

# Breve historia de la criomicroscopía electrónica

Considerada método del año 2015 por la revista *Nature Methods*, los recientes avances en esta técnica permiten obtener imágenes de estructuras moleculares con una resolución extraordinaria

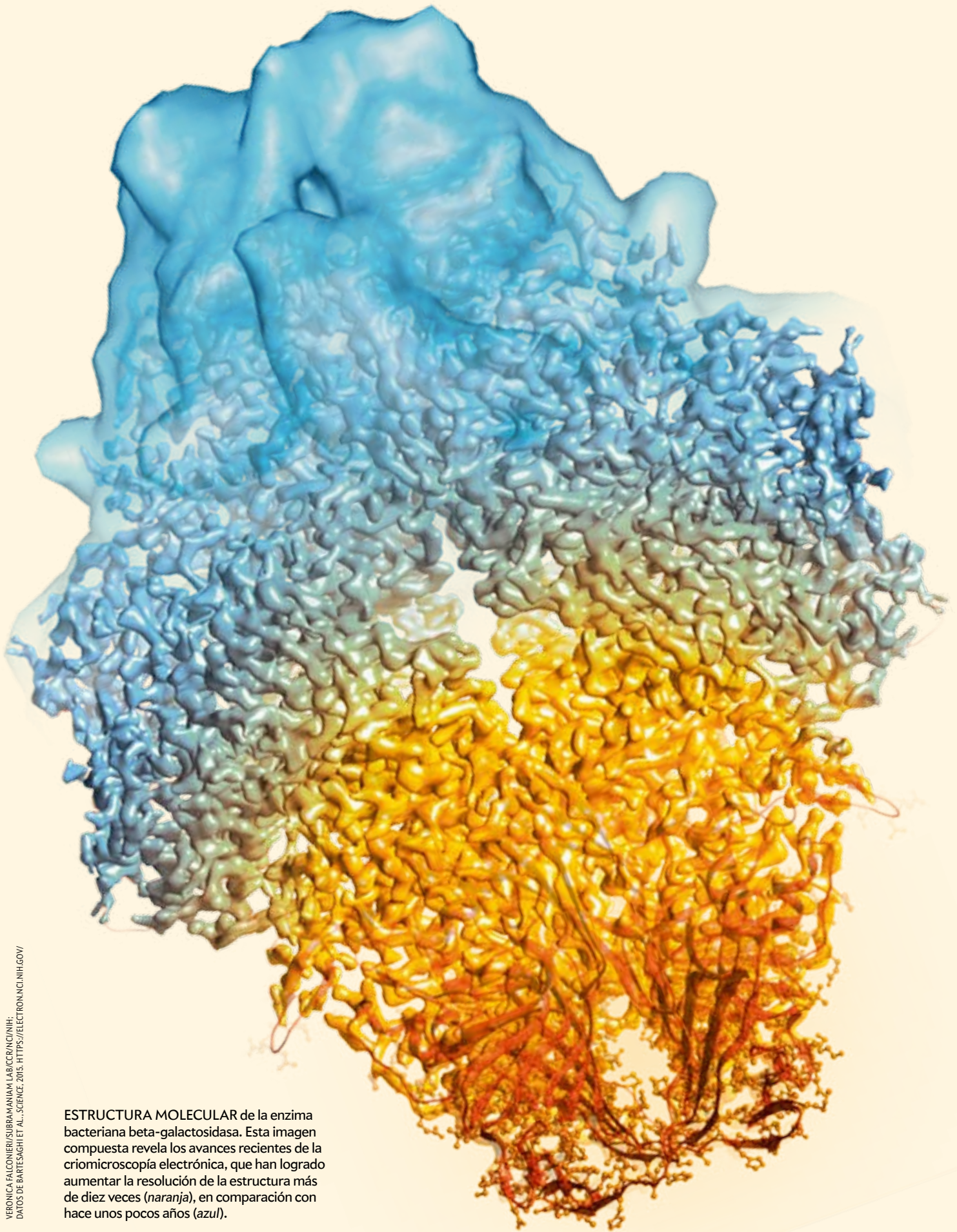
*Eva Nogales*

## EN SÍNTESIS

**La criomicroscopía electrónica** se ha erigido en los últimos veinte años como una técnica idónea para el estudio de estructuras macromoleculares con precisión atómica.

**Ya no es preciso cristalizar** la muestra ni disponer de un gran volumen de la misma. Ello supone una gran ventaja a la hora de estudiar estructuras nanométricas.

**Los grandes avances técnicos** en la captación de las imágenes y la potencia de cómputo han facilitado la elaboración de modelos tridimensionales a partir de las imágenes planares.



VERONICA FALCONERI/SUBRAMANIAM LAB/CCR/NCI/NIH;  
DATOS DE BARTESAGHI ET AL., SCIENCE, 2015. [HTTPS://ELECTRONCNCI.NIH.GOV/](https://electroncnci.nih.gov/)

**ESTRUCTURA MOLECULAR** de la enzima bacteriana beta-galactosidasa. Esta imagen compuesta revela los avances recientes de la criomicroscopía electrónica, que han logrado aumentar la resolución de la estructura más de diez veces (*naranja*), en comparación con hace unos pocos años (*azul*).

**Eva Nogales** trabaja en el departamento de biología celular y molecular de la Universidad de California en Berkeley, en el Instituto Médico Howard Hugues y en la división de biofísica molecular y bioimagen del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley, en California.



**L**A CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA SE HA ERIGIDO DURANTE LOS DOS ÚLTIMOS DECENIOS EN UNA técnica idónea para el estudio de los sistemas complejos que desafían la caracterización estructural. Las recientes mejoras introducidas en ella suponen un salto de gigante en términos de aplicabilidad, rendimiento y resolución, por lo que ha despertado un gran interés en todo el mundo y ha sido considerada método del año por la revista *Nature Methods*. El presente artículo expone algunos de los hitos en el campo de la criomicroscopía electrónica que le han granjeado su éxito actual.

#### UN NICHU ÚNICO EN LA BIOLOGÍA ESTRUCTURAL

Con el fin de visualizar la arquitectura de los complejos macromoleculares, se han desarrollado técnicas de biología estructural que han demostrado ser un recurso inapreciable a la hora de brindarnos una comprensión mecanicista de la función biomolecular. Hasta la fecha, el método más común para desentrañar la estructura de las macromoléculas a escala atómica ha sido la cristalografía de rayos X. Pero esta técnica exige una muestra abundante y la cristalización de las proteínas, que a menudo dista de ser sencilla. Por su parte, la resonancia magnética nuclear (RMN) no requiere cristalización, pero sí el enriquecimiento isotópico, aparte de una gran cantidad de muestra, y las limitaciones de tamaño la han restringido en general a proteínas y moléculas de ARN pequeñas o a dominios aislados. Los inconvenientes de estas técnicas clásicas dificultan o imposibilitan su aplicación a los complejos grandes, las proteínas integrales de membrana, los polímeros y los complejos macromoleculares donde concurren composiciones o conformaciones diversas.

La criomicroscopía electrónica de partículas aisladas ha emergido en las dos últimas décadas como una técnica de biología estructural aplicable al estudio de los sistemas biológicos complejos porque obvia la cristalización y solo precisa pequeñas cantidades de muestra. Los últimos avances en instrumentación y programación han mejorado enormemente la capacidad de la criomicroscopía electrónica para dilucidar estructuras de partículas aisladas, con resoluciones que permiten la modelización atómica directa en los mapas de densidad, y también para lidiar con mezclas de composición y conformación diversa. Además, el tiempo para desentrañar la estructura ha disminuido notablemente con la automatización de la adquisición y del procesamiento de los datos, así como gracias al menor número de imágenes de partículas requerido para obtener una señal de alta resolución (gracias a nuevas técnicas de detección). Las bases de datos se están colmando a un ritmo inédito de nuevas estructuras aportadas por la criomicroscopía electrónica, entre ellas las de complejos macromoleculares críticos que hasta hace muy poco se consideraban metas fantasiosas. Nos hallamos ante un enorme

avance en términos de aplicabilidad, rendimiento y resolución de dicha técnica, lo que la sitúa en el centro de atención de la comunidad científica internacional.

En las páginas siguientes comparto con el lector mi visión personal sobre las etapas históricas que marcan el desarrollo de la microscopía electrónica de reconstrucción tridimensional (3D), y que a la postre han propiciado el éxito actual de la técnica. Esta narración pretende ser un relato conciso de las muchas contribuciones al progreso de este campo realizadas por numerosos laboratorios.

#### PREPARAR LAS MUESTRAS

Los especímenes biológicos pueden visualizarse directamente a escala molecular con la microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes captadas representan proyecciones bidimensionales del objeto y, al combinar por ordenador varias imágenes proyectadas desde diferentes ángulos (vistas), se obtiene una reconstrucción en tres dimensiones. A finales de los años sesenta del siglo xx, David DeRosier y Aaron Klug, del Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigaciones Médicas del Reino Unido (LBM-CIM), usaron transformadas de Fourier-Bessel para combinar múltiples vistas de las moléculas que conforman la cola helicoidal del bacteriófago T4. Con ello nacía la reconstrucción tridimensional mediante microscopía electrónica.

Pero hubo que vencer tres obstáculos metodológicos importantes para consolidar la técnica como método general: primero era preciso preservar la muestra en las condiciones de ultravacío en las que opera el microscopio; también se debía minimizar el daño causado por los electrones de alta energía que impactan contra ella; y, por último, se necesitaba un mecanismo para compensar el escaso contraste de las muestras biológicas, que por su abundancia en elementos ligeros dispersan los haces de electrones de modo similar al fondo acuoso.

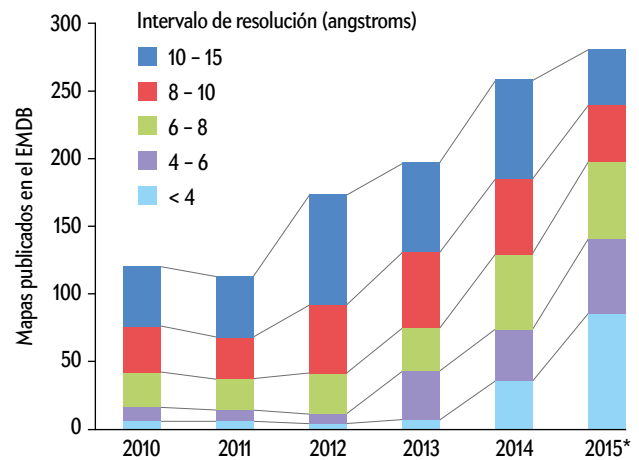
La primera solución práctica, utilizada por DeRosier y Klug y aún aplicada en ciertos especímenes, consistió en aplicar como colorante sales de átomos pesados (acetato de uranilo, por ejemplo) para crear una especie de molde seco de las moléculas antes de introducir la muestra en el microscopio. La tinción con

EL NÚMERO DE MAPAS de estructuras moleculares obtenidos a partir de microscopía electrónica y depositados en el Banco de Datos de Microscopía Electrónica (EMDB; <http://emdatbank.org>) ha ido aumentando en los últimos seis años. El incremento más notable se ha producido en los últimos dos años para las estructuras con resoluciones inferiores a 4 angstroms. (El asterisco indica que los datos de 2015 están incompletos; llegan hasta el 14 de octubre.)

metales pesados reduce el problema del daño por la radiación, pues esta incide sobre el recubrimiento inorgánico y no sobre la proteína. Además, este método genera una imagen de alto contraste debido al elevado número atómico del uranio (puesto que las proteínas producen una menor dispersión que el colorante, el contraste aparece invertido, de ahí que el método sea conocido como «tinción negativa»). Sin embargo, este procedimiento conlleva un coste, ya que la tinción puede no ser homogénea o penetrar en pequeñas cavidades de la muestra y el secado puede destruir las estructuras. Y lo que es más importante: la resolución se ve limitada por el tamaño del grano de la sal del átomo pesado (a unos 15 angstroms, en el mejor de los casos).

El avance que abrió la puerta a la dilucidación de las estructuras con alta resolución provino de la demostración, de la mano de Kenneth Taylor y Robert Glaeser, del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley (LNLB), en California, de que la criogenia de las muestras hidratadas permitía conservar las características de alta resolución en las proteínas. Este descubrimiento marcó el inicio de la criomicroscopía electrónica. Un trabajo posterior dirigido por Jacques Dubochet, del Laboratorio Europeo de Biología Molecular, en Heidelberg, dio lugar a un método práctico para la vitrificación del material biológico (generar películas finas de solución que inmediatamente se sumergían en criógenos potentes, como el etano o el propano líquidos). Junto con la comercialización de criotapas estables, tales progresos contribuyeron a la difusión de la criomicroscopía electrónica y sus aplicaciones.

Las muestras helicoidales, los virus y los cristales bidimensionales constituyeron los especímenes favoritos antes del ple-

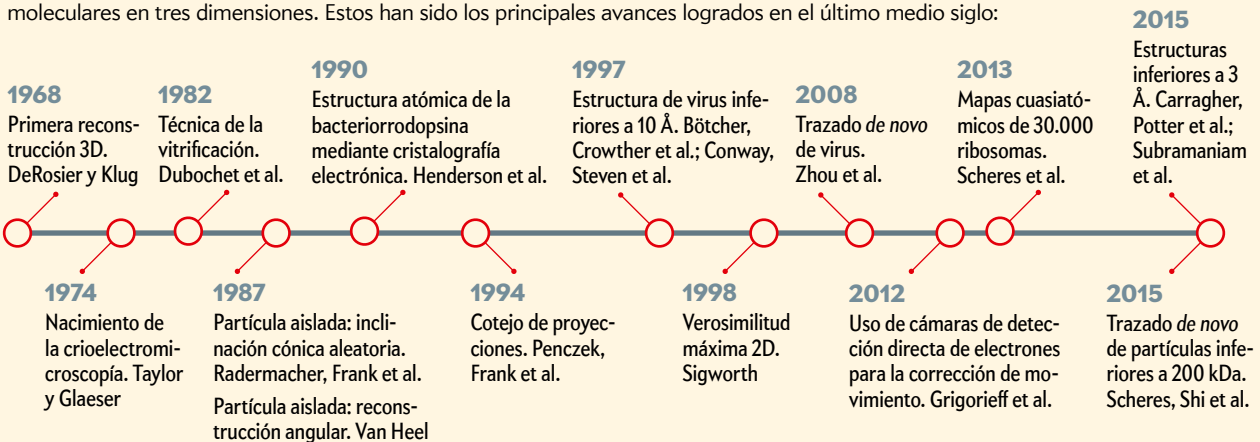


no desarrollo de la metodología de reconstrucción 3D. Merece una mención especial el trabajo pionero de Richard Henderson, del LBM-CIM, y sus colaboradores sobre el desarrollo de la cristalografía electrónica 2D, que a la postre desveló la estructura atómica de la bacteriorrodopsina, que fue durante muchos años el modelo de referencia para los receptores de siete hélices acoplados a proteínas G [véase «Arquitectos de la comunicación celular», por Javier González Maeso; INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, marzo de 2016]. Henderson y sus colaboradores usaron una combinación de imágenes y patrones de difracción electrónica de cristales bidimensionales. Entre las dificultades de la técnica figuran la necesidad de inclinar la muestra para captar diversas vistas de la molécula y el requisito de conseguir cristales bidimensionales perfectamente planos (algo nada sencillo, puesto que suelen tener el espesor de una sola proteína). Por ello, la cristalografía electrónica solo ha podido desentrañar un puñado de estructuras, y solo unas pocas de ellas con resolución atómica. Con todo, ha dado varios modelos atómicos de gran importancia biológica, como son el del complejo captador de luz en plantas y el de la tubulina, así como la estructura de

## HITOS

# Desarrollo de una técnica

La **microscopía electrónica**, con la incorporación de sucesivas mejoras, ha contribuido a dilucidar estructuras moleculares en tres dimensiones. Estos han sido los principales avances logrados en el último medio siglo:



(Å = angstroms; kDa = kilodaltons)

mayor resolución obtenida hasta la fecha con la microscopía electrónica 3D, la de la acuaporina 0 a 1,9 angstroms, lograda por Tom Walz y Steve Harrison, de la Escuela de Medicina de Harvard. Una ventaja de la cristalografía electrónica es que posibilita el estudio de las proteínas integrales de membrana en su entorno natural, como fue en el caso de la bacteriorrodopsina y de la acuaporina 0.

Con la criomicroscopía electrónica también se han resuelto, casi hasta la escala atómica, algunas disposiciones helicoidales ordenadas que pueden considerarse cristales unidimensionales

(naturales o artificiales). Entre ellas se cuenta el receptor de la acetilcolina, analizado por Unwin, del LBM-CIM. Su trabajo incluía un estudio con resolución temporal que recurría a un proceso de congelación rápido para capturar el canal abierto antes de la inactivación. Los virus icosaédricos, cuya gran simetría supone una ventaja a la hora de alinear las partículas y amplificar la señal en la reconstrucción final, fueron las primeras muestras no cristalizadas con las que se superó la barrera nanométrica. Ello permitió visualizar la estructura secundaria de las proteínas y, a la larga, obtener mapas de densidad con resolución

## FUNDAMENTO

# Así funciona la criomicroscopía electrónica

Una breve revisión de la técnica y las fases que conlleva

ALLISON DOERR

**Durante décadas**, la cristalografía de rayos X reinó como técnica dominante para extraer información de alta resolución sobre la estructura de las macromoléculas. La criomicroscopía electrónica de partículas aisladas se empleaba tradicionalmente para desentrañar la morfología de los grandes complejos proteicos que se resistían a la cristalización, si bien la resolución obtenida era sustancialmente peor que con la cristalografía. Aunque la estrategia general no ha variado de modo apreciable a lo largo de los años, los últimos avances técnicos en la preparación de muestras, en computación y, sobre todo, en la instrumentación están posibilitando el uso de la criomicroscopía electrónica para la resolución de estructuras macromoleculares con una resolución cuasiatómica.

### Primer paso: preparación de la muestra

Un experimento de criomicroscopía electrónica empieza con una muestra de proteína purificada. La solución proteica se deposita en una rejilla especial que consiste en una lámina microperforada (normalmente de carbono amorfo) encajada en un soporte metálico. En el caso ideal, las partículas de proteína se reparten uniformemente por los orificios de la rejilla siguiendo distintas orientaciones. A continuación, la rejilla se sumerge en un criógeno, como etano líquido, que la ultracongela instantáneamente y deja, así, atrapadas las partículas en una fina película de hielo amorfo. Además de capturar la estructura de la proteína en el momento de la congelación, el proceso protege hasta cierto punto la muestra del daño por radiación y evita la evaporación de la solución tamponadora en las condiciones de ultravacío con las que opera el microscopio electrónico de transmisión.

Los investigadores han explorado diversas opciones para mejorar la preparación de la muestra, como son refinar la purificación de los frágiles complejos proteicos, automatizar la preparación de las rejillas y perfeccionar las mismas. Estas mejoras, en apariencia graduales, pueden tener juntas un gran impacto en el éxito de un experimento de criomicroscopía electrónica.

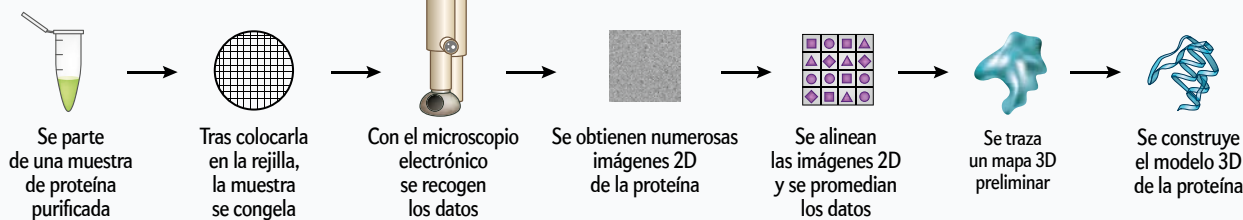
### De imágenes 2D al modelo 3D

El apelativo «de partículas aisladas» proviene del hecho de que las electromicrografías bidimensionales retratan partículas individuales de proteína depositadas en la rejilla. Dada la necesidad de aplicar bajas dosis de electrones para no dañar las muestras radiosensibles, las proyecciones bidimensionales contienen demasiado ruido para poder resolver las estructuras con detalle atómico. Pese a ello, las señales pueden mejorarse obteniendo el promedio de un elevado número de partículas.

A menudo, estas quedan congeladas en la rejilla en orientaciones al azar, por lo que el promediado no es un proceso sencillo. Pero ello supone una ventaja, porque se necesitan muchas vistas bidimensionales distintas de la proteína para reconstruir su estructura tridimensional. Con sofisticados métodos de procesamiento, las imágenes se alinean y los datos se combinan. A continuación se traza un mapa 3D preliminar que se refina de forma iterativa y se valida con herramientas informáticas especializadas. Por último, la secuencia proteica se ajusta en el mapa 3D para construir un modelo en tres dimensiones de la proteína.

Antes eran necesarios millones de imágenes de partículas individuales para resolver una estructura con alta definición. Hoy el

### Diagrama del proceso



cuasiatómica con los que trazar directamente modelos atómicos de estructuras totalmente nuevas.

No obstante, para hacer de la microscopía electrónica 3D una técnica de aplicación general, se necesitaban nuevos algoritmos y estrategias de reconstrucción de macromoléculas que no estuvieran organizadas en estructuras icosaédricas, helicoidales ni cristalinas. La metodología para tratar muestras compuestas por diferentes complejos macromoleculares, o partículas aisladas, que adoptan orientaciones aleatorias (o al menos múltiples) sobre la rejilla del microscopio se desarrolló en el trabajo pionero

desarrollo de las cámaras de detección directa de alta sensibilidad permite resolver las estructuras con muchas menos imágenes, con el consiguiente ahorro de tiempo y de muestra, a la vez que se logran mejores resoluciones.

### El despuntar de los detectores directos

En los inicios de la criomicroscopía electrónica, las imágenes bidimensionales de las partículas se obtenían en una película fotográfica. Esta proporcionaba resoluciones relativamente altas, pero su manipulación era tediosa. Muchos investigadores adoptaron entonces los dispositivos de carga acoplada (CCD) por la comodidad de la lectura digital, aunque la resolución de este tipo de cámaras era mediocre.

El desarrollo y la comercialización de los aparatos de detección directa han supuesto un avance importante para la criomicroscopía electrónica. Mientras que las cámaras CCD convierten los electrones en fotones para grabar las imágenes, los detectores directos hacen exactamente lo que su nombre indica: detectan directamente los electrones. De ese modo, las imágenes de las partículas son captadas con mucha mayor sensibilidad.

Los detectores directos también son rápidos, por lo que las imágenes pueden grabarse en «modo de vídeo». Teniendo en cuenta esta virtud, se han ideado métodos para corregir la distorsión generada durante la captación de las imágenes por los mínimos movimientos de las muestras causados por el haz de electrones. Este novedoso modo de recolección de datos ha sido clave para obtener información con una resolución cuasiatómica.

### Heterogeneidad: una bendición y una maldición

A diferencia de la cristalización, que atrapa las proteínas en su orientación más estable, las proteínas de las muestras analizadas con la criomicroscopía electrónica se mueven libremente hasta el momento de la ultracongelación. Puesto que se trata de una técnica para partículas aisladas, estas transiciones conformacionales pueden captarse y estudiarse, lo que acaba redundando en una comprensión biológica más profunda de la función y de los mecanismos de las proteínas.

El inconveniente estriba en que esa heterogeneidad conformacional dificulta, y a veces mucho, la reconstrucción 3D de alta resolución. Los algoritmos informáticos han llegado muy lejos y son capaces de clasificar conjuntos de datos heterogéneos en subconjuntos estructuralmente homogéneos, pero aún queda mucho margen de mejora.

Allison Doerr es editora de Nature Methods.

del equipo de Joachim Frank, de la Universidad de Columbia. Su esfuerzo condujo al nacimiento y la difusión de la reconstrucción de partículas aisladas, la más utilizada hoy para la dilucidación de estructuras con la criomicroscopía electrónica.

### ANALIZAR LAS IMÁGENES

La clave de la criomicroscopía electrónica de partículas aisladas radica en las herramientas informáticas que definen las orientaciones relativas de las proyecciones bidimensionales con las que proceder a la reconstrucción en tres dimensiones. Los dos principales retos de tal empresa conciernen al carácter ruidoso de las imágenes y a la necesidad de identificar informáticamente sus orientaciones relativas. Además, con el fin de minimizar el daño por radiación de la muestra, la toma de datos se efectúa con dosis muy bajas de electrones (unos 20 a 40 electrones por angstrom cuadrado), por lo que para amplificar la señal es preciso promediar varias decenas o cientos de miles de imágenes de partículas aisladas (antes de disponer de la nueva técnica de detección, este número era del orden de millones).

Las orientaciones relativas se determinan con varios métodos. Frank y Pawel Penczek, de la Universidad de Texas, propusieron el «cotejo de proyecciones» (*projection matching*), que compara cada imagen experimental con vistas generadas por ordenador de una referencia en 3D que se asemeja a la estructura real y que asigna los ángulos según un criterio de correlación cruzada. Puede suceder que las estructuras de referencia iniciales tengan que dilucidarse *de novo* a partir de las imágenes con métodos geométricos (que recogen dos o más imágenes de la misma zona del espécimen desde diferentes ángulos de inclinación), que suelen considerarse fiables y aportan información sobre la quiralidad de la estructura. Entre estos se halla el método de reconstrucción mediante inclinación cónica aleatoria, descrito por Frank y Michael Radermacher, de la Universidad de Vermont. Como alternativa a los métodos geométricos, la orientación relativa entre las imágenes de la partícula puede determinarse analíticamente teniendo en cuenta el hecho de que cada par de proyecciones bidimensionales comparte una «línea común» en la transformada de Fourier tridimensional. El popular método de reconstitución angular propuesto por Marin van Heel, del Colegio Imperial de Londres, traslada al espacio real este principio de las líneas comunes y, aunque no necesita inclinar el espécimen, no define la quiralidad del objeto.

Las diversas metodologías de análisis de la imagen se han integrado en paquetes de *software* que los expertos utilizan con asiduidad, como Spider e Imagic. EMAN y más tarde EMAN2 fueron desarrollados por Wah Chiu y Steve Ludtke, del Colegio de Medicina Baylor, en Houston, con el fin de facilitar el procesado de las imágenes a los neófitos. Frealign, desarrollado por Nikolaus Grigorieff, del Campus de Investigación Janelia, se centra en el refinamiento tridimensional (consistente en mejorar iterativamente la densidad de referencia junto con la asignación de ángulos a las imágenes experimentales, lo cual aumenta la resolución) e incorpora una corrección muy eficaz de la función de transferencia de contraste del microscopio (el efecto del sistema óptico sobre la imagen como función de la frecuencia espacial) en el procedimiento de reconstrucción. SPARX fue creado por Penczek, Glaeser, Paul Adams, también del LNLB, y Ludtke como un entorno de programación gráfica para usuarios finales, apto tanto para la cristalografía de rayos X como para la criomicroscopía electrónica. Xmipp, desarrollado por José María Carazo, del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC, en Madrid; Sjors Scheres, del LBM-CIM, y colaboradores,

usa una interfaz basada en X-Windows y hace hincapié en la modularidad de los protocolos de análisis de imágenes y en la descripción de la heterogeneidad estructural.

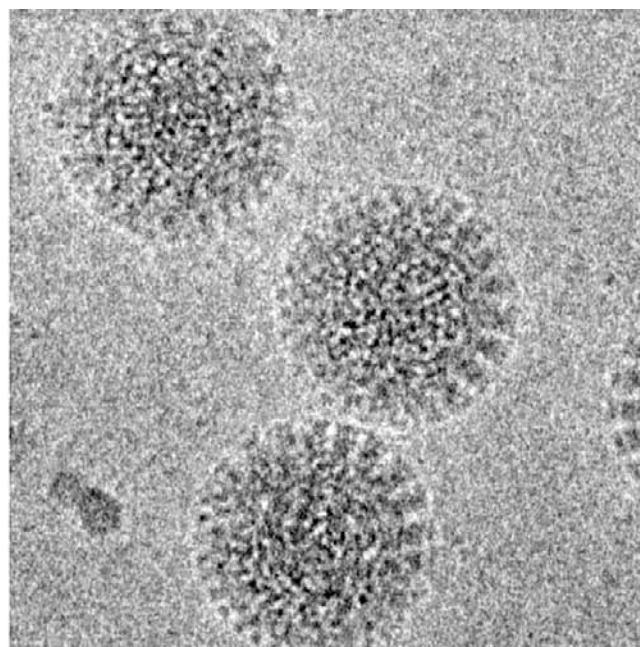
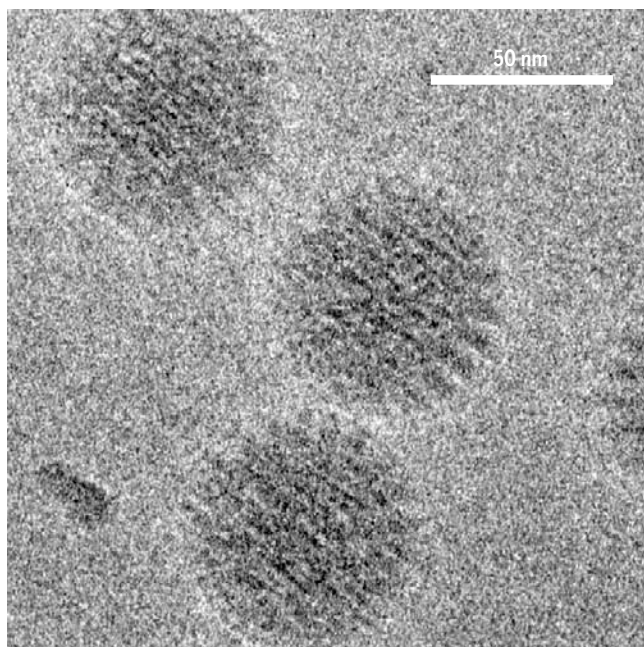
Como la criomicroscopía electrónica es una técnica para partículas aisladas, a menudo las muestras plantean el reto adicional de la heterogeneidad de composición o de conformación, una de las principales razones por las que no resulta fácil conseguir resoluciones altas. Los análisis de muestras heterogéneas requieren clasificar las imágenes de las partículas en subconjuntos estructuralmente homogéneos. Esta tarea puede llevarse a cabo usando, en primer lugar, principios geométricos y, a continuación, un método de cotejo de proyecciones con referencias múltiples. Un importante avance en el análisis de las imágenes de criomicroscopía electrónica se fraguó cuando Fred Sigworth, de la Universidad Yale, introdujo por primera vez criterios de máxima verosimilitud. El método consiste en asignar a cada imagen experimental no una única orientación relativa acorde con un cierto criterio de similitud, sino un conjunto de probabilidades de tener una orientación cualquiera. Se ha comprobado que así es posible tratar con fiabilidad las imágenes cargadas de ruido generadas por la criomicroscopía.

Desde entonces, para determinar de manera simultánea estados coexistentes en la muestra, se han implementado metodologías de máxima verosimilitud que clasifican sin supervisión las imágenes de las partículas. Si bien se trata de un proceso que exige una enorme potencia de cómputo, la capacidad para identificar y caracterizar múltiples estados estructurales ofrece una valiosa comprensión de la dinámica macromolecular. Hoy en día, los paquetes como Frealign y Xmipp incorporan principios de máxima verosimilitud. RELION, programa desarrollado por Scheres, ha atraído la atención mundial por su capacidad para tratar muestras heterogéneas y por su interfaz sencillo, lo que ha hecho el análisis de imágenes de partículas aisladas accesible a una comunidad de usuarios más amplia.

## UNA NUEVA ERA: MÁS, MEJOR Y MÁS RÁPIDO

El campo de la microscopía electrónica 3D ha experimentado enormes progresos desde el estudio pionero de la cola del bacteriófago T4. Se han desarrollado nuevos instrumentos y métodos de procesamiento de imágenes, y la llegada de la automatización en la adquisición y análisis de los datos ha mejorado el rendimiento. En el decenio que separa la dilucidación de las primeras estructuras de virus que rompieron la barrera nanométrica y el primer trazado *de novo* de una cápside vírica, el campo de la criomicroscopía electrónica se ha consolidado, con un número creciente de laboratorios que utilizan la técnica y la incesante mejora de la resolución. Pero los avances nunca han transformado tanto el panorama como durante los últimos años, con la comercialización de las cámaras de detección directa de electrones.

La nueva técnica de detección da como resultado imágenes con un contraste notablemente mayor, lo que, sumado a la rápida velocidad de lectura, admite un «modo de vídeo» de adquisición de los datos que supera las limitaciones del movimiento inducido por el haz. Cuando los electrones atraviesan la muestra vitrificada generan el movimiento de las partículas y el hielo mientras la imagen se está captando, con lo que esta aparece borrosa. Este fenómeno se corrige dividiendo la dosis total en cortas series de fotogramas (por ejemplo, de 20, con dosis típicas de 1 electrón por angstrom cuadrado por cada fotograma) que luego se alinean y promedian, con lo que se evita que la imagen quede difuminada por el movimiento inducido por el haz; este procedimiento fue explorado por primera vez por Grigorieff. El elevado cociente entre señal y ruido de las imágenes de las partículas permite alinearlas con más precisión y, por tanto, contribuye a conseguir resoluciones más altas, potencialmente atómicas. Los avances técnicos en los detectores no solo han llevado a la determinación de estructuras tridimensionales con mayor resolución partiendo de un volumen de datos menor, sino



EL TRATAMIENTO DE LAS IMÁGENES ha mejorado la calidad de las criomicrografías, como la de estos rotavirus, obtenida con una cámara de detección directa de electrones a 40 fotogramas por segundo. A la imagen de la izquierda no se le ha aplicado ninguna alineación y aparece borrosa por efecto del movimiento generado por el haz de electrones incidente. La imagen de la derecha es el resultado de someter la anterior al alineamiento para compensar dicho movimiento, con la evidente mejora en nitidez y contraste.

FUENTE: «BEAM-INDUCED MOTION OF VITRIFIED SPECIMEN ON HOLEY CARBON FILM», FORA. F. BRILOT, J. Z. CHEN, A. CHENG, J. PAN, S. C. HARRISON, C. S. POTTER, B. CARRAGHER, R. HENDERSON Y N. GRIGORIEFF EN J. STRUCT. BIOL., N.º 177, PÁGS. 630-637, 2012

**LOS MICROSCOPIOS ELECTRÓNICOS** como Titan Krios, uno de los más costosos del mundo, incorporan los recientes avances para dilucidar la estructura de complejos moleculares con una resolución muy elevada.

que, además, ahora es posible visualizar muestras en estado hidratado y congelado de menor tamaño, de modo que se pueden estudiar complejos pequeños o proteínas individuales. Tal vez sea más significativo el hecho de que también mejora la clasificación de las muestras heterogéneas, lo cual ha conducido al descubrimiento y la descripción de estados inusuales.

Así pues, como resultado de las mejoras en el equipo físico y en las herramientas informáticas, la aplicabilidad, la resolución y el rendimiento de la criomicroscopía electrónica de partículas aisladas se han incrementado de manera espectacular, lo que la convierte en una excelente alternativa a la cristalografía de rayos X. Como consecuencia de ello, está provocando una avalancha de nuevos conocimientos sobre sistemas biológicos que antes se resistían a la caracterización estructural. Entre ellos se cuenta un número cada vez mayor de proteínas integrales de membrana; polímeros biológicos, como la actina F y los microtúbulos; grandes ensamblajes que solo se producen en cantidades ínfimas, como los complejos de iniciación de la transcripción; y estados inusuales dentro de mezclas bioquímicas complejas, como los que se observan en los complejos de iniciación de la traducción eucariota.


### REFLEXIONES FINALES

La criomicroscopía electrónica ha alcanzado tal nivel de madurez que ciertos tipos de muestras, como virus o ribosomas, ya muy pocas veces se caracterizan mediante cristalografía de rayos X. Una tendencia similar comienza a entereverse en el caso de las proteínas integrales de membrana. A medida que disminuya el tamaño necesario de las moléculas para poder ser analizadas, el número de sistemas susceptibles de estudio con la criomicroscopía electrónica crecerá y esta se apropiará de un dominio experimental que antes pertenecía a los rayos X. Pero, para esta autora, el aliciente se halla más en lo «grande» que en lo «pequeño». Los complejos macromoleculares de gran tamaño, en especial cuando la reconstitución se vuelve limitante y las fuentes endógenas son escasas, han representado durante un tiempo el dominio de la criomicroscopía electrónica. Estos ensamblajes tienden a ser flexibles y, aunque los métodos de clasificación han llegado muy lejos en mezclas bioquímicas o estados conformacionales bien definidos, el movimiento continuo que caracteriza ciertas muestras planteará un reto para los esquemas clasificatorios e impondrá un límite a la resolución alcanzable, al menos durante varios años. Aun así, tales estudios conseguirán resoluciones subnanométricas a la vez que describirán estados múltiples (o incluso trayectorias conformacionales). En tales casos, el conocimiento de las estructuras obtenido con la criomicroscopía será muy valioso, pero lo será aún más si pueden incorporarse estructuras cristalinas de componentes obtenidas por rayos X usando metodologías híbridas para generar modelos



pseudoatómicos. En este contexto, los métodos informáticos que predicen las interacciones o estructuras proteicas también desempeñarán un papel clave de aquí en adelante.

Importantes cuestiones técnicas y nuevas oportunidades aguardan al campo de la criomicroscopía electrónica. Se están desarrollando la tecnología de placa de fases, detectores aún mejores, procedimientos perfeccionados y reproducibles para la preparación de las muestras y nuevos programas informáticos capaces de tratar formas continuas de variabilidad estructural, lo que propiciará mayores avances en un futuro cercano. Entre los retos inmediatos se halla el elevado coste de adquisición y mantenimiento de los equipos de microscopía electrónica y la enorme potencia de cómputo necesaria, un hecho que invita a pensar en un nuevo modelo de financiación en el que se compartan instrumentos y recursos

de supercomputación. Por último, en el campo en auge de la criomicroscopía electrónica existe una clara necesidad de herramientas sencillas para validar estructuras que estén al alcance de toda la comunidad científica. 

*La autora agradece a R. Glaeser sus comentarios durante la preparación del artículo y declara recibir financiación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales de los EE.UU.*

Artículo original publicado en *Nature Methods*, vol. 13, n.º 1, págs. 23-27, 2016.  
Traducido con el permiso de Macmillan Publishers Ltd. © 2016

Con la colaboración de **nature**

#### PARA SABER MÁS

- Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs.**  
D. J. De Rosier y A. Klug en *Nature*, vol. 217, págs. 130-134, 1968.
- Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*.**  
M. Radermacher et al. en *Journal of Microscopy*, vol. 146, págs. 113-136, 1987.
- Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy.** R. Henderson et al. *Journal of Molecular Biology*, vol. 213, págs. 899-929, 1990.
- Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies.**  
J. Frank. Academic Press, San Diego, 1996.
- Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography.**  
E. Nogales, S. G. Wolf y K. H. Downing en *Nature*, vol. 391, págs. 199-203, 1998.
- A maximum-likelihood approach to single-particle image refinement.**  
F. J. Sigworth en *Journal of Structural Biology*, vol. 122, págs. 328-339, 1998.
- Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex.**  
I. S. Fernández et al. en *Science*, vol. 342, DOI: 10.1126/science.1240585, 2013.
- Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy.** J. Du et al. en *Nature*, vol. 526, págs. 224-229, 2015.

#### EN NUESTRO ARCHIVO

**Microscopios de rayos X.** Malcolm R. Howells, Janos Kirz y David Sayre en *IyC*, abril de 1991.