



Crio microscopia elettronica per determinare la struttura di macromolecole complesse

Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes

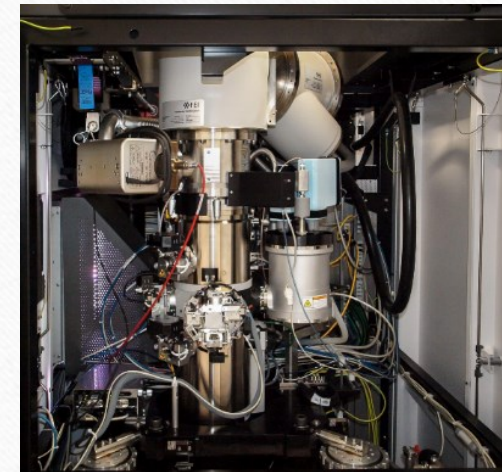
Alessandra Sophia Montanari
Docente: Paolo Mariani

Anno accademico 2019/2020

LE ORIGINI

Parte tutto da Antoni Van Leeuwenhoek, con il suo primo microscopio rudimentale ma funzionale, per arrivare poi al microscopio ottico ed infine al microscopio elettronico.

In tempi più recenti, si è sviluppato il super microscopio da premio Nobel che sfrutta la tecnica della criomicroscopia.



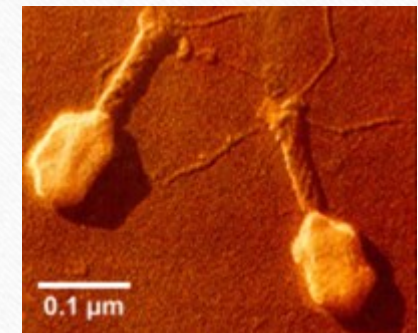
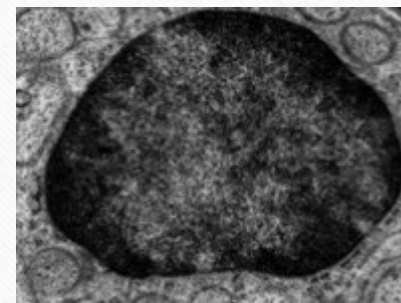
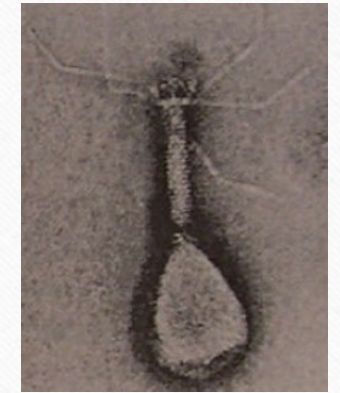
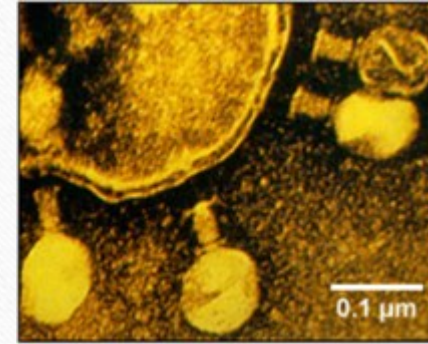
TUTTO STA NEL SUPERARE I LIMITI



La preparazione di campioni per la microscopia tradizionale prevede:

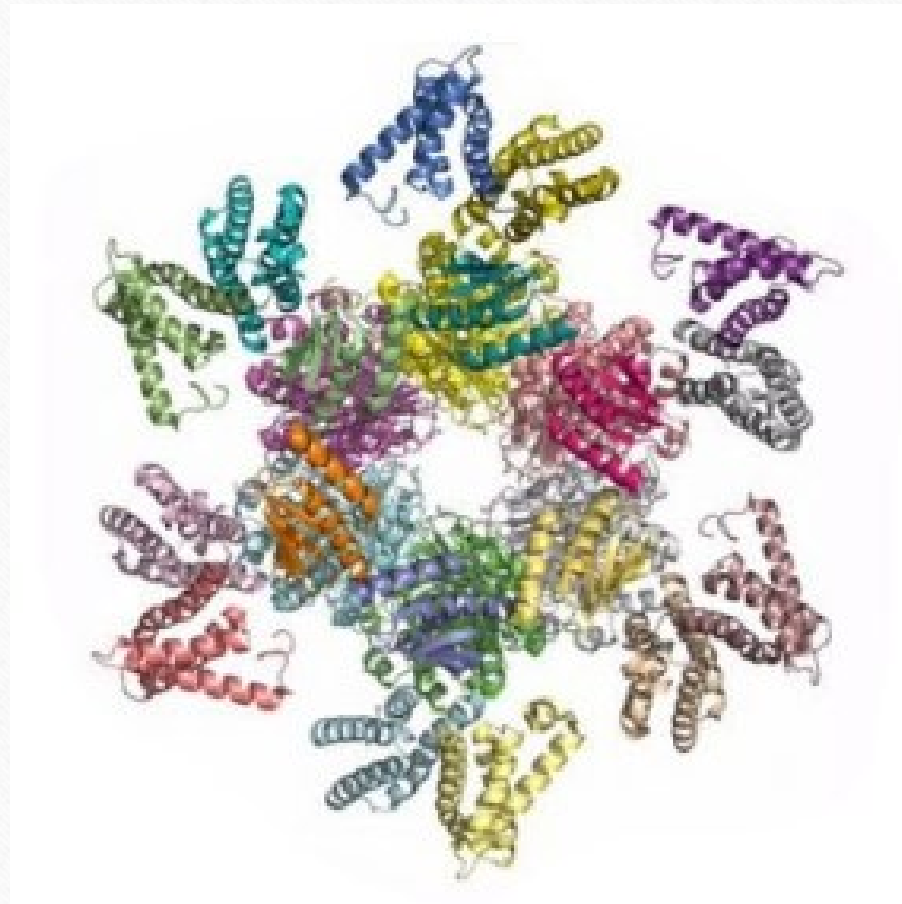
- 1) Prelievo
- 2) Dissezione
- 3) Fissazione chimica o fisica
- 4) Inclusione del campione
- 5) Taglio
- 6) Posizionamento su vetrino
- 7) Colorazione
- 8) Montaggio del vetrino

La colorazione dei campioni può essere positiva, se si usano sali pesanti e appare un'immagine scura su fondo chiaro, negativa se il campione rimane incolore o si può usare la tecnica dell'ombreggiatura, dove si ha come risultato finale un'immagine con delle aree più scure che appaiono come ombre, aiutando a percepire lo spessore. Purtroppo però la colorazione o l'essiccazione possono produrre artefatti che portano anche a limitare la risoluzione finale.



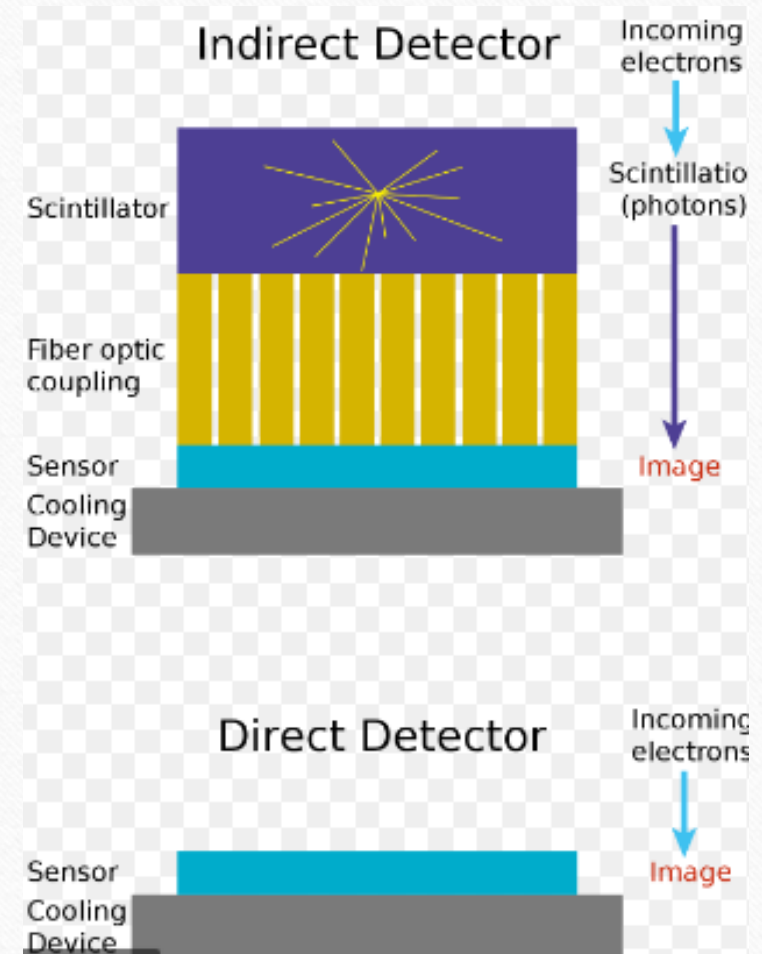
ACQUA VETRIFICATA

Partendo dagli studi di Henderson che ottenne grandi risultati ma non applicabili universalmente, Dubochet arrivò alla soluzione, usando quella che viene detta acqua vetrificata, o vetrosa, dove l'acqua viene congelata in modo così rapido da permetterle di mantenere la forma disordinata che ha allo stato liquido, in modo da non rappresentare un ostacolo, ma un aiuto prezioso.



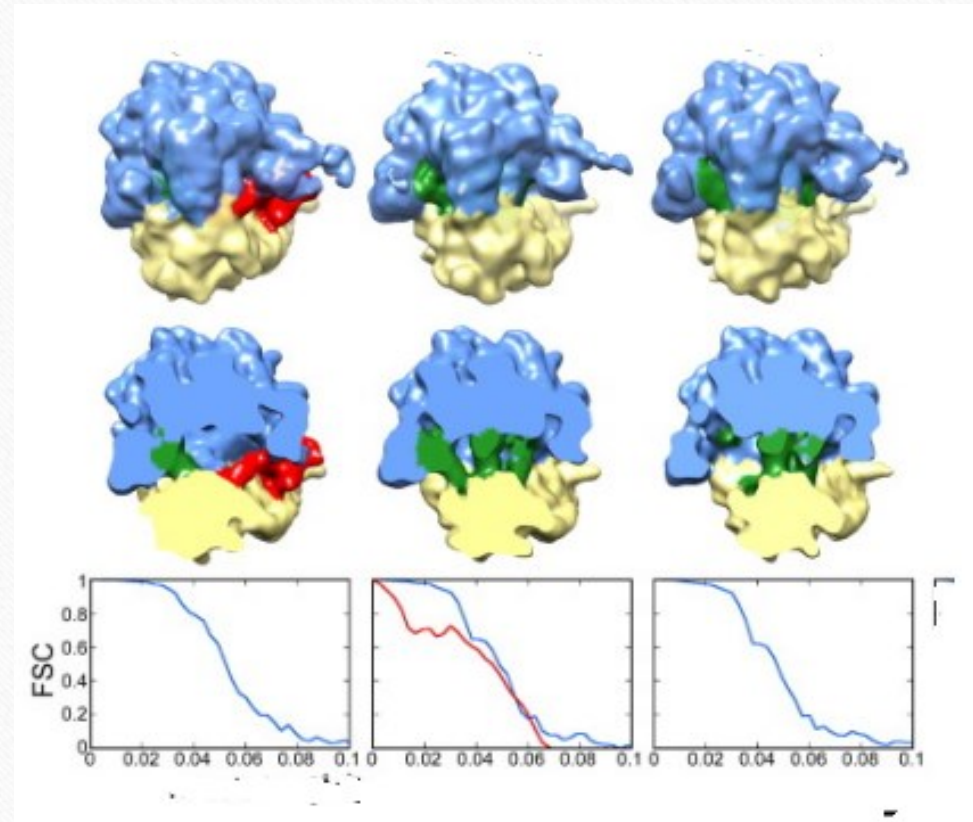
SVILUPPI RECENTI NELLA CRIO MICROSCOPIA

Lo sviluppo di rivelatori di elettroni diretti ha permesso di risolvere il problema della perdita di risoluzione e sensibilità, in modo che il movimento del campione dovuto a varie cause, e il tempo di esposizione del campione non fossero più un limite nella ricerca scientifica.



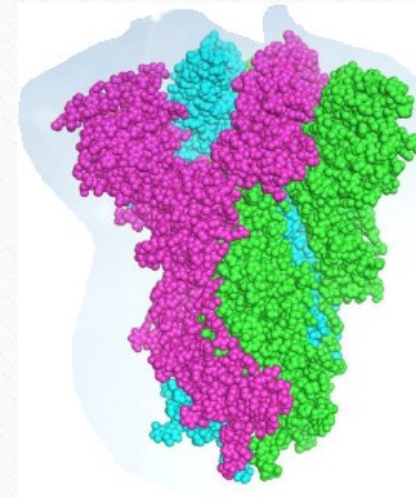
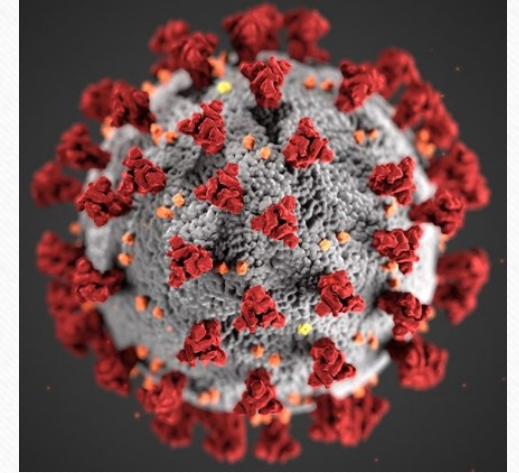
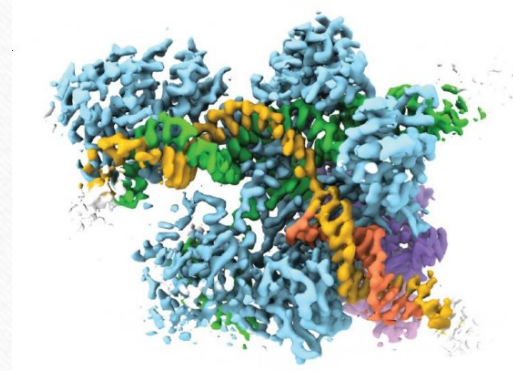
E' TUTTO COLLEGATO

Non solo la tecnica è rivoluzionaria, ma è anche accompagnata da un diverso approccio alla lettura dei dati, che sfrutta la statistica Bayesiana e si avvale di software all'avanguardia come Relion e FREALING.



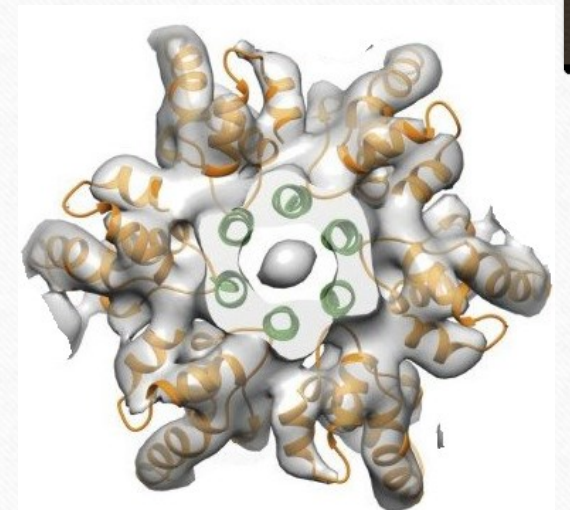
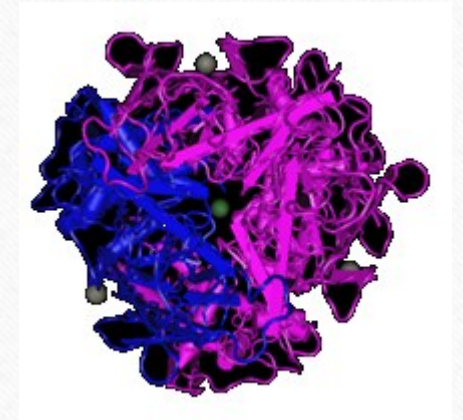
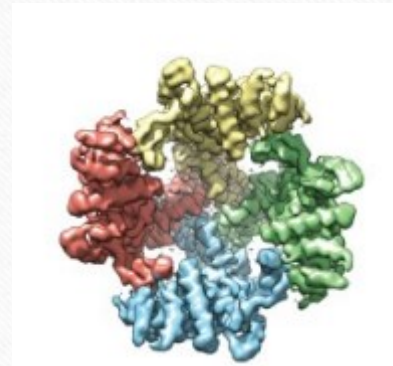
A condizione che vi sia una buona distribuzione degli orientamenti di visualizzazione, si può ottenere una prima ricostruzione 3D della molecola.

Una volta assegnati gli orientamenti e ricostruita una prima mappa 3D, può essere perfezionata mediante ulteriori cicli di analisi di linee comuni o corrispondenza della proiezione con una ricerca angolare più precisa. Un approccio più recente per la raffinatezza si basa appunto su algoritmi di verosimiglianza e analisi bayesiane nei quali le particelle non sono assegnate a una singola classe, ma sono considerate come una distribuzione di probabilità di appartenenza.



ESEMPI RECENTI DI STRUTTURE BIOLOGICHE DETERMINATE TRAMITE ANALISI DI SINGOLE PARTICELLE

- 1) Rotavirus, un virus a rna
- 2) Il canale ionico TRPV1, un sensore che contribuisce alla sensazione di dolore
- 3) La poliproteina GAG, la principale proteina precursore dei retrovirus



BIBLIOGRAFIA

- 2) Microscopio Van Leeuwenhoek, microscopio ottico, microscopio elettronico, crio microscopio, fonte: microbiologiaitalia.it
- 3) Vetrini colorati, fonte: onlinescuolazanichelli.it
- 4) Immagini colorate di batteriofagi e batteri, fonte: microbiologiaitalia.it
- 5) Molecola osservata al criomicroscopio, fonte: biopilss.net
- 6) Differenza fra rilevazione diretta e indiretta, fonte: sciencedirect.it
- 7) Schermata Relion, fonte: sciencedirect.it
- 8) Molecole 3d, tra cui il coronavirus, fonte: lastatalenews.it
- 9) Rotavirus, canale ionico TRPV1, poliproteina GAG al criomicroscopio elettronico, fonte: ncbi

RIASSUNTO

Nella tesi trattata è stata introdotta una breve parte sulla storia del microscopio, dalle origini fino ad oggi, sono stati spiegati i principali problemi che hanno portato alcuni studiosi ad interrogarsi sullo sviluppo di tecniche innovative per aiutare la ricerca scientifica.

Il metodo rivoluzionario si basa sull'uso di una tecnica che comprende il raffreddamento molto veloce di una molecola di acqua, detta vetrificata, in modo da proteggere la molecole biologica dai danni causati dal fascio di elettroni ma, allo stesso tempo, la velocità di raffreddamento repentina le impedisce di formare dei cristalli che potrebbero rappresentare un ostacolo nella risoluzione finale, parallelamente a questa tecnica sono stati introdotti nuovi Software che coadiuvano la ricerca usando un nuovo approccio basandosi sulle probabilità e sulla statistica Bayesiana.

La degna conclusione di questa scoperta è stata data dalla vittoria di Jacques Dubochet, Joachim Frank e Richard Henderson del premio Nobel per la chimica nel 2017.