

# La microscopía electrónica:

*una herramienta para visualizar las biomoléculas*

Pilar Cossio

(Colombia, 1984-v.)

Física de la Universidad de Antioquia, Magíster y Doctora en Física y Química de Sistemas Biológicos de la Universidad Sissa, Italia. Posdoctorados en los Institutos Nacionales de Salud (NIH), Estados Unidos, y en el Instituto Max Planck, del mismo país. Profesora de cátedra de la Universidad de Antioquia. Ha sido acreedora a varios premios y reconocimientos y ha publicado numerosos artículos.



## Resumen

**V**isualizar el nanomundo, en particular el mundo de las biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, es un reto para la ciencia. Varias técnicas experimentales se han desarrollado para este propósito, en especial la criomicroscopía electrónica, una rama de la biología estructural que busca caracterizar la estructura tridimensional de las biomoléculas. Esta técnica consiste en tomar imágenes bidimensionales de las biomoléculas en ángulos de orientación aleatorios. Las imágenes son procesadas con algoritmos computacionales y de ellas se genera la estructura tridimensional. Dicha técnica ha avanzado enormemente en los últimos años, creando la revolución de la resolución en la microscopía. En este artículo se discuten las razones que llevaron a la criomicroscopía electrónica a ser un pilar de la biología estructural.

## Palabras clave

Microscopía, nanomundo, proteínas, temperaturas criogénicas.

Las proteínas y los ácidos nucleicos son biomoléculas esenciales para la vida. Estas desarrollan importantes funciones como, por ejemplo, transportar el oxígeno, extraer energía de los alimentos y transmitir señales eléctricas. La vida existe debido a estas y por ello es fundamental estudiarlas. Una manera de entender su función biológica es caracterizando su estructura tridimensional a nivel atómico, esto es, visualizando la organización espacial de los átomos que las componen.

La biología estructural se encarga de desarrollar métodos experimentales para determinar la estructura tridimensional de las biomoléculas. Entre ellos están la cristalografía de rayos X, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la criomicroscopía electrónica de molécula única. Esta última ha generado recientemente una revolución en el área de la biología estructural.

La criomicroscopía electrónica de molécula única consiste en tomar imágenes bidimensionales de una muestra pura de proteína o de ácidos nucleicos, en solución acuosa a temperaturas criogénicas (Cheng, 2018). El objetivo principal de esta técnica consiste en reconstruir la estructura tridimensional a partir de las imágenes bidimensionales, llamadas micrografías, en donde se encuentran múltiples partículas con ángulos de orientación aleatorios. Es decir, la imagen bidimensional de cada biomolécula de la muestra es tomada en un ángulo de orientación desconocido y aleatorio. Primero, la ubicación de cada partícula tiene que ser identificada dentro de las micrografías (véase figura 1A). Después, algoritmos matemáticos o de inteligencia artificial le asignan a cada partícula seleccionada una orientación, esto es, un ángulo de proyección. Cuando todas las partículas tienen asignada su orientación entonces es posible reconstruir una estructura tridimensional (véase figura 1B). La estructura tridimensional se mejora utilizando métodos computacionales iterativos (donde se perfecciona la asignación del ángulo de orientación de cada partícula). Así, utilizando grandes números de partículas y supercomputadores es posible reconstruir la estructura tridimensional de una biomolécula hasta, probablemente, llegar a resoluciones donde se puedan visualizar los átomos. La resolución es la capacidad de un método o de un instrumento de captar detalles finos de un objeto.

Una de las mayores ventajas de la criomicroscopía electrónica es que las imágenes son tomadas en condiciones cercanas al ambiente biológico real. No hay necesidad de construir cristales como en cristalografía de rayos X; ni tampoco que las moléculas sean pequeñas como en RMN. Debido a esto, estructuras de proteínas

antes inaccesibles han sido reconstruidas; por ejemplo, el ribosoma (Fisher et al., 2015) y grandes proteínas simétricas (D'Imprima et al., 2016 y Sun et al., 2015). La gran cantidad y calidad de las reconstrucciones tridimensionales obtenidas hasta ahora han creado la *revolución de la resolución* (Kühlbrandt, 2014) en criomicroscopía.

Esta revolución llevó a que en 2017 se le otorgara el Premio Nobel en química a Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson. Dubochet desarrolló el método experimental para congelar la muestra a temperaturas criogénicas, dejándola en solución vítrea (Dubochet et al., 1998). Frank y Henderson desarrollaron métodos experimentales y teóricos para identificar las biomoléculas en la muestra y reconstruir la estructura tridimensional (Penczek, Radermacher y Frank, 1992 y Rosenthal y Henderson, 2003).

Sin embargo, la revolución de la criomicroscopía electrónica no ha terminado. Existen varios problemas por resolver. Una de las premisas para reconstruir la estructura tridimensional es que todas las partículas correspondan a la biomolécula en el mismo estado conformacional. Pero, ¿qué sucede si la biomolécula es flexible y puede adquirir múltiples conformaciones? El análisis de moléculas dinámicas y flexibles genera grandes retos para los algoritmos computacionales en criomicroscopía, ya que no solo se debe identificar la mejor orientación de cada partícula, sino que también es necesario identificar la mejor conformación de la molécula (Cossio y Hummer, 2013). Otro reto es el análisis de muestras donde las biomoléculas adquieren orientaciones preferenciales, pero no se exploran todos los ángulos de proyección necesarios para determinar la estructura 3D. En estas muestras no es posible la reconstrucción de la estructura tridimensional de las biomoléculas (Cossio y Hummer, 2018). Adicionalmente, uno de los problemas por resolver es cómo sistematizar la optimización del proceso y la reducción del tiempo de toma y análisis de datos experimentales. Los avances en estos aspectos traerán grandes beneficios para la generación de las estructuras tridimensionales de las

miles de biomoléculas diferentes. Dados todos estos retos, consideramos que la criomicroscopía electrónica es un campo con un gran potencial de desarrollo que permitirá descifrar los secretos de cómo están estructuralmente hechas las moléculas que componen la vida.

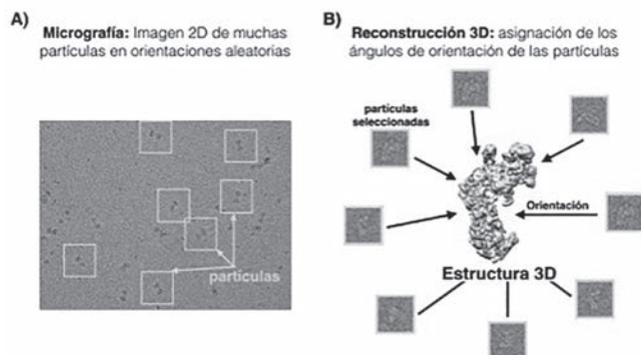


Figura 1. A) Ejemplo de una micrografía, que es una imagen 2D en donde se encuentran múltiples partículas con ángulos de orientación aleatorios. B) Reconstrucción tridimensional de la biomolécula del complejo I (centro) (D'Imprima et al., 2016) utilizando las técnicas de criomicroscopía electrónica. A cada partícula de la biomolécula se le asigna un ángulo de proyección (orientación) y la estructura tridimensional se reconstruye combinando muchas partículas con diferentes orientaciones.

## Referencias

- Cheng, F. (2018). Single-particle cryo-EM-How did it get here and where will it go. *Science*, 361(6405), 876-880.
- Cossio, P. y Hummer, G. (2013). Bayesian analysis of individual electron microscopy images: towards structures of dynamic and heterogeneous biomolecular assemblies. *Journal of Structural Biology*, 184(3), 427-437.
- Cossio, P. y Hummer, G. (2018). Likelihood-based structural analysis of electron microscopy images. *Current Opinion Structural Biology*, 49, 162-168.
- D'Imprima, E., Mills, D., Parey, K. et al. (2016). Cryo-EM structure of respiratory complex I reveals a link to mitochondrial sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1857(12), 1935-1942.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. y Schultz, P. (1998). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 21(2), 129-228.
- Fisher, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V. y Stark, H. (2015). Structure of the E. coli ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*, 520(7548), 567-570.
- Kühlbrandt, W. (2014). The resolution revolution. *Science*, 34(6178), 1443-1444.
- Naydenova, K. y Russo, Ch. (2017). Measuring the effects of particle orientation to improve the efficiency of electron cryomicroscopy. *Nature Communications*, 8(1), 629.
- Penczek, P., Radermacher, M. y Frank, J. (1992). Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice. *Ultramicroscopy*, 40(1), 33-53.
- Rosenthal, P. B. y Henderson, R. (2003). Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 333(4), 721-745.
- Sun, Y.-L., Qi, L., Sun, S.-M., Huang, J.-Ch., Zheng, B.-Y., Chen, Q.-D., Shao, Z. y Sun, H. B. (2015). Aqueous multiphoton lithography with multifunctional silk-centred bio-resists. *Nature Communication*, 6.