

## Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC 2026

# Arquitetura Oculta do Metabolismo: Como Filamentos de Glutaminase Remodelam a Mitocôndria no Câncer

**Pesquisadora Responsável:** Raquel Arminda Martinez Machado

**Coorientadora:** Sandra Martha Gomes Dias

**Unidade do CNPEM:** LN Bio

### 1. Introdução e estado da arte

O metabolismo celular está no centro da biologia do câncer — e poucas enzimas são tão estratégicas quanto a glutaminase. Responsável pela conversão de L-glutamina em L-glutamato e amônia, essa enzima sustenta processos essenciais como a produção de energia, biossíntese de macromoléculas e sinalização celular. Em células tumorais, a glutamina frequentemente atua como um combustível crítico, tornando a glutaminase um alvo de grande interesse biomédico <sup>1</sup>.

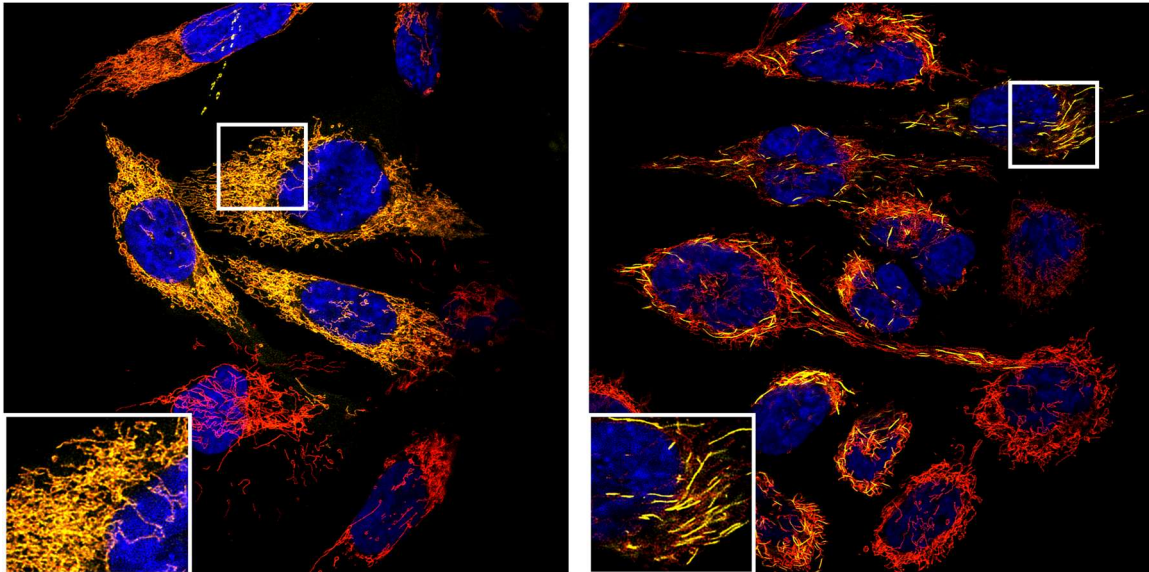
Em mamíferos, a glutaminase é codificada pelos genes **GLS** e **GLS2**, que originam isoformas com funções surpreendentemente distintas. Enquanto a isoforma GAC (derivada de GLS) está fortemente associada à progressão tumoral, as isoformas de GLS2 apresentam papéis mais complexos e dependentes do contexto celular.

Nos últimos anos, um novo paradigma emergiu: enzimas metabólicas podem formar estruturas supramoleculares, como filamentos, capazes de modular sua atividade e função celular. Nosso grupo demonstrou recentemente que filamentos de GAC se organizam em mitocôndrias sob privação de glutamina (**Figura 1**), influenciando diretamente a dinâmica mitocondrial ao impedir a fissão e favorecer a resistência à mitofagia — um fenômeno que pode ir além do metabolismo clássico<sup>2</sup>.

Curiosamente, a enzima **P5CS**, envolvida no metabolismo de prolina, também apresenta a capacidade de formar filamentos dentro de mitocôndrias sob stress nutricional <sup>3</sup>. Dados preliminares do nosso laboratório indicam que filamentos de GLS2 e P5CS pode co-localizar com filamentos de GAC em condições de estresse metabólico. Essa observação levanta uma hipótese fascinante: **os filamentos de glutaminase podem atuar como plataformas organizadoras que integram metabolismo e estrutura celular.**

O desenvolvimento deste projeto contemplará várias etapas em que o aluno de iniciação científica poderá participar, aprender, executar e gerar resultados:

- 1) Utilizar técnicas de biologia celular, incluindo cultura de células e microscopia confocal.
- 2) Validar interações proteína-proteína, técnica essencial para a compreensão de muitos processos biológicos e doenças.
- 3) Analisar a complexidade da dinâmica mitocondrial, que transcende a simples produção de energia.



**Figura 1: Filamentos de GLS em células de câncer de próstata.** Células PC3 que expressam constitutivamente GLS (amarelo) foram cultivadas por 6 horas em condição de privação de glutamina. À esquerda, o mutante R387A, que não apresenta a capacidade de filantar e à direita a expressão da proteína sem mutações. Marcação mitocondrial (vermelho). Núcleo (azul).

## 2. Objetivos

O objetivo desta proposta é validar possíveis parceiros moleculares que interajam com filamentos de GLS. Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar se filamentos de GLS2 e P5CS co-localizam com filamentos de GAC utilizando microscopia confocal.
- 2) Utilizar técnicas de validação proteína-proteína para verificar interação direta entre esta enzimas.
- 3) Verificar se esta interação afeta a dinâmica da morfologia mitocondrial.

## 3. Metodologia

### CLONAGEM DE PLASMÍDEO

Iremos clonar os genes GLS2 e P5CS humano fusionados com tag de fluorescência, em vetores para superexpressão em células de mamífero, utilizando a técnica de “In vitro assembly”<sup>4</sup>.

### CULTIVO DE CELULAR

Utilizaremos a linhagem de câncer de próstata PC3 transduzidas com os plasmídeos de interesse, utilizando diferentes tags de fluorescência. Essas células serão cultivadas em RPMI com ou sem suplementação de 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB.

### BIOTINILAÇÃO POR APROXIMAÇÃO

A validação da interação proteína-proteína será feita pela técnica de biotinylation por aproximação (BioID). Utilizaremos o vetor de GAC fusionada com a biotinylation (mini-turbo) já previamente estabelecido e validado em nosso laboratório. As células serão

co-transduzidas com o vetor de GAC e a proteína de interesse e após 48h de expressão, as células serão tratadas com e sem biotina por 30 min, para que a marcação aconteça. As células serão então lisadas com tampão RIPA e 500 ug do extrato proteico total será utilizado para captura das proteínas marcadas, utilizando beads magnéticas de streptavidina. Após várias lavagens, as proteínas ligadas às beads serão eluídas por aquecimento 10 min a 95 graus em tampão de corrida. Estas amostras serão então utilizadas para identificação das proteínas marcadas pela técnica de Western Blotting.

#### AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA MITOCONDRIAL

Para avaliarmos a dinâmica da morfologia mitocondrial, iremos utilizar as ferramentas já disponíveis em nosso laboratório como, marcadores mitocondriais (Mitotraker e Mitomays.E2C) e marcadores que regulam a dinâmica mitocondrial (DRP1 e mitofusina 1 e 2). Iremos analisar fusão e fissão das mitocôndrias utilizando microscopia confocal e análise de imagens.

#### 4. Cronograma de atividades

Atividades	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre
1) Clonagem do plasmídeo P5CS	X			
2) Avaliar co-localização dos filamentos	X			
3) Avaliar biotinição por aproximação		X		
4) Relatório parcial	X	X		
5) Avaliar morfologia mitocondrial		X	X	
6) Relatório Final				X
7) Congresso de Iniciação Científica				X

#### 5. Referências

1. Fan, Y. *et al.* Exploiting the Achilles' heel of cancer: disrupting glutamine metabolism for effective cancer treatment. *Frontiers in Pharmacology* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1345522> (2024).
2. Adamoski, D. *et al.* Molecular mechanism of glutaminase activation through filamentation and the role of filaments in mitophagy protection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01118-0> (2023) doi:10.1038/s41594-023-01118-0.
3. Ryu, K. W. *et al.* Cellular ATP demand creates metabolically distinct subpopulations of mitochondria. *Nature* **635**, 746–754 (2024).
4. García-Nafria, J., Watson, J. F. & Greger, I. H. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Sci. Rep.* **6**, (2016).