

Desenvolvimento e Padronização de Sondas de DNA para Microscopia de Super-Resolução Aplicado ao Estudo dos Nucleóides Mitocondriais

Pesquisador Responsável: Thayná Mendonça Avelino
Laboratório Nacional de Biociências (LN Bio) - CNPem

1. Introdução:

O DNA mitocondrial (mtDNA) ou nucleóides mitocondriais, são estruturas altamente dinâmicas que desempenham um papel crucial na regulação da função mitocondrial e do metabolismo celular. Diferentemente do genoma nuclear, o mtDNA é compactado em nucleóides que não possuem histonas, dependendo, em vez disso, de proteínas como o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) para sua organização (1).

A estrutura, o número e a distribuição desses nucleóides variam entre diferentes tipos celulares e estados metabólicos, mas sua organização espacial exata e os mecanismos regulatórios envolvidos ainda não são completamente compreendidos (2,3). Estudos recentes sugerem que a posição dos nucleóides dentro das mitocôndrias não é aleatória e pode ser influenciada por fatores como a dinâmica mitocondrial, o potencial de membrana e o fluxo metabólico (4-6).

Embora muitos avanços tenham sido alcançados no entendimento dos mtDNAs, as técnicas de imagem empregadas apresentam limitações para capturar, com alta resolução, a organização e a dinâmica dos nucleóides em nível de célula única (7). A microscopia de super-resolução superou o limite de difração de Abbe (11,12), explorando as propriedades fotofísicas das sondas fluorescentes, que precisam atender a requisitos específicos para essa técnica. Na nanoscopia STED (do inglês *stimulated emission depletion microscopy*), a super-resolução é obtida por meio da depleção seletiva de fluoróforos excitados usando um feixe de depleção com núcleo oco. Para essa abordagem, as sondas ideais devem possuir alta foto estabilidade, capacidade de depleção no comprimento de onda adequado, baixa excitabilidade indesejada e biocompatibilidade (11).

Avanços recentes em microscopia STED (9), combinado ao uso de sondas para mapeamento de cromatina (*Oligopainting*) (10), possibilitam agora a visualização de estruturas cromatínicas em resolução subdifrativa, essas novas abordagens abrem caminho para um entendimento mais aprofundado da organização dos nucleóides. Diante desse cenário, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de sondas de DNA (*oligoprobes*) compatíveis com STED que permitirão um mapeamento preciso da organização e da dinâmica dos nucleóides mitocondriais, com potencial aplicação para outros mapeamentos de conformacionais de ácidos nucleicos.

2. Estado da Arte:

Atualmente, as abordagens mais avançadas para estudar nucleóides incluem microscopia eletrônica e técnicas de super-resolução, como dSTORM e PALM, que oferecem alta resolução, mas dependem de protocolos complexos de marcação e análise de dados. A microscopia STED tem se destacado como uma ferramenta promissora, pois permite a obtenção de imagens com resolução subdifrativa sem a

necessidade de reconstrução computacional, sendo uma abordagem mais direta e precisa.

Apesar desses avanços, a eficácia da microscopia STED para o estudo de nucleóides mitocondriais ainda é limitada pela falta de sondas fluorescentes adequadas. As sondas baseadas em DNA (*Oligopaint* ou *Oligoprobes*), amplamente utilizadas para mapeamento da cromatina nuclear, apresentam potencial para marcação específica do DNA mitocondrial, mas ainda não foram otimizadas para aplicações desse tipo aplicada a microscopia STED. O desenvolvimento de sondas *Oligopaint* compatíveis com STED permitirá um mapeamento mais preciso da organização e dinâmica dos nucleóides, superando as limitações das técnicas atuais e proporcionando novos insights sobre a regulação mitocondrial.

3. Objetivos:

O objetivo deste projeto é desenvolver, padronizar e validar sondas fluorescentes de DNA para a marcação do DNA mitocondrial, otimizadas para microscopia de super-resolução STED. Especificamente, buscamos:

- a) Projetar e sintetizar sondas *Oligopaint* específicas para DNA mitocondrial, garantindo especificidade e eficiência na hibridização ao mtDNA.
- b) Avaliar as propriedades fotofísicas e fotostabilidade das sondas para garantir compatibilidade com STED.
- c) Testar diferentes estratégias de marcação em células e protocolos de preparação de amostras para minimizar artefatos e otimizar a resolução obtida.

4. Metodologia

Para atingir os objetivos propostos, o projeto será desenvolvido nas seguintes etapas:

- a) Design e síntese das sondas de DNA:
Seleção de sequências-alvo no mtDNA considerando acessibilidade estrutural e eficiência de hibridização. Síntese e marcação das sondas com fluoróforos adequados para STED, garantindo compatibilidade espectral com os sistemas de excitação e depleção.
- b) Caracterização das propriedades fotofísicas das sondas:
Análises de espectroscopia de fluorescência para determinar fotostabilidade e eficiência de depleção dos fluoróforos em condições de STED. Ensaios de especificidade e eficiência de marcação em células fixadas, verificando a colocalização com proteínas mitocondriais marcadas.
- c) Otimização do protocolo de microscopia STED para nucleóides mitocondriais:
Teste de diferentes condições de fixação e hibridização para minimizar perda de sinal ou artefatos. Aquisição de imagens em microscópio STED, ajustando parâmetros de depleção e análise para otimizar a resolução espacial.

5. Cronograma

Atividade	set/25	out/25	nov/25	dez/25	jan/26	fev/26	mar/26	abr/26	mai/26	jun/26	juI/26	ago/26
1. Design e síntese das sondas Oligopaint	●	●	●									
2. Caracterização das propriedades fotofísicas das sondas		●	●	●	●							
3. Testes em células fixadas			●	●	●	●						
4. Otimização dos protocolos de microscopia STED				●	●	●	●	●				
5. Aquisição e análise de imagens de nucleóides mitocondriais						●	●	●	●	●		
6. Relatório parcial e ajustes metodológicos						●	●					
7. Interpretação dos dados e ajustes finais								●	●	●		
8. Redação e submissão do relatório final									●	●	●	●

6. Referências:

- 1) Kukat C, Wurm CA, Spähr H, Falkenberg M, Larsson NG, Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *PNAS*. 2011;108(33):13534-13539.
- 2) Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem*. 2008;283(6):3665-3675
- 3) Filograna R, Mennuni M, Alsina D, Larsson NG. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more, the better? *FEBS Lett*. 2021;595(8):976-1002
- 4) Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson NG. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85:133-60. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014402.
- 5) Lewis SC, Uchiyama LF, Nunnari J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science*. 2016 Jul 15;353(6296):aaf5549. doi: 10.1126/science.aaf5549.
- 6) Isaac RS, Tullius TW, Hansen KG, Dubocanin D, Couvillion M, Stergachis AB, Churchman LS. Single-nucleoid architecture reveals heterogeneous packaging of mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2024 Mar;31(3):568-577. doi: 10.1038/s41594-024-01225-6.
- 7) Bonekamp NA, Larsson NG. SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell*. 2018 Jan 11;172(1-2):388-388.e1. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.039. PMID: 29328920.
- 8) Kakudji EV, Lewis SC. Mitochondrial nucleoids. *Current Biology*. 2024 Nov 4;34(21):R1067-R1068. doi: 10.1016/j.cub.2024.09.078. PMID: 39500273.
- 9) Hell, S.W.; Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett*. 1994, 19, 780–782.
- 10) Beliveau BJ, Apostolopoulos N, Wu CT. Visualizing genomes with Oligopaint FISH probes. *Curr Protoc Mol Biol*. 2014 Jan 6;105:Unit 14.23. doi: 10.1002/0471142727.
- 11) Jeong S, Widengren J, Lee JC. Fluorescent Probes for STED Optical Nanoscopy. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Dec 22;12(1):21. doi: 10.3390/nano12010021.
- 12) Huang B, Babcock H, Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell*. 2010 Dec 23;143(7):1047-58. doi: 10.1016/j.cell.2010.12.002.