Tomografia eletrônica criogênica de nanopartículas porosas

Pesquisador responsável: Marcelo Alexandre de Farias

Unidade do CNPEM: Laboratório Nacional de Nanotecnologia – LNNano

1 INTRODUÇÃO

A tomografia eletrônica criogênica (cryo-ET) é uma técnica de imageamento tridimensional utilizada para obter reconstruções estruturais em alta resolução de macromoléculas em seu estado nativo (in situ) [1,2]. Esta habilidade de visualizar as macromoléculas em seu estado nativo, faz com que a cryo-ET seja uma ferramenta crucial para estudar a estrutura de uma grande variedade de amostras biológicas, tais quais: vírus, ultraestrutura bacteriana, motores moleculares, seções de células, etc. Além disto, outras áreas como a ciência dos materiais, nanomedicina, etc, também se aproveitam desta dimensão extra em suas pesquisas. Neste contexto, nanopartículas diversas, coloides, polímeros, sistemas auto-organizados, micelas, lipossomos, entre outros, são exemplos de amostras que vêm sendo estudadas por cryo-ET.

Durante a análise por cryo-ET, a amostra é sequencialmente inclinada e imageada em diferentes ângulos em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM), obtendo assim, uma série tomográfica desta amostra. Tipicamente esta série tomográfica é adquirida em câmeras CMOS e as inclinações da amostra ocorrem entre os ângulos de -70° até +70°. Então, o volume 3D (i.e. tomograma) é reconstruído a partir do conjunto de projeções 2D adquiridas da amostra congelada. Com resoluções tipicamente entre 3-20 nm, a técnica de cryo-ET é capaz de preencher lacunas que vão desde a imagem de células vivas, até estruturas de resolução atômica [3,4].

O preparo de amostras para cryo-ET envolve a vitrificação da mesma, a qual tipicamente é feita por plunge-freezing (i.e. congelamento por imersão) ou high pressure freezing (congelamento sob alta pressão). No LNNano/CNPEM, a vitrificação de amostras é feita via congelamento por imersão. Neste método, a grade de microscopia eletrônica de transmissão é rapidamente mergulhada em um líquido criogênico (e.g. etano líquido) resfriado por nitrogênio líquido, congelando instantaneamente a amostra. A amostra congelada é conduzida ao TEM, sendo mantida a pelo menos -170 °C durante toda a análise.

Recentemente, análises de tomografia eletrônica de nanotubos de carbono e de nanopartículas de sílica mesoporosas vêm sendo conduzidas na Divisão de Caracterização do

LNNano/CNPEM, visando a determinação estrutural tanto dos nanotubos de carbono e quanto dos poros das nanopartículas de sílica mesoporosas. Nanotubos de carbono são partículas modelo para diversos grupos de estudo, enquanto que nanopartículas de sílica mesoporosas vêm sendo muito utilizadas como agentes carregadores de drogas. Avanços utilizando cryo-ET nestes sistemas, permitirão tanto estudar a interação de nanotubos de carbono com meios biológicos, quanto avaliar a morfologia e interconectividade dos poros das nanopartículas de sílica mesoporosas para o carregamento adequado da droga.

2 OBJETIVO

O objetivo deste projeto está na geração sistemática de dados de tomografia eletrônica criogênica de nanopartículas porosas.

2.1 - Objetivos específicos

- Elaborar protocolo para aquisição de dados de tomografia eletrônica criogênica;
- Reconstruir estruturas tridimensionais de nanotubos de carbono e de nanopartículas de sílica mesoporosas.

3 METODOLOGIA

O projeto se divide basicamente em 4 etapas: (i) deposição dos fiduciais em grades de microscopia eletrônica de transmissão, (ii) preparo criogênico das amostras, (iii) aquisição da série tomográfica no microscópio eletrônico de transmissão e (iv) processamento dos dados adquiridos.

(i) A deposição adequada dos fiduciais é crucial para a etapa final de processamento dos dados. Os fiduciais são utilizados para realizar o alinhamento preciso das imagens obtidas em diferentes ângulos durante a série tomográfica. A técnica de microscopia eletrônica de transmissão será utilizada para verificar a qualidade da distribuição dos fiduciais depositados;

(ii) As amostras serão preparadas de acordo com a metodologia já estabelecida no grupo. Tipicamente, a grade de microscopia eletrônica é conduzida ao processo de glow discharge, e de congelamento em gelo amorfo (crio preparação). Serão utilizadas amostras de nanotubos de carbono e de nanopartículas de sílica mesoporosa;

(iii) As séries tomográficas de -70°/+70° serão adquiridas com passo de 2°. Condições ópticas para aquisição dos dados serão definidas durante a análise, de acordo com a

tolerância da amostra ao feixe de elétrons (i.e. limite de dose total depositada antes de haver dano na amostra causado pelo feixe de elétrons);

(iv) O processamento dos dados de tomografia de elétrons consiste basicamente no alinhamento (i.e. alinhar as imagens a um eixo comum de rotação), reconstrução (i.e criar um volume a partir das imagens 2D) e segmentação (i.e. agrupar pixels/voxels em subconjuntos de interesse).

O bolsista terá assistência completa durante todas as etapas metodológicas. As etapas ii e iii serão majoritariamente conduzidas pelo pesquisador responsável. Entretanto, havendo interesse e disponibilidade por parte do bolsista, o mesmo poderá ser treinado e acompanhar o preparo e análise de amostras de criomicroscopia.

REFERÊNCIAS

[1] Dunstone, M.A., de Marco, A. Cryo-electron tomography: an ideal method to study membrane-associated proteins. Phil. Trans. R. Soc. B, 372 (**2017**) 20160210. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0210

[2] Englmeier, R., Förster, F. In Situ Studies of Mitochondrial Translation by Cryo-Electron Tomography. In: Minczuk M., Rorbach J. (eds) Mitochondrial Gene Expression. Methods in Molecular Biology, vol 2192. (**2021**). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0834-0_18

[3] Chen, M., Bell, J.M., Shi, X. Sun, S. Y., Wang, Z., Ludtke S. J. A complete data processing workflow for cryo-ET and subtomogram averaging. Nat Methods 16, (**2019**) 1161–1168. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0591-8

[4] Miao, J., Ercius, P., Billinge, S. J. L. Atomic electron tomography: 3D structures without crystals. Science, 353, (**2016**), aaf2157. https://doi.org/10.1126/science.aaf2157