

Nº 19, dez/97, p.1-4

ANÁLISE DA ESTRUTURA DA GLUTAMINA SINTETASE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA: PRIMEIROS RESULTADOS.

Paulo Sergio de Paula Herrmann¹
Jane Frommer²
Luiz Alberto Colnago¹

A microscopia de força atômica (AFM) foi introduzida em 1986 como uma ferramenta para obtenção de imagens de materiais não condutores em escala atômica (WIESENDANGER, 1994). Por isso rapidamente começou a ser utilizada na obtenção de imagens de materiais biológicos como proteína, DNA, vírus, bactérias, células animais e vegetais, etc. A principal vantagem do método para análise de materiais biológicos é a simplicidade de se obter imagens mesmo em meio aquoso, que é um meio similar ao ambiente fisiológico.

Há vários trabalhos que têm demonstrado a potencialidade da técnica de AFM na caracterização de proteínas principalmente em cristais ou estrutura ordenadas.

Neste estudo usou-se a microscopia de força atômica na análise da estrutura da proteína glutamina sintetase isolada. É uma enzima envolvida no processo de fixação de nitrogênio e fotorespiração (KOZAKI & TAKEBA; 1996). É responsável pela catálise da reação entre amônia e ácido glutâmico, gerando a glutamina. A proteína possui 12 subunidades com ponto isoelétrico de 6,12. Possui formato hexagonal com dois anéis sobrepostos um sobre o outro. Cada unidade possui peso molecular de 51772 Da, com uma seqüência de 468 aminoácidos.

As imagens foram obtidas no laboratório de microscopia de AFM do centro de pesquisa da IBM, no Almaden Research Center, em San Jose, CA, USA. O sistema utilizado foi um microscópio Nanoscope III, do tipo multimodo, fabricado pela Digital, Santa Barbara, CA, USA. A técnica utilizada para obtenção das imagens, foi a de contato periódico (Tapping mode)-reduz os efeitos da força lateral sobre a amostra-utilizando cantiléver e agulha de Silício com freqüência de ressonância de 345 Khz e constante de mola em torno de 16 N/m.

A Glutamina Sintetase liofilizada (EC 6.3.1.2) de E.Coli W, adquirida da Sigma, foi diluída em uma solução de 10^{-4} M de NaCl. Para análise no ar, as amostras foram preparadas depositando-se uma gota da solução de proteína sobre

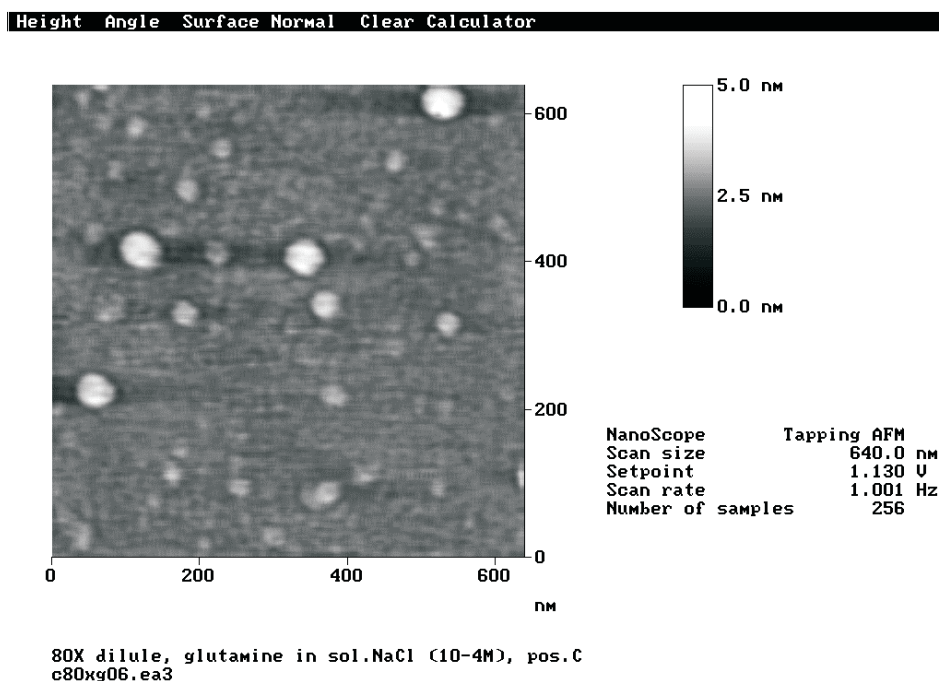
¹ Pesquisadores Embrapa Instrumentação Agropecuária. Caixa Postal 741, São Carlos-SP, CEP 13560-970

² Pesquisadora IBM Almaden Research Center. Harry Road 605, San Jose-CA, USA

PA/19, CNPDIA, dez/97, p.2

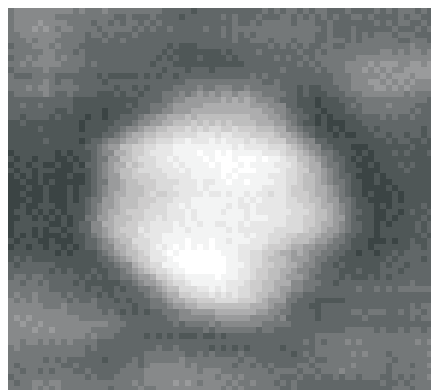
uma lâmina de mica, recentemente clivada. Após 1 minuto a lâmina foi lavada com água de Milli-Q e colocada em dissecador. Para obtenção da imagem em meio líquido, a solução de Glutamina Sintetase foi injetada em uma célula para solução, usando mica como substrato.

Foram obtidas dezenas de imagem das amostras preparadas com glutamina sintetase. Na figura 1 (a) tem-se uma imagem da proteína analisada numa área de 640 nm X 640 nm. A altura máxima ficou em torno de 5 nm. A figura 1 (b) é expansão da imagem de uma das biomoléculas, (90nm X 90nm). Na figura 2 tem-se a Glutamina, obtida com dados de difração de raio-X, com dimensões de : 14,5 nm X 14,5 nm X 4,5 nm. Pode se observar a estrutura hexagonal da proteína em ambos os métodos de análise (AFM e difração de raio X).



Height

(a)



(b)

Figura 1. Imagens glutamina sintetase, mostrando na parte (a) a topografia em 640 nm X 640 nm obtida com AFM, resolução da imagem é de 2,5 nm; (b) aumento, com uma única biomolécula (90 nm X 90 nm) da mesma imagem

PA/19, CNPDIA, dez/97, p.3

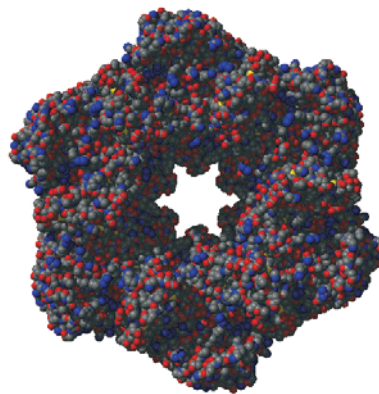


Figura 2. Estrutura da proteína através de difração de raio-X (cristalografia).

A técnica permite extrair informações quantitativas através da análise da imagem da amostra, visto que um plano topográfico é obtida da mesma. A figura 3 possibilita observar valores da distância horizontal de cada molécula, na mesma distância vertical para ambas. O valor obtido, na distância horizontal, (24,0 nm) é maior do que a dimensão conhecida para a cristalografia (14,5 nm). Isto se deve basicamente a convolução do tamanho e formato da agulha sobre a amostra.

No nível de resolução que obtivemos é possível conhecer a conformação da estrutura da proteína. Esta técnica também possibilitará estudar os mutantes desta mesma proteína e a atividade enzimática.

Apesar da potencialidade, a técnica de AFM, precisa ainda do desenvolvimento de metodologias de preparação de amostras, como também do melhor conhecimento dos processos envolvidos na interação entre agulha e amostra.

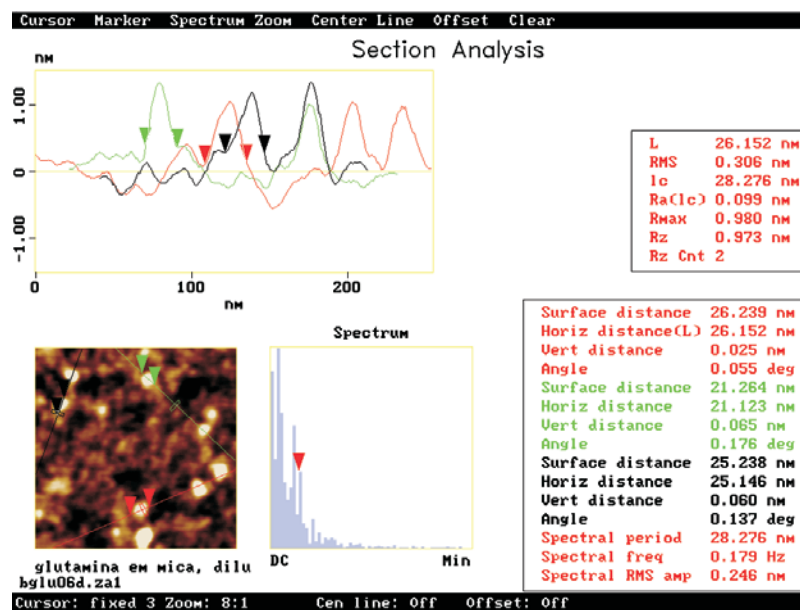


Figura 3. Análise quantitativa do perfil da imagem, através da obtenção do perfil das proteínas. No detalhe pode ser visto três medidas realizadas em distintas posições.

PA/19, CNPDIA, dez/97, p.4

Apresentou-se neste trabalho aspectos experimentais na utilização do método de microscopia de força atômica para obtenção de imagem de proteína, no caso específico a Glutamina Sintetase. A pesquisa que está em andamento no Centro de Instrumentação da EMBRAPA está permitindo criar uma metodologia própria para estudos de proteína de interesse agropecuário, como também outros biomateriais.

Referências Bibliográficas

- WIESENDANGER, R. **Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy**. Cambridge University Press, Cambridge, 1994
- KOZAKI, A.; TAKEBA, G. Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. **Nature**, v. 384, p.557-560, DEC. 1996