

Determinación estructural mediante criomicroscopía electrónica de partículas individuales y procesamiento de imágenes

Jaime Martín Benito y Rocío Arranz

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

RESUMEN

Los microscopios electrónicos de transmisión permiten la observación de muestras biológicas a decenas de miles de aumentos con enorme detalle. Los avances tecnológicos han posibilitado incluso la obtención de imágenes de moléculas biológicas aisladas, lo que ha sentado las bases para el desarrollo de la técnica de determinación estructural conocida como *criomicroscopía electrónica de partículas individuales*. Esta metodología está revolucionando la biología estructural actual y algunos de sus principales impulsores, los investigadores Richard Henderson, Joachim Frank y Jacques Dubochet, han recibido por ello el Premio Nobel de Química en 2017. En la presente revisión se expondrá una breve descripción de los aspectos fundamentales de esta técnica.

LA HERRAMIENTA: EL (CRIO)MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

La aparición del microscopio electrónico a mediados de los años 30 abrió una nueva era en la observación de las muestras biológicas. La posibilidad de usar electrones como fuente de iluminación, con una longitud de onda mucho más corta que la luz visible, permitió diseñar sistemas ópticos capaces de alcanzar grandes magnificaciones. De este modo, la obtención de imágenes de estructuras subcelulares con gran detalle supuso una revolución en biología. Las mejoras técnicas posteriores aumentaron la calidad de las imágenes y pusieron al alcance de los investigadores la posibilidad de estudiar grandes complejos macromoleculares. Así en 1968 David DeRosier y Aaron Klug determinaron la primera estructura tridimensional de un agregado molecular a baja resolución, la cola del bacteriófago T4. En esos experimentos pioneros, con microscopios de tecnología muy limitada, para poder obtener imágenes de los complejos moleculares se recurría a un agente de tinción. Ya en los años 70 apareció una nueva tecnología que permitía que el haz de electrones tuviera un alto brillo y una iluminación mucho más coherente desde el punto de vista

óptico. Este avance, conocido como “cañón de emisión de campo”, supuso un enorme paso en la mejora de la calidad de las imágenes. Las décadas posteriores trajeron mejoras en la preparación de muestras y en los detectores, como veremos en detalle en los apartados siguientes. Todos estos desarrollos han servido para que los nuevos microscopios puedan obtener imágenes incluso de proteínas de muy pequeño tamaño que sirven para resolver su estructura a nivel atómico.

El principio en el que se basa la reconstrucción tridimensional de proteínas mediante criomicroscopía electrónica (crioME) es sencillo: si se consiguen obtener imágenes de proyección de una proteína o complejo macromolecular en diferentes direcciones, éstas pueden servir para calcular su estructura tridimensional. No obstante, tras este sencillo principio, existen múltiples dificultades técnicas y metodológicas que se deben superar para conseguir ese objetivo. En los siguientes apartados se mostrarán los pasos necesarios para determinar una estructura mediante crioME.

LA MUESTRA: COMO PREPARARLA

Cuando se quiere determinar la estructura de un complejo macromolecular usando microscopía electrónica se debe empezar por emplear un método que preserve la muestra de las condiciones de alto vacío del microscopio y del daño por radiación ejercido por el haz de electrones al incidir en ella. En los principios de la microscopía la solución buscada fue añadir a la muestra de una sal de un elemento pesado, como el acetato de uranilo, que a la vez que deshidrata la muestra y la fija, aporta contraste a la imagen. Esta técnica pronto se mostró insuficiente porque limita la resolución y puede introducir gran número de artefactos en el proceso de reconstrucción tridimensional. Para evitar estos problemas, a mediados de los 80 se desarrolló la técnica de congelación a alta velocidad o vitrificación, que ha dado origen a la crioME. En esta técnica se coloca una

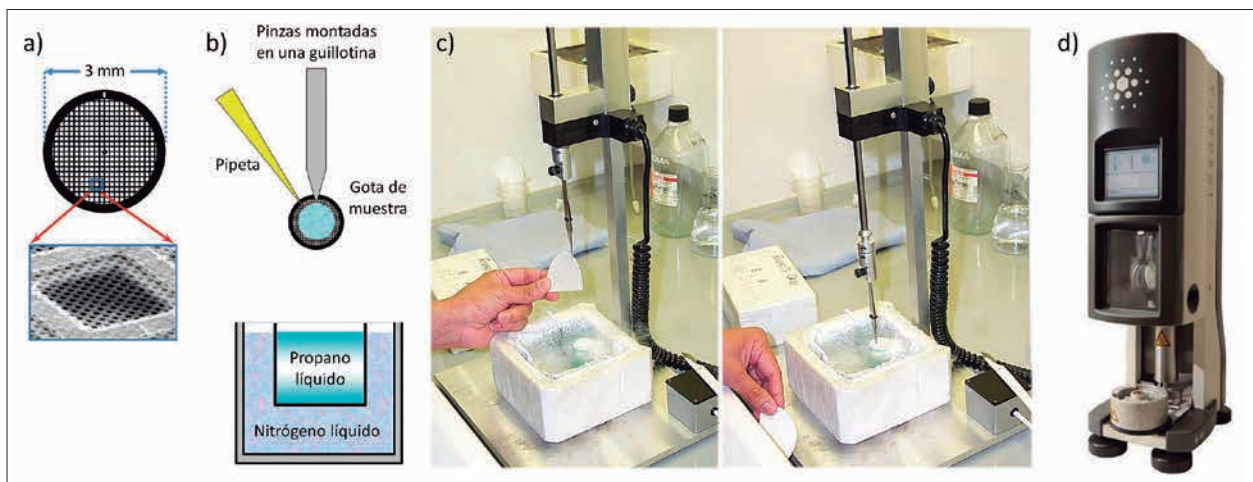


Figura 1

La preparación de la muestra. a) Las rejillas de criome tienen tres milímetros de diámetro y suelen estar hechas de cobre/rodio, cobre/paladio u oro. Además están recubiertas de una fina película de carbón perforado y es en el hielo que queda atrapado en estos agujeros donde se hace la toma de datos. b) Esquema de un sistema de vitrificación. Sobre la rejilla, sujeta a una pinza montada sobre una guillotina, se colocan 2-4 μl de muestra. En la parte inferior hay un depósito con el agente criogénico (etano o propano líquido) que es enfriado a unos $-180\text{ }^\circ\text{C}$ mediante nitrógeno líquido. c) Proceso de vitrificación. Tras colocar la muestra como se indica en b) se incuba durante unos segundos y después se elimina el exceso de muestra tocando la rejilla con un papel secante. Instantáneamente después se dispara el mecanismo que sumerge la rejilla en el agente criogénico a gran velocidad, produciéndose la vitrificación. d) Aspecto de un moderno robot de vitrificación (*Vitrobot® Mark IV*; FEI Company). En estos robots todo el proceso de vitrificación es automático y se puede hacer en condiciones de humedad y temperaturas controladas.

pequeña gota de muestra en una rejilla de microscopía y, mediante una guillotina, se sumerge rápidamente en un depósito de etano o propano líquido que se encuentra a unos $-180\text{ }^\circ\text{C}$. Esto produce la congelación de la muestra en unos pocos milisegundos (el gradiente de temperatura es superior a $10.000\text{ }^\circ\text{C/s}$) en una matriz de hielo vítreo y evita la formación de cristales de hielo. La congelación ultrarrápida atrapa a las proteínas en su estado nativo e hidratado, incluso puede utilizarse para aislar estados conformacionales de vida muy corta, y permite la determinación de la estructura de las proteínas tal y como son en solución. En la *Figura 1* se muestra un esquema de cómo se realiza este proceso.

El proceso de vitrificación evita los artefactos producidos por la tinción negativa y protege parcialmente de los daños por radiación, pero introduce nuevos problemas en el manejo de la muestra y en el procesamiento de los datos obtenidos. En primer lugar, y desde que se realiza la vitrificación, la muestra debe mantenerse en todo momento a unos $-175\text{ }^\circ\text{C}$ ya que un ligero aumento de la temperatura -basta unos $20\text{ }^\circ\text{C}$ - puede modificar la estructura del hielo y dejar inservible la preparación. En segundo lugar la protección que brinda la baja temperatura al daño por radiación es limitada, y esto debe ser tenido en cuenta durante la toma de datos. Finalmente la ausencia de un agente de tinción hace que el contraste de la muestra sea muy pequeño y produzca una imágenes con una relación

señal/ruido mucho menor que las muestras teñidas. Sin embargo, y a pesar de estos inconvenientes, la preparación de muestras por vitrificación tiene una ventaja fundamental que la hace imprescindible para determinación estructural en microscopía electrónica: las imágenes obtenidas con esta técnica son una proyección directa del potencial de los átomos que componen la muestra, es decir, son una imagen fidedigna de su estructura atómica.

LA TOMA DE LOS DATOS: LOS NUEVOS CRIOMICROSCOPIOS

Una vez la muestra ha sido preparada mediante vitrificación el siguiente paso es la adquisición de imágenes para ser procesadas. Es en este punto donde hay que enfrentarse a uno de los primeros problemas de esta técnica, el daño por radiación. La interacción de los electrones con la muestra la calienta, ioniza y puede destruirla en pocos segundos; para evitar esto se han diseñado protocolos en los que en la zona en la que se toman los datos se ilumina el menor tiempo y con la menor dosis posible. Aunque esto minimiza el daño producido por el haz, también disminuye el contraste y la relación señal/ruido de la imagen.

En el pasado reciente los microscopios recogían las imágenes sobre placas de película, que posteriormente eran digitalizadas, o sobre detectores digitales convencionales (CCD) equipados con un centelleador que convertía la señal >>>

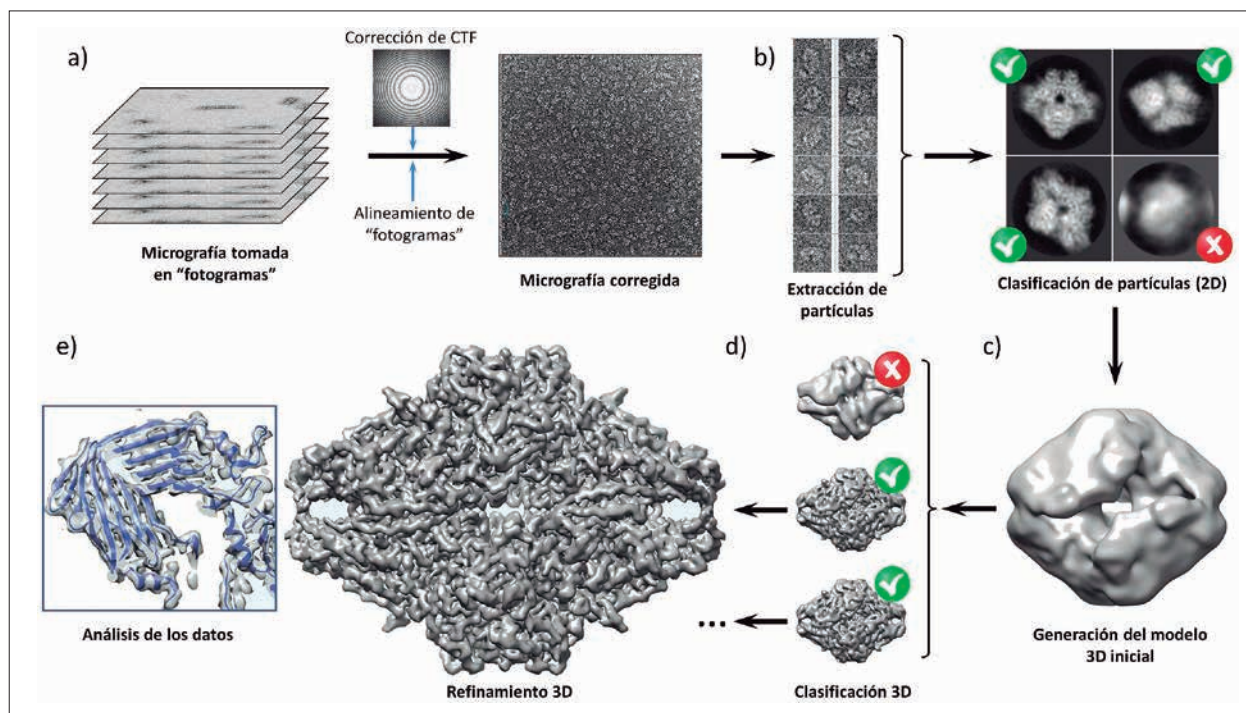


Figura 2

El procesamiento de los datos. a) Los nuevos detectores realizan múltiples lecturas del sensor en el tiempo que dura una exposición, así una imagen está compuesta por muchos fotogramas. De este modo los pequeños movimientos de dilatación de la muestra al ser calentada por el haz pueden ser corregidos mediante un realineamiento de fotogramas consecutivos. También pueden ser eliminados los últimos fotogramas si se detecta que el haz ha dañado la muestra en exceso. El cálculo de los defectos introducidos por la óptica del microscopio, representados por lo que se llama la Función de Transferencia de Contraste (CTF en inglés), también se realiza aquí. b) Tras las correcciones se obtiene una imagen sobre la que se seleccionan, normalmente de modo automático, las pequeñas imágenes de las proyecciones de la muestra. Las imágenes, en la actualidad cientos de miles o millones de ellas, son agrupadas formando clases homogéneas, que una vez alineadas nos dan promedios con una relación señal/ruido mucho más alta. Los falsos positivos seleccionados por error quedan agrupados en clases incoherentes que son eliminadas en este paso. c) Con las proyecciones de buena calidad se calcula una estructura tridimensional inicial. d) Usando como base ese modelo inicial se realiza una nueva clasificación, esta vez tridimensional, en la que se busca si la muestra tiene o no varias conformaciones. Aquí también se pueden eliminar partículas que sean de mala calidad. e) El refinamiento de los diferentes conformeros por separado genera la(s) estructura(s) detallada(s) del complejo.

>>> de los electrones en luz. No obstante, la sensibilidad de esos métodos de toma de datos es limitada. Además, en las condiciones de mínima dosis empleada, las exposiciones eran de aproximadamente un segundo y los movimientos de dilatación de la muestra emborronaban las imágenes. Esto era en la práctica uno de los mayores factores limitantes de la resolución, dejándola en los mejores casos a 5-7 Å.

Sin embargo, la aparición de los detectores directos de electrones (DDD) en los nuevos microscopios ha sido el primer pilar de lo que se conoce en criome como la “revolución de la resolución”. Estos sensores permiten la detección de electrones sin la necesidad de un centelleador y con una frecuencia de lectura de datos muy alta. Las ventajas de esta nueva tecnología son enormes, por un lado la ausencia de un centelleador aumenta mucho la eficiencia y la calidad de detección de la señal. Por otro lado, la posibilidad de tomar decenas de “fotogramas” por segundo permite corregir las

distorsiones producidas en la imagen por el movimiento de dilatación de la muestra. Todo ello redundará en una calidad de imágenes muy superior a las anteriormente existentes.

Por último, la automatización en la recogida de datos ha aumentado el rendimiento de los microscopios en órdenes de magnitud, siendo este el segundo salto cuantitativo la revolución de la criome. Todos los procesos básicos de carga de muestras, mantenimiento del sistema a temperaturas criogénicas, adquisición de imágenes... han sido automatizados de tal modo que con una mínima intervención del operario se pueden tomar miles de imágenes por día.

LA DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA: EL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.

Una vez las imágenes han sido adquiridas deben ser procesadas para determinar la estructura de la molécula o complejo en estudio. Este es probablemente el punto

metodológicamente más complejo de todo el proceso, y básicamente consiste en cinco etapas: 1) corrección de los “defectos” de las imágenes generadas por el microscopio, 2) extracción, clasificación y selección de las partículas de interés, 3) generación de un modelo inicial, 4) determinación de la heterogeneidad presente en la muestra y 5) refinamiento y obtención de la(s) estructura(s) final(es). La *figura 2* muestra un resumen de estos pasos.

Los programas necesarios para ejecutar todas estas tareas han sido realizados gracias a contribuciones de muchos laboratorios en todo el mundo. Es indudable que el enorme desarrollo en los últimos años de este tipo de software es el tercer pilar sobre el que se asienta la nueva criome.

1. Corrección de las imágenes generadas por el microscopio

En esta etapa se procura eliminar todas las distorsiones presentes en las imágenes tomadas por el microscopio (*Figura 2a*).

Uno de los factores que deterioran la calidad de la imagen es el movimiento de dilatación consecuencia del calentamiento inducido por el haz en el hielo. Para su corrección se aprovecha la capacidad de los nuevos detectores DDD de realizar decenas de lecturas del sensor por segundo; es decir, una imagen está realmente compuesta por múltiples “fotogramas” tomados en el tiempo que dura la exposición (normalmente unos segundos). Estos fotogramas son comparados consecutivamente en un ordenador, de manera que se puede calcular el movimiento que han sufrido las partículas presentes en la imagen durante toda la exposición y así ser corregido para evitar esa distorsión.

El segundo factor que afecta a la calidad de la imagen es el deterioro de la muestra por el daño por radiación: cuantos más electrones recibe la muestra mayor deterioro presentará y de peor calidad será la imagen. Los microscopios modernos pueden medir la dosis de radiación que está recibiendo la muestra durante la exposición, en consecuencia se puede determinar si, por ejemplo, en los últimos “fotogramas” de la exposición la muestra está lo suficientemente dañada como para ser eliminados.

El tercer factor de distorsión es el producido por las aberraciones de las lentes del microscopio y las propiedades ópticas de los electrones. Este factor está bien caracterizado y es conocido como Función de Transferencia de Contraste y puede ser fácilmente corregido.

2. Extracción y selección de las partículas

Una vez corregidas las imágenes se extraen de éstas las partículas de la muestra bajo estudio para su procesamiento (*Figura 2b*). Debido a la enorme cantidad de datos que generan los nuevos microscopios la selección de partículas se hace de modo automático, lo que desafortunadamente hace que falsos positivos sean extraídos. Para solventar

este problema se realiza una clasificación también automática de las imágenes que en la mayoría de los casos nos permite separar las proyecciones reales de nuestra muestra de los falsos positivos. Esta clasificación agrupa las imágenes que corresponden a una misma proyección y las promedia generando imágenes medias con una relación señal/ruido mucho más alta y que pueden dar una idea clara de la estructura de la muestra. Por otro lado los falsos positivos se agrupan en clases “basura” que son eliminadas del procesamiento (*Figura 2b*).

3. Generación de un modelo inicial y primeros pasos para la obtención de la estructura.

La reconstrucción tridimensional en criome se basa en la obtención de la estructura a través de sus proyecciones. Un ejemplo similar es el dibujo técnico, en el que se puede obtener la forma de una pieza a partir de sus proyecciones de planta, perfil y alzado. Sin embargo, este método de reconstrucción necesita el conocimiento previo de las direcciones en las que ha sido proyectada la estructura tridimensional. Por seguir con el ejemplo del dibujo, en él se sabe que la planta, perfil y alzado son proyecciones ortogonales del objeto. De este modo, el procesamiento en criome se basa en la comparación de las imágenes obtenidas de la muestra con las proyecciones de un modelo, esto permite asignar las direcciones de proyección a los datos experimentales y realizar una reconstrucción. Esta reconstrucción se toma como nuevo modelo y se repite el proceso iterativamente hasta que se resuelve la estructura. La obtención del modelo inicial se hace generalmente a partir de las mejores medias bidimensionales obtenidas en el apartado anterior y a través de métodos matemáticos bien establecidos. (*Figura 2c*).

4. Determinación de la heterogeneidad presente en la muestra.

Una de las ventajas de la criome es la posibilidad de determinar la estructura de diferentes estados conformacionales de una misma proteína o complejo que se encuentran mezclados en la muestra. Una vez generado una reconstrucción preliminar como se indica en el apartado anterior ésta se puede usar como modelo para realizar una clasificación tridimensional que separe los diferentes conformeros de la muestra. El proceso es muy similar a la clasificación bidimensional mencionada en el apartado 2 y el resultado final son grupos de imágenes cada uno de los cuales pertenece a una conformación diferente (*Figura 2d*).

5. Refinamiento y obtención de la(s) estructura(s) final(es)

Por último, los grupos de imágenes pertenecientes a una única estructura tridimensional son refinados por separado siguiendo un proceso iterativo en el que cada vez las direcciones de proyección son calculadas con mayor precisión (*Figura 2e*). La estructura final se obtiene tras la aplicación de factores de corrección que intentan paliar la pérdida de señal en las altas frecuencias inherentes a los microscopios electrónicos >>>

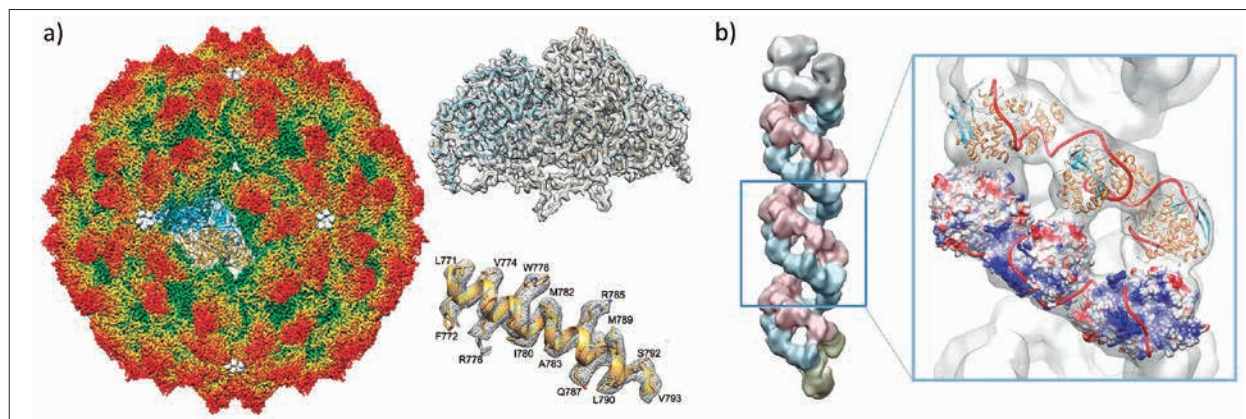


Figura 3.

El análisis de las estructuras. a) Si la resolución del mapa final lo permite, se puede trazar la estructura atómica del complejo en estudio. En este ejemplo se muestra la estructura atómica del virus *Rosellinia Necatrix Quadrivirus 1* a 3,6 Å de resolución, la unidad asimétrica de su cápsida y un ejemplo de una α hélice sobre la que se ha trazado la estructura atómica (imagen cedida por Dr. JR Castón, DOI:10.1371/journal.ppat.1006755). b) En los casos en los que la resolución no permita el trazado de la molécula se puede hacer un “encaje” de estructuras ya existentes en la envoltura de densidad obtenida por criome. En el ejemplo se muestran 6 copias de la estructura de nucleoproteína del virus de la gripe A, resuelta previamente por rayos X, encajadas sobre el mapa de densidad de la estructura de la ribonucleoproteína completa resuelta a 18 Å de resolución (imagen de los autores DOI: 10.1126/science.1228172).

EL ANÁLISIS: TRAZADO DE LA MOLÉCULA O EL “ENCAJE” DE ESTRUCTURAS EXISTENTES

Cuando el proceso de reconstrucción termina, se dispone de un mapa de densidad con estructura de la proteína. La resolución del volumen obtenido puede variar desde unos 3 Å (o incluso por debajo), lo que permite hacer el trazado de la estructura atómica del complejo, hasta algunas decenas de Angstroms, lo que sólo posibilita ver la envoltura de las proteínas. Los factores que determinan que el resultado sea uno u otro son muchos, entre ellos probablemente el más importante es la flexibilidad de la muestra. Si un complejo tiene una variabilidad estructural muy alta, es decir, sus conformaciones se mueven en un continuo de posibles posiciones la resolución final estará limitada. Otro factor es el tamaño, las moléculas pequeñas normalmente son más difíciles de alinear y esto puede también dificultar alcanzar altas resoluciones. Factores técnicos como que las moléculas tengan tendencia a adsorberse en las rejillas en una posición determinada también pueden afectar al resultado final.

Cuando la resolución obtenida permite el trazado de la estructura atómica de la proteína o de los componentes del complejo macromolecular, las conclusiones biológicas a las que se puede llegar son similares a las que se obtienen con otras técnicas clásicas como son los rayos X o la resonancia magnética nuclear (Figura 3a). Sin embargo, cuando no es posible obtener la estructura atómica (resoluciones de 5 Å o peores)

los mapas de criome se pueden complementar con el “encaje” de estructuras atómicas previamente determinadas con otras técnicas. Así se generan lo que se conoce como estructuras “pseudo-atómicas” que también pueden aportar gran información biológica y funcional de la muestra bajo estudio, un ejemplo de esto muestra en la Figura 3b.

CONCLUSIONES

La criome de partículas individuales permite la determinación de la estructura de proteínas y complejos macromoleculares a media y alta resolución con muy poca cantidad de muestra; incluso diferentes estados conformacionales mezclados en una misma muestra pueden ser estudiados simultáneamente. Los desarrollos tecnológicos de la última década han propiciado lo que se conoce como “la revolución de la resolución”, lo que ha permitido que se determinen estructuras a mayor resolución y con mayor facilidad. Todos estos factores están haciendo que la criome esté cambiando el panorama de la biología estructural moderna. ■

PARA LEER MÁS

- Bai, XC, McMullan G, Scheres, SHW (2015) How cryo-EM is revolutionizing structural biology TIBS 40, 49-57.
- Fernández Leiro R, Scheres SHW (2016). Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature* 537, 339-46.
- Frank J (2016). Advances in the field of single-particle cryo-electron microscopy over the last decade. *Nat. Protocol* 12, 209-12.
- Nogales E (2016). The development of cryo-EM into a mainstream structural biology technique. *Nat. Meth.* 13, 24-7.