



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL' AMBIENTE
CORSO DI LAUREA : SCIENZE BIOLOGICHE

MICROSCOPIA CRYO-EM E SPLICING

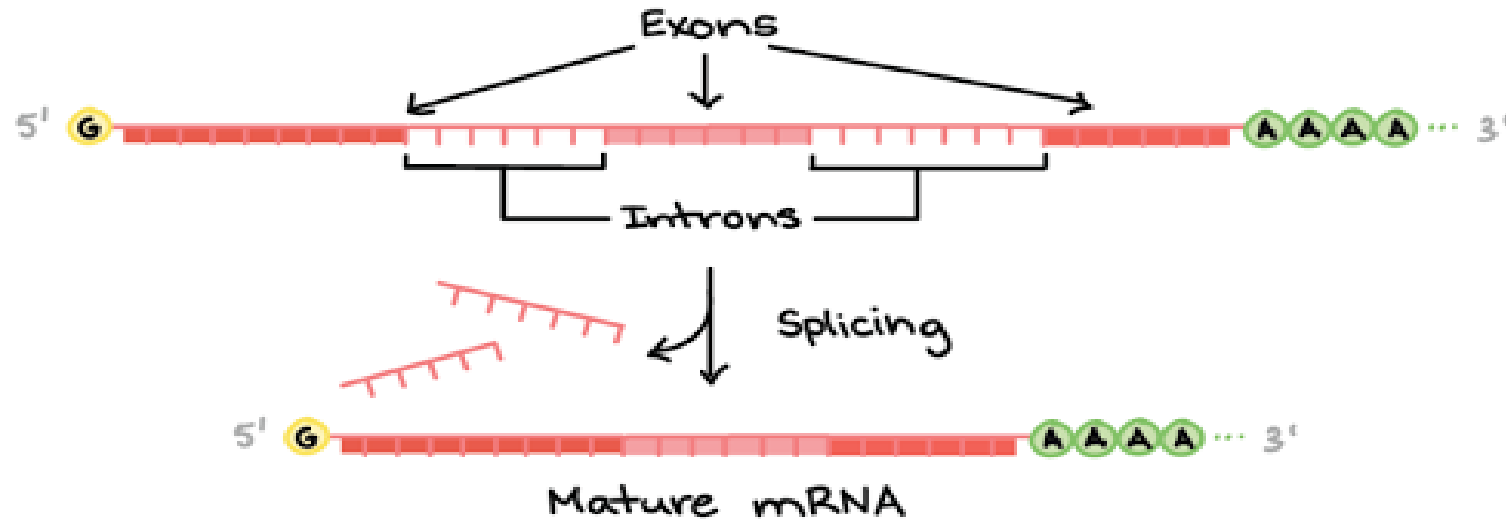
CRYO-EM MICROSCOPY AND SPLICING

Tesi di laurea di :
Fiorentini Lorenzo

Docente referente :
La Teana Anna

Sessione : maggio 2021
Anno Accademico : 2020-2021

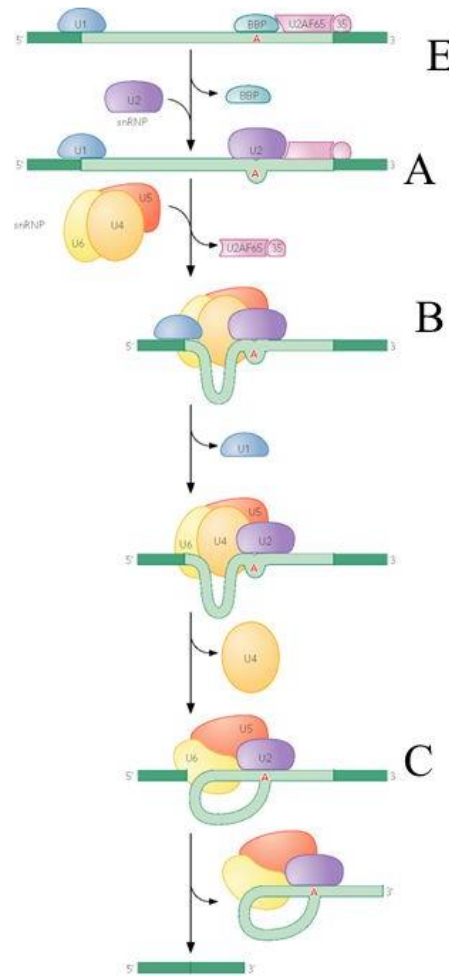
Lo Splicing



Lo splicing è un processo di maturazione dell' mRNA che consiste nella rimozione degli introni e nell' unione degli esoni del trascritto primario , le altre fasi della maturazione sono il capping e la poliadenilazione . Il complesso che svolge tale processo è lo spliceosoma .

LO SPLICEOSOMA

Nel corpo dell'articolo vengono citate tutte le operazioni eseguite dallo spliceosoma, e le varie conformazioni che assume. Inizialmente c'è la fase di riconoscimento, con appaiamento di U1 al sito di splicing 5' (complesso E), poi quando entra U2 e si lega nel sito di ramificazione abbiamo il complesso A (o pre-spliceosoma). Successivamente si legano U4, U5 e U6, unite insieme, mentre U1 viene rilasciato (complesso B). Infine U2, U4 e U6 formano il complesso attivo C, il quale catalizza le 2 reazioni di transesterificazione e porta quindi alla rimozione dell'introne. L'articolo sottolinea inoltre l'importanza delle proteine che cooperano con lo spliceosoma, in particolare parla delle proteine prp.



RNA splicing

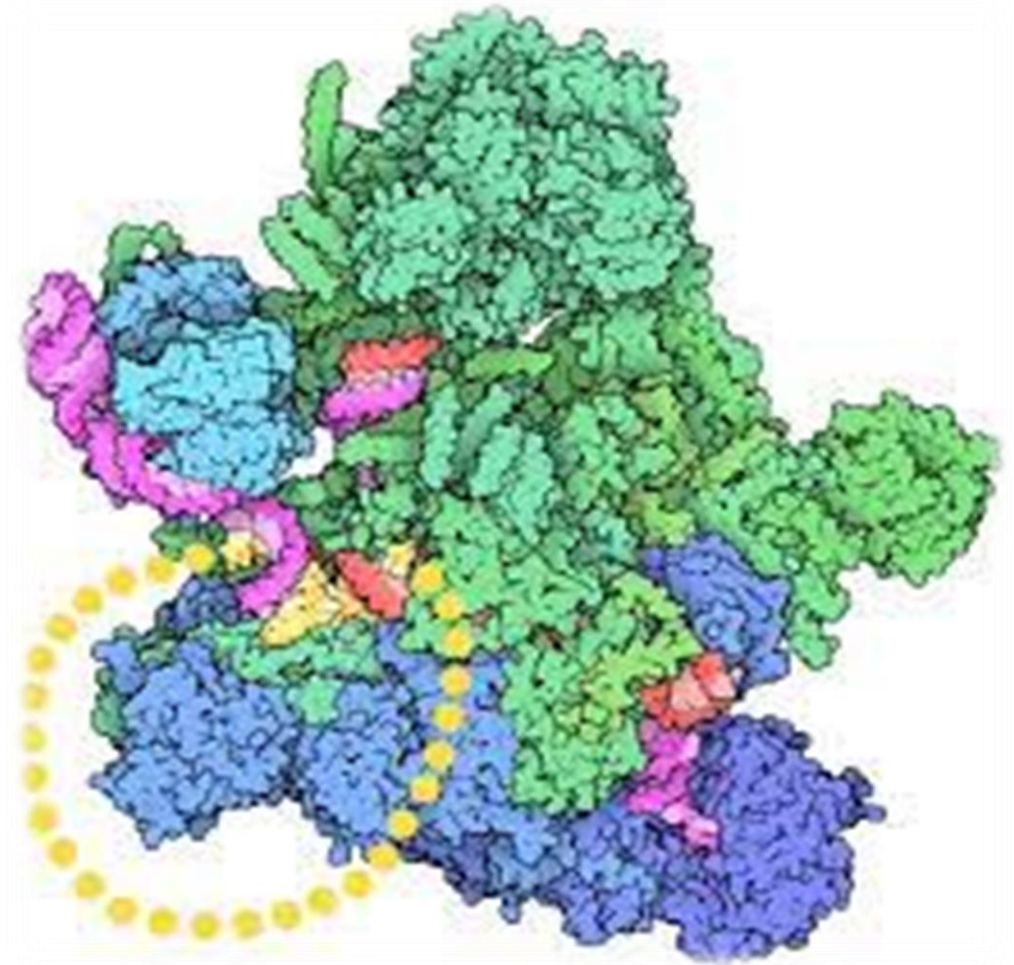
Passaggi dello spliceosoma

- Complesso E (early)
- A: (Branch site)
- B1: (spliceosoma completo)
- B2: U1 è rilasciato e si ha un riarrangiamento
- C1: U4 è rilasciato ed inizia la catalisi
- C2: sito 3' tagliato e gli esoni ligati
- [animazione](#)

PROTEINE PRP

Ci sono delle proteine che collaborano con lo spliceosoma per effettuare la rimozione degli introni, esse sono le prp, inoltre ne vengono citate altre, i chaperoni, che formano complessi con le prp.

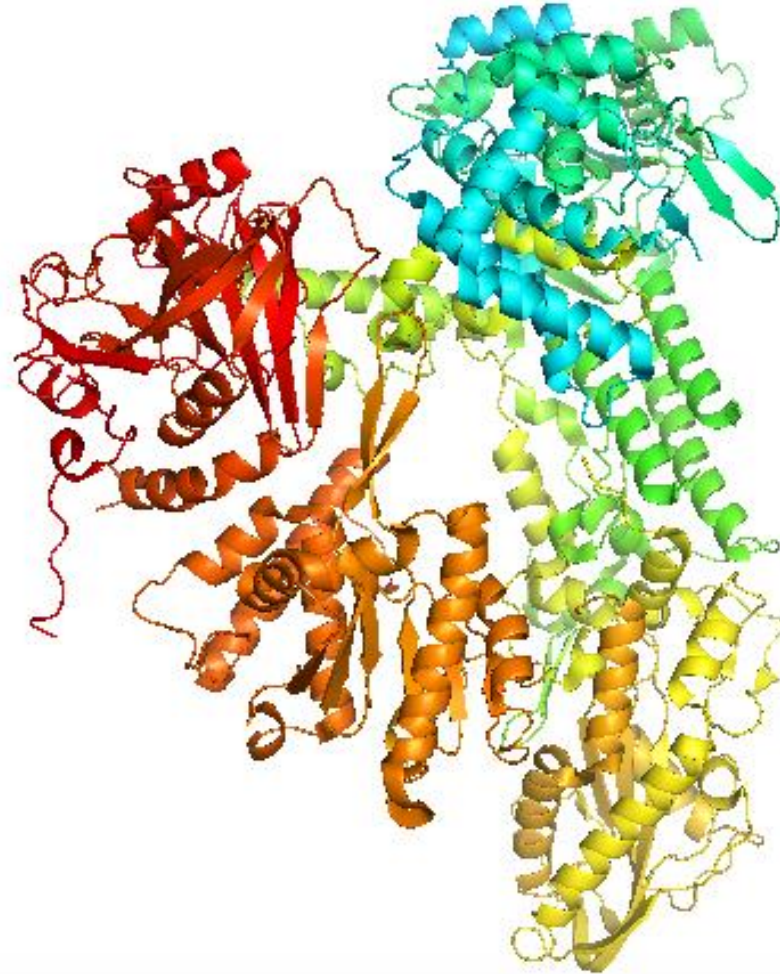
Le prp mediano il passaggio da un complesso all'altro dello spliceosoma.



PRP 8

Prp8 è la proteina chiave nel funzionamento dello spliceosoma ,
interviene nell'assemblaggio del
complesso attivo C dello
spliceosoma e quindi direttamente
nel processo di catalisi dei legami
al fine di rimuovere l'introne . Essa
è assemblata con una piccola
proteina chaperone , Aar2, e fa
parte dell'particella U5 dello
spliceosoma .

Nell'immagine la proteina prp8.



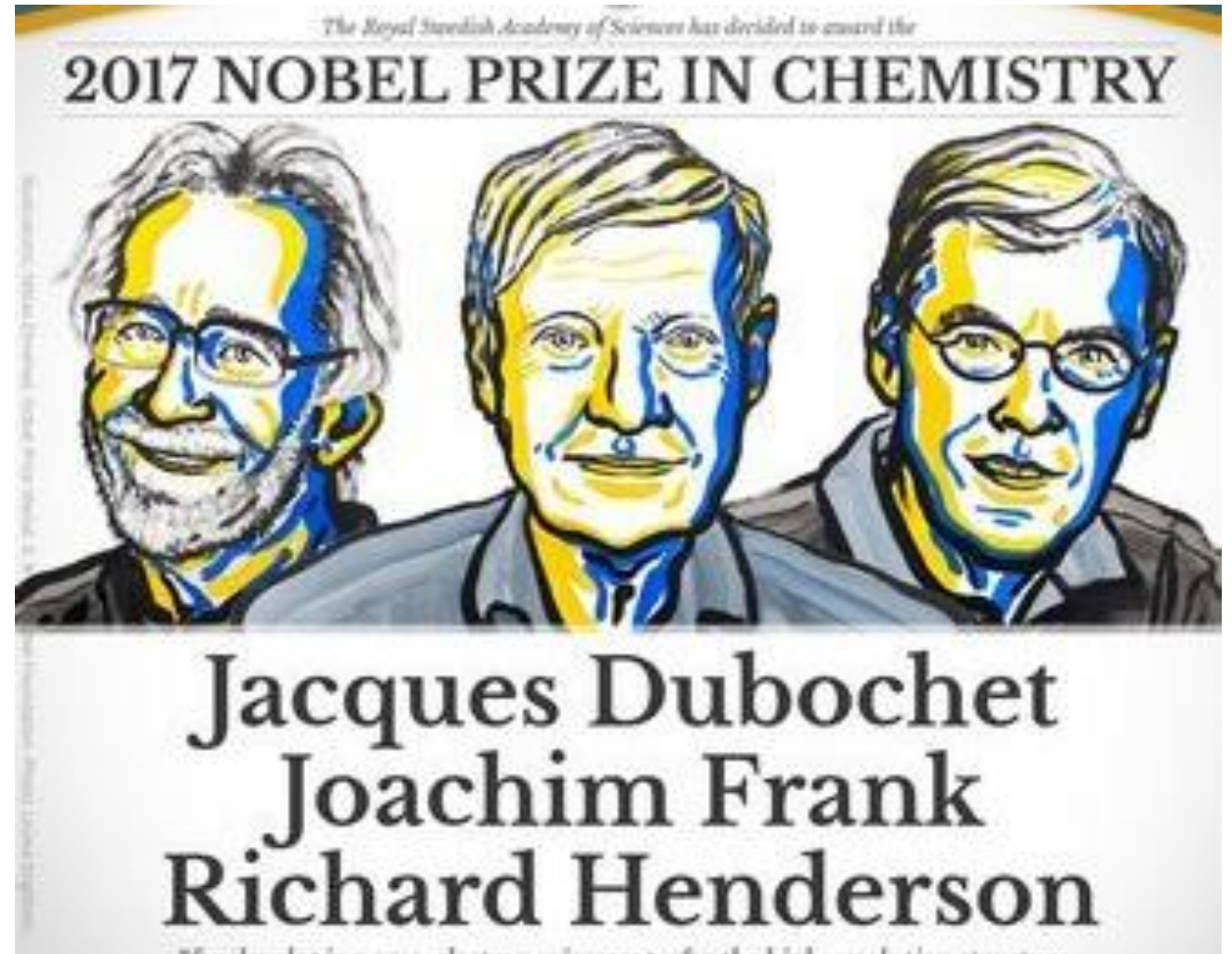
LA MICROSCOPIA CRYO-EM

- La **microscopia crioelettronica**, è un tipo di microscopia elettronica a trasmissione in cui il campione viene studiato a temperature criogeniche (generalmente alle temperature dell' azoto liquido).
- L'utilità della microscopia crioelettronica deriva dal fatto che consente l'osservazione di campioni non colorati o fissati in alcun modo, mostrandoli nel loro ambiente nativo, questo in contrasto con la cristallografia a raggi x , che richiede la cristallizzazione del campione, che può essere difficile nel caso di macromolecole, e la collocazione dello stesso in ambienti non fisiologici, che possono occasionalmente portare a cambiamenti conformazionali delle molecole. Si tratta pertanto di una tecnica particolarmente utile in biologia strutturale dove è fondamentale poter osservare le macromolecole biologiche nella loro conformazione nativa.
- Questo tipo di microscopia è stato fondamentale per capire il funzionamento dello spliceosoma e quindi le varie fasi dello splicing, l'articolo si focalizza proprio su tale argomento descrivendo l'importanza che ha avuto questo metodo nello scoprire il funzionamento del complesso ribonucleoproteico.

STORIA

Nei primi anni Ottanta, Jacques Dubochet concepì delle metodiche per congelare rapidamente dei campioni biomolecolari così da proteggerli dai danni elettronici e comunque lasciarli idratati, anche nel vuoto, mantenendo la loro forma nativa. Dal 1990, la tecnologia migliorò a tal punto che Henderson riuscì ad ottenere la prima struttura cryo-EM ad alta risoluzione

Nel 2017 Dubochet ed Henderson, insieme a Joachim Frank (un altro scienziato che collaborò con loro) ottennero il premio nobel per la chimica.



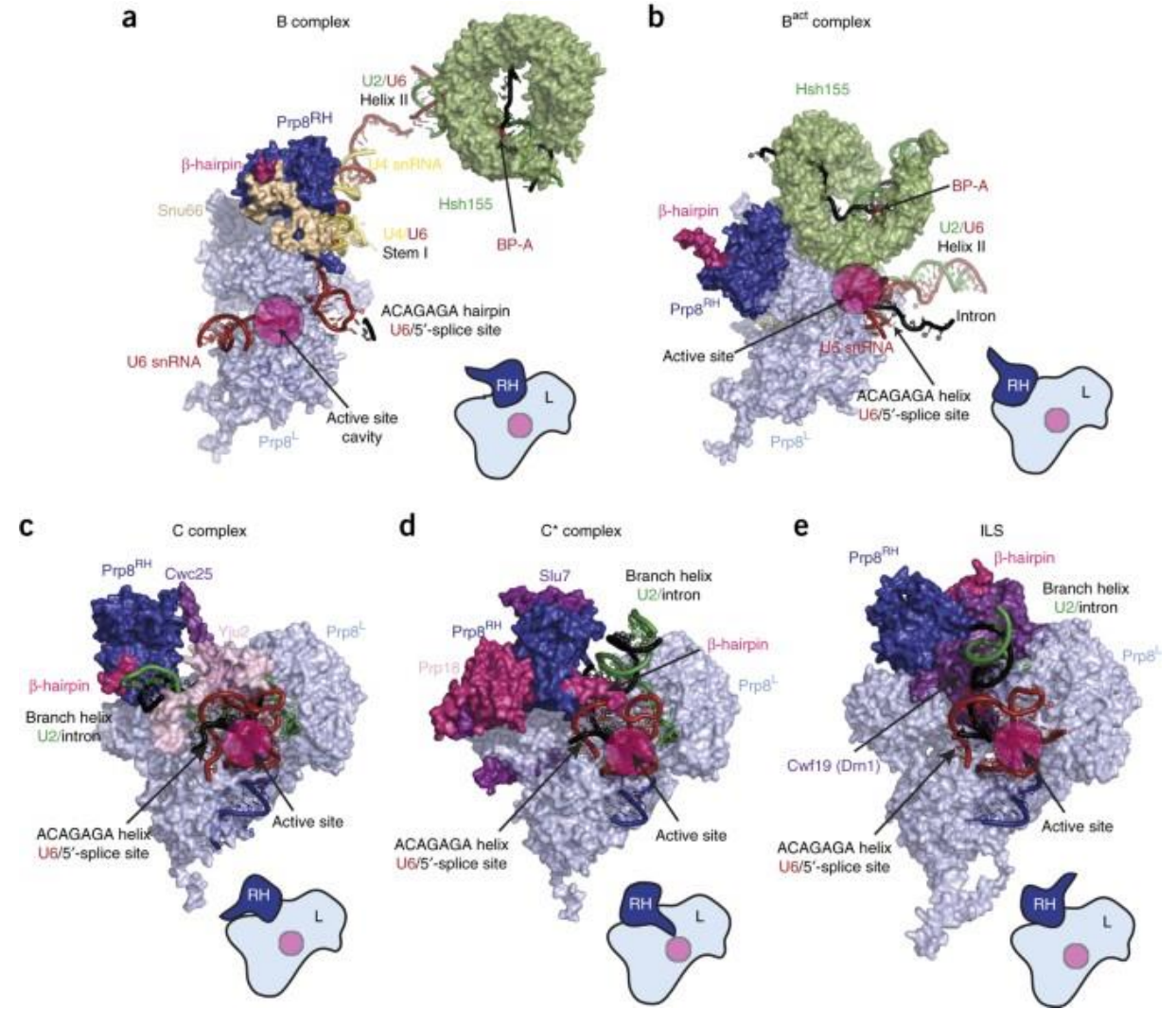
CONGELAMENTO

Questa fase è la parte peculiare e innovativa di questa microscopia, un rapido congelamento in etano liquido a -196°C , che permette la vetrificazione della proteina e il suo congelamento nella sua conformazione. Questo è un passaggio fondamentale, per studiare i sistemi biologici in relazione alla loro funzione, poiché diverse conformazioni significano diversa funzione. Ogni soluzione può essere congelata, si possono quindi studiare i sistemi biologici nella loro condizione nativa e/o in presenza di diversi soluti.



APPLICAZIONI

La microscopia elettronica criogenica è stata usata per esplorare i vari passaggi della reazione promossa dallo spliceosoma. Sono state ottenute strutture che mostrano le varie fasi dello splicing dell'mRNA comprese quelle che coinvolgono gli spliceosomi più complessi umani e così si sono chiariti i dettagli strutturali dell'intero processo.



Il meccanismo dello spliceosoma .

ARTICOLO SCELTO:

L'articolo descrive in modo estremamente specifico tutti i vari passaggi che portano alla rimozione degli introni nel trascritto primario di mRNA, e quindi tutte le varie funzioni e conformazioni dello spliceosoma, il complesso ribonucleoproteico che svolge tale funzione. Lo spliceosoma è formato da diverse particelle (le snRNP), e in tutte queste particelle ci sono le sm, c'è l'RNA e ci sono le prp, proteine specifiche per ogni particella. L'articolo si focalizza sulla funzione di quest'ultime, e sulle varie conformazioni dello spliceosoma (complesso A, B e C). Inoltre descrive il metodo grazie al quale è stato possibile scoprire e studiare tutti i vari processi dello splicing, ovvero la microscopia cryo-EM

FONTI BIBLIOGRAFICHE :

Diap 2: [khanacademy.org](https://www.khanacademy.org)

Diap 3: [animalresearch.info](https://www.animalresearch.info)

Diap 4: [pianetachimica.it](https://www.pianetachimica.it)

Diap 5 : [slideplayer.it](https://www.slideplayer.it)

Diap 7 : [ilblogdellasci.wordpress.com](https://www.ilblogdellasci.wordpress.com)

Diap 8: [wikipedia.org](https://www.wikipedia.org)

Diap 9 : [nature.com](https://www.nature.com)