

# Criotomografía electrónica

José Jesús Fernández

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). Campus UAM. Cantoblanco (Madrid).

## RESUMEN

La criotomografía electrónica es una técnica que permite la visualización y el análisis *in situ* de la organización molecular de la célula. Para ello combina una óptima preservación estructural de las muestras, microscopía electrónica tridimensional y técnicas computacionales de procesamiento de imagen. En este artículo se repasan los aspectos fundamentales de la técnica y se muestran ejemplos ilustrativos de su potencial para obtener información estructural y funcional en el contexto celular nativo.

## INTRODUCCIÓN

Las técnicas empleadas tradicionalmente en biología estructural para estudiar la estructura de las proteínas y complejos macromoleculares que forman parte de una célula se basan en una estrategia ‘reduccionista’. Los componentes objeto de estudio son purificados y analizados por medio de las técnicas de biología estructural disponibles, como Cristalografía de Rayos X, Resonancia Magnética Nuclear y criomicroscopía Electrónica de Partículas Individuales (véase el artículo “Determinación Estructural Mediante Criomicroscopía Electrónica de Partículas Individuales y Procesamiento de Imágenes” en este mismo número). Todas estas técnicas han contribuido enormemente a la comprensión de los complejos procesos que tienen lugar en la célula con un nivel resolución molecular y atómico. Sin embargo, los procesos celulares se llevan a cabo como resultado de interacciones, a menudo transitorias, entre múltiples diferentes complejos. Por tanto, una limitación intrínseca de estas técnicas es que los estudios se realizan sobre los componentes aislados y fuera del entorno celular, *ex situ*.

La criotomografía electrónica (crioTE) es una técnica única para llevar a cabo estudios estructurales *in situ*, en su entorno celular inalterado, sobre muestras preparadas con técnicas de congelación rápida que garantizan una óptima preservación estructural. La crioTE permite de este modo estudiar los módulos funcionales locales y sus interrelaciones en su contexto celular completamente nativo y con un nivel de resolución molecular, lo que se ha dado en llamar la “sociología molecular de la célula”. Esos estudios reciben el calificativo de *in situ sensu stricto*. También existen otras situaciones en las que únicamente se preserva un entorno celular local (p.ej. orgánulos aislados) para su análisis por crioTE, en cuyo caso se habla de estudios *in situ sensu largo*. Otra característica única de la crioTE es que proporciona un marco ideal para la biología estructural integrativa, donde información *ex situ* obtenida por medio de distintas técnicas se puede complementar e integrar para ser interpretada en su contexto biológico.

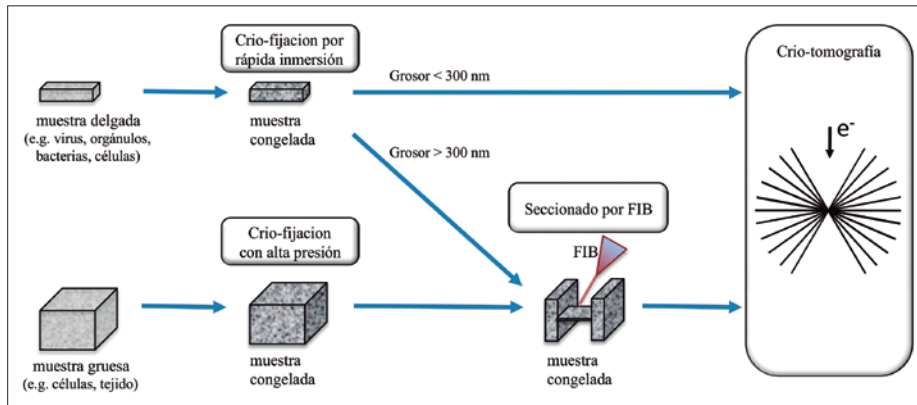
La crioTE se asienta sobre tres pilares fundamentales: (1) la preparación de muestras, (2) la adquisición de datos tomográficos y (3) su procesamiento computacional. En este artículo se repasan los aspectos más importantes de las distintas etapas en los estudios por crioTE, y se muestran algunos ejemplos representativos que ilustran el potencial de esta técnica para obtener información estructural y funcional en su entorno nativo y en términos cuantitativos.

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La preparación de muestras es la fase más importante de todo estudio estructural por crioTE. Las muestras han de fijarse para poder ser expuestas a las condiciones de alto vacío y al haz de electrones del microscopio. Tradicionalmente en la microscopía electrónica convencional se han usado protocolos basados en fijadores químicos y deshidratación, los cuales introducen artefactos que pueden llevar a interpretaciones incorrectas sobre la organización celular.

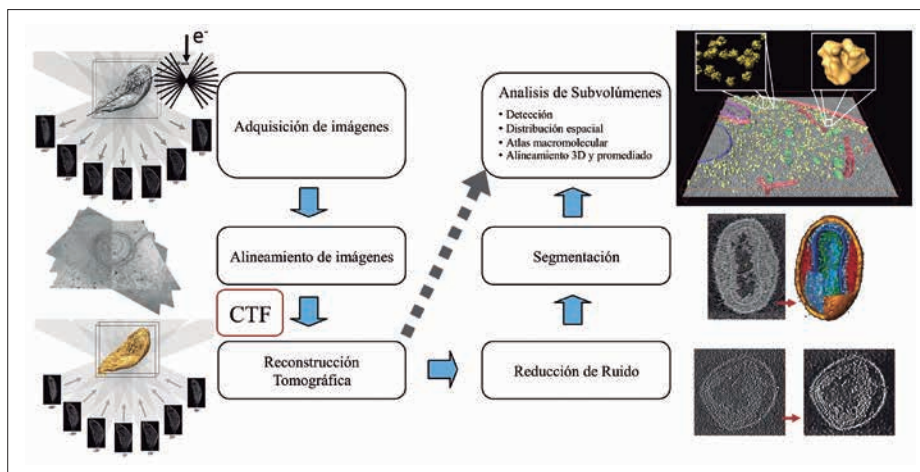
En crioTE las muestras se preparan mediante criofijación, que garantiza la mejor preservación estructural. Aquí la muestra se congela de forma ultrarrápida (ms) evitando la formación de cristales de hielo, y se mantiene hidratada en hielo amorfo (vítreo), un proceso que se conoce como vitrificación. Si la muestra es suficientemente delgada (unos pocos mm, como muestras de virus u orgánulos aislados, bacterias o si el interés está en la periferia de células eucariotas), la vitrificación se realiza por rápida inmersión en etano líquido. Si la muestra supera varias mm de grosor (p.ej. células o tejido, hasta 200 mm), la vitrificación se ha de realizar con alta presión para asegurar que el hielo no cristalice.

Otra cuestión que cubre la fase de preparación de muestras es la de asegurar que su grosor es adecuado (idealmente, < 300 nm) para la capacidad de penetración de los electrones y la visualización en el microscopio. Si la muestra vitrificada no es lo suficientemente fina (p.ej. células completas o tejido), es necesario seccionarla. Una técnica que ha emergido en la última década y que se está estableciendo como estándar es la de seccionado por un haz de iones focalizado (FIB, *Focused Ion Beam*). El haz de iones se emplea para eliminar material de la parte superior e inferior de la muestra, dejando una fina lámina de grosor adecuado (100–300 nm). Combinando FIB con métodos de microscopía correlativa óptica-electrónica (véase el artículo “Criomicroscopía correlativa tridimensional de tomografía de rayos X blandos” en este mismo número), es posible dirigir el haz de iones y extraer láminas de una región específica de la célula donde haya un evento de interés.



**Figura 1**

Preparación de muestras para criotomografía.



**Figura 2**

Etapas en la adquisición y procesamiento de imagen en criotomografía.

En conclusión, en criotomografía las muestras se vitrifican, asegurando así la óptima preservación estructural, y se mantienen hidratadas y congeladas durante la observación al microscopio. De ahí el término criotomografía, que es una extensión de la criomicroscopía electrónica, la técnica galardonada con el premio Nobel de Química 2017. La *Figura 1* esquematiza las etapas de la preparación de muestras en criotomografía.

### ADQUISICIÓN DE DATOS TOMOGRÁFICOS

Las imágenes que proporciona el microscopio electrónico son imágenes de proyección, donde la información estructural 3D de la muestra se solapa y se suma en la dirección del haz de electrones. Es decir, las imágenes son equivalentes a “radiografías” de la muestra. Los principios que rigen la criotomografía son los mismos que en el caso de la tomografía axial computerizada (TAC) comúnmente empleada en Medicina: la reconstrucción 3D de una muestra a partir de una serie de imágenes de proyección.

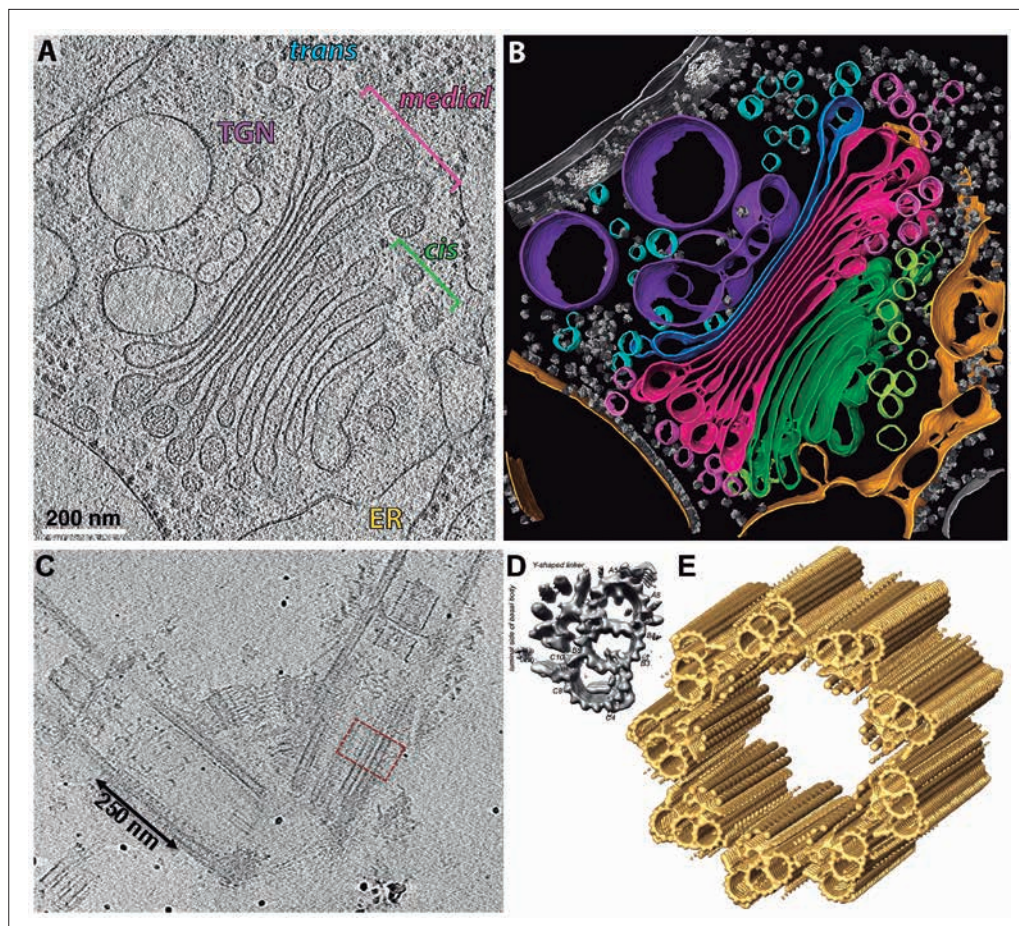
La muestra vitrificada y, en su caso seccionada, se introduce en el microscopio electrónico para su observación directamente a temperatura criogénica. De la muestra se adquieren una serie de imágenes a distintas vistas en torno a un eje de inclinación, a partir de las cuales se reconstruirá un volumen tridimensional (3D), como se describirá en las siguientes secciones (*Figura 2*). El tamaño de las imágenes ronda los 2048 x 2048 o 4096 x 4096 pixels, cubriendo un

área de entre 0,5 y 2 mm. El rango de inclinación normalmente está limitado en torno a  $\pm 60^\circ$  o  $\pm 70^\circ$ , con un intervalo angular entre  $1^\circ$  y  $5^\circ$ . Debido a limitaciones técnicas, no se puede cubrir completamente el rango de inclinación ( $\pm 90^\circ$ ). Como resultado, los volúmenes 3D presentan resolución anisótropa, con un nivel de detalle más pobre en la dirección del haz de electrones.

Los esquemas de adquisición han evolucionado para maximizar la calidad de la información estructural presente en las imágenes, gestionando el daño que la irradiación electrónica inflige a la muestra. Actualmente, la dosis electrónica acumulada total está limitada a un máximo de  $100 e^-/\text{Å}^2$  y se divide uniformemente entre las distintas imágenes adquiridas. Esa dosis tan reducida hace que las imágenes sean muy ruidosas y presenten una relación señal-ruido extremadamente baja. En las fases iniciales de la adquisición se toman las imágenes a menor inclinación, que son las que mejor preservan la información estructural porque la muestra ha sufrido menor daño electrónico acumulado.

### PROCESAMIENTO DE DATOS TOMOGRÁFICOS

El procesamiento de imagen es una herramienta fundamental en criotomografía, tanto para el cálculo del volumen 3D como para su interpretación. En este apartado se describen las etapas y aspectos más fundamentales del procesamiento (*Figura 2*). >>>



**Figura 3.**

Visualización *in situ* de orgánulos de *Chlamydomonas reinhardtii* por crióTE. (A,B) Aparato de Golgi visualizado en el contexto celular nativo mediante un enfoque *in situ sensu stricto*. (A) Sección de tomograma y (B) resultado de la segmentación. Paneles reproducidos de Bykov et al. *eLife* 2017;6:e3249, con permiso mediante licencia CC-BY. (C-E) Cuerpo basal purificado estudiado mediante un enfoque *in situ sensu largo* con crióTE y análisis de subvolúmenes (Li et al. *EMBO J* 2012;31:552-562, Li et al. *eLife* 2019;8:e43434). (C) Sección de tomograma, (D) resultado del promedio de tripletes de microtúbulos (C, caja roja) y (E) modelo 3D del cuerpo basal construido a partir del triplete promedio.

### >>> 1. Alineamiento de imágenes.

Las imágenes adquiridas con el microscopio suelen presentar ligeros desplazamientos y rotaciones. Para poder calcular la reconstrucción 3D es necesario alinearlas mutuamente para que se correspondan exactamente con la geometría de adquisición de datos tomográficos. Para ello, la estrategia estándar en crióTE consiste en incubar la muestra con oro coloidal durante la fase de preparación de muestras. Estas partículas de oro pueden identificarse fácilmente en las imágenes adquiridas y usarse como marcadores fiduciales para su alineamiento mediante procedimientos basados en mínimos cuadrados.

Cuando no es posible esta incubación con oro, en su lugar se intenta emplear como marcadores áreas de la

imagen que presenten alguna característica de buen contraste.

### 2. Corrección de la función de transferencia del microscopio.

El microscopio no es un instrumento perfecto. Tiene una función de transferencia de contraste (CTF, siglas de su nombre en inglés) que introduce una serie de artefactos en las imágenes. Éstos se caracterizan por una atenuación de algunos detalles en las imágenes y por un cambio de contraste en determinados rangos de resolución espacial. Estos artefactos afectan especialmente en los rangos de alta resolución y su corrección es esencial para poder interpretar las imágenes adecuadamente y calcular una reconstrucción 3D correcta, especialmente si el interés está en los detalles de



alta resolución. Esta corrección puede realizarse justo antes o durante el proceso de reconstrucción 3D.

### 3. Reconstrucción tomográfica.

El volumen 3D (o tomograma) se obtiene mediante la combinación de la serie de imágenes alineadas empleando algoritmos de reconstrucción tomográfica. El algoritmo estándar en crióTE es *Weighted Back-Projection* (WBP) que esencialmente consiste en retro-proyectar las imágenes adquiridas hacia el espacio del volumen, empleando la misma orientación en la que se han obtenido. El volumen 3D se obtiene repitiendo este proceso para todas las imágenes y sumando todas las retroproyecciones, como se ilustra en la *Figura 2*. Existen otros algoritmos que, de forma iterativa, van refinando y mejorando el contraste del volumen 3D a costa de un tiempo de cómputo mucho mayor.

### 4. Filtrado de ruido

Los tomogramas suelen tener una baja relación señal-ruido debido al ruido y bajo contraste de las imágenes adquiridas. Para reducir el ruido del tomograma, pero tratando de no afectar a la señal, se emplean métodos sofisticados de filtrado que consiguen reducir el ruido preservando los detalles estructurales. De esta forma, se consigue reducir el ruido pero preservando los detalles estructurales.

### 5. Segmentación

La segmentación consiste en extraer los distintos componentes estructurales del tomograma (p.ej. orgánulos celulares) mediante la identificación y agrupamiento de los voxels que pertenecen a ellos. Debido al bajo contraste y la complejidad de los entornos celulares reflejados en los tomogramas, las herramientas clásicas de segmentación no han dado buenos resultados por sí mismas. Por ese motivo, durante mucho tiempo estas herramientas se han combinado con segmentación manual. En los últimos años ha habido avances en el desarrollo de métodos dirigidos específicamente a determinadas características estructurales, con especial interés por las membranas ya que constituyen la frontera natural de los compartimentos celulares. Estos métodos (semi-) automáticos permiten una mayor agilización y objetividad en el proceso de segmentación. Recientemente, las técnicas basadas en Inteligencia Artificial se han empezado a aplicar con éxito. El sistema es entrenado para reconocer determinadas características estructurales (p.ej. membranas de distintos orgánulos, microtúbulos, ribosomas) a partir de un conjunto relativamente pequeño de datos. Una vez entrenado, el sistema es capaz de segmentar tomogramas complejos directamente y de forma automática.

### 6. Análisis de subvolumenes

Esta etapa se centra principalmente en el análisis de los complejos macromoleculares en su entorno celular nativo.

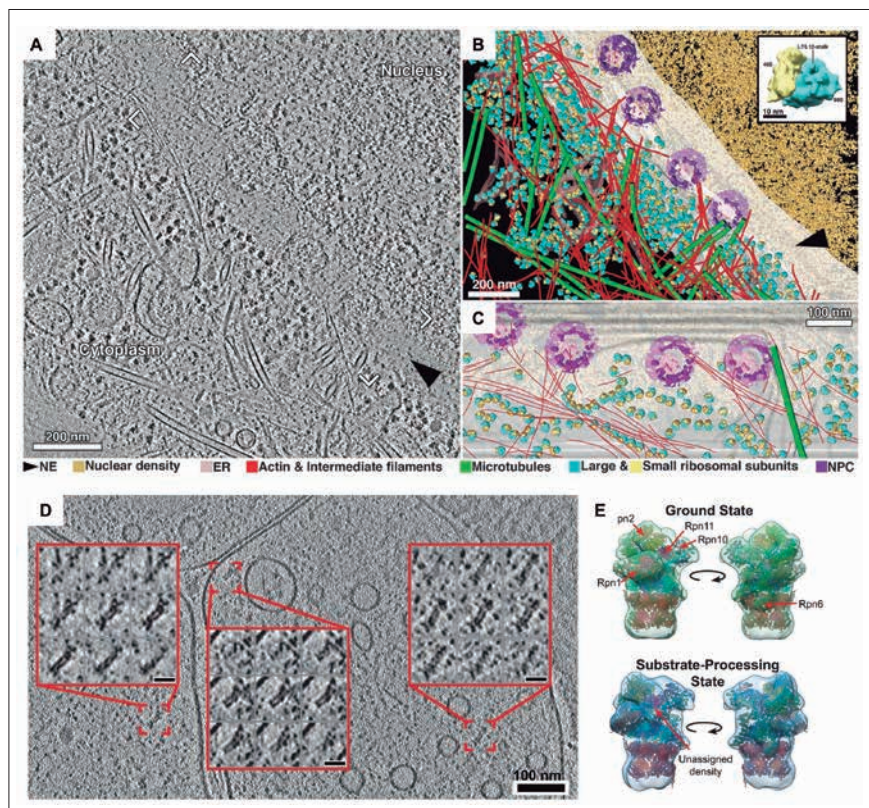
Estos complejos, o en general componentes estructurales repetitivos, se encuentran distribuidos por todo el tomograma, cada uno con su propia orientación. Estos complejos pueden detectarse mediante técnicas automáticas de reconocimiento de patrones basadas en correlación, normalmente a partir de un volumen de referencia (p.ej. una estructura similar existente en bases de datos). Una vez que los complejos se han detectado, pueden extraerse, alinearse y promediarse en 3D, para así obtener una visión de mayor calidad y mayor resolución del complejo macromolecular en cuestión. También se pueden aplicar técnicas de clasificación para identificar distintos tipos de complejos o sus distintas conformaciones y efectuar análisis cuantitativos. Por

**LA SEGMENTACIÓN** consiste en extraer los distintos componentes estructurales del tomograma mediante la identificación y agrupamiento de los voxels que pertenecen a ellos. Debido al bajo contraste y la complejidad de los entornos celulares reflejados en los tomogramas, las herramientas clásicas de segmentación no han dado buenos resultados.

otro lado, la información sobre (a) la estructura de los complejos, (b) su localización y (c) orientación en el tomograma posibilitan la construcción de “atlas macromoleculares” que permiten el análisis de la distribución espacial en 3D de los distintos complejos, sus conformaciones y las interacciones entre todos ellos. Todas estas posibilidades se traducen en un conocimiento más profundo de la organización molecular de la célula y de las interrelaciones entre los distintos componentes que la constituyen.

### 5. Ejemplos de estudios estructurales *in situ* mediante crióTE

La *Figura 3* muestra el estudio de varios orgánulos del alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* mediante crióTE. (A-B) muestra el aparato de Golgi de una célula vitrificada y seccionada con FIB. Se observan las distintas regiones de cisternas (cis, medial, trans), la red trans-Golgi y distintos tipos de vesículas, así como la variación de densidad luminal en todas ellas. La segmentación de las membranas se realizó por medio de métodos automáticos. En el trabajo mostrado en *Figura 3* (C-E) se empleó un enfoque *sensu largo* para estudiar el cuerpo basal purificado. Tras la vitrificación y crióTE, se extrajeron segmentos de los tripletes de microtúbulos (C, caja roja) que se alinearon y promediaron para obtener información estructural a 3,5 nm de resolución, suficiente para distinguir los protofilamentos de tubulina y su periodicidad de 4 nm (D). Este triplete promedio se empleó para construir un modelo 3D completo de la parte central del orgánulo (E) donde se puede estudiar la interacción entre los distintos tripletes y obtener información sobre el mecanismo de ensamblaje de este orgánulo. >>>



**Figura 4**

Visualización *in situ* de complejos macromoleculares en su contexto celular. (A-C) Periferia del núcleo de células HeLa. (A) Sección del tomograma, (B,C) vistas 3D de la segmentación donde se identifican distintos componentes en el entorno de la envuelta nuclear. Modificado de Mahamid *et al. Science* 2016; 351:969-72 con permiso. (D,E) Visualización de proteasomas en neuronas. (D) Sección del tomograma donde se identifican claramente proteasomas (cuyas secciones en Z se muestran). (E) Resultados promedio de dos clases de proteasomas que se han identificado en el citoplasma. Un ajuste con modelos atómicos muestra que estas clases se corresponden con dos estados distintos del proteasoma: inactivo y activo (procesando sustrato). Reproducido de Asano *et al. Science* 2015;347:439-42 con permiso.

La *Figura 4* muestra varios ejemplos del estudio de la organización molecular de entornos celulares en estado nativo mediante criOTE. (A-C) presenta la periferia nuclear de una célula humana vitrificada y seccionada por FIB. (B-C) muestran distintas vistas de la segmentación 3D donde se observa la complejidad del entorno de la envuelta nuclear y se identifican distintos tipos de estructuras filamentosas y ribosomas. El análisis de subvolúmenes permitió obtener un ribosoma promedio en torno a 3 nm de resolución (B, inset) y generar un atlas ribosomal que posibilita el estudio cuantitativo de la organización polisomal. En el trabajo mostrado en *Figura 4* (D-E) se estudiaron neuronas del hipocampo de rata en cultivo. En el citoplasma (D) se identifican claramente proteasomas, la maquinaria de degradación de proteínas que es de vital importancia para la homeostasis celular. Tras detectar los proteasomas de forma automática y aplicar alineamiento, promediado y clasificación se obtuvieron unas estructuras en torno a 3 nm de resolución que se ajustan muy bien con dos estados del proteasoma observados por técnicas estructurales de alta resolución: inactivo y activo (procesando sustrato) (E). El análisis cuantitativo de los estados de los proteasomas reveló que, en ausencia de estrés, sólo el 20% de ellos se haya activo y procesando sustrato, demostrando de esta forma la capacidad de la criOTE para proporcionar información funcional.

## CONCLUSIONES

La criOTE se ha establecido como una técnica para estudiar *in situ* los módulos funcionales y complejos macromoleculares que forman parte de la célula y sus interrelaciones, con capacidad de proporcionar información detallada a nivel estructural y funcional desde nuevas perspectivas. La criOTE va a permitir un conocimiento más profundo de la organización molecular de la célula y de los mecanismos que subyacen bajo los procesos celulares básicos, con potencial impacto en los campos de la biología estructural, molecular y celular. ■

## PARA LEER MÁS

- Fernández JJ. Computational methods for electron tomography. *Micron* 43 (2012) 1010-30.
- Frank J (editor). Electron Tomography: Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell. Springer-Verlag, New York, 2006.
- Galaz Montoya JG, Ludtke SJ. The advent of structural biology *in situ* by single particle cryo-electron tomography. *Biophysics Reports*, 3 (2017) 1-19.
- Lucic V, Rigort A, Baumeister W. Cryo-electron tomography: the challenge of doing structural biology *in situ*. *Journal of Cell Biology* 202 (2013) 407-19.
- McIntosh J (editor). Cellular Electron Microscopy. Academic Press, San Diego, 2007.
- Wan W, Briggs JA. Cryo-Electron Tomography and Subtomogram Averaging. *Methods in Enzymology* 579 (2016) 329-67.

>>>