

De interés

EL PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2017

4 de octubre de 2017

La Real Academia Sueca de Ciencias ha decidido conferir el premio Nobel en Química 2017 a:

Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson

“por el desarrollo de la microscopía crio-electrónica para la determinación de la estructura de biomoléculas en solución, con alta resolución”



Photo: Félix Imhof, © UNIL

JACQUES DUBOCHET

Nacido en 1942 en 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/profjacques-dubochet.html

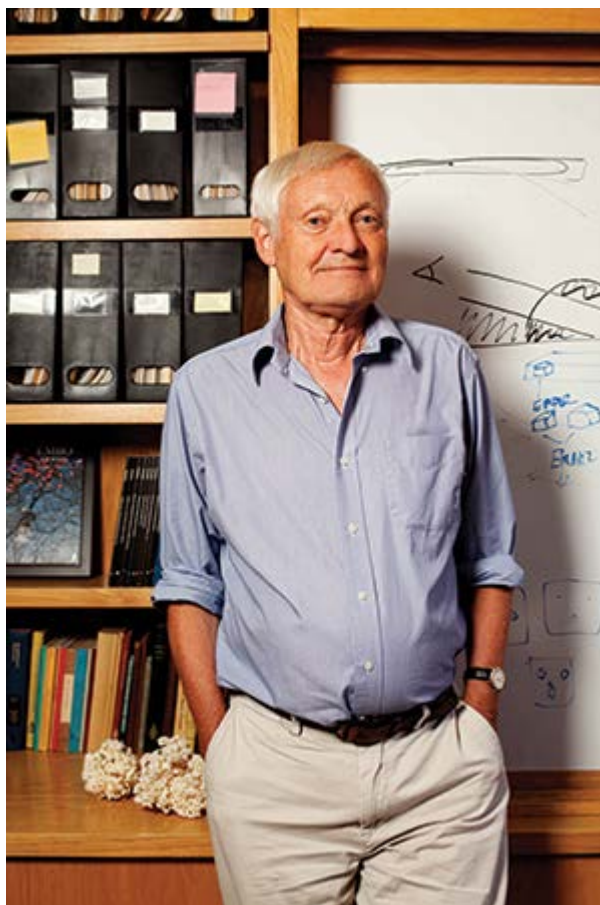


Photo courtesy of Columbia University Medical Center

JOACHIM FRANK

Nacido en 1940 en 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/>



Photo courtesy of MRC Laboratory of Molecular Biology

RICHARD HENDERSON

Nacido en 1945 en 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/

CAPTURARON LA VIDA EN DETALLE ATÓMICO

Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson fueron galardonados con el Premio Nobel de Química 2017 por el desarrollo de un método efectivo para generar imágenes tridimensionales de las moléculas de la vida. Usando la microscopía crio-electrónica, los investigadores ahora pueden congelar el movimiento medio de biomoléculas y retratarlas a resolución atómica. Esta tecnología ha llevado la bioquímica a una nueva era.

Durante los últimos años, numerosas estructuras asombrosas de la maquinaria molecular de la vida han llenado la literatura científica (figura 1): la aguja de inyección de *Salmonella* para las células atacantes; proteínas que confieren resistencia a la quimioterapia y antibióticos; complejos moleculares que gobiernan los ritmos circadianos; complejos de reacción de captura de luz para fotosíntesis y un sensor de presión del

tipo que nos permite escuchar. Estos son sólo algunos ejemplos de los cientos de biomoléculas cuya imagen se ha obtenido ahora con microscopía crio-electrónica (crio-EM).

Cuando los investigadores comenzaron a sospechar que el virus Zika estaba causando la epidemia de daño cerebral en recién nacidos en Brasil, se volcaron a la crio-EM para visualizar el virus. Durante algunos meses, se generaron imágenes tridimensionales (3D) del virus a resolución atómica y los investigadores pudieron comenzar la búsqueda de objetivos potenciales para los productos farmacéuticos

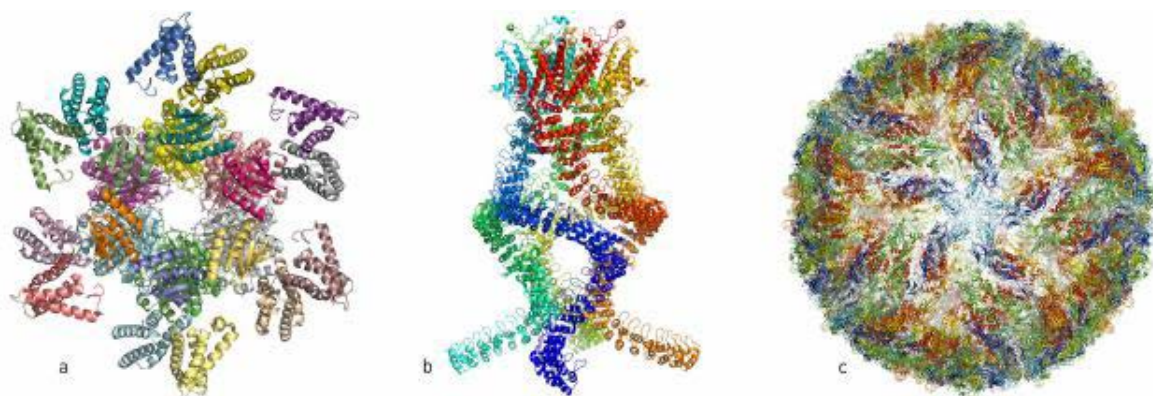


Figura 1. En los últimos años, los investigadores han publicado estructuras atómicas de numerosos complicados complejos de proteínas.

- a. *Un complejo proteico que rige el ritmo circadiano. b. Un sensor del tipo que lee cambios de presión en el oído y nos permite escuchar. c. El virus Zika.*

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

Fotos - 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 tenía ni idea de cómo se veían. Fue sólo en la década de 1950, cuando los investigadores en Cambridge comenzaron a exponer los cristales de proteínas a los rayos X, que fue posible visualizar por primera vez sus estructuras onduladas y en espiral.

A principios de los años ochenta, el uso de la cristalografía de rayos X se complementó con el uso de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) para el estudio de proteínas en estado sólido y en solución.

Esta técnica no sólo revela su estructura, sino también cómo se mueven e interactúan con otras moléculas.

Gracias a estos dos métodos, ahora hay bases de datos que contienen miles de modelos de biomoléculas que se utilizan en todo, desde la investigación básica hasta el desarrollo farmacéutico. Sin embargo, ambos métodos sufren de limitaciones fundamentales. La RMN en solución sólo funciona para proteínas relativamente pequeñas. La cristalografía de rayos X requiere que las moléculas formen cristales bien organizados, tales como cuando el agua se congela en hielo. Las imágenes son como retratos en blanco y negro de antiguas cámaras - su rígida pose revela muy poco sobre la dinámica de la proteína.

Además, muchas moléculas no se organizan en cristales, lo que hizo que Richard Henderson abandonara la Cristalografía de rayos X en la década de 1970 - y aquí es donde comienza la historia del Premio Nobel de Química 2017.

Problemas con cristales hicieron cambiar de camino a Henderson

Richard Henderson recibió su doctorado del bastión de cristalografía de rayos X, Cambridge, Reino Unido. Él utilizó el método para la obtención de imágenes de las proteínas, pero se produjeron reveses cuando intentó cristalizar una proteína que estaba naturalmente incrustada en la membrana que rodea a la célula.

Las proteínas de la membrana son difíciles de manejar. Cuando son removidas de su entorno natural - la membrana - a menudo se agrupan en una masa inútil. La primera proteína de membrana con que trabajó Richard Henderson era difícil de producir en cantidades adecuadas; la segunda falló en cristalizar.

Después de años de decepción, se volvió hacia la única alternativa disponible: el microscopio electrónico.

Está abierto a la discusión si la microscopía electrónica era realmente una opción en este tiempo. La microscopía electrónica de transmisión, como se llama la técnica, funciona más o menos como la microscopía ordinaria, pero un haz de electrones se envía a través de la muestra en lugar de luz. 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 átomos individuales.

En teoría, la resolución del microscopio electrónico era más que suficiente para que Henderson obtuviera la estructura atómica de una proteína de membrana, pero en la práctica el proyecto era casi imposible. Cuando el microscopio electrónico fue inventado en la década de 1930,

los científicos pensaron que sólo era adecuado para estudiar materia muerta. El intenso haz de electrones necesario para obtener imágenes de alta resolución incinera material biológico y, si el haz se debilita, la imagen pierde su contraste y se vuelve borrosa.

Además, la microscopía electrónica requiere vacío, una condición en la cual las biomoléculas se deterioran porque el agua circundante se evapora. Cuando las biomoléculas se secan, se derrumban y pierden su estructura natural, haciendo las imágenes inútiles.

Casi todo indicaba que Richard Henderson fracasaría, pero el proyecto fue salvado por la proteína especial que había elegido para estudiar: bacteriorhodopsina.

Lo mejor hasta entonces no fue suficientemente bueno para Henderson

La Bacteriorhodopsina es una proteína de color púrpura que está incrustada en la membrana de un organismo que realice fotosíntesis, donde captura la energía de los rayos del sol. En lugar de eliminar la proteína sensible de la membrana, como Richard Henderson había tratado anteriormente de hacer, él y su colega tomaron la membrana púrpura completa y la ubicaron bajo el microscopio electrónico. Cuando la proteína permaneció rodeado por la membrana conservó su estructura; cubrieron la superficie de la muestra con una solución de glucosa que la protegía de secarse en el vacío.

El duro haz de electrones fue un problema importante, pero los investigadores usaron la forma en que las moléculas de bacteriorhodopsina están empaquetadas en la membrana del organismo. En lugar de descargar una dosis completa de electrones, hicieron fluir un haz más débil a través de la muestra. El contraste de la imagen era pobre y no podían ver las moléculas individuales, pero utilizaron el hecho de que las proteínas se empaquetaban y se orientaban en la misma dirección. Cuando todas las proteínas difractan los haces de electrones de manera casi idéntica, pudieron calcular una imagen detallada basada en el patrón de difracción - utilizaron un acercamiento 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 de muchos ángulos diferentes.

De esta manera, en 1975 fue posible producir un crudo modelo 3D de la estructura de la bacteriorhodopsina (figura 2), que mostró cómo la cadena de proteína se movía a través de la membrana siete veces.

Era la mejor imagen de una proteína generada usando un microscopio electrónico. Muchos quedaron impresionados por la resolución, que fue de 7 Ångström (0,000007 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, aproximadamente 3 Ångström, y estaba convencido de que la microscopía electrónica tenía más para dar.



Figura 2.- El primer modelo aproximado de bacteriorhodopsina, publicado en 1975. Imagen de Nature 257: 28-32

Henderson produce la primera imagen a resolución atómica

Durante los siguientes años, la microscopía electrónica fue gradualmente avanzando. Los lentes mejoraron y la criotecnología se desarrolló (volveremos a esto), las muestras se enfriaron con nitrógeno líquido durante las mediciones, protegiéndolas de ser dañadas por el haz de electrones. Richard Henderson poco a poco agregó más detalles al modelo de bacteriorhodopsina. Para obtener las imágenes más nítidas viajó a los mejores microscopios electrónicos del mundo. Todos tenían sus debilidades, pero se complementan entre sí. Finalmente, en 1990, 15 años después de haber publicado el primer modelo, Henderson logró su objetivo y pudo presentar una estructura de la bacteriorhodopsina a resolución atómica (figura 3).

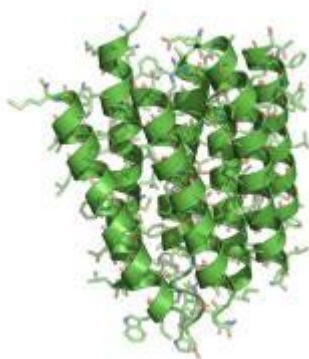


Figura 3. En 1990, Henderson presentó la estructura de la bacteriorhodopsina a resolución atómica

Demostró así que la crio-EM podría proporcionar imágenes tan detalladas como las generadas mediante cristalografía de rayos X, lo que fue un hito crucial. Sin embargo, este progreso se basó en una excepción: la forma regular en que la proteína naturalmente se empaquetaba en la membrana. Pocas otras proteínas espontáneamente se ordenan de esta manera. La cuestión era si el método podía generalizarse: ¿sería posible utilizar un microscopio electrónico para generar imágenes 3D de alta resolución de proteínas que estaban dispersadas aleatoriamente en la muestra y orientadas en diferentes direcciones? Richard Henderson creía que sí, mientras que otros pensaban que esto era una utopía.

Del otro lado del Atlántico, en el Departamento de Salud del Estado de New York, Joachim Frank había trabajado largamente para encontrar una solución justamente 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 un década completar esta idea.

Frank refina el análisis de imágenes

La estrategia de Joachim Frank se basaba en tener un ordenador que discriminara entre las trazas de proteínas posicionadas aleatoriamente y su entorno en una imagen difusa de microscopio electrónico.

Desarrolló un método matemático que permitía a la computadora identificar diferentes patrones recurrentes en la imagen. La computadora entonces ordenaba patrones similares en el mismo grupo y fusionaba la información de estas imágenes para generar una imagen promedio, más nítida. De esta manera obtenía un número de imágenes bidimensionales de alta resolución, que mostraban la misma proteína pero desde

diferentes ángulos. Los algoritmos para el software fueron completados en 1981.

El siguiente paso fue determinar matemáticamente cómo se relacionaban entre sí las diferentes imágenes bidimensionales y, sobre la base de esto, crear una imagen en 3D. Frank publicó esta parte del método de análisis de imágenes a mediados de los 80 y lo utilizó para generar un modelo de la superficie de un ribosoma, la gigantesca maquinaria molecular que genera proteínas dentro de la célula.

El método de procesamiento de imágenes de Joachim Frank fue fundamental para el desarrollo de la crio-EM. Ahora saltaremos algunos años atrás en el tiempo - en 1978, al mismo tiempo que Frank estaba perfeccionando sus programas de computadora, Jacques Dubochet fue reclutado por el Laboratorio Europeo de Biología Molecular en Heidelberg para resolver otro de los problemas básicos del microscopio electrónico: cómo se secan las muestras biológicas y se dañan cuando se exponen al vacío.

Dubochet hace vidrio del agua

En 1975, Henderson usó una solución de glucosa para proteger su membrana de la deshidratación, pero este método no funcionó para biomoléculas solubles en agua. Otros investigadores habían tratado de congelar las muestras porque el hielo se evapora más lentamente que el agua, pero los cristales de hielo desorganizaban tanto los haces de electrones que las imágenes eran inútiles.

El agua de vaporización era un dilema importante. Sin embargo, Jacques Dubochet vio una solución potencial: enfriar el agua tan rápidamente que solidificara en su forma líquida para formar un vidrio en lugar de cristales.

Un vidrio parece ser un material sólido, pero es en realidad un fluido porque tiene moléculas desordenadas. Dubochet se dio cuenta de que si podía conseguir agua en forma de vidrio - también conocida como agua vitrificada - el haz de electrones se difractaría uniformemente y daría un fondo uniforme.

Inicialmente, el grupo de investigación intentó vitrificar pequeñas gotas de agua en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero tuvieron éxito sólo cuando reemplazaron el nitrógeno con etano que, a su vez, era enfriado por nitrógeno líquido. Bajo el microscopio vieron una gota que no era similar a nada que hubieran visto antes. Primero asumieron que era etano, pero cuando la gota se calentó ligeramente las moléculas repentinamente se reorganizaron y formaron la estructura familiar de un cristal de hielo. Fue un triunfo - en particular, porque algunos investigadores habían asegurado que era imposible vitrificar 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

Tras el gran avance en 1982, el grupo de investigación de Dubochet desarrolló rápidamente las bases de la técnica que todavía se utiliza en crio-EM. Disolvían sus muestras biológicas – inicialmente diferentes formas de virus - en agua. La solución se extendía a través de una fina malla de metal como una fina película. Utilizando una construcción en forma de arco, inyectaban la malla en el etano líquido de modo que la delgada película de agua se vitrificara.

En 1984, Jacques Dubochet publicó las primeras imágenes de un número de virus diferentes, redondos y hexagonales, que se muestran en marcado contraste con el fondo de agua vitrificada. El material biológico podía ahora ser relativamente fácil de preparar para microscopía electrónica, y los investigadores muy pronto estaban golpeando a la puerta de Dubochet para aprender la nueva técnica.

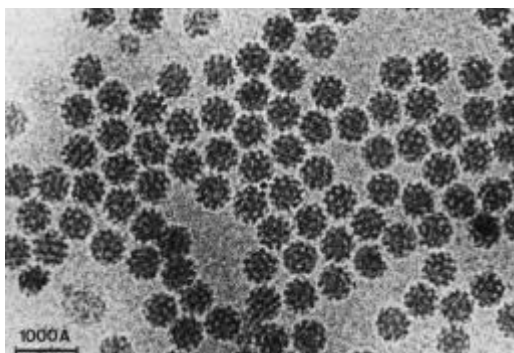


Figura 4- Dubochet generó las primeras imágenes de virus rodeados por agua vitrificada en 1984. Imagen de Nature 308: 32-36.

De la globología a la revolución

Las piezas más importantes de la crio-EM estaban así en su lugar, pero las imágenes todavía tenían una resolución pobre. En 1991, cuando Joachim Frank preparó ribosomas usando el método de vitrificación de Dubochet y analizó las imágenes con su propio software, obtuvo una estructura 3D que tenía una resolución de 40 Å. Era un sorprendente paso adelante para la microscopía electrónica, pero la imagen sólo mostraba los contornos del ribosoma. Francamente, parecía un glóbulo y la imagen ni siquiera se acercaba a la resolución atómica de la cristalografía de rayos X.

Debido a que la crio-EM raramente podía visualizar nada más que una

superficie desigual, el método fue a veces llamado «globología». Sin embargo, cada tuerca y tornillo del microscopio electrónico ha sido gradualmente optimizado, en gran medida debido a Richard Henderson manteniendo obstinadamente su visión de que la microscopía electrónica un día proporcionaría rutinariamente imágenes que mostraran átomos individuales. La resolución ha mejorado Ångström por Ångström, y el obstáculo técnico final fue superado en 2013, cuando un nuevo tipo de detector de electrones entró en uso (figura 5).

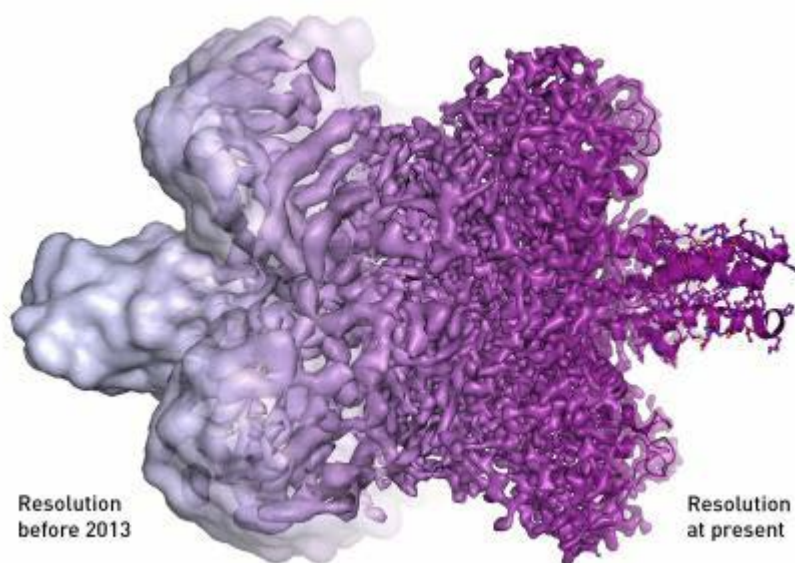


Figura 5. La resolución del microscopio electrónico ha mejorado radicalmente en los últimos años, desde que mostraba sólo glóbulos informes, siendo capaz ahora de visualizar las proteínas a resolución atómica.

Imagen: Martin Högbom

Cada rincón escondido de una célula puede ser explorado

Ahora el sueño es realidad, y estamos ante un desarrollo explosivo dentro de la bioquímica. Hay una serie de beneficios que hacen que la crio-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 en medio de su acción y los investigadores pueden tomar series de imágenes que capturan diferentes partes de un proceso.

De esta manera, producen «películas» que revelan cómo las proteínas se mueven e interactúan con otras moléculas.

Utilizando crio-EM, también es más fácil que nunca describir proteínas de membrana, que a menudo funcionan como objetivos para los productos

farmacéuticos, y grandes complejos moleculares. Sin embargo, las proteínas pequeñas no pueden ser estudiadas con microscopía electrónica, pero se pueden visualizar mediante espectroscopia 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, en las palabras de un científico, el cielo sería el límite».

Ahora estamos allí - el cielo es el límite. Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson han aportado, a través de sus investigaciones, «el mayor beneficio para la humanidad». Cada rincón de la célula puede ser capturado en detalle atómico y la bioquímica está lista para un futuro emocionante.

ENLACES Y LECTURAS AMPLIATORIAS

Información adicional acerca de los premios de este año, incluyendo información científica en inglés, está disponible en el sitio web de la Real Academia de Ciencias Sueca, <http://kva.se>, y en <http://nobelprize.org>.

Artículos

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

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

Text: Ann Fernholm

Translation: Clare Barnes

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

Editor: Ann Fernholm

©The Royal Swedish Academy of Sciences

Traducción al español: Luz Lastres Flores