

Projeto PIBIC

Estudos Estruturais de Hemocianinas por Crio Microscopia Eletrônica de Partícula Única

Orientador: Dr. Rodrigo Villares Portugal

Unidade do CNPEM: Laboratório de Microscopia Eletrônica / Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

Introdução

A visualização de complexos biológicos macromoleculares por técnicas de microscopia eletrônica vem sendo feita há décadas, através da utilização de sais de metais pesados. Com o desenvolvimento da técnica de preparação de amostras em gelo amorfo por Jacques Dubochet e colaboradores [1] em 1984, o uso da microscopia, como ferramenta de biologia molecular estrutural, atingiu um novo patamar. O congelamento rápido da amostra evita a formação de cristais de gelo, preservando a integridade estrutural da molécula. Essa característica, aliada aos métodos de análise de partícula única, e o recente aumento do poder computacional, fez com que a Crio Microscopia Eletrônica de Partículas Únicas (crio-ME) se firmasse como uma importante técnica de biologia molecular estrutural.

A crio-ME oferece a possibilidade de obtenção de estruturas de complexos moleculares de vários MDa, sendo a técnica indicada para, em combinação com outras de mais alta resolução (tais como Cristalografia de Proteínas por Difração de Raios X, Ressonância Magnética Nuclear e Modelagem por Homologia), abordar questões que envolvam grandes complexos moleculares. A aquisição de dados é feita diretamente, através de imagens de partículas individuais, permitindo acesso às características estruturais de cada molécula em solução (gelo amorfo), em condições controladas.

Objetivo

O objetivo deste projeto é familiarizar o estudante com a técnica de crio microscopia eletrônica e análise por partícula única, para obtenção de estruturas de complexos macromoleculares. Esse projeto faz parte de uma colaboração entre o LNLS, o Instituto Butantã e o Imperial College London, que visa o estudo estrutural de hemocianinas.

Metodologia

Os complexos macromoleculares a serem submetido à análise de crio-ME serão preparados em solução a ser aplicada à grade de microscopia, em um filme fino de carbono com orifícios. A amostra ficará depositada nos orifícios, como mostra a figura 1, e em seguida congeladas em gelo amorfo, para análise no microscópio. Durante a aquisição de dados, as grades serão mantidas à temperatura de -170°C , utilizando-se um porta-amostra criogênico.

As imagens serão adquiridas digitalmente em uma câmera acoplada ao microscópio e processadas de acordo com metodologias de partícula única [2] e também novas metodologias propostas para análise de amostras heterogêneas, quando apresentarem diferentes estados conformacionais [3].

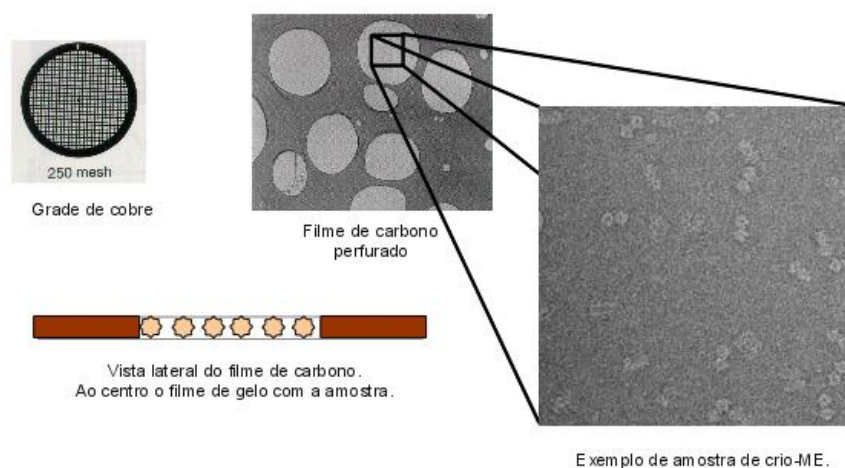


Figura 1 – Grades de microscopia utilizadas em experimentos de crio microscopia eletrônica.

Referências

- [1] Adrian M, Dubochet J, Lepault J, McDowell AW, *Nature* **308** (1984) 32-36.
- [2] Van Heel M, Gowen B, Matadeen R, Orlova EV, Finn F, Pape T, Cohen D, Stark H, Schmidt R, Schatz M, Patwardhan A, *Quat. Rev. Biophys.* **33** (2000) 307-369.
- [3] Van Heel M, Portugal R, Rohou A, Linnemayr, C, Bebeacua C, Schmidt R, Grant T, Schatz M, *International Tables for Crystallography, Vol. F.* (2011).