eyvani, H., Barghi, F., Ahmadiania, L., Ghazi-Khansari, M., Dehpour, A.R., Amanpour, S., Tavangar, S.M., Dardaei, L., Emami, A.H., Alimoghaddam, K., Ghavamzadeh, A., Ghaffari, S.H. (2017). Blockade of vascular endothelial growth factor receptors by tivozanib has potential anti-tumour effects on human glioblastoma cells. *Scientific Reports*, 7, 44075.
- Morehouse, R.F., Curthoys, N.P. (1981). Properties of rat renal phosphatedependent glutaminase coupled to Sepharose. Evidence that dimerization is essential for activation. *Biochemical Journal*, 193(3), 709–716.
- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.-H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., DeBerardinis, R.J. (2012). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*, 481, 385–388.
- Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., Ohara, O. (1998). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Research*, 5, 355–364.

- Nguyen, T.T., Ramachandran, S., Hill, M.J., Cerione, R.A. (2022). High-resolution structures of mitochondrial glutaminase C tetramers indicate conformational changes upon phosphate binding. *Journal of Biological Chemistry*, 298(2), 101564.
- Nishiki, Y., Farb, T.B., Friedrich, J., Bokvist, K., Mirmira, R.G., Maier, B. (2013). Characterization of a novel polyclonal anti-hypusine antibody. *SpringerPlus*, 2, 421.
- Olalla, L., Aledo, J.C., Bannenberg, G., Márquez, J. (2001). The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Letters*, 488(3), 116–122.
- Olalla, L., Gutiérrez, A., Campos, J.A., Khan, Z.U., Alonso, F.J., Segura, J.A., Márquez, J., Aledo, J.C. (2002). Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38939–38944.
- Ortlund, E., Lacount, M.W., Lewinski, K., Lebioda, L. (2000). Reactions of Pseudomonas 7A glutaminase-asparaginase with diazo analogues of glutamine and asparagine result in unexpected covalent inhibitions and suggests an unusual catalytic triad Thr-Tyr-Glu. *Biochemistry*, 39(6), 1199–1204.
- Pan, D., Gao, J., Zeng, X., Ma, G., Li, N., Huang, X., Du, X., Miao, Q., Lian, J., Xu, L., Zhou, H., & Chen, S. (2017). Quantitative proteomic analysis reveals up-regulation of caveolin-1 in FOXP3-overexpressed human gastric cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 14460.
- Pang, B., Fan, H., Zhang, I.Y., Liu, B., Feng, B., Meng, L., Zhang, R., Sadeghi, S., Guo, H., Pang, Q. (2012). HMGA1 expression in human gliomas and its correlation with tumor proliferation, invasion and angiogenesis. *Journal of Neuro-oncology*, 106(3), 543–549.
- Papa, A., Pandolfi, P.P. (2019). The PTEN-PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules*, 9(4), 153.
- Park M.H. (2006). The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *Journal of Biochemistry*, 139(2), 161–169.

Bibliografía

- Parlati, F., Bromley-Dulfano, S., Demo, S., Janes, J., Gross, M., Lewis, E., MacKinnon, A., Rodriguez, M., Yang, J.F., Zhao, F. Bennett, M. (2013) Antitumor Activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in hematological malignances. *Blood*, 122(21): 4226.
- 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., Ambrosio, A. (2017). The origin and evolution of human glutaminases and their atypical C-terminal ankyrin repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 292(27), 11572–11585.
- Pavlova, N.N., Thompson, C.B. (2016). The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47.
- Pei, S., Wang, X., Wang, X., Huang, H., Tao, H., Xie, B., Yang, A., Qiu, M., Tan, Z. (2022). Aberrant nuclear lamina contributes to the malignancy of human gliomas. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(2), 132–144.
- Perez, S.M., Brinton, L.T., Kelly, K.A. (2021). Plectin in Cancer: From Biomarker to Therapeutic Target. *Cells*, 10(9), 2246.
- Pérez-Gómez, C., Campos-Sandoval, J.A., Alonso, F.J., Segura, J.A., Manzanares, E., Ruiz-Sánchez, P., González, M.E., Márquez, J., Matés, J.M. (2005). Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochemical Journal*, 386(Pt 3), 535–542.
- Pérez-Gómez, C., Matés, J.M., Gómez-Fabre, P.M., del Castillo-Olivares, A., Alonso, F.J., Márquez, J. (2003). Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene. *Biochemical Journal*, 370(Pt 3), 771–784.
- Pezuk, J.A., Brassesco, M.S., Morales, A.G., de Oliveira, J.C., de Oliveira, H.F., Scrideli, C.A., Tone, L.G. (2013). Inhibition of polo-like kinase 1 induces cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to ionizing radiation. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 28(7), 516–522.
- Pinkus L. M. (1977). Glutamine binding sites. *Methods in Enzymology*, 46, 414–427.

- Porter, L.D., Ibrahim, H., Taylor, L., Curthoys, N.P. (2002). Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiological Genomics*, 9, 157–166
- Prescher, N., Hänsch, S., Knobbe-Thomsen, C. B., Stühler, K., Poschmann, G. (2021). The migration behavior of human glioblastoma cells is influenced by the redox-sensitive human macrophage capping protein CAPG. *Free Radical Biology & Medicine*, 167, 81–93.
- Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E.H., Man, O., Beckmann, J.S., Silman, I., Sussman, J.L. (2005). FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics*, 21(16), 3435–3438.
- Qi, H., Liu, S., Guo, C., Wang, J., Greenaway, F.T., Sun, M.Z. (2015). Role of annexin A6 in cancer. *Oncology Letters*, 10(4), 1947–1952.
- Qie, S., Chu, C., Li, W., Wang, C., Sang, N. (2014). ErbB2 activation upregulates glutaminase 1 expression which promotes breast cancer cell proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(3), 498–509.
- Rais, R., Jančařík, A., Tenora, L., Nedelcovych, M., Alt, J., Englert, J., Rojas, C., Le, A., Elgogary, A., Tan, J., Monincová, L., Pate, K., Adams, R., Ferraris, D., Powell, J., Majer, P., Slusher, B.S. (2016). Discovery of 6-diazo-5-oxo-l-norleucine (DON) prodrugs with enhanced CSF delivery in monkeys: a potential treatment for glioblastoma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(18), 8621–8633.
- Ramachandran, S., Pan, C.Q., Zimmermann, S C., Duvall, B., Tsukamoto, T., Low, B. C., Sivaraman, J. (2016). Structural basis for exploring the allosteric inhibition of human kidney type glutaminase. *Oncotarget*, 7(36), 57943–57954.
- Rath, O., Kozielski, F. (2012). Kinesins and cancer. *Nature reviews-Cancer*, 12(8), 527–539.
- Rathore, M.G., Saumet, A., Rossi, J.F., de Bettignies, C., Tempé, D., Lecellier, C.H., Villalba, M. (2012). The NF- κ B member p65 controls glutamine metabolism

Bibliografía

- through miR-23a. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), 1448–1456.
- Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., Weiss, M.S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(Pt 2), 209–214.
- Robinson, M.M., McBryant, S.J., Tsukamoto, T., Rojas, C., Ferraris, D.V., Hamilton, S.K., Hansen, J.C., 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). *Biochemical Journal*, 406(3), 407–414.
- Rubio, V. (2003). La cristalización de proteínas, en *Estructura de Proteínas* (Gómez-Moreno, C. y Sancho, J. eds.) pp. 233–252. Ed. Ariel Ciencia (Barcelona).
- Saha, S.K., Islam, S.M.R., Abdullah-Al-Wadud, M., Islam, S., Ali, F., Park, K.S. (2019). Multiomics Analysis Reveals that GLS and GLS2 Differentially Modulate the Clinical Outcomes of Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 8(3), 355.
- Scheffler, I. E. (1999). *Mitochondria*. Wiley-Liss (New York).
- Schiliro, C., Firestein, B.L. (2021). Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation. *Cells*, 10(5), 1056.
- Schulte, M.L., Fu, A., Zhao, P., Li, J., Geng, L., Smith, S.T., Kondo, J., Coffey, R.J., Johnson, M.O., Rathmell, J.C., Sharick, J.T., Skala, M.C., Smith, J.A., Berlin, J., Washington, M.K., Nickels, M.L., Manning, H.C. (2018). Pharmacological blockade of ASCT2-dependent glutamine transport leads to antitumor efficacy in preclinical models. *Nature Medicine*, 24(2), 194–202.
- Seltzer, M.J., Bennett, B.D., Joshi, A.D., Gao, P., Thomas, A.G., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Rabinowitz, J. D., Dang, C.V., Riggins, G.J. (2010). Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Research*, 70(22), 8981–8987.

- Shapiro, R.A., Clark, V.M., Curthoys, N.P. (1979). Inactivation of rat renal phosphate-dependent glutaminase with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. Evidence for interaction at the glutamine binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 254(8), 2835–2838.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498–2504.
- Sharma, D., Ravillah, D., Ray, A., Song, Y., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Chauhan, D., Anderson, K.C. (2014) Anti-myeloma activity of a novel glutaminase inhibitor CB-839. *Blood*, 124(21): 3439.
- Shay, J.W., Wright, W.E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 26(5), 867–874.
- Smith, E.M., Watford, M. (1988). Rat hepatic glutaminase: purification and immunochemical characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 260(2), 740–751.
- Smith, E.M., Watford, M. (1990). Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. Sequence similarity to kidney-type glutaminase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10631–10636.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Söderholm, H., Olsson, A., Lavenius, E., Rönstrand, L., Nånberg, E. (2001). Activation of Ras, Raf-1 and protein kinase C in differentiating human neuroblastoma cells after treatment with phorbol ester and NGF. *Cell Signalling*, 13(2), 95–104.
- Souba, W.W. (1993). Glutamine and cancer. *Annals of Surgery*, 218, 715–728.

Bibliografía

- Stalneck, C.A., Erickson, J.W., Cerione, R.A. (2017). Conformational changes in the activation loop of mitochondrial glutaminase C: A direct fluorescence readout that distinguishes the binding of allosteric inhibitors from activators. *Journal of Biological Chemistry*, 292(15), 6095–6107.
- Stalneck, C.A., Ulrich, S.M., Li, Y., Ramachandran, S., McBrayer, M.K., DeBerardinis, R.J., Cerione, R.A., Erickson, J.W. (2015). Mechanism by which a recently discovered allosteric inhibitor blocks glutamine metabolism in transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2), 394–399.
- Stanke, K.M., Wilson, C., Kidambi, S. (2021). High expression of glycolytic genes in clinical glioblastoma patients correlates with lower survival. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 752404.
- Studier F.W. (2014). Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*, in *Structural Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol. 1091 (Chen, Y., Ed.), pp. 17–32, Humana Press (Totowa, NJ).
- Sullivan, L.B., Martinez-Garcia, E., Nguyen, H., Mullen, A.R., Dufour, E., Sudarshan, S., Licht, J.D., DeBerardinis, R.J., & Chandel, N.S. (2013). The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS-dependent signaling. *Molecular Cell*, 51, 236–248.
- Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, E., Nagao, T., Yokote, K., Tatsuno, I., Prives, C. (2010). Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7461–7466.
- Szeliga, M., Bogacińska-Karaś, M., Kuźmicz, K., Rola, R., Albrecht, J. (2016). Downregulation of GLS2 in glioblastoma cells is related to DNA hypermethylation but not to the p53 status. *Molecular Carcinogenesis*, 55(9), 1309–1316.

- Szeliga, M., Obara-Michlewska, M., Matyja, E., Łazarczyk, M., Lobo, C., Hilgier, W., Alonso, F.J., Márquez, J., Albrecht, J. (2009). Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia*, 57(9), 1014–1023.
- Szeliga, M., Sidoryk, M., Matyja, E., Kowalczyk, P., Albrecht, J. (2005). Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neuroscience Letters*, 374(3), 171–3.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user–uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D605–D612.
- Taylor G.L. (2010). Introduction to phasing. *Acta crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 4), 325–338.
- Thangavelu, K., Chong, Q.Y., Low, B.C., Sivaraman, J. (2014). Structural basis for the active site inhibition mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA). *Scientific Reports*, 4, 3827.
- Thangavelu, K., Pan, C.Q., Karlberg, T., Balaji, G., Uttamchandani, M., Suresh, V., Schüler, H., Low, B.C., Sivaraman, J. (2012). Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7705–7710.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455, 1061–1068.
- Thomas, R., Weihua, Z. (2019). Rethink of EGFR in cancer with its kinase independent function on board. *Frontiers in Oncology*, 9, 800.

Bibliografía

- Tu, Y., Xie, P., Du, X., Fan, L., Bao, Z., Sun, G., Zhao, P., Chao, H., Li, C., Zeng, A., Pan, M., Ji, J. (2019). S100A11 functions as novel oncogene in glioblastoma via S100A11/ANXA2/NF- κ B positive feedback loop. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(10), 6907–6918.
- van Roy, F., Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(23), 3756–3788.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
- Vaupel, P., Mayer, A. (2012). Availability, not respiratory capacity governs oxygen consumption of solid tumors. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), 1477–1481.
- Velletri, T., Romeo, F., Tucci, P., Peschiaroli, A., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Niklison-Chirou, M.V., Amelio, I., Knight, R.A., Mak, T.W., Melino, G., Agostini, M. (2013). GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle*, 12(22), 3564–3573.
- Wang, J., Yang, T., Xu, G., Liu, H., Ren, C., Xie, W., Wang, M. (2016). Cyclin-dependent kinase 2 promotes tumor proliferation and induces radio resistance in glioblastoma. *Translational Oncology*, 9(6), 548–556.
- Wang, J.B., Erickson, J.W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K.F., Ambrosio, A.L., Dias, S.M., Dang, C.V., Cerione, R.A. (2010). Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*, 18(3), 207–219.
- Wang, K., Hong, R.L., Lu, J.B., Wang, D.L. (2018). Ste20-like kinase is upregulated in glioma and induces glioma invasion. *Neoplasia*, 65(2), 185–191.
- Wang, L., Zhu, L., Wu, K., Chen, Y., Lee, D.Y., Gucek, M., Sack, M.N. (2020). Mitochondrial general control of amino acid synthesis 5 like 1 regulates glutaminolysis, mammalian target of rapamycin complex 1 activity, and murine liver regeneration. *Hepatology*, 71(2), 643–657.

- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 8788–8793.
- Weinhouse, S. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 267–268.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., Thompson, C.B. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18782–18787.
- Xia, W., Spector, S., Hardy, L., Zhao, S., Saluk, A., Alemane, L., Spector, N.L. (2000). Tumor selective G2/M cell cycle arrest and apoptosis of epithelial and hematological malignancies by BBL22, a benzazepine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7494–7499.
- Xiang, L., Mou, J., Shao, B., Wei, Y., Liang, H., Takano, N., Semenza, G.L., Xie, G. (2019). Glutaminase 1 expression in colorectal cancer cells is induced by hypoxia and required for tumor growth, invasion, and metastatic colonization. *Cell Death and Disease*, 10(2), 40.
- Xiang, L., Xie, G., Liu, C., Zhou, J., Chen, J., Yu, S., Li, J., Pang, X., Shi, H., Liang, H. (2013). Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12), 2996–3005.
- Xiao, D., Ren, P., Su, H., Yue, M., Xiu, R., Hu, Y., Liu, H., Qing, G. (2015). Myc promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2. *Oncotarget*, 6(38), 40655–40666.

Bibliografía

- Xu, A., Chen, K.Y. (2001). Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsynaptic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 2555–2561.
- Xu, P., Oosterveer, M.H., Stein, S., Demagny, H., Ryu, D., Moullan, N., Wang, X., Can, E., Zamboni, N., Comment, A., Auwerx, J., Schoonjans, K. (2016). LRH-1 dependent programming of mitochondrial glutamine processing drives liver cancer. *Genes and Development*, 30(11), 1255–1260.
- Xu, X., Wang, J., Wang, M., Yuan, X., Li, L., Zhang, C., Huang, H., Jing, T., Wang, C., Tong, C., Zhou, L., Meng, Y., Xu, P., Kou, J., Qiu, Z., Li, Z., Bian, J. (2021). Structure-enabled discovery of novel macrocyclic inhibitors targeting glutaminase 1 allosteric binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(8), 4588–4611.
- Yang, W.H., Qiu, Y., Stamatatos, O., Janowitz, T., Lukey, M.J. (2021). Enhancing the Efficacy of Glutamine Metabolism Inhibitors in Cancer Therapy. *Trends in Cancer*, 7(8), 790–804.
- Ye, H., Huang, H., Cao, F., Chen, M., Zheng, X., & Zhan, R. (2016). HSPB1 Enhances SIRT2-Mediated G6PD Activation and Promotes Glioma Cell Proliferation. *PLoS one*, 11(10), e0164285.
- Yoo, H., Antoniewicz, M.R., Stephanopoulos, G., Kelleher, J.K. (2008). Quantifying reductive carboxylation flux of glutamine to lipid in a brown adipocyte cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 20621–20627.
- Yu, J.M., Jun, E.S., Jung, J.S., Suh, S.Y., Han, J.Y., Kim, J.Y., Kim, K.W., Jung, J.S. (2007). Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells. *Cancer Letters*, 257(2), 172–181.
- Yuan, T.L., Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510.
- Yun, D.P., Wang, Y.Q., Meng, D.L., Ji, Y.Y., Chen, J.X., Chen, H.Y., Lu, D.R. (2018). Actin-capping protein CapG is associated with prognosis, proliferation and metastasis in human glioma. *Oncology Reports*, 39(3), 1011–1022.

- Yuneva, M.O., Fan, T.W., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., Chen, X., Bishop, J.M. (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metabolism*, 15(2), 157–170.
- Zerrouqi, A., Pyrzynska, B., Febbraio, M., Brat, D.J., Van Meir, E.G. (2012). P14ARF inhibits human glioblastoma-induced angiogenesis by upregulating the expression of TIMP3. *Journal of Clinical Investigations*, 122(4), 1283–1295.
- Zhang, J., Liu, C., Hou, R. (2014). Knockdown of HMGB1 improves apoptosis and suppresses proliferation and invasion of glioma cells. *Chinese Journal of Cancer Research*, 26(6), 658–668.
- Zhang, J., Wang, C., Chen, M., Cao, J., Zhong, Y., Chen, L., Shen, H.M., Xia, D. (2013). Epigenetic silencing of glutaminase 2 in human liver and colon cancers. *BMC Cancer*, 13, 601.
- Zhang, T., Cui, Y., Wu, Y., Meng, J., Han, L., Zhang, J., Zhang, C., Yang, C., Chen, L., Bai, X., Zhang, K., Wu, K., Sack, M.N., Wang, L., Zhu, L. (2022). Mitochondrial GCN5L1 regulates glutaminase acetylation and hepatocellular carcinoma. *Clinical and Translational Medicine*, 12(5), e852.
- Zheng, Y. Z., & Liang, L. (2018). High expression of PXDN is associated with poor prognosis and promotes proliferation, invasion as well as migration in ovarian cancer. *Annals of diagnostic pathology*, 34, 161–165.
- Zu, X.L., Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 459–465.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1) Soluciones para SDS-PAGE e inmunotransferencias western**Solución de acrilamida-bisacrilamida (Bio-Rad)**

Acrilamida	29 % (p/v)
Bisacrilamida	1 % (p/v)

Gel separador

Acrilamida-bisacrilamida (30 %)	10-15 % (p/v)
Tris-HCl pH 8.8	375 mM
Persulfato amónico	0.1 % (v/v)
SDS	0.1 % (p/v)
TEMED	0.05 % (v/v)

Gel concentrador

Acrilamida-bisacrilamida (30%)	5 % (p/v)
Tris-HCl pH 6.8	130 mM
Persulfato amónico	0.1 % (v/v)
SDS	0.1 % (p/v)
TEMED	0.05 % (v/v)

Tampón de carga de proteínas 6x

Glicerol	36 % (v/v)
Azul de bromofenol	0.012 % (p/v)
β -mercaptoetanol	5 % (v/v)
SDS	10 % (p/v)
Tris-HCl pH 6.8	350 mM

Tampón electrolito 1x

Glicina	192 mM
Tris (base)	25 mM
SDS	0.1 % (p/v)

Solución desteñidora

Ácido acético	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)

Anexo I

Tampón de electrotransferencia

Glicina	192 mM
Tris (base)	25 mM
Metanol	20 % (v/v)

TBS 1x

NaCl	150 mM
Tris (base)	20 mM

El pH se ajustó a 7.5.

TTBS 1x

TBS	1x
Tween 20	0.1 % (v/v)

Rojo Ponceau

Rojo Ponceau S	0.5 % (p/v)
Ácido acético	1 % (v/v)

2) Soluciones para electroforesis de DNA

Tampón TAE 1x

Tris-HCl pH 7.2	40 mM
Acetato sódico	20 mM
EDTA	1 mM

Tampón de carga de DNA 6x

Sacarosa	25 % (p/v)
Azul de bromofenol	0.25 % (p/v)
Xileno cianol	0.25 % (p/v)

3) Medios de cultivo para bacterias

Medio LB (Luria-Bertani)

Extracto de levadura	0.5 % (p/v)
Bactotriptona	1 % (p/v)
NaCl	170 mM

El pH se ajustó a 7.4. A continuación, se esterilizó en autoclave.

Medio 2xYT

Extracto de levadura	1 % (p/v)
Bactotripton	1.6 % (p/v)
NaCl	85 mM

Se esterilizó en autoclave.

Medio ZYP-5052 para autoinducción

Se prepararon las siguientes soluciones stock:

ZY	Triptona	1 % (p/v)
	Extracto de levadura	0.5 % (p/v)
NPS 20x	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 M
	KH ₂ PO ₄	1 M
	Na ₂ HPO ₄	1 M
5052 50x	Glicerol	25 % (v/v)
	Glucosa	2.5 % (p/v)
	Lactosa	10 % (p/v)

MgSO₄ 1 M

Para preparar el medio ZYP-5052, se tuvo la precaución de añadir el MgSO₄ antes de la solución NPS 20x, para evitar la precipitación. Para preparar 1 L de medio:

ZY	928 mL
MgSO ₄ 1 M	1 mL
5052 50x	20 mL
NPS 20x	50 mL

El medio se esterilizó en autoclave excepto la solución 5052 50x, que se esterilizó utilizando un filtro de 0.45 µm.

Medio ZYM-5052 para autoinducción metálica

Se prepararon las siguientes soluciones stock:

ZY	Triptona	1 % (p/v)
----	----------	-----------

Anexo I

	Extracto de levadura	0.2 % (p/v)
M 50x	Na ₂ SO ₄	0.25 M
	KH ₂ PO ₄	1.25 M
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.25 M
	NH ₄ Cl	2.5 M
5052 50x	Glicerol	25 % (v/v)
	Glucosa	2.5 % (p/v)
	Lactosa	10 % (p/v)
MgSO ₄ 1 M		
Trazas de metales 1000x	NaCl	40 mM
	FeCl ₂ ·4H ₂ O	25 mM
	CaCl ₂ ·H ₂ O	1.25 mM
	H ₃ BO ₃	1 mM
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.075 mM
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.023 mM
	ZnCl ₂	2.5 mM
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.5 mM
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.2 mM

Las soluciones stock se esterilizaron en autoclave, excepto la solución 5052 50x, que se esterilizó utilizando un filtro de 0.45 µm. Para preparar el medio de autoinducción metálica, se añadieron los siguientes volúmenes de las soluciones stock:

ZY	380 mL
M 50x	8 mL
5052 50x	8 mL
MgSO ₄ 1 M	800 µL
Trazas de metales 1000x	800 µL
Kanamicina (50 mg/mL)	400 µL

Placas LB-agar

Extracto de levadura	0.25 % (p/v)
Bactotripton	0.5 % (p/v)
NaCl	85 mM
Agar	0.75 % (p/v)

El pH se ajustó a 7.4 y el volumen se enrasó a 500 ml. Se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar hasta aproximadamente 50 °C. Rápidamente se añadió el antibiótico correspondiente a una concentración final de 100 µg/mL, en el caso de ampicilina, y 50 µg/mL, en el caso de kanamicina, partiendo de soluciones stock 1000x.

Placas LB-agar con Kan/Tet/Gent/IPTG/Bluo-Gal

Medio LB-agar al que se le añadió el volumen necesario de los siguientes stocks, para conseguir la concentración final indicada:

Kanamicina (50 mg/mL)	50 µg/mL
Tetraciclina (10 mg/mL)	10 µg/mL
Gentamicina (10 mg/mL)	10 µg/mL
IPTG 1M	1 mM
Bluo-Gal (100 mg/mL)	200 µg/mL

4) Soluciones para protocolos de purificación**Tampón de lisis para IMAC (GLS2 expresada en *E. coli*)**

K ₂ HPO ₄ pH 7.5	10 mM
Tris-HCl pH 8	10 mM
KCl	300 mM
Imidazol	10 mM
Glicerol	10 % (v/v)
DTT	2 mM

Se preparó en agua desionizada. Se añadieron inhibidores de proteasas justo antes de su uso.

Tampón de lavado 1 (L1) y 2 (L2) para IMAC (GLS2 expresada en *E. coli*)

Se empleó tampón de lisis aumentando la concentración de imidazol a 75 mM para L1 y 100 mM para L2.

Anexo I

Tampón de elución para IMAC (GLS2 expresada en *E. coli*)

Na ₂ HPO ₄ pH 7.5	50 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	450 mM
Glicerol	10 % (v/v)
DTT	2 mM

Se preparó en agua desionizada. Se añadieron inhibidores de proteasas justo antes de su uso.

Tampón de lisis para IMAC (GLS2 expresada en células de insecto Sf21)

K ₂ HPO ₄ pH 7.5	20 mM
HEPES pH 7.5	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	20 mM
Glicerol	5 % (v/v)
TCEP	5 mM

Se preparó en agua desionizada. Se añadieron inhibidores de proteasas justo antes de su uso.

Tampón de elución para IMAC (GLS2 expresada en células de insecto Sf21)

K ₂ HPO ₄ pH 7.5	20 mM
HEPES pH 7.5	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
Glicerol	5 % (v/v)
TCEP	5 mM

Se preparó en agua desionizada.

Tampón para cromatografía de exclusión molecular (SEC)

K ₂ HPO ₄ pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Glicerol	5 % (v/v)
TCEP	5 mM

Para las muestras destinadas a ensayos de cristalización, se omitió el K₂HPO₄.

Tampón de lisis para células de insecto Sf9

K ₂ HPO ₄ pH 7.5	20 mM
HEPES pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	0.5 mM
Glicerol	5 % (v/v)
TCEP	5 mM

Se preparó en agua desionizada.

Tampón A para purificación de GIP

Na ₂ HPO ₄	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	20 mM

El pH se ajustó a 7.4.

PBS 1x

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.6 mM
KCl	6.2 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	9.3 mM
NaCl	150 mM

El pH se ajustó a 7.4. Se esterilizó en autoclave.

Tampón BLI

K ₂ HPO ₄	20 mM
HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
Glicerol	5 % (v/v)
TCEP	5 mM
RSA	0,05 % (p/v)
Tritón X-100	0.01 % (v/v)

Anexo II

Tabla suplementaria 1. Listado de proteínas diferencialmente reprimidas en la línea LN229-GLS2, tras el análisis proteómico. Como control se empleó la línea transfectada con el plásmido vacío, LN229-pcDNA3. Se indican el código de acceso de cada proteína a la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>), el nombre del gen correspondiente, la descripción de la proteína, ratio de abundancia y el p-valor de la ratio.

UniProt	Símbolo del gen	Descripción	Ratio Abundancia: (GLS2) / (pcDNA3)	Ratio Abundancia P-Value: (GLS2) / (pcDNA3)
P01023	A2M	alpha-2-macroglobulin	0,498	1,56E-06
Q9NRG9-1	AAAS	Aladin	0,494	3,38E-06
Q9H845	ACAD9	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	0,599	4,29E-04
P24752	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	0,128	4,19E-04
Q13443	ADAM9	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	0,394	2,44E-05
P35611-1	ADD1	Alpha-adducin	0,515	2,14E-06
Q9UEY8-1	ADD3	Gamma-adducin	0,125	7,46E-03
Q9H2P0	ADNP	Activity-dependent neuroprotector homeobox protein	0,524	1,57E-04
Q09666-1	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	0,55	8,54E-10
Q8IVF2-1	AHNAK2	Protein AHNAK2	0,416	3,91E-03
P02765	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	0,408	1,48E-04
Q02952-1	AKAP12	A-kinase anchor protein 12	0,478	9,46E-06
Q13740-1	ALCAM	CD166 antigen	0,586	1,24E-04
P27216-1	ANXA13	Annexin A13	0,541	1,25E-03
P08133-1	ANXA6	annexin A6	0,569	4,91E-06
Q9UKG1	APPL1	DCC-interacting protein 13-alpha	0,517	2,97E-03
Q8NEU8-1	APPL2	DCC-interacting protein 13-beta	0,549	1,14E-02
P61204	ARF3	ADP-ribosylation factor 3	0,462	1,42E-05
P84085	ARF5	ADP-ribosylation factor 5	0,51	1,15E-03
Q9Y4X5	ARIH1	E3 ubiquitin-protein ligase ARIH1	0,497	1,26E-02
Q9NVJ2	ARL8B	ADP-ribosylation factor-like protein 8B	0,552	1,35E-03
Q6NXE6-1	ARMC6	Armadillo repeat-containing protein 6	0,457	9,62E-06

Q6PL18-1	ATAD2	ATPase family AAA domain-containing protein 2	0,469	4,23E-08
Q8NHH9	ATL2	Atlastin-2	0,509	1,08E-04
O00244	ATOX1	Copper transport protein ATOX1	0,562	5,02E-04
P05026	ATP1B1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	0,354	1,36E-06
P46100	ATRX	transcriptional regulator ATRX	0,574	5,17E-03
Q9UIG0	BAZ1B	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	0,536	3,18E-06
P51572	BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	0,39	3,57E-04
Q13867	BLMH	bleomycin hydrolase	0,565	1,24E-03
O60885-1	BRD4	Bromodomain-containing protein 4	0,524	1,50E-02
P0C0L4-1	C4A; C4B	Complement C4-A	0,334	1,71E-03
Q9H7E9-1	C8orf33	UPF0488 protein C8orf33	0,553	2,82E-05
P62158	CALM3; CALM2; CALM1	Calmodulin	0,311	1,13E-07
Q16566	CAMK4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV	0,359	3,37E-05
P40121	CAPG	Macrophage-capping protein	0,037	8,14E-03
Q13938	CAPS	Calcyphosin	0,544	1,35E-06
Q13951-2	CBFB	Isoform 2 of Core-binding factor subunit beta	0,403	3,77E-04
P83916	CBX1	Chromobox protein homolog 1	0,546	6,50E-05
Q8IVM0	CCDC50	Coiled-coil domain-containing protein 50	0,425	2,98E-05
Q5ZPR3	CD276	CD276 antigen	0,568	1,30E-05
P04233-2	CD74	Isoform 2 of HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	0,503	1,82E-06
Q00587-1	CDC42EP1	Cdc42 effector protein 1	0,553	6,09E-03
P24941-1	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	0,368	1,73E-02
Q9NSP4-1	CENPM	Centromere protein M	0,342	1,50E-02
Q14677-1	CLINT1	Clathrin interactor 1	0,433	1,88E-04
Q9UDT6-1	CLIP2	CAP-Gly domain-containing linker protein 2	0,464	1,53E-06
Q96JQ2	CLMN	Calmin	0,407	2,90E-05
P09497-1	CLTB	clathrin light chain B	0,563	1,12E-06
Q8WX92	COBRA1; NELFB	Negative elongation factor B	0,543	7,09E-03
P12110	COL6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	0,53	2,59E-05
P21964-1	COMT	Catechol O-methyltransferase	0,487	3,85E-05
Q9UNS2	COPS3	COP9 signalosome complex subunit 3	0,558	1,19E-05
P20674	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	0,585	1,33E-05
P52943	CRIP2	Cysteine-rich protein 2	0,565	2,21E-04

Anexo II

P56545	CTBP2	c-terminal-binding protein 2	0,554	1,04E-06
P49711-1	CTCF	Transcriptional repressor CTCF	0,506	2,82E-03
P39880	CUX1	Homeobox protein cut-like 1	0,506	6,50E-05
O43169	CYB5B	Cytochrome b5 type B	0,282	5,74E-06
P99999	CYCS	cytochrome c	0,379	2,76E-05
Q14118	DAG1	Dystroglycan	0,534	1,54E-04
Q9UJU6-1	DBNL	Drebrin-like protein	0,581	1,33E-02
P61962	DCAF7	DDB1- and CUL4-associated factor 7	0,348	3,95E-04
O00273-1	DFFA	DNA fragmentation factor subunit alpha	0,441	9,66E-06
Q92620	DHX38	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	0,523	5,87E-03
Q12959	DLG1	Disks large homolog 1	0,461	9,55E-03
Q6XZF7	DNMBP	Dynamin-binding protein	0,565	1,09E-03
Q14185	DOCK1	Dedicator of cytokinesis protein 1	0,253	3,28E-03
Q14126	DSG2	Desmoglein-2	0,219	4,99E-07
P15924-1	DSP	Desmoplakin	0,16	2,22E-12
P33316-3	DUT	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	0,526	3,81E-03
P42126	ECI1	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	0,528	4,02E-03
O43854-1	EDIL3	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	0,203	1,01E-05
Q12805	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	0,514	1,08E-03
P20042	EIF2S2	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	0,55	9,26E-07
Q92556-1	ELMO1	Engulfment and cell motility protein 1	0,497	3,47E-03
O43768	ENSA	alpha-endosulfine	0,318	5,10E-03
O43491-1	EPB41L2	band 4.1-like protein 2	0,58	1,79E-06
P29317	EPHA2	Ephrin type-A receptor 2	0,56	1,39E-04
P07099	EPHX1	epoxide hydrolase 1	0,534	7,23E-06
Q8IUD2-1	ERC1	ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1	0,533	1,24E-02
Q969X5	ERGIC1	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	0,583	2,59E-07
Q9Y282-1	ERGIC3	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3	0,583	2,20E-04
O75477	ERLIN1	erlin-1	0,417	3,18E-04
O94905-1	ERLIN2	Erlin-2	0,572	1,01E-02
Q9NPD3	EXOSC4	Exosome complex component Rrp41	0,5	5,39E-04

Q86VR2	FAM134C; RETREG3	Reticulophagy regulator 3	0,452	1,67E-05
Q92520	FAM3C; WNT16	Protein FAM3C	0,437	3,32E-08
Q14320	FAM50A	Protein FAM50A	0,35	1,79E-03
Q52LJ0-2	FAM98B	Isoform 2 of Protein FAM98B	0,522	2,93E-04
Q14517	FAT1	Protocadherin Fat 1	0,257	1,40E-07
P62861	FAU	40S ribosomal protein S30	0,497	1,38E-05
P37268	FDFT1	squalene synthase	0,578	2,65E-02
P14324	FDPS	Farnesyl pyrophosphate synthase	0,545	2,27E-05
Q9Y613	FHOD1	FH1/FH2 domain-containing protein 1	0,591	8,43E-03
Q8NFF5	FLAD1	FAD synthase	0,512	3,42E-03
Q96PY5	FMNL2	Formin-like protein 2	0,383	3,79E-07
Q9C0B1-1	FTO	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO	0,346	4,50E-03
Q96AE4-2	FUBP1	Isoform 2 of Far upstream element-binding protein 1	0,501	2,72E-02
P04066	FUCA1	tissue alpha-L-fucosidase	0,271	2,11E-03
Q92538	GBF1	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1	0,389	9,79E-07
O75223-1	GGCT	gamma-glutamylcyclotransferase	0,574	3,13E-03
P16278	GLB1	Beta-galactosidase	0,559	6,50E-06
O76003	GLRX3	glutaredoxin-3	0,541	1,40E-04
Q13439-1	GOLGA4	Golgin subfamily A member 4	0,499	2,09E-06
P17174	GOT1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	0,476	1,66E-06
P0CG08	GPR89A; GPR89B	Golgi pH regulator B	0,569	4,53E-06
P07203	GPX1	Glutathione peroxidase 1	0,596	5,96E-05
Q92522	H1FX	Histone H1x	0,543	7,81E-04
P69905	HBA2; HBA1	Hemoglobin subunit alpha	0,541	7,65E-04
Q9NRZ9	HELLS	Lymphoid-specific helicase	0,279	2,27E-02
P20036	HLA-DPA1	HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain	0,223	3,46E-07
P09429	HMGB1	High mobility group protein B1	0,593	2,00E-03
P26583	HMGB2	High mobility group protein B2	0,465	2,17E-02
Q8WVV9	HNRNPLL; HNRPLL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	0,447	5,73E-07
Q99714-1	HSD17B10	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	0,592	1,00E-03
P48723	HSPA13	Heat shock 70 kDa protein 13	0,363	8,85E-06
Q92743	HTRA1	Serine protease HTRA1	0,472	5,07E-06
P51553-1	IDH3G	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial	0,458	4,83E-06

Anexo II

A1L0T0	ILVBL	Acetolactate synthase-like protein	0,288	2,00E-04
Q16891-2	IMMT	Isoform 2 of MICOS complex subunit MIC60	0,454	7,95E-05
Q9H1B7	IRF2BPL	interferon regulatory factor 2-binding protein-like	0,483	1,25E-02
P56199	ITGA1	Integrin alpha-1	0,448	1,47E-03
P19823	ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	0,489	6,06E-03
Q63ZY3-1	KANK2	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2	0,593	3,02E-02
Q96CX2	KCTD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	0,469	3,22E-05
Q7LBC6-1	KDM3B	Lysine-specific demethylase 3B	0,586	6,71E-06
Q9P260-1	KIAA1468	LisH domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468	0,533	2,14E-03
A0MZ66	KIAA1598; SHTN1	Shootin-1	0,389	4,70E-03
Q9NS87	KIF15	Kinesin-like protein KIF15	0,485	1,59E-06
O95235	KIF20A	kinesin-like protein KIF20A	0,431	1,29E-05
Q99661-1	KIF2C	Kinesin-like protein KIF2C	0,286	2,59E-04
Q9Y496	KIF3A	kinesin-like protein KIF3A	0,512	3,58E-02
O15066	KIF3B	Kinesin-like protein KIF3B	0,562	3,26E-03
Q9BW19	KIFC1	Kinesin-like protein KIFC1	0,479	1,86E-05
Q86UP2-1	KTN1	Kinectin	0,6	1,38E-06
Q71RC2	LARP4	La-related protein 4	0,484	3,04E-06
Q9Y4W2	LAS1L	Ribosomal biogenesis protein LAS1L	0,516	6,67E-04
P20700	LMNB1	Lamin-B1	0,482	2,45E-07
Q03252	LMNB2	Lamin-B2	0,588	2,05E-04
Q93052	LPP	Lipoma-preferred partner	0,555	9,59E-03
Q32MZ4-4	LRRFIP1	Isoform 4 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	0,402	4,80E-04
P78559-1	MAP1A	Microtubule-associated protein 1A	0,534	6,38E-03
Q9NZL9	MAT2B	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	0,41	6,86E-07
Q9BTE3-1	MCMBP	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	0,334	1,09E-07
P55081	MFAP1	microfibrillar-associated protein 1	0,526	6,85E-05
P46013	MKI67	Proliferation marker protein Ki-67	0,398	2,87E-07
P40692-1	MLH1	DNA mismatch repair protein MLH1	0,583	2,63E-05
Q9UBU8-2	MORF4L1	Isoform 2 of Mortality factor 4-like protein 1	0,382	5,84E-06

Q9NZW5	MPP6	MAGUK p55 subfamily member 6	0,486	7,99E-03
Q9Y3B7-1	MRPL11	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	0,034	2,90E-05
Q9BYD1	MRPL13	39S ribosomal protein L13, mitochondrial	0,588	6,55E-06
Q9HD33-1	MRPL47	39S ribosomal protein L47, mitochondrial	0,47	1,01E-04
P20585	MSH3	DNA mismatch repair protein MSH3	0,541	1,25E-04
P02795	MT2A	metallothionein-2	0,199	2,61E-05
Q9HD67	MYO10	Unconventional myosin-X	0,446	1,68E-02
Q9Y4H1-1	MYO5A	Unconventional myosin-Va	0,548	1,18E-03
Q96RE7	NACCI	Nucleus accumbens-associated protein 1	0,594	2,86E-05
P13591-1	NCAM1	Isoform 2 of Neural cell adhesion molecule 1	0,51	2,80E-04
P42695	NCAPD3	condensin-2 complex subunit D3	0,542	3,81E-08
Q6IBW4-1	NCAPH2	Condensin-2 complex subunit H2	0,545	1,02E-04
Q9NX14-1	NDUFB11	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	0,556	3,64E-04
Q9Y6M9	NDUFB9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	0,552	1,22E-03
O00217	NDUFS8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	0,287	2,41E-06
P56181-2	NDUFV3	Isoform 2 of NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	0,419	1,73E-03
Q13469	NFATC2	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2	0,383	4,24E-06
P08651	NFIC	Nuclear factor 1 C-type	0,327	3,78E-02
P08138	NGFR	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	0,326	4,03E-06
Q8NBF2-1	NHLRC2	NHL repeat-containing protein 2	0,459	1,22E-03
Q9BPW8	NIPSNAP1	Protein NipSnap homolog 1	0,544	2,48E-02
P61916	NPC2	Epididymal secretory protein E1	0,505	1,22E-04
P06748	NPM1	Nucleophosmin	0,478	1,31E-05
P49116-1	NR2C2	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	0,49	6,74E-05
P04150	NR3C1	Glucocorticoid receptor	0,581	1,17E-03

Anexo II

Q9H1E3	NUCKS1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	0,378	4,65E-05
Q9Y266	NUDC	nuclear migration protein nudC	0,595	9,73E-06
Q8WVJ2	NUDCD2	NudC domain-containing protein 2	0,381	1,39E-05
Q9BXS6	NUSAP1	Nucleolar and spindle-associated protein 1	0,324	4,23E-05
P51003	PAPOLA	Poly(A) polymerase alpha	0,375	4,90E-03
Q961Z0	PAWR	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	0,481	3,99E-07
Q08174	PCDH1	Protocadherin-1	0,505	1,81E-05
Q9UN70-1	PCDHGC3	Protocadherin gamma-C3	0,593	8,66E-03
Q5VU43	PDE4DIP; LOC653513	Myomegalin	0,438	4,11E-05
Q15121	PEA15	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	0,572	2,21E-06
Q9UBV8	PEF1	Peflin	0,508	1,51E-04
Q96G03	PGM2	Phosphoglucomutase-2	0,597	1,35E-04
Q13492-1	PICALM	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	0,566	1,42E-04
Q9H490	PIGU	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U protein	0,503	1,90E-07
P48739	PITPNB	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	0,465	2,05E-06
Q6P4A8	PLBD1	Phospholipase B-like 1	0,373	5,96E-03
Q15149-3	PLEC	Isoform 3 of Plectin	0,518	1,30E-06
P53350	PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1	0,427	1,18E-06
O00592	PODXL	Podocalyxin	0,493	1,89E-05
P0CG38	POTEI	POTE ankyrin domain family member 1	0,427	5,31E-05
Q9H2U2	PPA2	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	0,45	5,37E-06
O43447	PPIH	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	0,484	7,30E-06
Q13356	PPIL2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 2	0,305	6,37E-03
Q9BZL4	PPP1R12C	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C	0,425	5,51E-04
Q08209-1	PPP3CA	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	0,499	1,63E-02
P60510	PPP4C	Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit	0,515	1,90E-06
Q9UPN7	PPP6R1	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 1	0,299	1,05E-04

O43663-1	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	0,496	7,08E-03
Q8TCU6-1	PREX1	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	0,517	1,52E-02
P49643-1	PRIM2	DNA primase large subunit	0,47	1,10E-04
P54619-1	PRKAG1	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1	0,569	3,01E-04
Q15008	PSMD6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	0,571	5,57E-06
Q06323-1	PSME1	Proteasome activator complex subunit 1	0,241	1,31E-07
Q9P035	PTPLAD1; HACD3	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	0,563	1,37E-06
P49023	PXN	Paxillin	0,577	1,56E-05
P47897	QARS	glutamine--tRNA ligase	0,588	7,40E-07
Q9Y3P9	RABGAP1	Rab GTPase-activating protein 1	0,563	3,95E-02
P54725-1	RAD23A	UV excision repair protein RAD23 homolog A	0,42	6,68E-06
Q9UJF2	RASAL2	ras GTPase-activating protein nGAP	0,551	1,95E-06
Q5T8P6	RBM26	RNA-binding protein 26	0,444	5,24E-03
P78332	RBM6	RNA-binding protein 6	0,393	5,24E-04
Q9Y5S9	RBM8A; LOC101060541	RNA-binding protein 8A	0,429	7,61E-08
P35241-1	RDX	radixin	0,464	5,41E-03
P40938	RFC3	replication factor C subunit 3	0,537	1,40E-04
P31350-1	RRM2	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	0,595	1,07E-05
P31949	S100A11	protein S100-A11	0,59	3,18E-04
Q9UBE0-1	SAE1	SUMO-activating enzyme subunit 1	0,509	2,73E-05
Q9NR31	SAR1A	GTP-binding protein SAR1a	0,528	1,80E-05
Q9Y6B6	SAR1B	GTP-binding protein SAR1b	0,549	2,60E-03
Q6P3W7	SCYL2	SCY1-like protein 2	0,533	4,42E-05
P31431-1	SDC4	syndecan-4	0,068	4,43E-10
Q9BWM7	SFXN3	Sideroflexin-3	0,58	8,73E-04
Q5TCZ1	SH3PXD2A	SH3 and PX domain-containing protein 2A	0,507	4,48E-05
P29353	SHC1	SHC-transforming protein 1	0,468	1,20E-03
P63208	SKP1	s-phase kinase-associated protein 1	0,589	9,14E-06
Q9H936	SLC25A22	Mitochondrial glutamate carrier 1	0,447	2,21E-05
Q6NUK1	SLC25A24	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	0,432	3,16E-05
P50443	SLC26A2	sulfate transporter	0,381	7,23E-04

Anexo II

P11166	SLC2A1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	0,576	3,72E-06
Q9HBR0	SLC38A10	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10	0,295	2,29E-03
P08195	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	0,577	1,04E-06
Q01650	SLC7A5	large neutral amino acids transporter small subunit 1	0,435	2,48E-07
Q9H2G2-1	SLK	STE20-like serine/threonine-protein kinase	0,427	7,23E-06
P84022	SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3	0,375	9,01E-07
Q99717	SMAD5	mothers against decapentaplegic homolog 5	0,56	1,94E-03
Q92922	SMARCC1	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	0,584	6,47E-04
Q92925-1	SMARCD2	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 2	0,47	3,99E-04
Q969G3	SMARCE1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1	0,588	3,95E-04
Q9UMY4-1	SNX12	Sorting nexin-12	0,578	1,61E-05
Q9UNH7-1	SNX6	Sorting nexin-6	0,545	3,08E-04
Q9Y5X1	SNX9	Sorting nexin-9	0,234	4,68E-02
P35610	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1	0,581	2,92E-04
P00441	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	0,203	6,38E-04
P18583-1	SON	Protein SON	0,586	2,91E-05
Q13501-1	SQSTM1	sequestosome-1	0,567	2,05E-05
Q9HD15	SRA1	Steroid receptor RNA activator 1	0,504	5,61E-04
Q8WVM7	STAG1	Cohesin subunit SA-1	0,342	6,52E-04
Q9BX79-1	STRA6	Stimulated by retinoic acid gene 6 protein homolog	0,135	3,60E-06
Q9UNK0	STX8	Syntaxin-8	0,32	2,41E-02
Q96I99-1	SUCLG2	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	0,427	2,54E-05
O94901-9	SUN1	Isoform 9 of SUN domain-containing protein 1	0,52	8,79E-03
O15260-1	SURF4	surfeit locus protein 4	0,477	5,43E-03
Q92797-1	SYMPK	Symplekin	0,361	1,52E-04
Q8WXH0-1	SYNE2	Nesprin-2	0,335	1,09E-04
Q6ZMZ3	SYNE3	Nesprin-3	0,484	3,80E-02
O43759-1	SYNGR1	Synaptogyrin-1	0,575	5,93E-04
O15056	SYNJ2	Synaptojanin-2	0,345	3,26E-04

Q8N3V7-1	SYNPO	synaptopodin	0,178	9,03E-06
Q9Y6A5	TACC3	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	0,504	1,14E-04
Q4KMP7	TBC1D10B	TBC1 domain family member 10B	0,326	3,30E-03
Q92609-1	TBC1D5	TBC1 domain family member 5	0,451	1,35E-03
Q13428-1	TCOF1	Treacle protein	0,505	7,72E-06
Q9Y4R8	TELO2	telomere length regulation protein TEL2 homolog	0,533	4,14E-03
Q63HR2	TENC1; TNS2	tensin-2	0,515	9,03E-03
Q00059	TFAM	Transcription factor A, mitochondrial	0,562	1,05E-03
P07996	THBS1	thrombospondin-1	0,434	9,81E-05
Q01085	TIAL1	Nucleolysin TIAR	0,6	8,06E-05
Q9BVV7	TIMM21	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM21	0,43	1,63E-05
Q07157	TJP1	Tight junction protein ZO-1	0,511	8,59E-06
P04183	TK1	Thymidine kinase, cytosolic	0,569	6,20E-05
Q8NBN3-1	TMEM87A	Transmembrane protein 87A	0,461	1,44E-02
Q96JJ7-1	TMX3	Protein disulfide-isomerase TMX3	0,595	4,10E-04
Q12888-1	TP53BP1	TP53-binding protein 1	0,595	1,89E-03
P09493-3	TPM1	Isoform 3 of Tropomyosin alpha-1 chain	0,368	6,88E-05
P09493-5	TPM1	Isoform 5 of Tropomyosin alpha-1 chain	0,451	6,34E-04
P67936-2	TPM4	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-4 chain	0,303	3,17E-04
O75962-1	TRIO	Triple functional domain protein	0,349	4,63E-02
Q9BSV6	TSEN34	tRNA-splicing endonuclease subunit sen34	0,412	6,45E-04
P10599-1	TXN	thioredoxin	0,488	2,43E-05
O00762	UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	0,567	2,05E-04
P61086	UBE2K	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	0,411	3,22E-03
Q9NPD8	UBE2T	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T	0,564	1,50E-03
Q05086	UBE3A	Ubiquitin-protein ligase E3A	0,596	6,13E-05
Q96T88	UHRF1	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	0,493	1,60E-04
Q86UV5	USP48	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	0,576	1,35E-03
Q96JH7	VCPIP1	Deubiquitinating protein VCIP135	0,502	4,16E-04
Q969T9	WBP2	WW domain-binding protein 2	0,538	2,60E-02
P61964	WDR5	WD repeat-containing protein 5	0,354	2,91E-07

Anexo II

Q9H967	WDR76	WD repeat-containing protein 76	0,125	6,03E-08
P41221	WNT5A	protein Wnt-5a	0,131	7,01E-07
Q96S55-1	WRNIP1	ATPase WRNIP1	0,471	1,81E-02
Q9GZV5	WWTR1	WW domain-containing transcription regulator protein 1	0,578	2,29E-02
Q9C0E2	XPO4	Exportin-4	0,419	2,35E-02
P25490	YY1	Transcriptional repressor protein YY1	0,462	7,29E-03
Q8IWR0	ZC3H7A	Zinc finger CCCH domain-containing protein 7A	0,585	4,94E-02
O95218-1	ZRANB2	Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	0,586	6,08E-04

Tabla suplementaria 2. Listado de proteínas diferencialmente sobreexpresadas en la línea LN229-GLS2, tras el análisis proteómico. Como control se empleó la línea transfectada con el plásmido vacío, LN229-pcDNA3. Se indican el código de acceso de cada proteína a la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>), el nombre del gen correspondiente, la descripción de la proteína, ratio de abundancia y el p-valor de la ratio.

UniProt	Símbolo del gen	Descripción	Ratio Abundancia: (GLS2) / (pcDNA3)	Ratio Abundancia P-Value: (GLS2) / (pcDNA3)
Q9NP58	ABCB6	ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial	1,549	1,19E-04
P53396-1	ACLY	ATP-citrate synthase	1,526	1,98E-04
P24666-1	ACPI	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	1,719	7,79E-04
Q9NUB1	ACSS1	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial	2,183	9,63E-03
P68133	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle	2,311	5,53E-04
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	1,739	8,39E-04
Q562R1	ACTBL2	Beta-actin-like protein 2	2,251	1,21E-04
O00116	AGPS	Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	1,712	6,58E-04
O94788-1	ALDH1A2	retinal dehydrogenase 2	2,013	1,13E-05
P20073-1	ANXA7	Annexin A7	1,536	4,80E-06
Q8NCW5	APOA1BP	NAD(P)H-hydrate epimerase	2,313	1,76E-04
O15511-1	ARPC5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	1,608	1,48E-05
P04424	ASL	argininosuccinate lyase	2,103	5,49E-05

P08243-1	ASNS	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	1,522	1,26E-06
P31939	ATIC	bifunctional purine biosynthesis protein purH	1,536	4,70E-05
O75787	ATP6AP2	Renin receptor	1,878	7,45E-04
Q9Y5K8	ATP6V1D	V-type proton ATPase subunit D	2,381	5,37E-04
O14981	BTA1	TATA-binding protein-associated factor 172	1,652	9,79E-04
P47756-1	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta	5,157	7,55E-06
Q03135-2	CAV1	Isoform 2 of Caveolin-1	2,615	2,50E-04
Q00534	CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	1,581	9,36E-04
Q96G23	CERS2	Ceramide synthase 2	2,609	2,64E-04
Q9Y6A4	CFAP20	Cilia- and flagella-associated protein 20	1,943	2,07E-02
Q9BT09	CNPY3	Protein canopy homolog 3	1,54	8,44E-03
P78357	CNTNAP1	Contactin-associated protein 1	2,27	6,29E-04
Q14993	COL19A1	Collagen alpha-1(XIX) chain	2,394	4,81E-05
Q9Y5P4-1	COL4A3BP	Collagen type IV alpha-3-binding protein	1,557	1,26E-04
Q99829	CPNE1	Copine-1	1,503	5,66E-03
P23786	CPT2	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	1,709	2,21E-04
Q96CG8	CTHRC1	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	1,761	7,34E-06
P53634-1	CTSC	Dipeptidyl peptidase 1	1,617	1,12E-04
Q6BCY4	CYB5R2	NADH-cytochrome b5 reductase 2	19,303	1,24E-10
O00622	CYR61	Protein CYR61	1,505	3,14E-02
Q8WUX9	CHMP7	Charged multivesicular body protein 7	1,939	1,24E-05
Q9H0S4	DDX47	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	1,602	1,41E-03
Q9BUN8	DERL1	Derlin-1	1,558	1,84E-04
Q15392	DHCR24	Delta(24)-sterol reductase	1,539	3,13E-04
Q8IXB1-1	DNAJC10	DnaJ homolog subfamily C member 10	1,604	1,22E-04
Q9ULA0	DNPEP	Aspartyl aminopeptidase	2,827	1,77E-02
Q9UHL4	DPP7	Dipeptidyl peptidase 2	1,58	1,75E-02
Q9NZN3	EHD3	EH domain-containing protein 3	1,916	5,54E-03
Q14240-1	EIF4A2	eukaryotic initiation factor 4A-II	1,712	1,97E-06
P55010	EIF5	Eukaryotic translation initiation factor 5	1,727	4,69E-05
Q9Y6C2	EMILIN1	EMILIN-1	2,382	2,08E-07
P13929-1	ENO3	Beta-enolase	2,886	1,59E-02
Q96KP1	EXOC2	exocyst complex component 2	1,516	5,98E-03
Q96GK7	FAHD2A	fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2A	2,678	1,13E-05
Q9Y4E1	FAM21C	WASH complex subunit 2C	1,509	1,36E-03
Q8NCA5	FAM98A	protein FAM98A	1,875	1,99E-04
Q13642	FHL1	Four and a half LIM domains protein 1	4,21	1,06E-04

Anexo II

Q96AY3	FKBP10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	3,172	1,18E-06
P10253	GAA	lysosomal alpha-glucosidase	2,206	1,19E-03
Q92616	GCN1L1	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	2,041	1,68E-04
Q06210-1	GFPT1	glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	1,977	2,67E-07
P38435-1	GGCX	vitamin K-dependent gamma- carboxylase	1,826	1,23E-04
Q9UI32	GLS2	Glutaminase liver isoform, mitochondrial	14,768	7,00E-08
P15104	GLUL	Glutamine synthetase	5,918	1,28E-02
Q9HAV0	GNB4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	2,678	1,59E-03
Q9H8Y8-1	GORASP2	Golgi reassembly-stacking protein 2	2,21	1,29E-06
P06744	GPI	glucose-6-phosphate isomerase	1,905	3,34E-05
Q9BQ67	GRWD1	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	1,645	2,90E-04
P29083	GTF2E1	General transcription factor IIE subunit 1	1,566	5,00E-03
Q9Y5Q9	GTF3C3	General transcription factor 3C polypeptide 3	2,147	2,16E-02
Q5T447	HECTD3	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3	2,57	1,08E-05
Q02539	HIST1H1A	Histone H1.1	2,199	4,27E-02
P20671	HIST1H2AD	Histone H2A type 1-D	1,908	6,87E-05
Q7L7L0	HIST3H2A	Histone H2A type 3	2,827	1,40E-06
P52789	HK2	Hexokinase-2	2,628	4,97E-07
P04439	HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain	1,746	5,36E-06
P51659-1	HSD17B4	peroxisomal multifunctional enzyme type 2	1,506	7,02E-06
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	1,646	3,43E-06
O75874	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	2,115	1,39E-07
O15357	INPPL1	Phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate 5-phosphatase 2	1,576	1,63E-04
Q96J02	ITCH	E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog	3,004	3,94E-08
P26012	ITGB8	integrin beta-8	1,513	3,68E-04
Q13572-1	ITPK1	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	1,632	6,89E-05
Q9Y6Y0	IVNS1ABP	influenza virus NS1A-binding protein	1,578	2,77E-03
Q16363	LAMA4	Laminin subunit alpha-4	10,62	1,83E-07
P13473-1	LAMP2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	1,511	9,28E-05
P13796	LCP1	Plastin-2	2,169	4,31E-03
P00338-1	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	1,709	2,19E-05
Q08380	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	1,595	1,24E-04
P58546	LUZP6	Myotrophin	1,607	1,78E-05
Q15334	LLGL1	Lethal(2) giant larvae protein homolog 1	1,525	1,21E-04
P43355	MAGEA1	Melanoma-associated antigen 1	1,675	8,52E-05

O15479	MAGEB2	Melanoma-associated antigen B2	33,824	3,66E-06
P11137	MAP2	microtubule-associated protein 2	3,725	3,27E-04
P43121	MCAM	Cell surface glycoprotein MUC18	1,536	3,25E-03
P50579	METAP2	methionine aminopeptidase 2	1,665	1,16E-03
Q9UBP6	METTL1	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	1,539	3,01E-02
P14174	MIF	Macrophage Migration inhibitory factor	2,222	4,37E-05
Q5TGZ0	MINOS1	MICOS complex subunit Mic10	1,69	6,59E-04
P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase	1,547	1,15E-03
Q9Y2R9	MRPS7	28S ribosomal protein S7, mitochondrial	2,196	1,11E-03
P13995	MTHFD2	Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	1,545	1,96E-05
Q14764	MVP	major vault protein	2,455	6,06E-06
Q969H8	MYDGF	Myeloid-derived growth factor	1,729	2,50E-03
Q7Z406-1	MYH14	myosin-14	1,696	2,43E-03
P14649	MYL6B	Myosin light chain 6B	1,513	3,17E-03
Q9BPX3	NCAPG	Condensin complex subunit 3	1,508	1,13E-04
Q92597	NDRG1	Protein NDRG1	1,721	1,60E-03
O60524	NEMF	nuclear export mediator factor NEMF	1,551	6,29E-06
Q9BYT8	NLN	Neurolysin, mitochondrial	1,589	1,17E-04
Q8WTT2	NOC3L	Nucleolar complex protein 3 homolog	5,578	3,28E-02
O15118	NPC1	Niemann-Pick C1 protein	1,673	1,47E-03
P80303	NUCB2	Nucleobindin-2	1,742	1,11E-02
Q9NZJ9-1	NUDT4	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2	1,791	8,16E-04
Q8NFB5	NUP35	Nucleoporin NUP53	1,901	2,21E-02
P13674-1	P4HA1	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	2,169	4,58E-07
P07237	P4HB	Protein disulfide-isomerase	1,552	5,83E-07
Q13153	PAK1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	1,606	3,78E-03
O43252	PAPSS1	bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	1,754	2,07E-05
Q9UKK3	PARP4	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	1,758	1,37E-07
Q15084-1	PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6	2,247	6,13E-07
Q15118	PDK1	[Pyruvate dehydrogenase (Acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial	3,157	2,36E-06
Q6P996-1	PDXDC1	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	1,542	5,70E-04
P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	1,656	2,82E-05
P00558	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	2,395	5,38E-07
P00558-2	PGK1	Isoform 2 of Phosphoglycerate kinase 1	6,952	1,56E-03
Q16512-1	PKN1	serine/threonine-protein kinase N1	1,663	4,90E-04
Q9Y263	PLAA	Phospholipase A-2-activating protein	1,528	4,61E-03
P00750-1	PLAT	Tissue-type plasminogen activator	1,904	4,76E-06

Anexo II

Q9NQ66-1	PLCB1	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	1,736	1,87E-04
Q8N490-2	PNKD	Isoform 2 of Probable hydrolase PNKD	1,614	4,75E-03
Q9H488-1	POFUT1	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 1	1,584	5,69E-04
P45877	PPIC	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	1,657	1,26E-04
P62140	PPP1CB	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	1,978	8,19E-06
Q96C90	PPP1R14B	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	2,077	3,94E-07
P31321	PRKAR1B	cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit	12,514	2,89E-03
P41743	PRKCI	Protein kinase c iota type	1,573	9,60E-03
Q9UNN8	PROCR	Endothelial protein C receptor	4,894	3,58E-05
Q14558	PRPSAP1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1	1,519	2,14E-04
O60256-1	PRPSAP2	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	1,802	1,67E-02
P25787	PSMA2	Proteasome subunit alpha type-2	1,516	4,31E-04
Q92530	PSMF1	proteasome inhibitor PI31 subunit	1,844	1,02E-04
P78330	PSPH	phosphoserine phosphatase	3,304	1,01E-04
Q15269	PWP2	Periodic tryptophan protein 2 homolog	1,583	6,61E-05
Q92626	PXDN	peroxidasin homolog	2,805	7,11E-07
P11217	PYGM	Glycogen phosphorylase, muscle form	1,57	2,71E-02
P62820	RAB1A	Ras-related protein Rab-1A	1,832	1,69E-04
Q96D15	RCN3	Reticulocalbin-3	1,816	1,35E-06
P49247	RPIA	ribose-5-phosphate isomerase	1,511	3,92E-04
P62899	RPL31	60S ribosomal protein L31	1,51	3,05E-05
P32969	RPL9	60S ribosomal protein L9	1,568	8,76E-03
P62273-1	RPS29	40S ribosomal protein S29	1,503	2,68E-03
P62753	RPS6	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6	1,642	1,06E-07
Q9BY42	RTFDC1	protein RTF2 homolog	1,676	1,84E-04
Q9P0V9	SEPT10	septin-10	1,6	2,60E-04
Q15427	SF3B4	Splicing factor 3b subunit 4	1,797	9,67E-07
Q9Y3B4	SF3B6	Splicing factor 3B subunit 6	2,153	1,00E-02
P31947-1	SFN	14-3-3 protein sigma	2,173	2,94E-03
P43007-1	SLC1A4	neutral amino acid transporter A	1,904	3,67E-05
P35270	SPR	Sepiapterin reductase	2,237	2,05E-02
P43308	SSR2	Translocon-associated protein subunit beta	3,174	1,15E-05
P51571	SSR4	translocon-associated protein subunit delta	1,807	1,00E-03
O95630	STAMBP	STAM-binding protein	1,569	9,66E-04
O43815	STRN	striatin	5,415	4,12E-11
Q9UMZ2-1	SYNRG	Synergin gamma	1,962	6,60E-05
Q9C0D5	TANC1	Protein TANC1	2,236	8,75E-04
O15533-1	TAPBP	Tapasin	2,885	6,52E-05

Q8TC07-1	TBC1D15	TBC1 domain family member 15	1,633	2,76E-03
Q66K14-1	TBC1D9B	TBC1 domain family member 9B	1,689	3,10E-05
P48307	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	1,631	7,69E-04
P35442	THBS2	Thrombospondin-2	1,869	6,43E-04
Q9NQ88	TIGAR	Fructose-2,6-bisphosphatase TIGAR	1,52	1,96E-05
P35625	TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3	4,372	1,36E-13
O75663	TIPRL	TIP41-like protein	1,654	1,01E-03
Q6NUQ4	TMEM214	Transmembrane protein 214	3,226	1,21E-02
P63313	TMSB10	thymosin beta-10	2,17	2,29E-05
Q9Y296	TRAPPC4	Trafficking protein particle complex subunit 4	1,547	1,29E-03
Q14669-1	TRIP12	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	1,53	7,86E-04
Q8WZ42	TTN	Titin	1,97	9,36E-04
P68363	TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	4,667	3,07E-03
Q9BQE3	TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	1,79	1,58E-04
Q9H853	TUBA4B	Putative tubulin-like protein alpha-4B	3,372	4,06E-05
P07437	TUBB	tubulin beta chain	1,649	7,36E-07
Q15819	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	1,531	9,55E-05
P09936	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	1,941	1,78E-04
O60701	UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,93	4,73E-08
Q9NYU2-1	UGGT1	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	1,507	4,73E-07
Q16851	UGP2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	1,837	1,74E-05
O60287	URB1	nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1	1,566	4,75E-06
Q86UV5-5	USP48	Isoform 5 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	1,98	1,36E-02
Q99536	VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	2,037	4,82E-03
P13611-2	VCAN	Isoform V1 of Versican core protein	1,738	1,71E-04
Q86U90	YRDC	YrdC domain-containing protein, mitochondrial	1,846	1,25E-03

Anexo II

Tabla suplementaria 3. Grupos funcionales obtenidos tras el análisis de enriquecimiento funcional realizado con la aplicación ClueGO para proteínas diferencialmente reprimidas, según los criterios establecidos.

Función	Grupos	Nombre de los genes de las proteínas relacionadas
kinesin binding	0	KIF3A KTN1 PRC1 SHTN1
regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	1	GPX1 HMGB2 PEA15 THBS1
membrane protein ectodomain proteolysis	2	ADAM9 DAG1 SNX9
nucleus organization	3	HMGB2 LMNB1 PITPNB PLEC PLK1 SUN1
positive regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	4	CALM1 PLK1 UBE2K WNT5A
Schwann cell development	5	DAG1 ITGB4 LMNB2 PLEC SOD1
myotube cell development	6	GPX1 NFATC2 PLEC PPP3CA
protein-disulfide reductase activity	7	GLRX3 TMX3 TXN
spectrin binding	8	ADD1 EPB41L2 KIF3A MYO10
platelet alpha granule	9	A2M AHSG NHLRC2 THBS1 TMX3
intracellular cholesterol transport	10	ARL8B NPC2 RELCH
melanosome	11	ANXA6 CAPG MYO5A SLC2A1 SLC3A2 SYNGR1
regulation of ATP-dependent activity	12	ATP1B1 GABARAPL2 MSH3 TP53BP1 TPM1 UHRF1
ubiquitin-like protein ligase binding	13	ARIH1 AURKA CCDC50 ERLIN1 ERLIN2 GABARAPL2 NGFR PSMA3 RBX1 SMAD3 SMAD5 SNX9 SQSTM1 STX8 TP53BP1 UBE2C UBE2K UBE2T VCL
tau protein binding	14	FKBP4 MAP1A PICALM
beta-tubulin binding	15	ADNP APPL1 ARL8B GABARAPL2
positive regulation of viral process	16	CD74 HACD3 PIIH RAD23A
histone phosphorylation	17	AURKA BAZ1B CDK2 PPP4C
protein tetramerization	18	APPL2 HSD17B10 RRM2 TK1 TP53BP1
establishment of chromosome localization	19	KIF2C KIFC1 MLH1 NUDC SUN1
maintenance of protein location in nucleus	20	SKP1 SUN1 TXN
establishment of monopolar cell polarity	21	FAT1 GBF1 WNT5A
Lewy body	22	ARIH1 GPX1 KEAP1 PICALM SQSTM1
epidermal growth factor-activated receptor activity	23	EFEMP1 ITGA1 PIGU SHC1 SNX6
amino acid transmembrane transporter activity	24	SFXN3 SLC25A22 SLC38A10 SLC3A2 SLC7A5
positive regulation of endocytosis	25	APPL1 APPL2 KIF3A PICALM PPP3CA SCYL2 SNX12 TB C1D5 WNT5A

cellular response to transforming growth factor beta stimulus	26	ADAM9 APPL1 APPL2 HTRA1 NR3C1 PXN SMAD3 SMAD5 SNX6 THBS1 TP53BP1 WNT5A
filopodium	27	DAG1 FAT1 MYO10 MYO5A PODXL RDX SHTN1 SLC26A2 SLC7A5 SYNE2 UBE2K
nuclear migration	28	CLMN FHOD1 NUDC SUN1 SYNE2 SYNE3
response to reactive oxygen species	29	ADAM9 GPX1 HBA1 PAWR PXN RBX1 SOD1 TPM1 TXN UBE3A
anterograde axonal transport	30	ARL8B KIF3A KIF3B MAP1A MYO10 MYO5A SOD1 SUN1 SYNE2
anaphase-promoting complex-dependent catabolic process	31	CDK2 PEF1 PLK1 PSMA3 PSMA4 RBX1 SAE1 SKP1 UBE2C UBE3A
endopeptidase complex	32	CD74 HLA-DPA1 PIGU PSMA3 PSMA4 PSMC4 PSMD6 PSMD8 PSME1 RAD23A UBE3A
COPII-coated ER to Golgi transport vesicle	33	BCAP31 CD74 ERGIC1 ERGIC3 GLB1 HACD3 HLA-DPA1 KTN1 PEF1 PIGU SAR1A SAR1B
regulation of cell morphogenesis	34	ADD1 CDC42EP1 CUX1 DAG1 DBNL DLG1 DNMBP DOCK1 FMNL2 KIF3A LARP4 MYO10 PREX1 RDX S100A11 SYNE3 TJP1 TPM1 VCL WNT5A
positive chemotaxis	35	CAMK4 CD276 CD74 HLA-DPA1 HMGB1 HMGB2 SLC7A5 SMAD3 WNT5A
cell junction maintenance	36	CLTB CTBP2 DLG1 EPHA2 ERC1 TJP1 VCL
miRNA-mediated gene silencing	37	EFEMP1 PPP3CA SMAD3 TIAL1 TP53BP1 WNT5A ZC3H7A
cell adhesion molecule binding	38	ADAM9 ADD1 AHNAK CAPG CDC42EP1 CLINT1 DAG1 DBNL DLG1 DSG2 DSP EDIL3 EPHA2 ERC1 FMNL2 H1-10 HMGB1 ITGA1 ITGB4 KTN1 LMNB2 LRRFIP1 NUDC PICALM PLEC PPP3CA RDX S100A11 SHTN1 SLC3A2 SLK SNX9 THBS1 TJP1 VCL
developmental cell growth	39	ADNP ALCAM AURKA DBNL GOLGA4 LMNB2 RTN4R SHTN1 VCL WNT5A YY1
regulation of cellular response to insulin stimulus	40	AHSG APPL1 APPL2 C4A HMGB1 NUCKS1 RABGAP1 SOD1 TNS2
anchoring junction	41	ADAM9 ADD1 ADD3 AHNAK AKAP12 ALCAM ANXA6 ATP1B1 CDC42EP1 DAG1 DLG1 DNMBP DSG2 DSP EPB41L2 EPHA2 FAT1 FHOD1 HACD3 ITGA1 ITGB4 LPP MPP6 NGFR NPM1 PCDH1 PIGU PLEC PODXL PPP3CA PXN RDX S100A11 SDC4 SLC2A1 SYMPK SYNE2 SYNPO TJP1 TNS2 TPM4 VCL
regulation of cell cycle process	42	APPL1 APPL2 ATRX AURKA BAZ1B BRD4 CALM1 CDC6 CDK2 CTCF DLG1 KANK2 KIF15 KIF20A KIF3B MKI67 NCAPH2 NPM1 NUSAP1 PLK1 PRC1 PSMA3 PSMA4 PSME1 RDX RRM2 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 TACC3 TELO2 TP53BP1 UBE2C WDR76 WNT5A
regulation of cell cycle phase transition	43	APPL1 APPL2 ATRX AURKA BRD4 CDC6 CDK2 DLG1 KANK2 KIF3B NCAPH2 NPM1 NUSAP1 PLK1 PSMA3 PSMA4 PSME1 RDX RRM2 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 TELO2 TP53BP1 UBE2C WDR76 WNT5A
sister chromatid cohesion	44	ATRX AURKA CTCF MCMBP MLH1 NCAPD3 NCAPH2 PLK1 STAG1 SUN1 VCPIP1 WBP2 WNT5A

Anexo II

phosphatase binding	45	CALM1 DLG1 ENSA ITGA1 KIF3A NFATC2 PPP6R1 PXN SMAD3 SOD1 SYMPK TP53BP1
regulation of muscle system process	46	ANXA6 ATP1B1 CALM1 DAG1 DLG1 DOCK1 DSG2 DSP E DIL3 EFEMP1 GLRX3 PPP3CA PREX1 SDC4 SMAD3 SOD1 TPM1 WNT5A YY1
cytosolic transport	47	ARL8B ERC1 GBF1 PICALM RDX SNX12 SNX6 SNX9 SQSTM1 STX8 SURF4 TBC1D10B TBC1D5 TMEM87A
negative regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway	48	DLG1 EPHA2 HMGB1 HMGB2 NGFR SMAD3 THBS1 WNT5A
cytoskeletal protein binding	49	ADD1 ADD3 ADNP ANXA6 APPL1 ARL8B CALM1 CAPG CDC42EP1 CLIP2 CLMN DAG1 DBNL DLG1 ELMO1 EPB41L2 FAT1 FHOD1 FKBP4 FMNL2 GABARAPL2 KIF15 KIF20A KIF2C KIF3A KIF3B KIFC1 KTN1 MAP1A MYO10 MYO5A NUSAP1 PAWR PICALM PLEC PLK1 PRC1 PREX1 PXN RABGAP1 RDX SDC4 SHTN1 SMAD3 SNX6 SNX9 SYNE2 SYNE3 SYNPO TJP1 TPM1 TPM4 VCL
regulation of protein localization to cell periphery	50	APPL1 DAG1 DLG1 EPB41L2 EPHA2 FHOD1 FMNL2 PICALM PLEC PLK1 SQSTM1 STX8 TJP1 VCL
condensed chromosome	51	ADD3 ATRX BAZ1B BRD4 CDK2 CENPM CTCF HMGB1 HMGB2 KIF2C MCM5 MKI67 MLH1 MORF4L1 NCAPD3 NCAPH2 NUCKS1 NUDCD2 PLK1 PPP4C PRIM2 RFC2 RFC3 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 STAG1 TP53BP1 YY1
regulation of DNA replication	52	ATRX CD74 CDC6 CDK2 DFFA H1-10 MCM5 MLH1 MSH3 NGFR NUCKS1 PAWR PLK1 RFC2 RFC3 S100A11 TELO2 TP53BP1 WDR76 WNT5A WRNIP1 YY1
positive regulation of cell adhesion	53	ADAM9 CBFB CD276 CD74 DAG1 DOCK1 EDIL3 GLRX3 HLA-DPA1 HMGB1 LMNB2 MYO10 PODXL PPP3CA PREX1 SDC4 SLK SMAD3 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 THBS1 TJP1 TPM1 VCL WNT5A YY1
cell cortex	54	ADD1 ADD3 AKAP12 CAPG CDC42EP1 CLTB CRIP2 CTBP2 DBNL DLG1 EPB41L2 ERC1 FKBP4 GLRX3 MYO10 PREX1 PXN RDX SLC2A1 SNX9 TPM4
regulation of T cell differentiation	55	CAMK4 CBFB CD74 DLG1 HMGB1 PAWR PODXL RDX SDC4 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 SOD1
costamere	56	AHNAK AHNAK2 ATP1B1 CALM1 COL6A2 DAG1 DLG1 GLRX3 ITGB4 PDE4DIP PLEC PPP3CA RDX SDC4 SLC2A1 SLK SMAD3 SQSTM1 SYNE2 SYNPO THBS1 TPM1 TPM4 VCL
regulation of cell junction assembly	57	ADNP DAG1 EFEMP1 EPHA2 GLRX3 HMGB1 HMGB2 ITGB4 PPP3CA SDC4 SLK SMAD3 THBS1 TIAL1 TJP1 TP53BP1 VCL WNT5A YY1 ZC3H7A
cell-cell junction	58	ADAM9 ADD1 ADD3 AHNAK AKAP12 ALCAM ANXA6 ATP1B1 CAPG CDC42EP1 DAG1 DBNL DLG1 DNMBP DSG2 DSP EPB41L2 EPHA2 FAT1 FHOD1 HACD3 ITGA1 ITGB4 LPP MPP6 NGFR NPM1 PCDH1 PIGU PLEC PODXL PPP3CA PXN RDX S100A11 SDC4 SLC2A1 SMAD3 SNX9 SYMPK SYNE2 SYNPO TJP1 TNS2 TPM1 TPM4 VCL

regulation of fibroblast proliferation spindle	59	BCAP31 CD74 CDC6 DLG1 EPHA2 HMGB1 HMGB2 NGFR PAWR PEA15 SOD1 THBS1 TP53BP1 WNT5A
	60	AAAS ADD1 ADD3 ADNP ANXA6 APPL1 ARL8B AURKA CALM1 CAPG CBX1 CDC6 CLIP2 CLMN DAG1 DBNL DLG1 EPB41L2 FHOD1 FKBP4 FMNL2 GABARAPL2 KIF15 KIF20A KIF2C KIF3A KIF3B KIFC1 KTN1 MAP1A MYO10 MYO5A NPM1 NR3C1 NUDC NUDCD2 NUSAP1 PAWR PEA15 PICALM PLEC PLK1 PRC1 PXN RABGAP1 RDX SHTN1 SNX6 STAG1 SYNE2 SYNE3 SYNPO TACC3 TPM1 TPM4 VCL WDR5
cell-cell contact zone	61	ADD1 AHNAK AHNAK2 ATP1B1 CALM1 CDC42EP1 COL6A2 DAG1 DLG1 DSG2 DSP FHOD1 GLRX3 PDE4DIP PLEC PPP3CA RDX S100A11 SDC4 SLC2A1 SQSTM1 SYNE2 SYNPO TJP1 TPM1 TPM4 VCL
urogenital system development	62	ACAT1 DLG1 FKBP4 HELLS KANK2 LMNB2 PODXL PPP3CA SDC4 SMAD3 SMAD5 SOAT1 STRA6 TNS2 UBE3A WNT5A WWTR1
cellular response to peptide	63	AHSG APPL1 APPL2 C4A CDC6 GOT1 MYO5A NGFR NUCKS1 PIGU PXN RABGAP1 SHC1 SLC2A1 SMARCC1 SNX6 SOD1 TNS2 TP53BP1
chromatin organization	64	ATAD2 ATRX BAZ1B BRD4 CBX1 CDK2 CTCF DFFA FAM50A GPX1 H1-10 HELLS HMGB1 HMGB2 KDM3B MKI67 MLH1 MORF4L1 NPM1 NR3C1 NUCKS1 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 TP53BP1 UHRF1 WBP2 WDR5 YY1
cell cycle G2/M phase transition	65	APPL1 APPL2 ATRX AURKA BRD4 CALM1 CD74 CDC6 CDK2 COPS3 DLG1 ENSA KANK2 NPM1 PLK1 PSMA3 PSMA4 PSME1 RDX RRM2 S100A11 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 TELO2 TP53BP1 UBE2C WDR76
chromosome, centromeric region	66	ATAD2 ATRX BAZ1B BRD4 CBX1 CDK2 CENPM CTCF FAM50A GPX1 H1-10 HELLS HMGB1 HMGB2 KDM3B KIF2C MKI67 MORF4L1 NCAPD3 NPM1 NR3C1 NUCKS1 NUDCD2 PLK1 RAD23A SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 SQSTM1 STAG1 TP53BP1 UHRF1 WBP2 WDR5 WDR76 YY1
negative regulation of cholesterol biosynthetic process	67	ANXA6 APPL2 ERLIN1 ERLIN2 FAM3C FDFT1 FDPS GLB1 GOT1 IDH3G NPC2 NR3C1 SOAT1 SOD1 STRA6 TELO2 TP53BP1
regulation of nuclease activity	68	CD276 DFFA DLG1 EFEMP1 EPHA2 HLA-DPA1 HMGB1 HMGB2 ITGB4 MLH1 NGFR NPM1 PPP3CA SLC7A5 SMAD3 THBS1 TP53BP1 WNT5A YY1
regulation of proteolysis	69	A2M ADAM9 AHSG ARIH1 AURKA BCAP31 C4A CDC34 CDK2 CYCS ERLIN1 ERLIN2 GABARAPL2 GPX1 HMGB1 ITIH2 KEAP1 MAP1A NGFR PICALM PLK1 PPP3CA PSMA3 PSMA4 PSMC4 PSMD6 PSMD8 PSME1 RAD23A RBX1 RDX SKP1 SMAD3 SMARCC1 SNX12 SNX9 THBS1 TP53BP1 UBE2C UBE2K UBE3A WNT5A WWTR1
regulation of cell cycle G2/M phase transition	70	AURKA BRD4 CALM1 CD74 CDC6 CDK2 ENSA HLA-DPA1 NPM1 PLK1 PSMA3 PSMA4 PSME1 RBX1 SAR1B SKP1 TP53BP1 UBE2C WWTR1

Anexo II

clathrin-coated vesicle	71	ATP1B1 BCAP31 CD74 CLINT1 CLTB DBNL ERGC1 ERIC3 GLB1 HACD3 HLA-DPA1 KTN1 PEF1 PICALM PIGU PSMA3 PSMA4 PSMC4 PSMD6 PSMD8 PSME1 RAD23A SAR1A SAR1B SCYL2 SNX9 TBC1D5 TP53BP1 UBE3A WNT5A
isoleucine metabolic process	72	ACAT1 APPL2 BLMH DLG1 DUT ECI1 GOT1 HELLS HSD17B10 ILVBL KANK2 LMNB2 PGM2 PLBD1 PODXL PPP3CA SDC4 SMAD3 SMAD5 SOAT1 STRA6 SUCLG2 SYNJ2 TNS2 WNT5A WWTR1
DNA replication	73	ATRX CDC34 CDC6 CDK2 DFFA DUT FTO H1-10 HMGB1 HMGB2 MCM5 MCMBP MLH1 MORF4L1 MSH3 NFIC NPM1 NUCKS1 PPP4C PRIM2 PSMA3 PSMA4 RAD23A RBX1 RFC2 RFC3 RRM2 S100A11 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 TP53BP1 UBE2T UHRF1 VCPIP1 WRNIP1 YY1
cell-substrate junction assembly	74	ADAM9 ADD1 ADNP AHNAK CBFB CD276 CD74 DAG1 DLG1 DOCK1 DSG2 DSP EDIL3 EPHA2 HLA-DPA1 HMGB1 ITGA1 ITGB4 LMNB2 MYO10 PLEC PODXL PPP3CA PREX1 PXN RDX SDC4 SLK SMAD3 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 THBS1 TJP1 TPM1 VCL WNT5A
cadherin binding	75	ADD1 ADD3 AHNAK AHNAK2 ATP1B1 CAPG CDC42EP1 CLINT1 COL6A2 DAG1 DBNL DLG1 DNMBP DSG2 DSP EPHA2 ERC1 FAT1 FHOD1 FKBP4 FMNL2 GPX1 H1-10 KIF3A KTN1 LRRFIP1 MAP1A MPP6 MYO10 NGFR NUDC PCDH1 PICALM PIGU PLEC PODXL PPP3CA PREX1 PXN RDX S100A11 SDC4 SHTN1 SLC2A1 SLC3A2 SLK SMAD3 SNX9 SYMPK SYNE3 SYNPO TJP1 TPM1 VCL WNT5A
regulation of response to DNA damage stimulus	76	ATRX BAZ1B CAMK4 CD276 CD74 CDC34 CDC6 CDK2 COPS3 DFFA HLA-DPA1 HMGB1 ITGA1 MLH1 MORF4L1 NGFR PAWR PICALM PLK1 PPP4C PRC1 S100A11 SLC7A5 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 TCOF1 TELO2 THBS1 TP53BP1 WDR76 WNT5A WRNIP1 YY1
chromosome organization	77	ADD3 ATAD2 ATRX BAZ1B BRD4 CBX1 CD74 CDC34 CDC6 CDK2 CENPM COPS3 CTCF DFFA DUT FAM50A FTO GPX1 H1-10 HELLS HMGB1 HMGB2 KDM3B KIF2C KIFC1 MCM5 MCMBP MKI67 MLH1 MORF4L1 MSH3 NCAPD3 NCAPH2 NFIC NPM1 NR3C1 NUCKS1 NUDC NUDCD2 NUSAP1 PLK1 PPP4C PRC1 PRIM2 PSMA3 PSMA4 RAD23A RBX1 RFC2 RFC3 RRM2 S100A11 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 STAG1 SUN1 TACC3 TELO2 TP53BP1 UBE2C UBE2T UHRF1 VCPIP1 WBP2 WDR5 WDR76 WRNIP1 YY1
mitochondrial protein-containing complex	78	ACAD9 ACAT1 COX5A CYB5B CYCS DLG1 DUT FLAD1 HSD17B10 IDH3G IMMT MRPL11 MRPL13 MRPL47 NDUFB11 NDUFB4 NDUFB7 NDUFB9 NDUFS8 NDUFV3 PLEC RRM2 SH3PXD2A SLC25A22 SLC26A2 SOAT1 SUCLG2 TFAM TIMM21 TK1

regulation of DNA metabolic process	79	ATRX CDC6 CDK2 CTCF DFFA H1-10 HELLS HMGB1 HMGB2 MCM5 MLH1 MORF4L1 MSH3 NGFR NPM1 NR3C1 NUCKS1 PPP4C PRIM2 RFC2 RFC3 S100A11 SMAD3 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 TP53BP1 WNT5A WRNIP1 YY1
organelle localization	80	ARF3 ARF5 ARL8B ATL2 ATP1B1 BCAP31 CALM1 CD74 CLINT1 CLMN CLTB CTBP2 CUX1 DBNL DLG1 ERGIC1 ERGIC3 FHOD1 GABARAPL2 GBF1 GLB1 GOLGA4 HACD3 HLA-DPA1 HMGB1 KIF2C KIF3A KIF3B KIFC1 KTN1 MLH1 MYO5A NPM1 NUDC NUSAP1 PEF1 PICALM PIGU PITPNB PLK1 PSMA3 PSMA4 RDX SAE1 SAR1A SAR1B SCYL2 SDC4 SMAD3 SNX12 SNX6 SNX9 STX8 SUN1 SURF4 SYNE2 SYNE3 TBC1D5 WNT5A XPO4
actin filament binding	81	ADD1 ADD3 AHNAK ANXA6 ATP1B1 CAPG CDC42EP1 CLMN DAG1 DBNL DLG1 DNMBP DSG2 DSP ELMO1 EPB41L2 EPA2 FAT1 FHOD1 FKBP4 FMNL2 GPX1 KIF2C LPP MAP1A MPP6 MYO10 MYO5A NGFR PAWR PCDH1 PIGU PLEC PODXL PPP3CA PREX1 PXN RDX S100A11 SDC4 SHTN1 SLC2A1 SMAD3 SNX9 SYMPK SYNE2 SYNE3 SYNPO TJP1 TPM1 TPM4 UBE2C UBE2K VCL
sarcolemma	82	ADD1 ADD3 ADNP AHNAK AHNAK2 ANXA6 ATP1B1 ATRXC CALM1 CAPG CDC42EP1 COL6A2 CTBP2 DAG1 DBNL DLG1 DNMBP DSG2 DSP EPB41L2 EPA2 ERC1 FAT1 FHOD1 GLRX3 GPX1 ITGA1 KIF3A LMNB2 MAP1A MPP6 MYO5A NGFR PCDH1 PIGU PLEC PODXL PPP3CA PXN RDX S100A11 SDC4 SHTN1 SLC2A1 SLK SMAD3 SNX9 SOD1 SQSTM1 SYMPK SYNE2 SYNPO THBS1 TJP1 TPM1 VCL WNT5A YY1
mitotic cell cycle process	83	AAAS ADD3 ADNP APPL1 APPL2 ARL8B ATAD2 ATRX AURKA BAZ1B BRD4 CALM1 CAMK4 CAPG CBFB CBX1 CD74 CDC34 CDC6 CDK2 CENPM CLIP2 COPS3 CTCF DAG1 DCAF7 DFFA DLG1 DUT ENSA FAM50A FTO GABARAPL2 GBF1 GPX1 H1-10 HELLS HMGB1 HMGB2 KANK2 KDM3B KIF15 KIF20A KIF2C KIF3A KIF3B KIFC1 LMNB1 LMNB2 MAP1A MCM5 MCMBP MKI67 MLH1 MORF4L1 MSH3 NCAPD3 NCAPH2 NFIC NPM1 NR3C1 NUCKS1 NUDC NUDCD2 NUSAP1 PAWR PEA15 PLEC PLK1 PPP3CA PPP4C PRC1 PRIM2 PSMA3 PSMA4 PSME1 PXN RABGAP1 RAD23A RBX1 RDX RFC2 RFC3 RRM2 S100A11 SDC4 SHTN1 SMAD3 SMARCC1 SMARCD2 SMARCE1 SNX9 SOD1 SON SRA1 STAG1 SUN1 TACC3 TELO2 TP53BP1 UBE2C UBE2T UHRF1 VCPIP1 WBP2 WDR5 WDR76 WNT5A WRNIP1 YY1

Anexo II

Tabla suplementaria 4. Grupos funcionales obtenidos tras el análisis de enriquecimiento funcional realizado con la aplicación ClueGO para proteínas diferencialmente sobreexpresadas, según los criterios establecidos.

Función	Grupos	Nombre de los genes de las proteínas relacionadas
peroxisomal matrix	0	AGPS HSD17B4 IDH1
MHC class I protein binding	1	DERL1 TAPBP TUBB
modulation by symbiont of entry into host	2	CAV1 EXOC2 P4HB
focal adhesion	3	ACTB ARPC3 ARPC5 CAV1 EHD3 FHL1 HSPB1 ITGB8 LCP1 MCAM P4HB PAK1 PFN1 PKN1 PPP1CB PROCRR PXDN RALA RPL19 RPL31 RPL9 RPS29
response to hyperoxia	4	CAV1 MMP2 TIMP1
ruffle assembly	5	CAV1 FAM98A INPPL1 PFN1
structural constituent of postsynapse	6	ACTB ACTBL2 LLGL1
stress fiber	7	ACTA1 LCP1 MYH14 PXDN
carbon-oxygen lyase activity	8	ENO3 FAHD2A HSD17B4 TPI1
protein serine/threonine kinase inhibitor activity	9	HSPB1 PRKAR1B SFN
negative regulation of protein ubiquitination	10	CAV1 VNS1ABP PLAA TRIP12
cellular component maintenance	11	CNTNAP1 LLGL1 PARD6A PRKCI TANC1
U2 snRNP	12	PHF5A SF3A1 SF3A2 SF3B4 SF3B6
glutamine family amino acid biosynthetic process	13	ASL ASNS GFPT1 GLS2 GLUL PSPH
azurophil granule	14	ACLY CPNE1 CTSC DNPEP DPP7 GAA LAMP2 META P2 TUBB VAT1
acetyl-CoA biosynthetic process	15	ACLY ACSS1 HSD17B4 PAPSS1 PDK1
endoplasmic reticulum protein-containing complex	16	ABCB6 DERL1 DNAJC10 HLA-A NCAPG P4HA1 P4HB PDIA6 PGK1 RAB1A SLC1A4 SSR4 TAPBP
lysosome organization	17	ACLY ATP6AP2 ATP6V1D CHMP7 CPNE1 CTSC DPP7 GAA LAMP2 TUBB VAT1
polysome	18	GCN1 NDRG1 RPL18A RPL19 RPL31 RPL9 RPS29 RPS6
hemostasis	19	ACTB CAV1 DHCR24 EMILIN1 GGCX GPI HSPB1 ITPK1 NAXE PGK1 PLAT PROCR SERPINE1 TFPI2 THBS2
regulation of microtubule polymerization	20	HSPB1 LLGL1 MAP2 METAP2 NDRG1 PAK1 PKN1 RAB1A UCHL1
carbohydrate catabolic process	21	ENO3 GAA GAPDH GFPT1 GPI HK2 INPPL1 LDHA NLN PDK1 PGAM1 PGK1 POFUT1 PPP1CB PYGM TIGARR TPI1 UGP2
ficolin-1-rich granule	22	ACLY ARPC5 ATP6AP2 CPNE1 CTSC DNPEP DPP7 GAA GPI IDH1 LAMP2 LGALS3BP METAP2 MIF MVP P

regulation of protein polymerization	23	GAM1 PSMA2 PSMD7 PXDNI SERPINE1 TIMP1 TIMP3 TUBB VAT1 VCAN
stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	24	ARPC3 ARPC5 CAPZB EMILIN1 MAP2 METAP2 NCPG NDRG1 PAK1 PFN1 PKN1 TMSB10 WASHC2C
proteasome complex	25	ARPC3 ARPC5 CAPZB HSPB1 LLGL1 MAP2 METAP2 NCAPG NDRG1 PAK1 PFN1 PKN1 PSMA2 PSMA3 PSMA4 PXDNI RAB1A TMSB10 UCHL1 WASHC2C
		ACTB CAV1 CCND1 CDK6 CTHRC1 FHL1 GCN1 GPI HK2 HLA-A HSPB1 ITCH LAMA4 MMP2 NDRG1 P4HB PAK1 PDK1 PFN1 PGK1 PKN1 PLAT PNKD PSMA2 PSMA3 PSMA4 PSMC4 PSMD7 PSMD8 PSMF1 PXDNI TAPBP TIGAR TIMP1

Anexo III

Secuencias codificantes de los transcritos de GA humanas y su traducción a aminoácidos

El resultado azul indica la alternancia de exones. El resultado en rojo indica los aminoácidos codificados a través del empalme de exones.

1) KGA

Secuencia codificante (2010 nt):

```
1 ATGATGCGGC TCGAGGCTC GGGGATGCTG CGGGACCTGC TCCTGCGGTC GCCCGCCGGC
61 GTGAGCGCGA CTCTGCGGCG GGCACAGCCC TTGGTCACCC TGTGCCGGCG TCCCCGAGGC
121 GGGGGACGGC CGGCCGCGGG CCCGGCTGCC GCCGCGCGAC TCCACCCGTG GTGGGGCGGG
181 GGCGGCTGGC CGGCGGAGCC CCTCGCGCGG GGCCTGTCCA GCTCTCCTTC GGAGATCTTG
241 CAGGAGCTGG GCAAGGGGAG CACGCATCCG CAGCCCAGGG TGTCGCCACC CGCTGCCCCG
301 GCGGCGCCCG GCCCAAGGA CGGCCCCGGG GAGACGGACG CGTTTGCAA CAGCGAGGGC
361 AAAGAGCTGG TGGCCTCAGG TGAAAATAAA ATAAACAGG GTCTGTTACC TAGCTTGAA
421 GATTTGCTGT TCTATACAAT TGCTGAAGGA CAAGAGAAAA TACCTGTTCA TAAATTTATT
481 ACAGCACTCA AATCTACAGG ATTGCGAACG TCTGATCCCA GGTTGAAAGA GTGTATGGAT
541 ATGTTAAGAT TAACTCTTCA AACAACATCA GATGGTGTCA TGCTAGACAA AGATCTTTTT
601 AAAAAATGTG TTCAGAGCAA CATTGTTTTG TTGACACAAG CATTTAGAAG AAAGTTTGTC
661 ATTCCTGACT TTATGTCTTT TACCTCACAC ATTGATGAGT TATATGAAAG TGCTAAAAAG
721 CAGTCTGGAG GAAAGGTTGC AGATTATATT CCTCAACTGG CCAAATTCAG TCCCATTG
781 TGGGGTGTGT CTGTTTGTAC AGTAGATGGA CAGAGGCATT CTAAGGAGA TACCAAAGTT
841 CCCTTCTGTC TTCAGTCTTG TGTA AACCT TTGAAATATG CCATTGCTGT TAATGATCTT
901 GGAAGTGAAT ATGTGCATCG ATATGTTGGA AAAGAGCCGA GTGGACTAAG ATTCAACAAA
961 CTATTTTTGA ATGAAGATGA TAAACCACAT AATCCTATGG TAAATGCTGG AGCAATTGTT
1021 GTGACTTCAC TAATAAAGCA AGGAGTAAAT AATGCTGAAA AATTTGACTA TGTCATGCAG
1081 TTTTGAATA AGATGGCTGG TAATGAATAT GTTGGATTCA GTAATGCAAC GTTTCAGTCT
1141 GAAAGAGAAA GTGGAGATCG AAATTTTGCA ATAGGATATT ACTTAAAAGA AAAGAAGTGT
1201 TTTCCAGAAG GCACAGACAT GGTGGGTATA TTAGACTTCT ACTTCCAGCT GTGCTCCATT
1261 GAAGTGACTT GTGAATCAGC CAGTGTGATG GCTGCGACAC TGGCTAATGG TGGTTTCTGC
1321 CCAATTACTG GTGAAAGAGT ACTGAGCCCT GAAGCAGTTC GAAATACATT GAGTTTGATG
1381 CATTCCTGTG GCATGTATGA CTTCTCAGGG CAGTTTGCTT TCCATGTTGG TCTTCCTGCA
```

1441 AAATCTGGAG TTGCTGGGGG CATTCTTTTA GTTGTCCCA ATGTTATGGG TATGATGTGC
 1501 TGGTCTCCTC CTCTGGATAA GATGGGCAAC AGTGTTAAGG GAATTCACCTT TTGTCACGAT
 1561 CTTGTTTCTC TGTGTAATTT CCATAACTAT GATAATTTGA GACACTTTGC AAAAAAAGCTT
 1621 GATCCTCGAA GAGAAGGTGG TGATCAAAGG GTAAAGTCAG TGATAAATCT TTTGTTTGCT
 1681 GCATATACTG GAGATGTGTC TGCACCTCGA AGATTTGCTT TGTCAGCTAT GGACATGGAA
 1741 CAGCGGGACT ATGATTCTAG AACAGCACTC CATGTAGCTG CTGCAGAGGG TCATGTTGAA
 1801 GTTGTTAAAT TTTTGCTGGA AGCCTGCAAA GTAAACCCTT TCCCAAGGA CAGGTGGAAT
 1861 AACACTCCCA TGGATGAAGC ACTGCACCTT GGACACCATG ATGTATTTAA AATTCTCCAA
 1921 GAATACCAAG TCCAGTACAC ACCTCAAGGA GATTCTGACA ACGGAAGGA AAATCAAACC
 1981 GTCCATAAGA ATCTTGATGG ATTGTTGTAA

Traducción (669 aa):

1 MMRLRSGML RDLLLRSPAG VSATLRRAPQ LVTLCRRPRG GGRPAAGPAA AARLHPWWGG
 61 GGWPAEPLAR GLSSSPSEIL QELGKGSTHP QPGVSPPAAP AAPGPKDGPQ ETDAFGNSEG
 121 KELVASGENK IKQGLLPSLE DLLFYTIAEG QEKIPVHKFI TALKSTGLRT SDPRLKECMD
 181 MLRLTLQTTS DGVMLDKDLF KRCVQSNIVL LTQAFRRKFV IPDFMSFTSH IDELYESAKK
 241 QSGGKVADYI PQLAKFSPDL WGVSVCTVDG QRHSTGDTKV PFCLQSCVKP LKYAIAVNDL
 301 GTEYVHRYVG KEPSGLRFNK LFLNEDDKPH NPMVNAGAIV VTSLIKQGVN NAEKFDYVMQ
 361 FLNKMAGNEY VGFSNATFQS ERESGDRNFA IGYLKEKKC FPEGTDMVGI LDFYFQLCSI
 421 EVTCEASAVM AATLANGGFC PITGERVLSP EAVRNTLSLM HSCGMYDFSG QFAFHVGLPA
 481 KSGVAGGILL VVPNVMGMMC WSPPLDKMGN SVKGIHFCHD LVSLCNFHNH DNLRHFPAKLL
 541 DPRREGGDQR VKSVINLLFA AYTGDVSALR RFALSAMDME QRDYDSRTAL HVAAAEGHVE
 601 VVKFLEACK VNPFPKDRWN NTPMDEALHF GHHDVFKILQ EYQVQYTPQG DSDNGKENQT
 661 VHKNLDGLL

2) GCA

Secuencia codificante (1797 nt):

1 ATGATGCGGC TGCAGAGCTC GGGGATGCTG CGGGACCTGC TCCTGCGGTC GCCCGCCGGC
 61 GTGAGCGCGA CTCTGCGGCG GGCACAGCCC TTGGTCACCC TGTGCCGGCG TCCCCGAGGC
 121 GGGGACGGC CGGCCGCGGG CCCGGCTGCC GCCGCGGAC TCCACCCGTG GTGGGGCGGG
 181 GCGGCTGGC CGGCGGAGCC CCTCGCGCGG GGCCTGTCCA GCTCTCCTTC GGAGATCTTG
 241 CAGGAGCTGG GCAAGGGGAG CACGCATCCG CAGCCCGGGG TGTCGCCACC CGCTGCCCCG

Anexo III

301 GCGGCGCCCG GCCCAAGGA CGGCCCCGGG GAGACGGACG CGTTTGCAA CAGCGAGGGC
361 AAAGAGCTGG TGGCCTCAGG TGAAAATAAA ATAAAACAGG GTCTGTTACC TAGCTTGAA
421 GATTTGCTGT TCTATACAAT TGCTGAAGGA CAAGAGAAAA TACCTGTTCA TAAATTTATT
481 ACAGCACTCA AATCTACAGG ATTGCGAACG TCTGATCCCA GGTGAAAGA GTGTATGGAT
541 ATGTTAAGAT TAACTCTTCA AACAAATCA GATGGTGTCA TGCTAGACAA AGATCTTTTT
601 AAAAAATGTG TTCAGAGCAA CATTGTTTTG TTGACACAAG CATTTAGAAG AAAGTTTGTG
661 ATTCCTGACT TTATGTCTTT TACCTCACAC ATTGATGAGT TATATGAAAG TGCTAAAAAG
721 CAGTCTGGAG GAAAGGTTGC AGATTATATT CCTCAACTGG CCAAATTCAG TCCCATTG
781 TGGGGTGTGT CTGTTTGTAC AGTAGATGGA CAGAGGCATT CTAAGGAGA TACCAAAGTT
841 CCCTTCTGTC TTCAGTCTG TGTAACCT TTGAAATATG CCATTGCTGT TAATGATCTT
901 GGAAGTGAAT ATGTGCATCG ATATGTTGGA AAAGAGCCGA GTGGACTAAG ATTCAACAAA
961 CTATTTTTGA ATGAAGATGA TAAACCACAT AATCCTATGG TAAATGCTGG AGCAATTGTT
1021 GTGACTTCAC TAATAAAGCA AGGAGTAAAT AATGCTGAAA AATTTGACTA TGTCATGCAG
1081 TTTTGAATA AGATGGCTGG TAATGAATAT GTTGATTC AATAAGCAAC GTTTCAGTCT
1141 GAAAGAGAAA GTGGAGATCG AAATTTTGA ATAGGATATT ACTTAAAAGA AAAGAAGTGT
1201 TTTCCAGAAG GCACAGACAT GGTGTTGATA TTAGACTTCT ACTTCCAGCT GTGCTCCATT
1261 GAAGTGACTT GTGAATCAGC CAGTGTGATG GCTGCGACAC TGGCTAATGG TGGTTTCTGC
1321 CCAATTACTG GTGAAAGAGT ACTGAGCCCT GAAGCAGTTC GAAATACATT GAGTTTGATG
1381 CATTCTGTG GCATGTATGA CTTCTCAGG CAGTTTGCTT TCCATGTTGG TCTTCTGCA
1441 AAATCTGGAG TTGCTGGGGG CATTCTTTTA GTTGTCCTCA ATGTTATGGG TATGATGTGC
1501 TGGTCTCCTC CTCTGGATAA GATGGGCAAC AGTGTTAAGG GAATTCATT TTGTCACGAT
1561 CTTGTTTCTC TGTGTAATTT CCATAACTAT GATAATTTGA GACACTTTCG AAAAAACTT
1621 GATCCTCGAA GAGAAGGTGG TGATCAAAGG CATTCTTTG GACCATTGGA CTATGAAAGT
1681 CTCCAACAAG AACTTGCTTT AAAAGAGACA GTATGGAAAA AAGTGCACC TGAGTCAAAAT
1741 GAGGACATCT CTACAACGT AGTATATAGA ATGGAAAGTC TGGGAGAGAA AAGCTAA

Traducción (598 aa):

1 MMRLRGSGML RDLLLRSPAG VSATLRRQP LVTLCRRPRG GGRPAAGPAA AARLHPWWGG
61 GGWPAEPLAR GLSSSPSEIL QELGKGSTHP QPGVSPPAAP AAPGPKDGP ETDAFGNSEG
121 KELVASGENK IKQGLLPSLE DLLFYTIAEG QEKIPVHKFI TALKSTGLRT SDPRLKECMD
181 MLRLTLQTT DGVM LDKDLF K KCVQSNIVL LTQAFRRKFV IPDFMSFTSH IDELYESAKK
241 QSGGKVADYI PQLAKFSPDL WGVSVCTVDG Q RHSTGDTKV PFCLQSCVKP LKYAIAVNDL
301 GTEYVHRYVG KEPSGLRFNK LFLNEDDKPH NPMVNAGAI V TSLIKQGVN NAEKFDYVMQ

361 FLNKMAGNEY VGFSNA^TFQS ERESGDRNFA IGYLLKEKKC FPEGTDMVGI LDFYFQLCSI
 421 EVTCEASASVM AATLANGGFC PITGERVLSP EAVRNTLSLM HSCGMYDFSG QFAFHVGLPA
 481 KSGVAGGILL VVPNVMMGC WSPPLDKMGN SVKGIHFCHD LVSLCNFHNY DNLRHFAKKL
 541 DPRREGGDQR HSFGLDYES LQQELALKET VWKKVSPESN EDISTTVVYR MESLGEKS

3) GAB

Secuencia codificante (1802 nt):

1 ATGCGCTCCA TGAAGGCTCT GCAGAAGGCC CTGAGCCGGG CTGGCAGTCA CTGCGGGCGA
 61 GGAGGCTGGG GTCACCCGAG CCGGAGCCCC CTCCTTGGCG GGGGCGTCCG GCACCACCTC
 121 AGTGAGGCCG CGGCGCAGGG CAGAGAGACG CCACACAGCC ACCAGCCGCA GCACCAGGAT
 181 CATGATTCAT CAGAAAGTGG CATGCTGTCC CGCCTGGGTG ATTTGCTCTT TTACTACTATT
 241 GCTGAAGGAC AGGAACGAAT CCCTATCCAC AAGTTCACCA CTGCACTAAA GGCCACTGGA
 301 CTGCAGACAT CAGATCCTCG GCTCCGAGAC TGCATGAGCG AGATGCACCG CGTGGTCCAA
 361 GAGTCCAGTA GTGGTGGCCT CTTGGACCGA GATCTCTTCC GAAAGTGTGT GAGCAGCAAC
 421 ATTGTGCTCC TGACCCAGGC ATTCCGAAAG AAGTTTGTCA TTCCTGATTT TGAGGAGTTC
 481 ACGGGCCATG TGGATCGCAT CTTTGAGGAT GTCAAAGAGC TCACTGGAGG CAAAGTGGCA
 541 GCCTACATCC CTCAGCTGGC CAAGTCAAAC CCAGACCTGT GGGGTGTCTC CCTGTGCACT
 601 GTGGATGGTC AACGGCACTC TGTGGGCCAC ACAAAGATCC CCTTCTGCCT GCAGTCTGT
 661 GTGAAGCCCC TCACCTATGC CATCTCCATA AGCACCCTAG GCACTGACTA CGTGCACAAG
 721 TTTGTGGGCA AAGAGCCAAG TGGCCTGCGC TACAACAAGC TCTCCCTCAA TGAGGAAGGA
 781 ATCCCCATA ACCCCATGGT CAATGCTGGT GCCATTGTTG TCAGCTCCCT GATCAAGATG
 841 GACTGTAACA AAGCAGAGAA GTTTGATTTT GTGTTGCAGT ATCTCAACAA AATGGCTGGG
 901 AATGAATACA TGGGTTTCAG CAATGCCACA TTCCAGTCAG AGAAGGAAAC AGGGGATCGG
 961 AATTATGCCA TCGGCTATTA TCTCAAGGAA AAGAAGTGCT TTCCTAAGGG GGTGGACATG
 1021 ATGGCTGCCC TTGATCTCTA CTTCCAGCTG TGTTCTGTGG AGGTCACCTG TGAATCAGGC
 1081 AGTGTGATGG CAGCCACCCT CGCCAACGGT GGGATCTGCC CCATCACAGG CGAGAGTGTG
 1141 CTGAGTGCTG AAGCAGTGCG CAACACCCTC AGCCTCATGC ATTCCTGCGG CATGTATGAC
 1201 TTCTCTGGCC AGTTTGCCTT CCACGTGGGC CTGCCAGCCA AGTCAGCTGT ATCAGGAGCC
 1261 ATCCTCCTGG TGGTACCCAA TGTCATGGGA ATGATGTGCC TGTACCCCC ATTGGACAAG
 1321 CTGGGGAACA GCCATAGGGG GACCAGCTTC TGCCAGAAGT TGGTGTCTCT CTTCAATTTT
 1381 CACAACATG ACAACCTGAG GCACTGTGCT CGGAAGTTAG ACCCACGGCG TGAAGGGGCA
 1441 GAAATTCGGA ACAAGACTGT GGTCAACCTG TTATTTGCTG CCTATAGTGG CGATGTCTCA

Anexo III

1501 GCTCTTCGAA GGTTCGCTT GTCAGCCATG GATATGGAAC AGAAAGACTA TGA CTCTCGCGC
1561 ACAGCTCTGC ATGTTGCTGC AGCTGAAGGA CACATCGAAG TTGTTAAATT CCTGATCGAG
1621 GCTTGCAAAG TGAATCCTTT TGCCAAGGAC AGGTGGGGCA ACATTCCCCT GGATGATGCT
1681 GTGCAGTTCA ACCATCTGGA GGTGGTCAAA CTGCTTCAAG ATTACCAGGA CTCCTACACA
1741 CTCTCTGAAA CTCAGGCTGA GGCAGCAGCT GAGGCCCTGT CCAAAGAGAA CTTAGAAAGC
1801 ATGGTATGA

Traducción (602 aa):

1 MRSMKALQKA LSRAGSHCGR GGWGHPSRSP LLGGGVRHHL SEAAAQGRET PHSHPQHQD
61 HDSSSESGMLS RLGDLLFYTI AEGQERIPHI KFTTALKATG LQTS DPRLRD CMSEMHRVVQ
121 ESSSGGLLDR DLFRKCVSSN IVLLTQAFRK K FVIPDFEEF TGHVDRI FED VKELTGGKVA
181 AYIPQLAKSN PDLWGVSLCT VDGQRHSVGH TKIPFCLQSC VKPLTYAISI STLGT DYVHK
241 FVGKEPSGLR YNKLSLNEEG IPHNPMVNAG AIVVSSLIK M DCNKA EK FDF VLQYLNKMAG
301 NEYMGFSNAT FQSEKETGDR NYAIGYYLKE KKCFPKGVDM MAALDLYFQL CSVEVTCESG
361 SVMAATLANG GICPITGESV LSAEAVRNTL SLMHSCGMYD FSGQFAFHVG LPAKSAVSGA
421 ILLVVPNVMG MMCLSPPLDK LGNSHRGTSF CQKLVSLFNF HNYDNLRHCA RKLDP RREGA
481 EIRNKTVVNL LFAAYS GDVS ALR R FALSAM DMEQKDYDSR TALHVAAAE G HIEVVKFLIE
541 ACKVNPFAKD RWGNIPLDDA VQFNHLEVVK LLQDYQDSYT LSETQAEAAA EALSKENLES
601 MV

4) LGA

Secuencia codificante (1669 nt):

1 ATGTTGCAGA AGGAGGAGCA GGTAGCAGTT CTCAGGCCCC ACTTTCCTCC CCATTTCTCT
61 GCCCCCAAAC AGTGATTCAT CAGAAAGTGG CATGCTGTCC CGCCTGGGTG ATTTGCTCTT
121 TTACACTATT GCTGAAGGAC AGGAACGAAT CCCTATCCAC AAGTTCACCA CTGCACTAAA
181 GGCCACTGGA CTGCAGACAT CAGATCCTCG GCTCCGAGAC TGCATGAGCG AGATGCACCG
241 CGTGGTCCAA GAGTCCAGTA GTGGTGGCCT CTTGGACCGA GATCTCTTCC GAAAGTGTGT
301 GAGCAGCAAC ATTGTGCTCC TGACCCAGGC ATTCCGAAAG AAGTTTGTCA TTCCTGATTT
361 TGAGGAGTTC ACGGGCCATG TGGATCGCAT CTTTGAGGAT GTCAAAGAGC TCACTGGAGG
421 CAAAGTGGCA GCCTACATCC CTCAGCTGGC CAAGTCAAAC CCAGACCTGT GGGGTGTCTC
481 CCTGTGCACT GTGGATGGTC AACGGCACTC TGTGGGCCAC ACAAAGATCC CCTTCTGCCT

541 GCAGTCCTGT GTGAAGCCCC TCACCTATGC CATCTCCATA AGCACCCCTAG GCACTGACTA
 601 CGTGCACAAG TTTGTGGGCA AAGAGCCAAG TGGCCTGCGC TACAACAAGC TCTCCCTCAA
 661 TGAGGAAGGA ATCCCCCATA ACCCCATGGT CAATGCTGGT GCCATTGTTG TCAGCTCCCT
 721 GATCAAGATG GACTGTAACA AAGCAGAGAA GTTTGATTTT GTGTTGCAGT ATCTCAACAA
 781 AATGGCTGGG AATGAATACA TGGGTTTCAG CAATGCCACA TTCCAGTCAG AGAAGGAAAC
 841 AGGGGATCGG AATTATGCCA TCGGCTATTA TCTCAAGGAA AAGAAGTGCT TTCCTAAGGG
 901 GGTGGACATG ATGGCTGCCC TTGATCTCTA CTTCCAGCTG TGTTCGTGGG AGGTCACCTG
 961 TGAATCAGGC AGTGTTCATGG CAGCCACCCT CGCCAACGGT GGGATCTGCC CCATCACAGG
 1021 CGAGAGTGTG CTGAGTGCTG AAGCAGTGCG CAACACCCTC AGCCTCATGC ATTCCTGCGG
 1081 CATGTATGAC TTCTCTGGCC AGTTTGCCTT CCACGTGGGC CTGCCAGCCA AGTCAGCTGT
 1141 ATCAGGAGCC ATCCTCCTGG TGGTACCCAA TGTCATGGGA ATGATGTGCC TGTACCCCC
 1201 ATTGGACAAG CTGGGGAACA GCCATAGGGG GACCAGCTTC TGCCAGAAGT TGGTGTCTCT
 1261 CTTCAATTTT CACAACCTATG ACAACCTGAG GCACTGTGCT CGGAAGTTAG ACCCACGGCG
 1321 TGAAGGGGCA GAAATTCGGA ACAAGACTGT GGTCAACCTG TTATTTGCTG CCTATAGTGG
 1381 CGATGTCTCA GCTCTTCGAA GGTTCGCTT GTCAGCCATG GATATGGAAC AGAAAGACTA
 1441 TGAAGGGGCA GAAATTCGGA ACAAGACTGT GGTCAACCTG TTATTTGCTG CCTATAGTGG
 1501 CCTGATCGAG GCTTGCAAAG TGAATCCTTT TGCCAAGGAC AGGTGGGGCA ACATTCCCCT
 1561 GGATGATGCT GTGCAGTTCA ACCATCTGGA GGTGGTCAA CTGCTTCAAG ATTACCAGGA
 1621 CTCCTACACA CTCTCTGAAA CTCAGGCTGA GGCAGCAGCT GAGGCCCTGT CCAAAGAGAA
 1681 CTTAGAAAGC ATGGTATGA

Traducción (565 aa):

1 MLQKEEQVAV LRPHPPHSL PPNSDSSESG MLSRLGDLLE YTIAEGQERI PIHKFTTALK
 61 ATGLQTS DPR LRDCMSEMHR VVQESSGGL LDRDLFRKCV SSNIVLLTQA FRKKFVIPDF
 121 EEFTGHVDRI FEDVKELTGG KVAAYIPQLA KSNPDLWGVS LCTVDGQRHS VGHTKIPFCL
 181 QSCVKPLTYA ISISTLGTDY VHKFVGKEPS GLRYNKLSLN EEGIPHNPMV NAGAIIVSSL
 241 IKMDCNKA EK FDFVLQYLNK MAGNEYMGFS NATFQSEKET GDRNYAIGYY LKEKKCFPKG
 301 VDMMAALDLY FQLCSVEVTC ESGSVMATL ANGGICPITG ESVLSAEAVR NTLSLMHSCG
 361 MYDFSGQFAF HVGLPAKSAV SGAILLVVFN VMGMMCLSP LDKLGNSHRG TSFCQKLVSL
 421 FNFHNYDNLR HCARKLDPRR EGAEIRNKT VNL LFAAYSG DVSALR R FAL SAMDMEQKDY
 481 DSRTALHVAA AEGHIEVVKF LIEACKVNP AKDRWGNIP DDAVQFNHLE VVKLLQDYQD
 541 SYTLSETQAE AAAEALSKEN LESMV

Anexo III

Formas truncadas de GLS2 humana expresadas en *E. coli* con el vector pET-28b

En rojo, las secuencias de la etiqueta de histidina y del sitio de corte por trombina, respectivamente. Subrayado, el primer residuo de la forma truncada de GLS2 correspondiente.

GLS2₇₃₋₆₀₂ (551 aa):

```
1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MGDLLFYTIA EGQERIPiHK FTTALKATGL QTSDPRLRDC
61 MSEMHRVVQE SSSGGLLDRD LFRKCVSSNI VLLTQAFRKK FVIPDFEETF GHVDRIFEDV
121 KELTGGKVAA YIPQLAKSNP DLWGVSLCTV DGQRHSVGHT KIPFCLQSCV KPLTYAISIS
181 TLGTDYVHKF VGKEPSGLRY NKLSLNEEGI PHNPMVNAGA IVVSSLIKMD CNKAEKDFDV
241 LQYLNMAGN EYMGFSNATF QSEKETGDRN YAIGYYLKEK KCFPKGVDMM AALDLYFQLC
301 SVEVTCESGS VMAATLANGG ICPITGESVL SAEAVRNTLS LMHSCGMYDF SGQFAFHVGL
361 PAKSAVSGAI LLVVPNVMGM MCLSPPLDKL GNSHRGTSFC QKLVSLFNFH NYDNLRHCAR
421 KLDPRREGAE IRNKTVVNL FAAYSGDVSA LRRFALSAMD MEQKDYDSRT ALHVAAAEGH
481 IEVVKFLIEA CKVNPFAKDR WGNIPLDDAV QFNHLEVVKL LDYQDSYTL SETQAEAAAE
541 ALSKENLESM V
```

GLS2₅₆₋₆₀₂ (568 aa):

```
1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MPQHGDHDS ESGMLSR LGD LLYTIAEGQ ERIPIHKFTT
61 ALKATGLQTS DPRLRDCMSE MHRVVQESSS GLLDRDLFR KCVSSNIVLL TQAFRKKFVI
121 PDFEETFQHV DRIFEDVKEL TGGKVAAYIP QLAKSNPDW GVSLCTVDGQ RHSVGH TKIP
181 FCLQSCVKPL TYAISISTLG TDYVHKFVGK EPSGLRYNKL SLNEEGIPHN PMVNAGAI VV
241 SSLIKMDCNK AEKDFDFVLQY LNKMAGNEYM GFSNATFQSE KETGDRNYAI GYYLKEKCF
301 PKGVDMMAAL DLYFQLCSVE VTCESGSVMA ATLANGGICP ITGESVLSAE AVRNTLSLMH
361 SCGMYDFSGQ FAFHVGLPAK SAVSGAILLV VPNVMMCL SPPLDKLGNS HRGTSFCQKL
421 VSLFNFNHNYD NLRHCARKLD PRREGAEIRN KTVVNL LFAA YSGDV SALRR FALSAMDMEQ
481 KDYDSRTALH VAAAEGHIEV VKFLIEACKV NPFAKDRWGN IPLDDAVQFN HLEVVKLLQD
541 YQDSYTLSET QAEAAAEALS KENLESMV
```

GLS2₆₂₋₄₈₃ (443 aa):

```

1  MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MDSSESGMLS RLGDLLFYTI AEGQERIPHI KFTTALKATG
61  LQTS DPRLRD CMSEMRVVQ ESSSGLLDR DFRKCVSSN IVLLTQAFRK KFVIPDFEEF
121 TGHVD RIFED VKELTGGKVA AYIPQLAKSN PDLWGVSLCT VDGQRH SVGH TKIPFCLQSC
181 VKPLTYAISI STLGTDYVHK FVGKEPSGLR YNKLSLNEEG IPHNPMVNAG AIVVSSLIK M
241 DCNKA EKDFD VLQYLNKMAG NEYMGFSNAT FQSEKETGDR NYAIGYYLKE KKCFPKGVDM
301 MAALDLYFQL CSVEVTCE SG SVMAATLANG GICPITGESV LSAEAVRNTL SLMHSCGMYD
361 FSGQFAFHVG LPAKSAVSGA ILLVVPNVMG MMCLSPPLDK LGNSHRGT SF CQKLVSLFNF
421 HNYDNL RHCA RKLDPREGA EIR

```

Formas truncadas de GLS2 humana expresadas en células de insecto Sf21 con el vector pFast-Bac1

En rojo, la secuencia de la etiqueta de histidina en el extremo C-terminal de la proteína recombinante.

GLS2₁₋₆₀₂:

```

1  MRSMKALQKA LSRAGSHCGR GGWGHPSRSP LLGGGVRHHL SEAAAQGRE T PSHQPQH QD
61  HDSSSESGMLS RLGDLLFYTI AEGQERIPHI KFTTALKATG LQTS DPRLRD CMSEMRVVQ
121 ESSSGLLDR DFRKCVSSN IVLLTQAFRK KFVIPDFEEF TGHVD RIFED VKELTGGKVA
181 AYIPQLAKSN PDLWGVSLCT VDGQRH SVGH TKIPFCLQSC VKPLTYAISI STLGTDYVHK
241 FVGKEPSGLR YNKLSLNEEG IPHNPMVNAG AIVVSSLIK M DCNKA EKDFD VLQYLNKMAG
301 NEYMGFSNAT FQSEKETGDR NYAIGYYLKE KKCFPKGVDM MAALDLYFQL CSVEVTCE SG
361 SVMAATLANG GICPITGESV LSAEAVRNTL SLMHSCGMYD FSGQFAFHVG LPAKSAVSGA
421 ILLVVPNVMG MMCLSPPLDK LGNSHRGT SF CQKLVSLFNF HNYDNL RHCA RKLDPREGA
481 EIRNKTVVNL LFAAYSGDVS ALRRFALSAM DMEQKDYDSR TALHVAAAEG HIEVVKFLIE
541 ACKVNPFAKD RWGNIPLDDA VQFNHLEVVK LLQDYQDSYT LSETQAEAAA EALSKENLES
601 MVHHHHHH

```

Anexo III

GLS2₅₆₋₆₀₂:

1 MPQH^QDHDSS ESGML SRLGD LLYTIAEQ ERIPIHKFTT ALKATGLQTS DPRLRDCMSE
61 MHRVVQESS GLLDRDLFR KCVSSNIVLL TQAFRKKFVI PDFEFTGHV DRIFEDVKEL
121 TGGKVAAYIP QLA^SNPDLW GVS^LCTVDGQ RHSVGH^TKIP FCLQSCVKPL TYAISISTLG
181 TDYVHKFVGK EPSGLRYNKL SLNEEGIPHN PMVNAGAI^VV SSLIKMDCNK AEKDFDFVLQY
241 LNKMAGNEYM GFSNATFQSE KETGDRNYAI GYYLKEKKCF PKGVDMMAAL DLYFQLCSVE
301 VTCESGSVMA ATLANGGICP ITGESVLSAE AVRNTLSLMH SCGMYDFSGQ FAFHVGLPAK
361 SAVSGAILLV V^PNVMGMMCL SPPLDKLGNS HRGTSFCQKL VSLFNFNHNYD NLRHCARKLD
421 PRREGAEIRN KTVV^NLLFAA YSGDV^SALRR FALSAMDMEQ KDYDSRTALH VAAAEGHIEV
481 VKFLIEACKV NPF^AKDRWGN IPLDDAVQFN HLEVVKLLQD YQDSYTLSET QAEAAAEALS
541 KENLESMV^{HH} ^{HHHH}