

Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

XIV Semana Integrada do Instituto de
Física de São Carlos

Livro de Resumos da Pós-Graduação

São Carlos
2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Informação do IFSC

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos
(13: 21-25 ago.: 2023: São Carlos, SP.)

Livro de resumos da XIII Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo / Organizado por Adonai Hilário da Silva [et al.]. São Carlos: IFSC, 2023.
358p.

Texto em português.

1.Física. I. Silva, Adonai Hilário da, org. II. Título.

ISSN: 2965-7679

72

Análise estrutural da septina de *Chlamydomonas reinhardtii* (CrSept): mecanismos de catálise e polimerização.

MAMANI, Eloy Condori¹; PINTO, Andressa Patricia Alves¹; FERNANDEZ, Bryan Marquez¹; CABREJOS, Diego Antonio Leonardo¹; ARAÚJO, Ana Paula Ulian de¹

bmarquezf@ifsc.usp.br

¹Instituto de Física de São Carlos – USP

As septinas são uma família diversa de proteínas pertencentes à superclasse das P-loop GTPases, conhecidas por sua capacidade de se ligar e hidrolisar GTP. Essas proteínas desempenham papéis essenciais em processos celulares como a organização do citoesqueleto e a divisão celular, estando presentes em uma ampla variedade de eucariotos, que incluem animais, fungos e certos protistas, como algas e ciliados. Sua capacidade de formar filamentos e complexos supramoleculares é crucial para manter sua função celular. (1) Estudos prévios realizados em nosso grupo (2) sobre a única septina presente em *Chlamydomonas reinhardtii* (CrSept) mostraram que trata-se de uma proteína monomérica em solução, devido a uma taxa de hidrólise de GTP excepcionalmente alta, até 40 vezes maior que a observada em outras septinas. A resolução da estrutura cristalográfica (CrSept G86-393) revelou que esse comportamento hidrolítico se deve à presença de um “dedo de arginina” (R-finger), um elemento estrutural exclusivo das septinas de algas. Dada a sua singularidade, a CrSept se torna um modelo interessante para explorar os mecanismos de catálise e polimerização das septinas. Assim, este projeto está centrado no estudo de uma construção alternativa de CrSept (CrSept 71-401), que inclui 15 aminoácidos adicionais na extremidade N-terminal e 9 na C-terminal. A adição desses resíduos visa ajudar na compreensão tanto o mecanismo catalítico quanto a capacidade de polimerização da proteína. Esta nova construção de CrSept está fusionada à SUMO para ajudar em sua solubilidade, e após ser purificada por afinidade, a SUMO será clivada com SUMOprotease. A proteína será então purificada por cromatografia de exclusão molecular (SEC) para ser submetida a experimentos de cristalização. Estes serão realizados na presença de nucleotídeos (GTP e GMPPNP), utilizando o método de gota pendente (sitting drop) para análise estrutural por difração de raios X. Para estabilizar estados intermediários chave durante a cristalização, será utilizado AlF_3 (3), o que permitirá capturar configurações específicas da proteína em estados de transição e proporcionar uma visualização detalhada do arranjo atômico e da conformação de CrSept. Além disso, serão estudados os mutantes pontuais R239A e R239H, afim de avaliar a catálise e polimerização. Serão também realizados ensaios biofísicos, como medidas de dicroísmo circular (CD) e calorimetria de varredura diferencial (DSC), utilizando as diferentes construções de CrSept na presença dos nucleotídeos. Tais medidas visam determinar se alterações no sítio catalítico induzem mudanças conformacionais que impactam a eficiência da hidrólise de GTP. Finalmente, será avaliado se a variante CrSept 71-401 e os mutantes são capazes de polimerizar de maneira autônoma, sob diferentes condições experimentais, variando a concentração de NaCl e pH. Esses estudos têm o potencial de oferecer uma compreensão do papel estrutural das septinas na formação de filamentos e sua implicação em funções celulares fundamentais.

Palavras-chave: Septinas; Dedo de arginina (R-finger); Mecanismo catalítico.

Agência de fomento: CNPq (132173/2023-9)

Referências:

- 1 WEIRICH, C. S. *et al.* The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 9, p. 478-489, June 2008. DOI: 10.1038/nrm2407.
- 2 PINTO, A. P. A. *et al.* Filaments and fingers: novel structural aspects of the single septin from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Biological Chemistry**, Amsterdam, v. 292, n. 26, p. 10899-10911, June 2017. DOI: 10.1074/jbc.M116.762229.
- 3 KOZLOVA, M. I. *et al.* Common patterns of hydrolysis initiation in P-loop fold nucleoside triphosphatases. **Biomolecules**, Basel, v. 12, n. 10, p. 1345, Sept. 2022. DOI: 10.3390/biom12101345.