

Análise estrutural de complexos macromoleculares por criomicroscopia eletrônica de partículas isoladas

Dr. Rodrigo Villares Portugal – Pesquisador Responsável

Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano)

1. Introdução

A visualização de complexos biológicos macromoleculares por técnicas de microscopia eletrônica é feita há várias décadas. No fim dos anos 50, a utilização de sais de metal pesado para o preparo das amostras mostrou-se uma técnica efetiva para melhoria do contraste apresentado por imagens de macromoléculas biológicas em solução. Embora tenha introduzido um significativo avanço, essa técnica ainda apresentava sérias limitações, entre elas a possibilidade de deformação estrutural da molécula e a exposição da amostra ao ambiente de vácuo do interior do microscópio. Com o desenvolvimento da técnica de preparação de amostras em gelo amorfo por Jacques Dubochet e colaboradores [Adrian 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, mantendo-a da mesma maneira que se encontra em solução. O atual sucesso da microscopia eletrônica na biologia molecular estrutural está fortemente relacionado ao desenvolvimento dessa técnica. Com o surgimento dos métodos de Análise de Partículas Isoladas, novos microscópios eletrônicos de transmissão e o aumento do poder computacional disponível, a Crio-Microscopia Eletrônica de Partículas Isoladas (crio-ME) se firmou como uma importante técnica de biologia molecular estrutural.

Poucos anos atrás, a crio-ME de partícula única, apresentava restrições, que recentemente foram superadas. O tamanho das moléculas passíveis de análise era tipicamente da ordem de MDa, não sendo possível resolver estruturas de tamanho inferior a várias centenas de kDa. As estruturas obtidas pela técnica possuíam resolução de alguns nanômetros, tornando necessária a combinação de técnicas de alta resolução para qualquer tipo de análise. Além disso, amostras heterogêneas inviabilizavam o tratamento de dados ou introduziam uma séria diminuição de resolução, em função da diversidade de estados presentes.

Esse cenário mudou radicalmente nos últimos anos. O tamanho dos complexos com estruturas resolvidas por crio microscopia eletrônica (crio-ME) de partículas isoladas é hoje limitado a pouco mais de 100 kDa e a resolução obtida para complexos estáveis é tipicamente inferior a 4Å, tendo estruturas resolvidas com resolução próxima a 2Å. Subramaniam e colaboradores apresentaram uma estrutura de 2,2 Å de resolução, obtida inteiramente por criomicroscopia de partículas isoladas [Bartesaghi 2015], como mostra a Figura 1. Mais importante, a possibilidade de se trabalhar com amostras heterogêneas é hoje uma realidade, sendo este um importante diferencial com relação a outras técnicas de biologia estrutural.

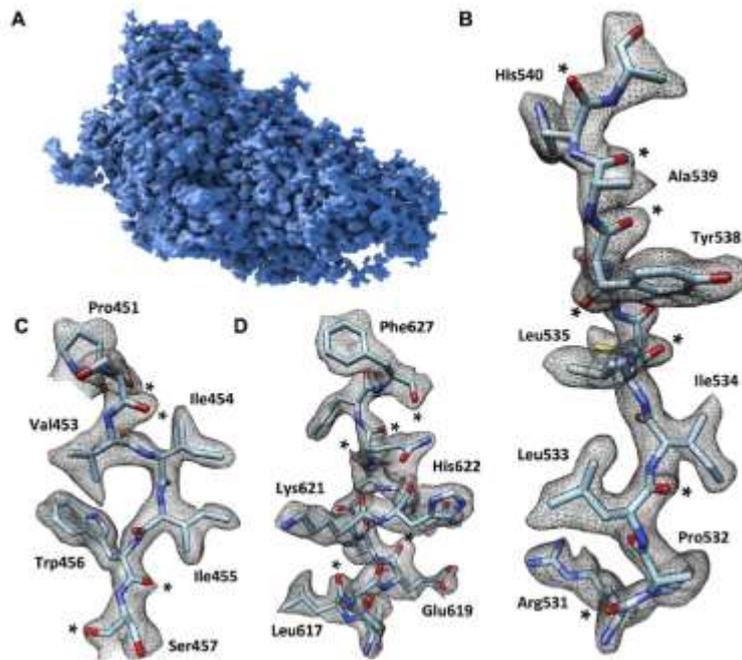


Figura 1. Detalhes da estrutura de beta-galactosidase obtida por criomicroscopia eletrônica de partículas isoladas a uma resolução de 2,2Å. (extraído de [Bartesaghi 2015]).

A flexibilidade das macromoléculas, ou a existência de diferentes complexos, faz com que uma mesma amostra, analisada no microscópio, possa ter diferentes estruturas da macromolécula presentes. Sendo assim, a existência de diferentes conformações, ou estruturas, está ligada à dinâmica da proteína, podendo também estar associada à ligação de outras moléculas ou peptídeos. Várias metodologias vêm sendo propostas para se lidar com a necessidade de obter estruturas de dois ou mais complexos existentes na mesma amostra, sem a necessidade de separá-los para a aquisição de dados [Klaholz 2004; Penczek 2006; Leschziner 2007; van Heel 2012, Scheres 2012]. Metodologias recentes para obtenção de alta resolução se baseiam em métodos estatísticos, principalmente *Maximum Likelihood and Bayesian approach* [Scheres 2012], tornando o processamento dos dados uma tarefa intensa em termos computacionais. O responsável por este projeto, e colaboradores, sugeriram uma nova metodologia não derivada das abordagens em uso corrente para obtenção de estruturas de alta resolução (eLife (2016), submetido), chamada de Alinhamento Por Classificação (ABC – Alignment By Classification). Há várias questões em aberto nessa metodologia, em particular, a necessidade de se trabalhar com populações heterogêneas de dados.

2. Objetivo

Este projeto tem como objetivo a avaliação do desempenho da técnica de processamento de Alinhamento por Classificação para resolução estrutural de complexos poliméricos que possuam variabilidade conformacional.

3. Metodologia

Serão utilizadas conjuntos de dados, obtidos pela técnica de criomicroscopia eletrônica no grupo de criomicroscopia, de proteínas de interesse, que apresentem variabilidade conformacional. Utilizando-se softwares dedicados, o aluno aprenderá o processamento de dados de partículas isoladas [van Heel, 2012] assim como a nova metodologia a ser avaliada. O grupo de criomicroscopia possui um cluster de computadores no qual os dados serão processados. Havendo interesse e disponibilidade do aluno, o mesmo poderá ser treinado e acompanhar o preparo de amostras de criomicroscopia e coleta de dados.

Referências

- Adrian M, Dubochet J, Lepault J, McDowell AW, *Nature* **308** (1984) 32-36.
Klaholz BP, Myasnikov AG & van Heel M, *Nature* **427** (2004) 862-865 (especially: Supp. Info).
Leschziner AE & Nogales E, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36** (2007) 43-62.
Penczek PA, Frank J, Spahn CMT, *J. Struct. Biol.* **154** (2006) 184-194.
Scheres SHW. *J. Mol. Biol.* **415** (2012) 406-418.
Van Heel M, Portugal R, Schatz M, In: *Electron Microscopy in Life Science – An Electronic Textbook* (2009).
Van Heel M, Portugal R, Rohou A, Linnemayr, C, Bebeacua C, Schmidt R, Grant T, Schatz M, *International Tables for Crystallography, Vol. F.* (2012).
Bartesaghi, A, Merk, A, Banerjee, S, Mathies, D, Wu, X, Milne, JLS, Subramaniam, S, *Science* (2015), 1-8, DOI:10.1126/science.aab1576