

FOTOGRAFIARON LA VIDA A NIVEL ATÓMICO

Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson han recibido el Premio Nobel de Química 2017 por haber desarrollado un método eficaz para generar imágenes tridimensionales de las moléculas de la vida. Usando microscopía crioelectrónica los investigadores pueden ahora congelar biomoléculas en pleno movimiento y fotografiarlas con resolución atómica. Esta tecnología ha llevado a la bioquímica a una nueva era.

En los últimos años asombrosas estructuras de la maquinaria molecular de la vida han llenado la literatura científica (figura 1): el dispositivo de inyección de la Salmonella para atacar las células; proteínas que confieren resistencia a la quimioterapia y a los antibióticos; complejos moleculares que rigen los ritmos circadianos; complejos que capturan la luz en la fotosíntesis y un sensor de presión similar al que nos permite escuchar. Estos son solo algunos ejemplos de los cientos de biomoléculas que han sido fotografiadas utilizando microscopía crioelectrónica (cryo-EM).

Cuando los investigadores comenzaron a sospechar que el virus Zika estaba causando la epidemia de recién nacidos con daño cerebral en Brasil, recurrieron a la cryo-EM para visualizar el virus. A lo largo de unos meses se generaron imágenes tridimensionales (3D) del virus con resolución atómica, y así los investigadores pudieron comenzar a buscar productos farmacéuticos efectivos contra ellos.

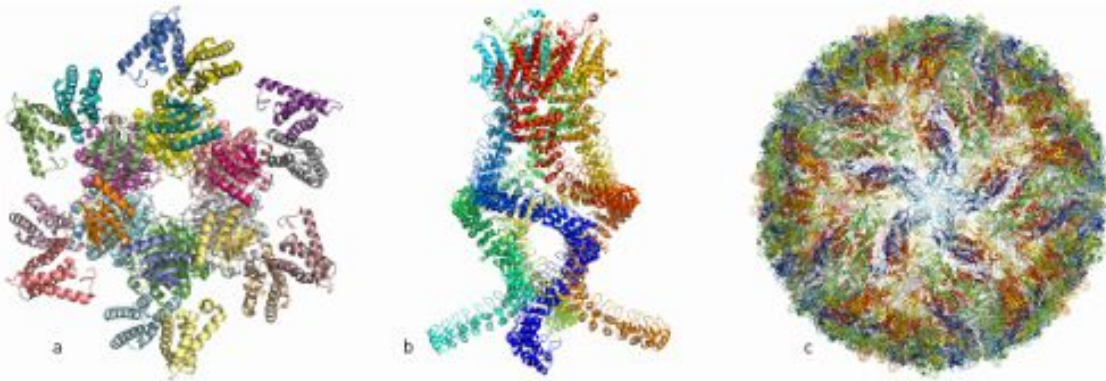


Figura 1. En los últimos años los investigadores han publicado estructuras atómicas de numerosos complejos de proteínas.

- a) Un complejo de proteínas que rige el ritmo circadiano. b) Un sensor que registra los cambios de presión en el oído y nos permite escuchar. c) El virus Zika.

Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson han hecho descubrimientos innovadores que han permitido el desarrollo de la cryo-EM. El método ha llevado a la bioquímica a una nueva era, ahora es más fácil que nunca capturar imágenes de biomoléculas.

Las imágenes: una clave importante para el conocimiento

En la primera mitad del siglo XX, las biomoléculas (proteínas, ADN y ARN) eran terra incognita en el mapa de la bioquímica. Los científicos sabían que desempeñaban papeles fundamentales en la célula, pero no tenían idea de su aspecto. Fue en la década de 1950 cuando los investigadores de Cambridge comenzaron a exponer los cristales de proteínas a rayos X, observando por primera vez sus estructuras en espiral.

A principios de la década de 1980 el uso de la cristalografía de rayos X se complementó con el uso de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) para estudiar proteínas en estado sólido y en solución. Esta técnica no solo revela su estructura, sino también cómo se mueven e interactúan con otras moléculas.

Gracias a estos dos métodos hay bases de datos que contienen miles de modelos de biomoléculas que son utilizadas desde la investigación básica hasta el desarrollo de fármacos. Sin embargo ambos métodos tienen limitaciones fundamentales. La RMN en solución solo funciona para proteínas relativamente pequeñas.

La cristalografía de rayos X requiere que las moléculas formen cristales bien organizados, como cuando el agua se congela formando cristales de hielo. Las imágenes obtenidas son como las antiguas fotografías en blanco y negro: imágenes estáticas que revelan muy poco acerca de la dinámica de la proteína.

No obstante, muchas moléculas no forman cristales, lo que motivó que **Richard Henderson** abandonara la técnica de rayos X en la década de 1970. Aquí comienza la historia del Premio Nobel de Química 2017.

Los problemas con los cristales hicieron que Henderson cambiara de pista

Richard Henderson hizo su doctorado en el grupo de cristalografía de rayos X de Cambridge, Reino Unido. Usó el método para obtener imágenes de proteínas, pero surgieron dificultades cuando intentó cristalizar una proteína incrustada en la membrana que rodea la célula.

Las proteínas de membrana son difíciles de manejar. Cuando se retiran de su entorno natural la membrana, a menudo, se transforma en una masa amorfa. La primera proteína de membrana con la que Richard Henderson trabajó fue difícil de producir en cantidades adecuadas; la segunda no cristalizó. Después de años de decepciones, recurrió a la única alternativa disponible: el microscopio electrónico.

En ese momento se discutía sobre si la microscopía electrónica realmente era una opción. La microscopía electrónica de transmisión, como se llama la técnica, funciona más o menos como la microscopía ordinaria, pero, en lugar de luz, se envía un haz de electrones a través de la muestra. La longitud de onda de los electrones es mucho más corta que la de la luz, por lo que el microscopio electrónico puede hacer visibles estructuras muy pequeñas, incluso la posición de los átomos individuales.

En teoría la resolución del microscopio electrónico era más que adecuada para que Henderson obtuviera la estructura atómica de una proteína de membrana, pero en la práctica el proyecto era casi imposible. Cuando se inventó el microscopio electrónico en la década de 1930, los científicos pensaban utilizarlo para estudiar la materia inanimada. El intenso haz de electrones necesario para obtener imágenes de alta resolución destruye el material biológico y, si el haz se debilita, la imagen pierde su contraste y se vuelve borrosa.

Además, el microscopio electrónico requiere trabajar en vacío, una condición en la que las biomoléculas se deterioran porque el agua se evapora. Cuando las biomoléculas se secan, pierden su estructura natural, haciendo inservibles las imágenes.

Casi todo indicaba que Richard Henderson fracasaría, pero el proyecto se salvó gracias a la proteína que había elegido estudiar: **la bacteriorrodopsina**.

Lo mejor no era lo suficientemente bueno para Henderson

La bacteriorrodopsina es una proteína de color púrpura que está incrustada en la membrana de los organismos fotosintetizadores donde captura la energía de los rayos del sol. En lugar de eliminar la proteína sensible de la membrana, como Richard Henderson había intentado anteriormente, tomaron la membrana púrpura completa y la colocaron bajo el microscopio electrónico. Cuando la proteína permaneció rodeada por la membrana, conservó su estructura; además cubrieron la superficie de la muestra con una solución de glucosa que la protegía de la desecación cuando se hacía el vacío.

El fuerte haz de electrones fue un problema importante, pero los investigadores aprovecharon la forma de empaquetarse las moléculas de bacteriorrodopsina en la membrana. En lugar de utilizar un haz estándar hicieron pasar un flujo más débil a través de la muestra. El contraste de la imagen era pobre y no podían ver las moléculas individuales, pero teniendo en cuenta que las proteínas se empaquetaban y orientaban regularmente en la misma dirección, todas las proteínas difractan los haces de electrones de una manera casi idéntica, lo que permitió calcular una imagen más detallada basada en el patrón de difracción que utilizaba un enfoque matemático similar al utilizado en la cristalografía de rayos X.



En la siguiente etapa los investigadores giraron la membrana bajo el microscopio electrónico, tomando imágenes desde diferentes ángulos. De esta manera (en 1975) fue posible producir un modelo tridimensional de la estructura de la bacteriorrodopsina (figura 2), que mostraba cómo la cadena de proteína se movía a través de la membrana

Era la mejor imagen de una proteína generada utilizando un microscopio electrónico. Muchas personas quedaron impresionadas con la resolución, que fue de 7 Å (0.0000007 milímetros), pero esto no fue suficiente para Richard Henderson. Su objetivo era lograr la misma resolución que la proporcionada por la cristalografía de rayos X, de aproximadamente 3 Å, y estaba convencido de que el microscopio electrónico tenía más que ofrecer.

Figura 2. El primer modelo aproximado de bacteriorrodopsina, publicado en 1975. Imagen de Nature 257: 2 8 -32

Henderson produce la primera imagen con resolución atómica

En los años siguientes, la microscopía electrónica mejoró gradualmente. Las lentes mejoraron y se desarrolló la criotecnología (volveremos sobre esto), enfriando las muestras con nitrógeno líquido durante las mediciones, para protegerlas de los daños por el haz de electrones.

Richard Henderson fue agregando poco a poco más detalles al modelo de bacteriorrodopsina. Para obtener imágenes más nítidas, viajó a los mejores microscopios electrónicos del mundo. Todos tenían sus debilidades, pero se complementaban. Finalmente, en 1990, 15 años después de haber publicado el primer modelo, Henderson logró su objetivo y pudo presentar una estructura de bacteriorrodopsina con resolución atómica (figura 3).

Demostró que la cryo-EM podría proporcionar imágenes tan detalladas como las generadas utilizando cristalografía de rayos X, lo cual fue un hito crucial. Sin embargo este progreso se basó en una excepción: que la proteína se empaqueta naturalmente de manera regular en la membrana. Pocas proteínas se ordenan espontáneamente de esta manera. La pregunta era si el método podría generalizarse: ¿sería posible usar un microscopio electrónico para generar imágenes 3D de alta resolución de proteínas que se dispusieran al azar en la muestra orientándose en diferentes direcciones? Richard Henderson creía que sí, mientras otros pensaban que esto era una utopía.

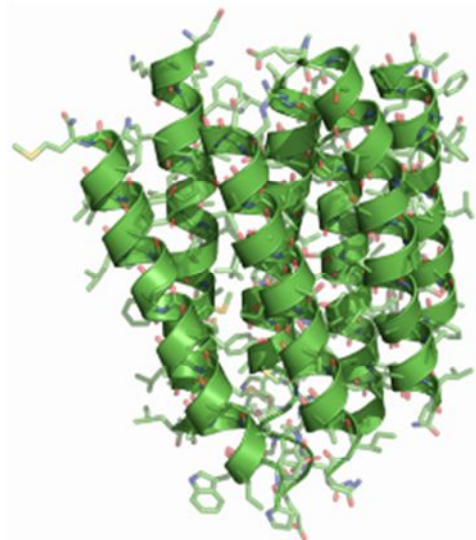
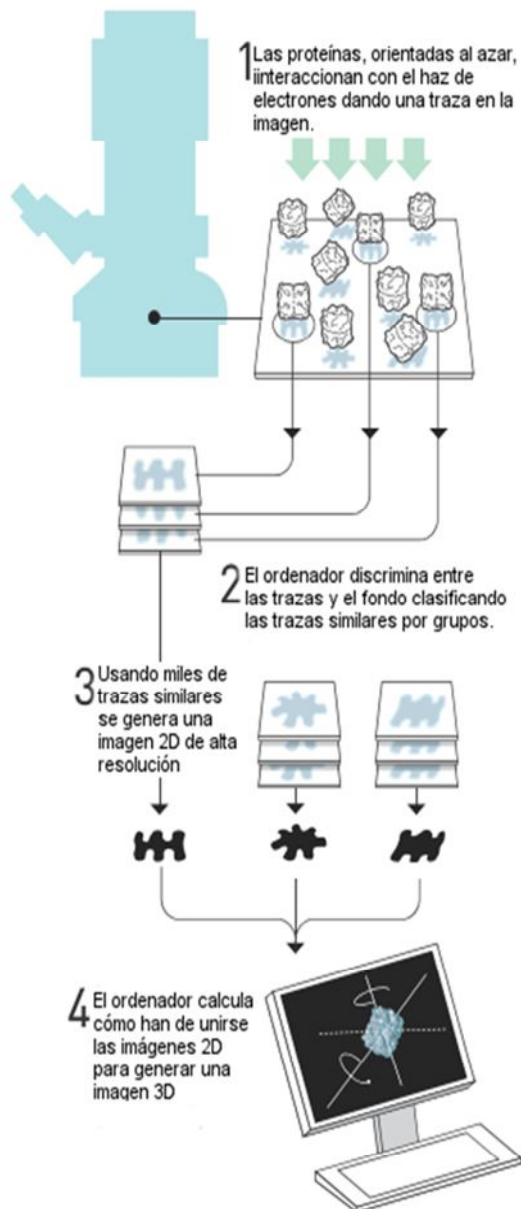


Figura 3. En 1990, Henderson presentó una estructura de bacteriorrodopsina con resolución atómica.

Figura 4. El método de Frank para obtener imágenes 3D



Al otro lado del Atlántico, en el Departamento de Salud del Estado de Nueva York, **Joachim Frank** había trabajado durante mucho tiempo para encontrar una solución a ese problema.

En 1975 presentó una estrategia teórica donde la información, aparentemente mínima, encontrada en las imágenes bidimensionales del microscopio electrónico, podría fusionarse para generar un todo tridimensional de alta resolución. Le llevó más de una década darse cuenta de esta idea.

Frank refina el análisis de las imágenes

La estrategia de Joachim Frank (figura 4) se basa en discriminar, mediante un programa informático, entre las proteínas colocadas al azar y el fondo borroso del microscopio electrónico. Desarrolló un método matemático que permitía al ordenador identificar diferentes patrones recurrentes en la imagen. Luego el ordenador clasifica patrones similares en el mismo grupo y fusiona la información para generar una imagen promedio más nítida. De esta manera obtuvo una serie de imágenes bidimensionales de alta resolución que mostraban la misma proteína pero desde diferentes ángulos. Los algoritmos del software se completaron en 1981.

El siguiente paso fue determinar matemáticamente cómo fusionar las diferentes imágenes bidimensionales entre sí para obtener una imagen 3D. Frank publicó esta parte del método de análisis de imágenes a mediados de la década de 1980 y la utilizó para generar un modelo de la superficie de un ribosoma, la gigantesca maquinaria molecular que construye proteínas en el interior de la célula.

El método de procesamiento de imágenes de Joachim Frank fue fundamental para el desarrollo de la cryo-EM.

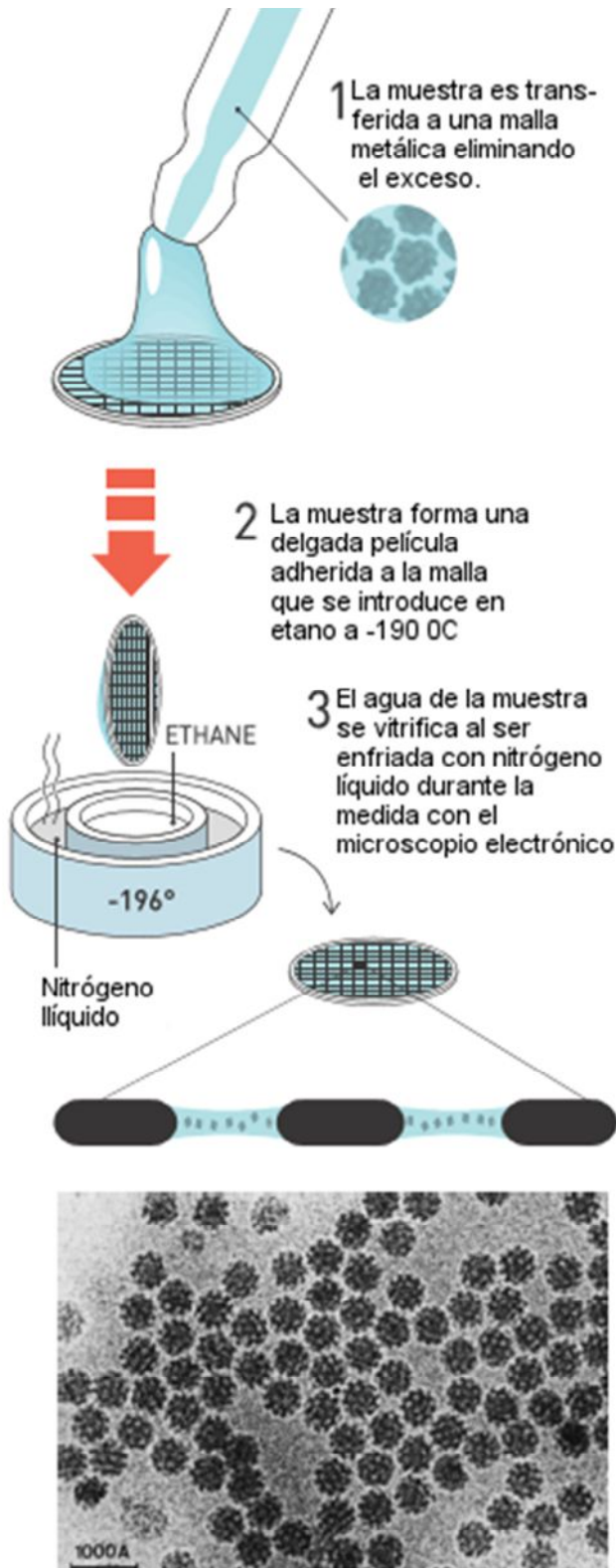
Daremos ahora un salto de unos años hacia atrás.

En 1978, al mismo tiempo que Frank estaba perfeccionando sus programas informáticos, **Jacques Dubochet** fue contratado por el Laboratorio de Biología Molecular Europeo, en Heidelberg, para resolver otro de los problemas básicos del microscopio electrónico: que las muestras biológicas se secan y se dañan cuando se exponen al vacío.

Dubochet obtiene vidrio del agua

En 1975, Henderson usó una solución de glucosa para proteger sus membranas de la deshidratación, pero este método no funcionó con biomoléculas solubles en agua. Otros investigadores habían intentado congelar las muestras ya que el hielo se evapora más lentamente que el agua, pero los cristales de hielo alteraron tanto los haces de electrones que las imágenes fueron inútiles.

Figura 5. Método de vitrificación de Dubochet



Dubochet obtuvo la primera imagen de un virus por vitrificación del agua en 1984.

Imagen de Nature 308: 32-36

La vaporización del agua era un gran problema. Sin embargo, Jacques Dubochet vio una posible solución: enfriar el agua tan rápidamente que se solidificara para formar un vidrio en lugar de un cristal. Un vidrio parece un material sólido, pero en realidad es un fluido ya que sus moléculas están desordenadas. Dubochet se dio cuenta de que si pudiera obtener agua vitrificada, el haz de electrones se difractaría uniformemente y proporcionaría un fondo uniforme.

Inicialmente, el grupo de investigación intentó vitrificar pequeñas gotas de agua en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero el éxito llegó cuando reemplazaron el nitrógeno por etano que, a su vez, se había enfriado con nitrógeno líquido. Bajo el microscopio vieron una gota que no se parecía a nada que hubieran visto antes. Primero supusieron que era etano, pero cuando la gota se calentó ligeramente, las moléculas se reorganizaron repentinamente y adquirieron la familiar estructura de un cristal de hielo. Fue un triunfo, ya que algunos investigadores sostenían que era imposible vitrificar las gotas de agua. Ahora creemos que el agua vitrificada es la forma más común de agua en el universo.

Una técnica simple para el contraste

Después de los descubrimientos de 1982, el grupo de investigación de Dubochet desarrolló rápidamente la base de la técnica que todavía se usa en cryo-EM (figura 5). Disolvieron sus muestras biológicas, inicialmente diferentes formas de virus, en agua. La solución se depositó luego en una fina malla metálica formando una película delgada. Usando un dispositivo similar a un arco, dispararon la red en el etano líquido para que la delgada película de agua se vitrificara.

En 1984, Jacques Dubochet publicó las primeras imágenes de varios virus diferentes, redondos y hexagonales, que se podían observar en marcado contraste con el fondo de agua vitrificada. El material biológico ahora podría prepararse con relativa facilidad para el microscopio electrónico, y los investigadores pronto llamaron a la puerta de Dubochet para aprender la nueva técnica.

De la biología a la revolución

Las principales piezas de la cryo-EM estaban ya en su sitio, pero las imágenes aún tenían una baja resolución. En 1991, cuando Joachim Frank preparó ribosomas usando el método de vitrificación de Dubochet y analizó las imágenes utilizando su propio software, obtuvo una estructura 3D que tenía una resolución de 40 Å. Fue un avance increíble para la microscopía electrónica, pero la imagen solo mostró los contornos del ribosoma. La imagen de Frankly era borrosa y su resolución ni siquiera se acercaba a la de la cristalografía de rayos X

Debido a que la cryo-EM raramente podía visualizar otra cosa que no fuera una superficie desigual, el método a veces se llamaba "blobología" (término que quiere poner de manifiesto lo borroso ("blob") de las imágenes obtenidas). Sin embargo, y en gran parte debido a que Richard Henderson mantuvo obstinadamente que el microscopio electrónico proporcionaría rutinariamente imágenes que mostrarían átomos individuales, se ha optimizado, poco a poco, cada tuerca y cada tornillo del microscopio electrónico logrando una mejora de la resolución, angstrom a angstrom, hasta que el obstáculo técnico final se superó en 2013, cuando se puso en uso un nuevo tipo de detector de electrones (figura 6).

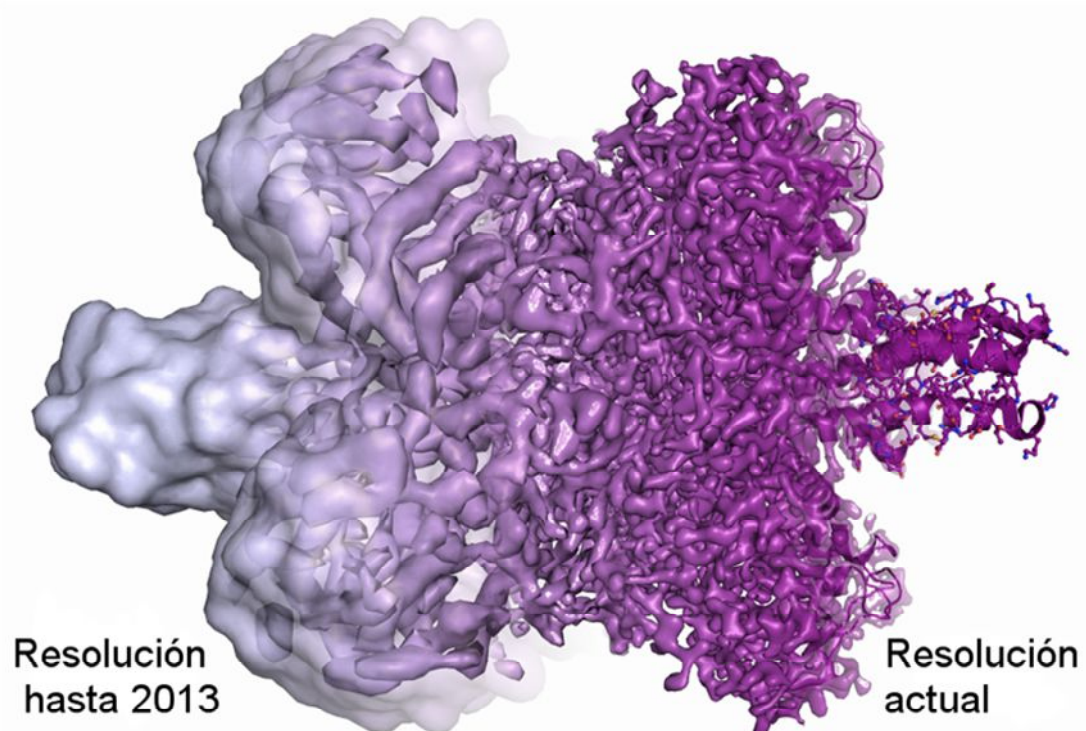


Figura 6. La resolución del microscopio electrónico ha mejorado radicalmente en los últimos años, desde las manchas borrosas iniciales hasta la visualización actual de proteínas con resolución atómica. Imagen: Martin Högbom.

Cada rincón de una célula puede ser explorado

Ahora el sueño es realidad y nos enfrentamos a un desarrollo explosivo de la bioquímica. Hay varias cosas que hacen que la cryo-EM sea tan revolucionaria: el método de vitrificación de Dubochet es relativamente fácil de usar y requiere un tamaño de muestra mínimo. Debido al rápido proceso de enfriamiento, las biomoléculas se pueden congelar de forma casi instantánea lo que permite tomar series de imágenes que capturan las diferentes partes de un proceso. De esta forma producen 'películas' que revelan cómo las proteínas se mueven e interactúan con otras moléculas.

Usando la cryo-EM, también es más fácil que nunca estudiar las proteínas de membrana, que a menudo funcionan como dianas para productos farmacéuticos, y los grandes complejos moleculares. Sin embargo, las proteínas pequeñas no se pueden estudiar con microscopía electrónica, pero se pueden visualizar usando espectroscopía de RMN o cristalografía de rayos X.

Después de que Joachim Frank presentara la estrategia para su método general de procesamiento de imágenes en 1975, un investigador escribió: *"Si tales métodos fueran perfeccionados, entonces el cielo sería el límite"*.

Ahora estamos allí, el cielo es el límite. **Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson**, a través de su investigación, trajeron "el mayor beneficio para la humanidad". Cada rincón de la célula se puede observar a nivel atómico y la bioquímica está lista para un futuro emocionante.

LINKS AND FURTHER READING

Additional information on this year's prizes, including a scientific background in English, is available on the website of the Royal Swedish Academy of Sciences, www.kva.se, and at <http://nobelprize.org>. There you can watch video footage of the press conferences, the Nobel Lectures and more. Information on exhibitions and activities related to the Nobel Prizes and the Prize in Economic Sciences is available at www.nobelmuseum.se.

Articles

Dubochet, J. (2016) A Reminiscence about Early Times of Vitreous Water in Electron Cryomicroscopy. *Biophys J.*, 110, 756-757.

Elmes, J. (2016) Interview with Richard Henderson. *Times Higher Education*, www.timeshighereducation.com/people/interview-richard-henderson-university-of-cambridge

Gelfand, A. (2016) The Rise of Cryo-Electron Microscopy, *Biomedical Computation Review*, http://biomedicalcomputationreview.org/sites/default/files/riseofc-e_bcr-spring-2016-web.pdf

Mossman, K. (2007) Profile of Joachim Frank, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 19668-19670. Wilson, R. och Gristwood, A. (2015) Jacques Dubochet. www.embl.de/aboutus/alumni/news/news_2015/20150709_dubochet/

Videos

Serious Science (20 June 2017) Electron Cryomicroscopy — Richard Henderson www.youtube.com/watch?v=L6U--sYUF9s

Serious Science (22 Aug. 2017) Single-Particle Electron Microscopy - Richard Henderson www.youtube.com/watch?v=j_sfs6uwWlc

The Franklin Institute (5 July 2016) Joachim Frank — 2014 Laureate of the Franklin Institute in Life Science www.youtube.com/watch?v=mtvht8Uyh2s

The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the Nobel prize in Chemistry 2017 to

JACQUES DUBOCHET	JOACHIM FRANK	RICHARD HENDERSON
Born 1942 in Aigle, Switzerland. Ph.D. 1973, University of Geneva and University of Basel, Switzerland. Honorary Professor of Biophysics, University of Lausanne, Switzerland. www.unil.ch/dee/en/home/menuinst/people/honorary-professors/prof-jacques-dubochet.html	Born 1940 in Siegen, Germany. Ph.D. 1970, Technical University of Munich, Germany. Professor of Biochemistry and Molecular Biophysics and of Biological Sciences, Columbia University, New York, USA. http://franklab.cpmc.columbia.edu/franklab/	Born 1945 in Edinburgh, Scotland. Ph.D. 1969, Cambridge University, UK. Programme Leader, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK. www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/rh15/

Science Editors: Peter Brzezinski, Gunnar von Heijne and Sara Snogerup Linse, the Nobel Committee for Chemistry

Text: Ann Fernholm

Illustrations: ©Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences (unless otherwise credited)

Editor: Ann Fernholm

©The Royal Swedish Academy of Sciences