



## Sesión científica celebrada el 30 de noviembre de 2017 para conmemorar los Premio Nobel 2017 en Fisiología o Medicina y en Química



Juan Ramón Lacadena Calero  
Coordinador de la sesión  
Sesión celebrada el 30 de noviembre de 2017  
e-mail: jrlgbucm@bio.ucm.es

---

### ORDEN DEL DÍA

#### *Presentación:*

---

**“El Premio Nobel 2017 en Fisiología o Medicina. Genética y reloj biológico”**

**“El Premio Nobel 2017 en Química. Regla de oro de la investigación biológica: la pregunta, el material biológico, la técnica”**

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero  
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

#### *Ponentes:*

---

**“Ritmos circadianos: importancia del ciclo luz-oscuridad en reproducción”**

Dr. Albino García Sacristán  
Catedrático de Fisiología, Universidad Complutense de Madrid. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

**“Criomicroscopía electrónica: de la biología descriptiva a la biología estructural”**

Dr. José María Valpuesta, Dr. José L. Carrascosa  
Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

# El Premio Nobel 2017 en Fisiología o Medicina. Genética y reloj biológico

Juan-Ramón Lacadena Calero

---

Un año más, la Real Academia Nacional de Farmacia se reúne en Sesión Científica para conmemorar los Premios Nobel correspondientes a las especialidades de Fisiología o Medicina y de Química.

Dijo en cierta ocasión Theodosius Dobzhansky, eminente biólogo evolucionista, que *Drosophila* había dejado de ser la especie privilegiada de la investigación en Genética para pasar a la honorífica oscuridad de una reina fundadora. Pues bien, el pasado día 2 de octubre de 2017, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska ha querido contradecir a Dobzhansky cuando hizo pública la concesión del Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2017 a los investigadores Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young “por sus descubrimientos de los mecanismos moleculares que controlan el ritmo circadiano”. Los galardonados utilizaron como organismo modelo a *Drosophila melanogaster*, la mosca del vinagre o de la fruta. De hecho, el galardonado Jeffrey Hall dijo en una entrevista que “el cuarto premiado clave aquí es la pequeña mosca”, refiriéndose a *Drosophila*. Pero hagamos un poco de historia.

Como señala la nota de prensa de la Asamblea Nobel, la historia empezó cuando, en 1971, Seymour Benzer y Ronald Konopka identificaron mutantes de *Drosophila* que mostraban alteraciones en el ciclo normal de 24 horas de la eclosión de la pupa y la actividad motora, demostrando que todas las mutaciones correspondían a un mismo gen, que denominaron *period* (1). Como veremos después, dicho gen fue caracterizado diez años más tarde por los tres galardonados Hall, Rosbash y Young. Los galardonados demostraron que este gen codifica para una proteína que se acumula en la célula durante la noche y se degrada durante el día. Posteriormente fueron identificadas otras proteínas implicadas en la maquinaria que mantiene el autocontrol del reloj biológico celular. Los mecanismos descubiertos en *Drosophila* han sido ratificados en las células de otros organismos, incluyendo a la especie humana. Como dice la nota de prensa de la Institución Karolinska, nuestro reloj interno adapta con exquisita precisión nuestra fisiología a las fases del día drásticamente diferentes. El reloj biológico regula funciones críticas tales como el comportamiento, los niveles hormonales, el sueño, la temperatura corporal y el metabolismo. Por otro lado, el desajuste crónico entre nuestro estilo de vida y el ritmo marcado por nuestro reloj está asociado con un aumento del riesgo de contraer diversas enfermedades.

Permítaseme un inciso para comentar brevemente la trayectoria científica de Seymour Benzer (1921-2007), que inició su carrera investigadora como físico, pasando luego al campo de la Biología Molecular y, más tarde, al de la Genética. En 1955, Benzer, trabajando con mutantes *rII*

del bacteriófago T4 de *Escherichia coli*, propuso el concepto de *cistrón* como unidad funcional del gen (2). Recuerdo mis clases de Genética General en la Universidad cuando dedicaba una hora para explicar sus trabajos. Posteriormente, diez años más tarde, Benzer se pasó al estudio de los procesos genéticos que condicionan el comportamiento de los organismos, utilizando *Drosophila* en sus experimentos. Entonces, como profesor de Biología en Caltech, fue cuando en colaboración con Ronald Konopka, identificó un gen que controla el sentido del tiempo en el organismo. Decía un comentarista que, si Benzer estuviera vivo (murió en 2007), tendría que haber compartido el premio porque fue su trabajo pionero el que sentó la base primordial sobre la que se edificó la investigación que ha sido objeto del galardón Nobel.

Como señala Carlos Ibáñez, Profesor de Neurociencia en el Instituto Karolinska (3), una década después del descubrimiento de Benzer y Konopka, los tres galardonados con el Premio Nobel aislaron y caracterizaron molecularmente el gen *period*, pero esos primeros conocimientos no explicaban de forma evidente el posible mecanismo molecular del ritmo o reloj circadiano.

Un primer paso fue el posterior descubrimiento por Hall, Rosbash y Young de otros genes (*timeless*, *doubletime*, *clock*, *cycle*) que interactuaban con el gen *period*, proponiendo el modelo de “lazo de retroalimentación transcripción-traducción” o TTFL (acrónimo de Transcription-Translation Feedback Loop). En este mecanismo de regulación, la transcripción de los genes *period* y *timeless* es reprimida por sus propios productos: las proteínas PER y TIM, respectivamente, originando una oscilación autónoma. Se trata de un nuevo paradigma genético: la existencia de un TTFL circadiano auto-sostenido. Posteriormente, se encontró la interrelación entre distintos TTFL junto con una compleja red de reacciones, incluyendo procesos de fosforilación (por la kinasa DBT) y degradación de las proteínas de los TTFL, ensamblaje de complejos proteicos, translocación nuclear y otras modificaciones post-traduccionales que generan oscilaciones con un periodo de unas 24 horas. Las proteínas CLOCK y CYCLE, codificadas por los genes *clock* y *cycle*, respectivamente, son factores de transcripción que activan el gen *period*.

Termina Ibáñez su comentario científico diciendo que los osciladores circadianos de las células, que responden de forma diferente a las señales externas, controlan varias salidas (outputs) fisiológicas, tales como los patrones del sueño, la temperatura corporal, la liberación de hormonas, la tensión sanguínea y el metabolismo. Estos descubrimientos han revelado mecanismos fisiológicos cruciales que explican la adaptación circadiana con

importantes implicaciones para la salud humana y la enfermedad.

Finalizo esta presentación poniendo de manifiesto con orgullo que, un año más, la investigación en el campo de la Genética ha merecido el Premio Nobel. Repito aquí, actualizadas, las cifras que he puesto de relieve en ocasiones anteriores: Hoy, en 2017, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 46 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 101 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 46 premios considerados, 36 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 9 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 101 científicos galardonados, 79 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 21 de Química y 1 de la Paz. Finalmente, me gustaría destacar que en lo que va de siglo XXI se ha premiado la investigación genética en diecisiete ocasiones: en 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”), 2004 (Axel y Buck, “por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo”), 2006 (Fire y Mello, “por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena”), 2006 (Kornberg, “por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica”), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, “por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”), 2008 (zur Hausen, “por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical”; Barré-Sinoussi y Montagnier, “por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana”), 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”), 2009 (Blackburn, Greider y Szostack, “por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa”), 2009 (Ramakrishnan, Steitz y Yonath, “por los estudios de la estructura y función del ribosoma”), 2010 (Robert G. Edwards, “por el desarrollo de la fecundación in vitro”), 2011 (Bruce A. Beutler y Jules A. Hoffmann “por sus descubrimientos en relación con la activación de la inmunidad innata”; y a Ralph M. Steinman “por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa”), 2012 a John B. Gurdon y Shinya Yamanaka “por el descubrimiento de que las células diferenciadas pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes”, 2013 a Randy W. Schekman que compartió el premio con James E. Rothman y Thomas C. Südhof “por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema principal de transporte en nuestras células” 2015 a Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sancar “por sus estudios de los mecanismos de reparación del ADN”, en 2016 a Yoshinori Ohsumi “por sus descubrimientos de los mecanismos para la autofagia” y, finalmente, en 2017 a Jeffrey C. Hall,

Michael Rosbash y Michael W. Young “por sus descubrimientos de los mecanismos moleculares que controlan el ritmo circadiano”.

Sin duda, es una década prodigiosa para la Genética como una Alicia en el “País de las maravillas moleculares” que diría Lewis Carroll. En 1995 inicié con mi discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia (4) la historia “nobelada” (con “b” de Nobel) de la Genética que tuve la oportunidad de actualizar doce años después (5), y que puse al día en 2016, en una Monografía de esta Real Academia Nacional de Farmacia (6). No obstante, al paso que vamos, es posible que pronto se vuelva a quedar viejo y quién sabe si de aquí a diez años estaré escribiendo –si vivo– una tercera *addenda* de mi visión “nobelada” de la historia de la Genética que comencé hace dos décadas.

## REFERENCIAS

1. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. 1971; 68: 2112-2116.
2. Benzer, S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. Proc. Nat. Acad. Sci., 1955; 41:344-354.
3. Ibáñez, C. Scientific background. Discoveries of molecular mechanisms controlling the circadian rhythm., 7 pp. Nobel Assembly at Karolinska Institutet. 2017.
4. Lacadena, J.R. Historia “nobelada” de la Genética: Concepto y método. Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España, Madrid, 76 pp. 1995.
5. Lacadena, J.R. Conmemorando los 100 años del término “Genética” (1905-2005): Una historia “nobelada” de la Genética. Conferencia plenaria, Congreso de la Sociedad Española de Genética, Almería, 2005, Secretariado de Publicaciones, Universidad de León, VII+109 pp. 2007.
6. Lacadena, J.R. Historia “nobelada” de la Genética (1900-2016): Concepto y método. Segunda *addenda*. Monografía XLIV, Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, 199 pp. 2016. a.

# Ritmos circadianos: importancia del ciclo luz-oscuridad en reproducción

Albino García Sacristán

<sup>1</sup> Catedrático de Fisiología, Universidad Complutense de Madrid. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

**ABSTRACT:** Living organisms have an internal biological clock that helps them anticipate and adapt to the rotation of the Earth. The circadian system is responsible for generating and synchronizing all circadian rhythms. These rhythms are synchronized by the suprachiasmatic nucleus (SQN) of the hypothalamus that sends signals through melatonin, cortisol, body temperature and the autonomic nervous system to the different peripheral clocks (liver, heart, pancreas, etc.). Each neuron of the SQN and each cell of the biological clocks have a molecular machinery formed by different genes with the capacity to encode proteins, which determine rhythms of 24 hours (circadian) in their activity. The light interacts with an intrinsically photosensitive ganglion cell of the retina, whose synapse axon in the SQN projects axons on the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. The SQN as a function of the light-dark phase inhibits or excites, respectively, the PVN. This nucleus through the sympathetic nervous system innervates the pineal gland regulating the synthesis of melatonin. Studies on seasonal reproduction have established that the pineal gland mediates the effect of the light-dark environment that allows these species to have specific reproductive seasons throughout the year. This fact guarantees that births occur at the most favorable time of the year for the offspring. Melatonin being the analog signal of ambient lighting, which allows this hormone to synchronize the reproduction of animals whose reproductive cycles are controlled by the photoperiod. In recent years it has been shown that light is the best synchronizer of human biological rhythms. A lack of light-dark adjustment can produce disorders in the phase, in the amplitude and in the period of certain biological rhythms, with the endocrine system being one of the most affected by the action of melatonin on the hypothalamus-adenohypophysis axis.

**RESUMEN:** Los organismos vivos poseen un reloj biológico interno que les ayuda a anticiparse y adaptarse a la rotación de la Tierra. El sistema circadiano es el encargado de generar y sincronizar todos los ritmos circadianos. Estos ritmos se hallan sincronizados por el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo que envía señales a través de la melatonina, el cortisol, la temperatura corporal y el sistema nervioso autónomo a los diferentes relojes periféricos (hígado, corazón, páncreas, etc.). Cada neurona del NSQ y cada célula de los relojes biológicos poseen una maquinaria molecular formada por diferentes genes con capacidad para codificar proteínas, que determinan ritmos de 24 horas (circadianos) en su actividad. La luz interacciona con una célula ganglionar de la retina intrínsecamente fotosensible, cuyo axón sinapta en el NSQ y este proyecta axones sobre el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo. El NSQ en función de la fase luz-oscuridad inhibe o excita, respectivamente, el NPV. Este núcleo por mediación del sistema nervioso simpático inerva la glándula pineal regulando la síntesis de melatonina. Estudios sobre reproducción estacional han establecido que la glándula pineal media en el efecto del ambiente luz-oscuridad que permiten a estas especies tener épocas reproductoras concretas a lo largo del año. Este hecho garantiza que los nacimientos ocurran en la época del año más favorable para las crías. Siendo la melatonina la señal analógica de la iluminación ambiental, lo que permite a esta hormona sincronizar la reproducción de los animales cuyos ciclos reproductivos están controlados por el fotoperiodo. En estos últimos años se ha demostrado que la luz es el mejor sincronizador de los ritmos biológicos humanos. Una falta de ajuste luz-oscuridad puede producir desórdenes en la fase, en la amplitud y en el periodo de determinados ritmos biológicos, siendo el sistema endocrino uno de los más afectados por la acción que tiene la melatonina sobre el eje hipotálamo-adenohipófisis.

**Corresponding Author:** [agarcias@ucm.es](mailto:agarcias@ucm.es)

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 4 (2017), pp. 448-456

## INTRODUCCIÓN

La vida en la Tierra se adapta a la rotación del planeta. Los organismos vivos poseen un reloj biológico interno que les ayuda a anticiparse y adaptarse al ritmo regular diario.

El sistema circadiano es el encargado de generar y sincronizar todos los ritmos circadianos, es decir, los que presentan un periodo de 24 horas. Funciona como una

orquesta en la que cada músico toca en un momento preciso. El director es el núcleo supraquiasmático (NSQ), una pequeña estructura del hipotálamo que opera a modo de reloj cerebral central. Los músicos se agrupan en una serie de relojes periféricos, alojados en todos los tejidos y órganos (hígado, corazón, páncreas, etc.); se hallan sincronizados por las señales que les envía el director a través de la melatonina, el cortisol, la temperatura corporal

y el sistema nervioso autónomo. La actividad de estos relojes controla todos los ritmos de nuestro cuerpo (Figura 1).

Cada neurona del NSQ y cada célula de los relojes posee una maquinaria molecular formada por los genes *bmal1*, *clock*, *per* (*per1*, *per2* y *per3*) y *cry* (*cry1* y *cry2*) con capacidad para generar ritmos de unas 24 horas (circadianos) en su actividad, induciendo además la expresión rítmica del diez por ciento del resto del genoma. Si se somete a un organismo a un aislamiento total, estos ritmos persisten con un periodo ligeramente superior a las

24 horas, lo que pone de manifiesto su carácter endógeno.

Los investigadores Jeffrey C. Hall (Nueva York, 1945) y Michael Rosbash (Kansas City, 1944), de la Universidad Brandeis, en Boston, y Michael W. Young (Miami, 1949), de la Universidad Rockefeller, en Nueva York, han sido galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2017, por sus descubrimientos de los mecanismos moleculares que controlan el ritmo circadiano.

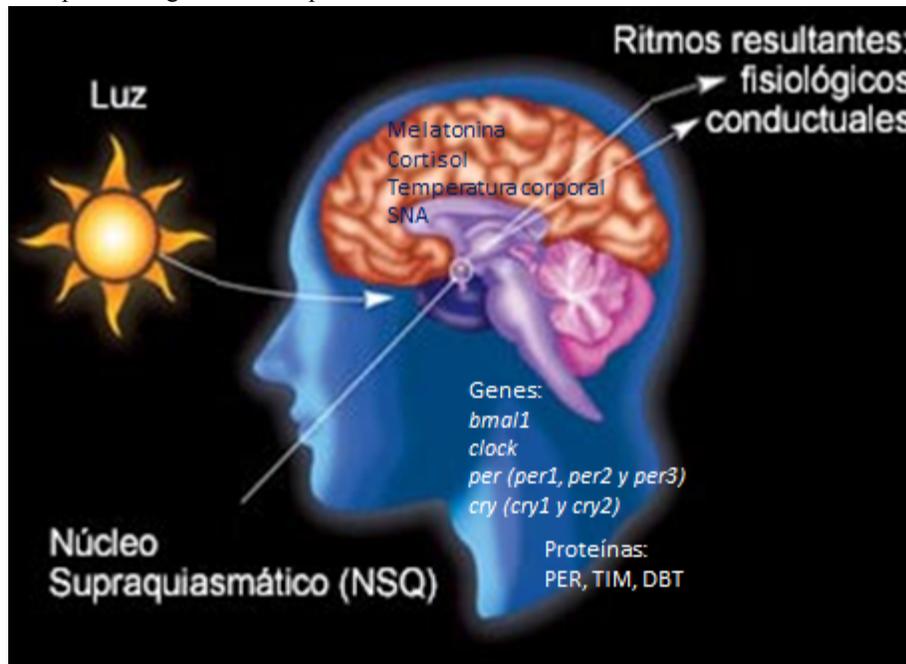


Figura 1. Sistema circadiano.

Estos científicos han sido capaces de analizar este reloj biológico interno y han comprendido su funcionamiento. Sus descubrimientos explican cómo las plantas, animales y humanos adaptan sus respectivos ritmos biológicos de modo que estén sincronizados con las revoluciones de la Tierra.

El director y los músicos siguen fielmente la “partitura” circadiana. El núcleo supraquiasmático ajusta constantemente su ritmo con la hora de la jornada y mantiene conexión directa con la retina, que le informa sobre la luminosidad del entorno. La luz llega al NSQ gracias a las células ganglionares retinianas, unas neuronas que producen un fotopigmento muy sensible a la luz (melanopsina) y que permite una vía independiente de la visión consciente.

## RELOJES BIOLÓGICOS

Mediante ciertos mecanismos moleculares denominados relojes biológicos, los organismos adaptamos nuestra fisiología y ciertas conductas a las diferentes fases del día o del año. Gracias a ellos, nuestras pautas de sueño, alimentación o temperatura corporal siguen ritmos circadianos; algunos animales sincronizan con el sol sus

desplazamientos migratorios y su reproducción; o las plantas perciben la luz diurna y la temperatura para decidir en qué momento del año florecer. ¿Pero dónde residen estos relojes? ¿Cómo funcionan? ¿Cuáles son las consecuencias de que se desajusten?

Durante muchos años hemos sabido que los seres vivos poseemos un reloj biológico interno que nos ayuda a anticiparnos y adaptarnos a los ritmos regulares de cada día. Pero ¿cómo funciona este reloj? Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash, y Michael W. Young, indagaron en nuestro reloj biológico y elucidaron su funcionamiento interno.

Los laureados identificaron un gen que regula el ritmo biológico diario normal. Demostraron que este gen codifica una proteína que se acumula en las células durante la noche y se degrada durante el día. Más tarde descubrieron otros componentes proteicos de esta maquinaria al revelar el mecanismo que gobierna el reloj autónomo de las células. Ahora sabemos que los relojes biológicos funcionan con esos mismos principios en las células de otros organismos multicelulares, entre ellos los humanos.

El reloj interno regula funciones esenciales, como los

niveles hormonales, el sueño, la temperatura corporal y el metabolismo. Nuestro bienestar se ve afectado cuando se produce un desajuste temporal entre nuestro entorno y en este reloj. También hay indicios de que la discordancia crónica entre nuestro estilo de vida y los ritmos circadianos se asocia a un mayor riesgo de sufrir varias enfermedades.

En la década de los setenta del siglo pasado se había demostrado que un gen, al que se denominó *per* (de

«período»), controlaba los ritmos circadianos en las moscas de la fruta, pero se desconocía cómo funcionaba. En 1984, los tres científicos recién premiados lograron aislar el gen en cuestión. Después, Hall y Rosbash observaron que PER, la proteína codificada por el gen *per*, se acumulaba durante la noche y se degradaba durante el día. De este modo, los niveles de proteína PER oscilan en un ciclo de 24 horas, en sincronía con el ritmo circadiano (Figura 2).

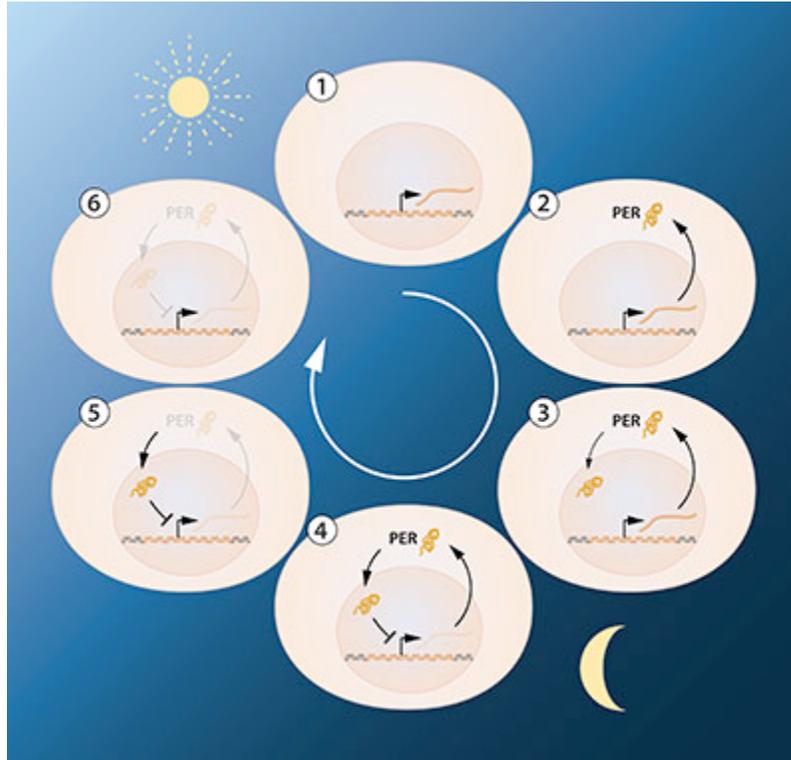


Figura 2. Autorregulación negativa del gen *per* en un ciclo de 24 horas.

El siguiente paso consistía en comprender cómo se podían generar y mantener esos ritmos circadianos. Hall y Rosbash plantearon la hipótesis de que la proteína PER bloqueaba la actividad del mismo gen *per*. Propusieron que, mediante un mecanismo de autorregulación negativa, la proteína PER evitaría su propia síntesis y, por tanto, regularía su propio nivel en un ritmo cíclico continuo (Figura 3).

El modelo era tentador, pero faltaban algunas piezas del rompecabezas. Para impedir la actividad del gen *per*, la proteína PER, que se produce en el citoplasma, tenía que llegar al núcleo celular, donde se localiza el material genético. Hall y Rosbash habían demostrado que la proteína PER se acumulaba en el núcleo durante la noche, pero ¿cómo llegaba hasta allí? En 1994, Young descubrió un segundo gen de reloj, atemporal, que codificaba la proteína TIM (de timeless), la cual era necesaria para que hubiera un ritmo circadiano normal. Posteriormente, Young demostró que, cuando TIM se unía a PER, las dos

proteínas podían entrar en el núcleo celular y allí bloqueaban la actividad del gen *per*, con lo que se cerraba el ciclo de autorregulación negativa.

Sin embargo, todavía quedaban preguntas por resolver: ¿Qué controlaba la frecuencia de las oscilaciones? Young identificó otro gen que codificaba la proteína DBT, la cual retrasaba la acumulación de la proteína PER. Ello proporcionaba información sobre cómo se ajustaba una oscilación para que coincidiera con un ciclo de 24 horas.

Los descubrimientos de los tres galardonados establecieron principios mecánicos clave sobre el reloj biológico, y durante los años siguientes se aclararon otros componentes moleculares del mecanismo. Desde sus descubrimientos fundamentales, la cronobiología se ha convertido en un campo de investigación vasto y dinámico, con implicaciones para nuestra salud y bienestar.

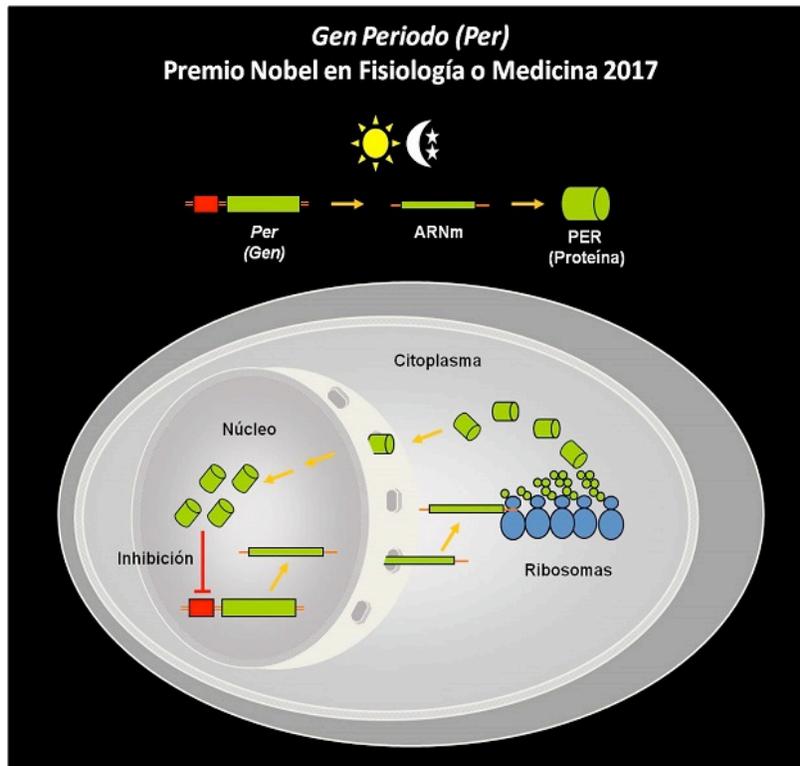


Figura 3. Representación simplista de la retroalimentación negativa que ejerce PER sobre su propio gen *per*.

### CONEXIONES NERVIOSAS RETINA- HIPOTÁLAMO-GLÁNDULA PINEAL.

La luz viaja a través de la capa de las células ganglionares de la retina (RGC) y las células nerviosas en el interior de la retina a los conos y bastones en la capa fotorreceptora de la retina. Los conos y bastones envían señales nerviosas de nuevo a través de la retina interior al ganglio, y a través del nervio óptico a las áreas visuales del cerebro. Un pequeño número de las RGCs contienen melanopsina y tienen capacidad fotorreceptora intrínseca (ipRGC). Estas células envían señales nerviosas a áreas no visuales (no formadoras de imagen) del cerebro.

La luz interactúa con una célula ganglionar de la retina intrínsecamente fotosensible (ipRGC), cuyo axón discurre a lo largo del tracto retinohipotalámico (RHT) y finaliza sobre una neurona del núcleo supraquiasmático (NSQ). La neurona del núcleo supraquiasmático libera ácido gamma-amino-butírico (GABA) que inhibe la neurona del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo. En ausencia de luz esta célula libera glutamato el cual estimula la neurona del núcleo paraventricular de este modo la señal continua a través de las neuronas de la columna de células intermediolateral de la médula espinal (ILCC) que sinaptan con neuronas preganglionares simpáticas a nivel de la primera vertebra dorsal. El axón de estas neuronas sale del SNC y se proyecta sobre la cadena ganglionar que discurre paralela a la columna vertebral para sinaptar con una neurona postganglionar en el ganglio cervical superior (GCS). Estas neuronas postganglionares

simpáticas proyectan su axón en la glándula pineal liberando noradrenalina (NA) la cual interacciona con sus receptores beta-adrenérgicos para estimular los niveles de APMc intracelular, conduciendo a un aumento de la síntesis y transcripción del ARNm que codifica la N-acetiltransferasa (NAT) requerida para la conversión de serotonina a N-acetilserotonina. La membrana de los pinealocitos de la glándula pineal también presenta receptores alfa-adrenérgicos, a los cuales se une la NA. Este hecho activa la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) que permite la conversión de N-acetilserotonina en melatonina. La melatonina es liberada a los capilares y conducida a los órganos periféricos para transmitir la información acerca del ciclo luz-oscuridad y al sistema nervioso central para contribuir a arrastrar el reloj central de 24 horas al ciclo luz-oscuridad (Figura 4).

Las acciones de la melatonina en mamíferos están mediadas principalmente por dos receptores acoplados a proteínas G denominados MT1 y MT2. Estos receptores se encuentran en todos los vertebrados. Los receptores presentan la estructura general de receptores acoplados a proteínas G con siete segmentos transmembrana. Recientemente se ha evidenciado un tercer tipo de receptor el MT3 que se encuentra en la glándula pineal y que permite generar un mecanismo de retroalimentación negativa para mantener la concentración fisiológica de melatonina.



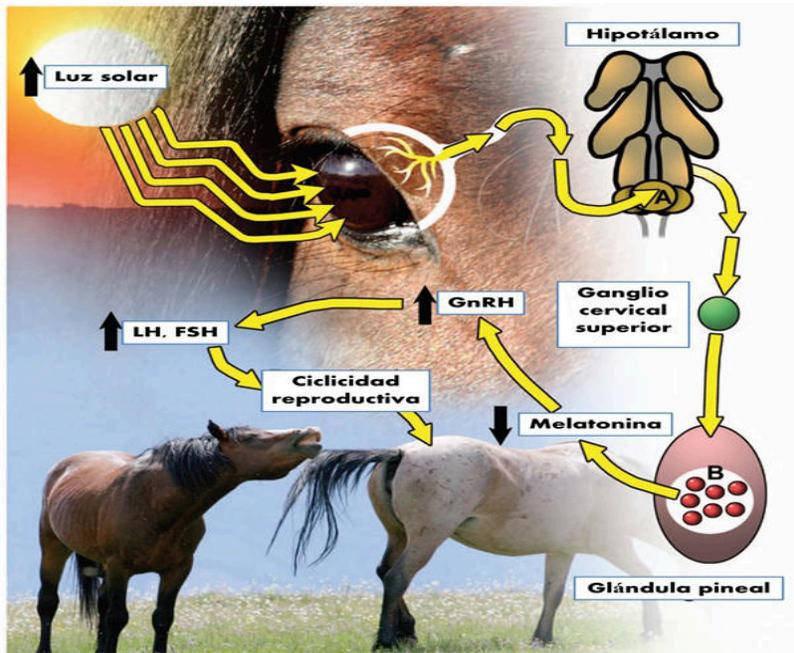


Figura 5. Regulación del estro.

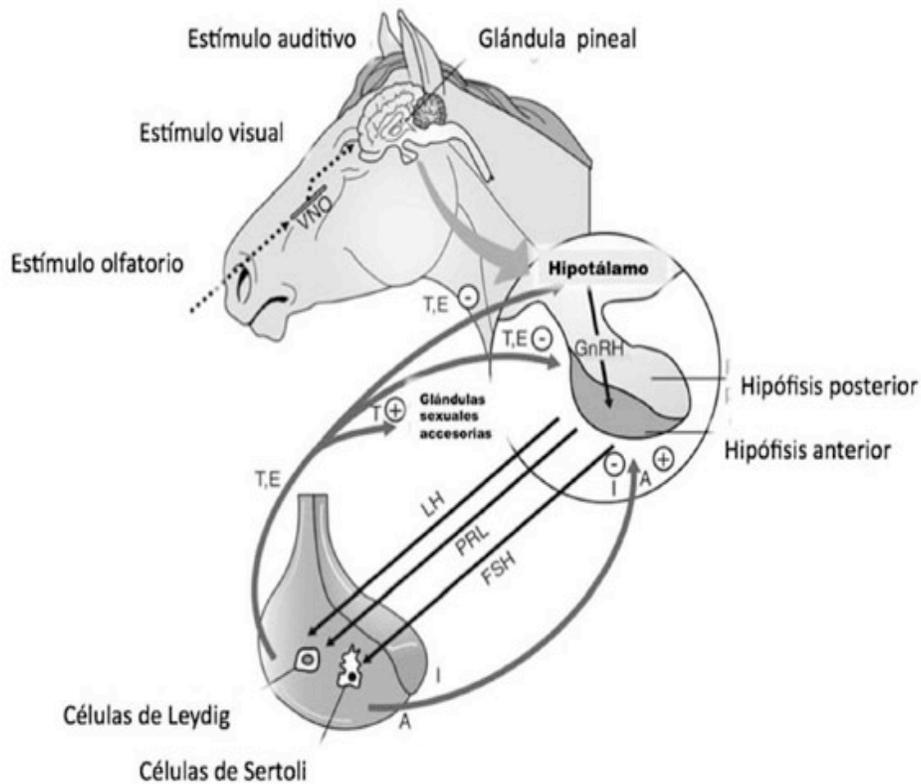


Figura 6. Influencia de la melatonina en la función testicular.

Quizás el impacto más importante derivado de estos estudios fue la comprensión de que la melatonina, desde el punto de vista evolutivo, no conserva un papel positivo o negativo en la reproducción. El aumento de producción de melatonina en estos animales tiene efectos opuestos, por lo que la melatonina no es ni progonadal ni antigonal. La

única función de la melatonina que se conserva evolutivamente es la de ser señal analógica de la iluminación ambiental (señal del tiempo o señal cronológica circulante).

La función principal de la glándula pineal es recibir información sobre la duración de los ciclos de luz-

oscuridad y transmitir esa información a través de la secreción de la hormona melatonina a los sistemas fisiológicos internos del cuerpo. La melatonina juega un papel crítico para sincronizar los ciclos de reproducción estacional a cambios en el ambiente fótico. Los animales cuyos ciclos reproductivos anuales están controlados por el fotoperiodo (longitud de fotofase y/o escotofase) se denominan fotoperiódicos.

En los animales de reproducción estacional, la información sobre la época del año es crucial para el éxito de la reproducción. Algunos ejemplos de las funciones estacionales de la melatonina incluyen, además de las que se requieren para el éxito de la reproducción, los cambios en el crecimiento, el color de la capa y los cambios en el apetito en preparación para o en la recuperación de la hibernación.

Los resultados de diferentes investigaciones parecen sugerir que la melatonina liberada por la glándula pineal actúa, ya sea a través de la sangre o el líquido cefalorraquídeo, en el hipotálamo o directamente sobre la hipófisis para reducir los niveles circulantes de LH en animales fotoperiódicos. La luz inhibe el estímulo simpático a la glándula pineal, que motiva la disminución de la síntesis de melatonina lo que determina el aumento de los niveles de LH que conduce al estro.

Uno de los hechos más sorprendentes de la reproducción es el que se observa en algunas hembras de ciclo corto de gestación que generan el estro en verano y el parto se produce en la primavera del año siguiente. ¿Cómo es posible esto ?.

Los corzos, especie que en estas últimas décadas tanto se ha extendido por la Península Ibérica, son un claro ejemplo de este tipo de reproducción. La gestación en la corza no comienza inmediatamente después del apareamiento, como ocurre en la mayoría de los animales. El óvulo, una vez fecundado, da lugar a un cigoto que sufre las primeras divisiones celulares hasta el blastocisto, luego el desarrollo se detiene y el embrión permanece en un estado latente hasta aproximadamente el mes de diciembre. En ese momento continúa desarrollándose normalmente produciéndose el parto en los meses de abril o mayo. En total transcurren unas 40 semanas desde la fecundación hasta el nacimiento, aunque realmente la verdadera gestación dura sólo 19 semanas. A este fenómeno se le llama diapausa embrionaria o

implantación diferida y es frecuente también en otros grupos de mamíferos como en varias especies de murciélagos, focas comedoras de cangrejos, osos hormigueros gigantes, canguros tamar, etc.

Mediante la diapausa embrionaria, la hembra tiene un control sobre su gestación. Si las condiciones ambientales son propicias y el estado nutricional de la hembra es el adecuado, se produce una liberación de hormonas que hace que se reinicie la gestación propiamente dicha. Si las condiciones son adversas o el estado de salud de la hembra no es el adecuado, la gestación no prosigue con el consiguiente ahorro energético para ella.

Hasta hace unos años se pensaba que el sistema circadiano humano, al contrario que el de los demás mamíferos, era insensible al ciclo luz-oscuridad y que los factores sociales eran los principales agentes sincronizadores. En estas tres últimas décadas se ha demostrado que la luz es el mejor sincronizador de los ritmos humanos (Figura 7). Una falta de ajuste luz-oscuridad puede producir desórdenes en la fase, en la amplitud y en el periodo de determinados ritmos biológicos.

Tres millones de años de evolución de la vida en un ambiente donde día y noche se han sucedido con precisión, en apenas un siglo la luz artificial ha invadido la noche y avanza como una mancha de aceite borrando la oscuridad. Por la mañana, lo primero que hacemos después de apagar el despertador es darle al interruptor de una lámpara; cuando el sol se oculta, la misma luz ilumina nuestras últimas horas de trabajo y ocio antes de acostarnos.

Estos actos, en apariencia inofensivos, entrañan un coste en términos de salud. Al encender la luz cuando ya se ha puesto el sol, el NSQ interpreta que es de día, cuando en realidad es de noche; se comunica entonces con los diferentes órganos, incluida la glándula pineal, y les envía una información errónea, que les induce a realizar los ajustes fisiológicos propios de la actividad diurna. De esta modo, los ritmos de las células se desincronizan del ciclo ambiental natural, lo que genera un desajuste temporal, que se conoce como cronodisrupción. Siendo el sistema endocrino uno de los más afectados por la acción que tiene la melatonina sobre el eje hipotálamo-adenohipófisis (Figura 8).

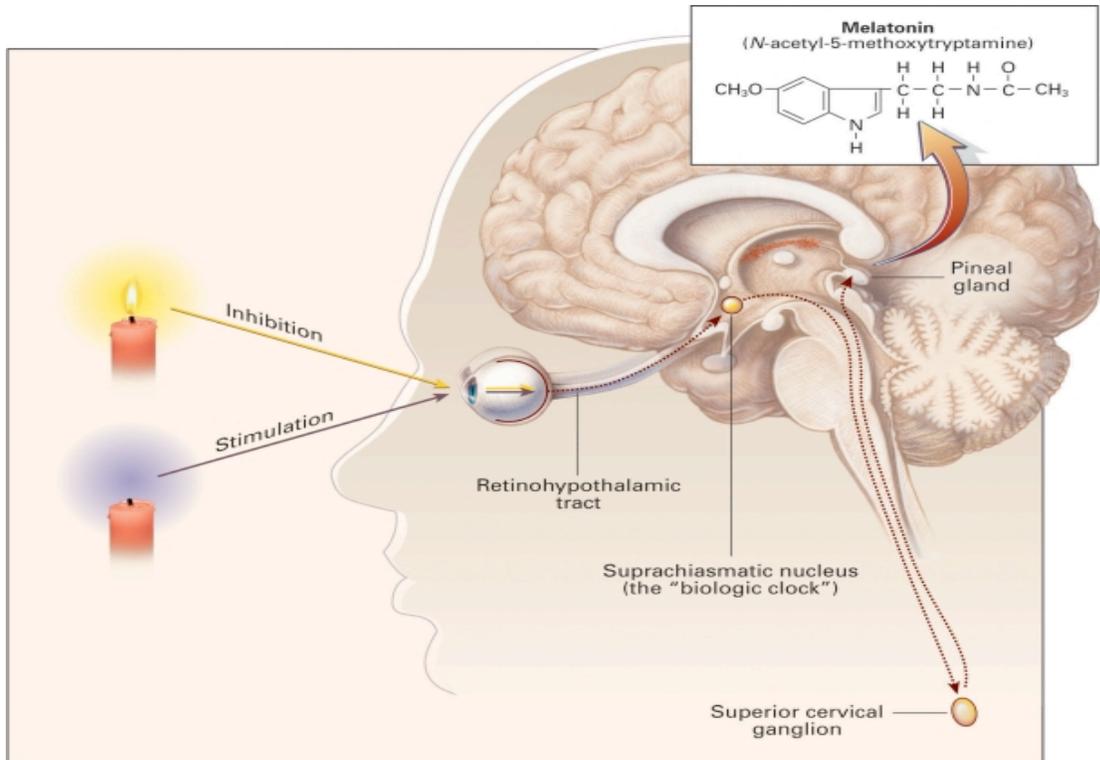


Figura 7. Regulación lumínica en la producción de melatonina en humanos.

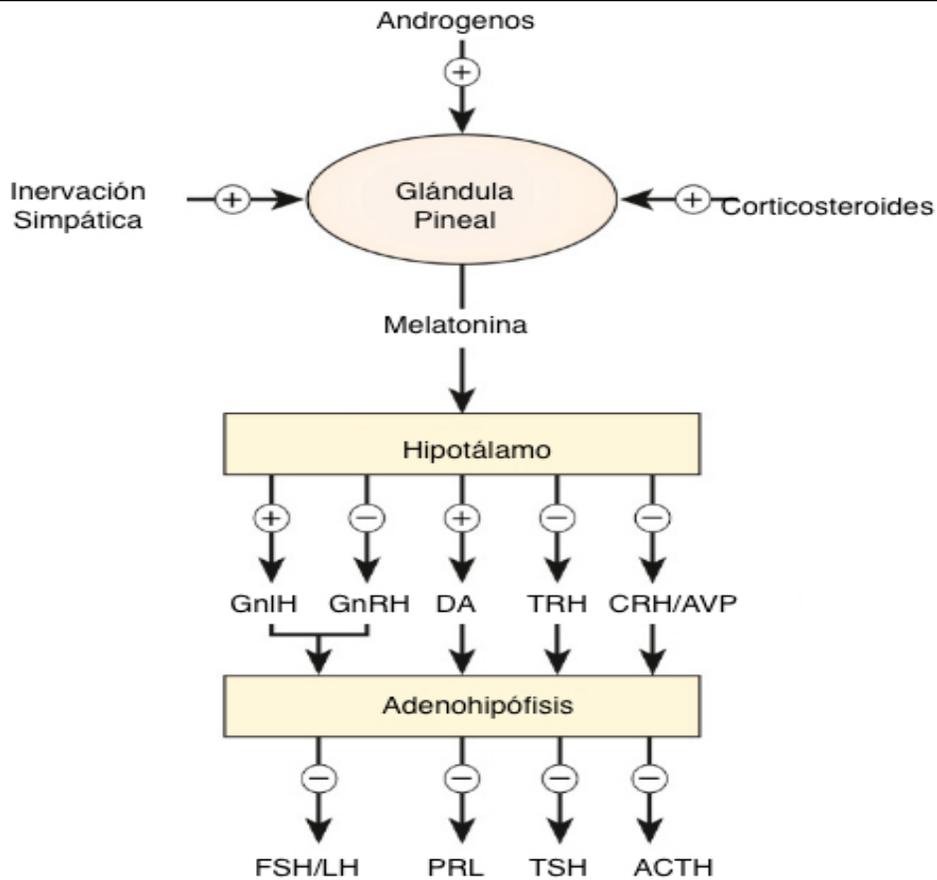


Figura 8. Acción de la melatonina en la producción de hormonas hipotalámicas.

Una falta de ajuste con el ciclo luz-oscuridad puede producir desordenes, entre los que destacan:

*Síndrome de fase retrasada de sueño* es propio de adolescentes y se caracteriza por la imposibilidad de iniciar el sueño nocturno antes de las dos o las tres de la madrugada. Por el contrario, el *síndrome de sueño avanzado* se caracteriza por una presentación anticipada del sueño con relación a lo normal, y lo padecen un 40% de ancianos que sufren problemas de sueño inadecuado con episodios frecuentes de despertar. Esta mala calidad del sueño disminuye el rendimiento intelectual y físico durante el día.

La depresión bipolar (*síndrome maniaco-depresivo*) y la denominada *enfermedad depresiva estacional* parecen estar relacionadas con el sistema circadiano. La enfermedad depresiva estacional se produce cada año en la misma época, al comienzo del otoño, y desaparece en primavera. Los que sufren esta enfermedad tienden a comer y dormir en exceso, disminuyen su actividad física, tienen dificultades con el trabajo y en las relaciones interpersonales.

Un ejemplo claro de desincronización es el que se produce cuando se realiza un vuelo transmeridiano a través de varios husos horarios. Aunque los efectos varían en intensidad dependiendo de los individuos, los síntomas generales incluyen: alteración del sueño, problemas gastrointestinales, disminución de la capacidad de atención y alerta y sensación general de malestar. Al conjunto de todas estas alteraciones se les denomina con el término anglosajón de *jet lag*. Dos factores fundamentales parecen ser los responsables de este síndrome: a) la desincronización externa que se produce entre el tiempo de los ritmos endógenos y el tiempo externo; al parecer, el sistema circadiano necesita varios días para sincronizarse con el tiempo ambiental local, y b) la desincronización interna entre diferentes ritmos fisiológicos debida a que los osciladores o relojes del organismo se ajustan al nuevo tiempo ambiental a diferentes velocidades, lo que produce diferencias de fase entre ellos.

El tiempo que se necesita para adaptarse al nuevo sistema ambiental depende del número de horas de cambio de fase producidas, del nuevo horario de iluminación, comidas y diversos factores sociales. La dirección del vuelo también influye en la capacidad de adaptación, los

vuelos en dirección oeste, que producen un retraso de fase del sistema circadiano, permiten un ajuste más rápido que los vuelos hacia el este, los cuales generan adelanto de fase.

Los *turnos rotatorios de trabajo* alteran con frecuencia los ritmos circadianos de los trabajadores, reduciendo la productividad y la satisfacción en el trabajo con consecuencias para la salud. De un 15% a un 30% de la población activa en los países industrializados tiene trabajos con turnos rotatorios. Este diseño laboral se ha desarrollado por las demandas económicas, la necesidad de atención continuada de procesos tecnológicos en industrias químicas, siderúrgicas, centrales nucleares, etc., o por la demanda de servicios de 24 horas en hospitales, transportes, bomberos, etc. Los turnos rotatorios de trabajo producen situaciones de desincronización externa, alterando el sueño y su control y produciendo desórdenes digestivos. En trabajadores con turnos nocturnos se ha descrito un riesgo de úlceras de estómago varias veces superior que en trabajadores de día.

Los resultados de numerosos estudios experimentales y epidemiológicos no dejan lugar a dudas: la cronodisrupción se asocia a una mayor incidencia de patologías, entre ellas deterioro cognitivo, hipertensión, envejecimiento acelerado, diabetes, obesidad, depresión, inmunodepresión, infertilidad, insomnio y cáncer. Ello llevó en 2007 a la Agencia Internacional del Cáncer, de la Organización Mundial de la Salud, a considerar el trabajo a turnos que produce cronodisrupción como cancerígeno potencial.

## BIBLIOGRAFIA

- Delgado JM et al. Manual de Neurociencia. Editorial Síntesis, S.A. Madrid. 1998
- Fundación Nobel. Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2017
- López Pérez M. La glándula pineal. En García Sacristán A. Editor Fisiología Veterinaria. Madrid: Editorial Tébar Flores 2017 (en prensa): pp. 457-470.
- Madrid Pérez JA. La iluminación artificial desajusta nuestro reloj biológico. *Investigación y Ciencia* 2015; 468:10-12.
- Madrid JA, Rol de Lama A. Cronobiología básica y clínica. Editec@Red, S.L. Madrid. 2016 .

# Premio Nobel en Química 2017. Regla de oro de la investigación biológica: la pregunta, el material biológico, la técnica

Juan-Ramón Lacadena Calero

---

Les solía decir a mis alumnos de la Facultad de Biología que si alguna vez pretendían alcanzar el Premio Nobel como investigadores, o al menos hacerse famosos, tenían que tener siempre presente la “regla de oro de la investigación”; es decir, buscar la respuesta a una pregunta importante, utilizar el material biológico idóneo y utilizar la técnica metodológica o instrumental adecuados.

En la Historia de la Biología en general y de la Genética en particular, en numerosas ocasiones se han galardonado con el Premio Nobel técnicas metodológicas o instrumentales que han revolucionado la investigación. Así, podemos recordar

- **Tecnología de ácidos nucleicos**

Endonucleasas de restricción: Arber, Smith y Nathans (1978)

Secuenciación del ADN: Gilbert y Sanger (1980)

Moléculas de ADN recombinante: Berg (1980)

Reacción en cadena de la polimerasa, PCR: Mullis (1993)

Mutagénesis dirigida: Smith (1993)

Tecnología *knock-out*: Capecchi, Evans y Smithies (2007)

Proteína fluorescente verde, GFP: Shimomura, Chalfie y Tsien (2008)

- **Técnicas de apoyo**

Anticuerpos monoclonales: Köhler y Milstein (1984)

Fecundación in vitro: Edwards (2010)

Ultracentrífuga: Svedberg (1926)

Electroforesis: Tiselius (1948)

Microscopio electrónico: Ruska (1986)

Microscopio electrónico de barrido: Binning y Rohrer (1986)

Microscopio de fluorescencia (Nanoscopía): Berzig, Hell y Moerner (2014)

Hoy, a esta lista hay que añadir la microscopía crio-electrónica que les ha valido el Premio Nobel 2017 en Química a Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson “por desarrollar la microscopía crio-electrónica para la determinación de estructuras de alta-resolución de biomoléculas en solución”, en palabras de la Real Academia Sueca de Ciencias otorgante del galardón. La glosa de este premio está cargo del Dr. José M<sup>a</sup> Valpuesta, que se incluye a continuación.

# Criomicroscopía electrónica: de la biología descriptiva a la biología estructural

José María Valpuesta, José L. Carrascosa

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Darwin, 3. 28049 Madrid.

**ABSTRACT:** The award to Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson of the Nobel Prize in Chemistry 2017 "for developing cryoelectron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution" has revealed once more the importance of structural biology, a small discipline in quantitative terms, but of a huge influence on molecular biology. Electron microscopy, a technique developed more than 80 years ago that has been fundamental in the generation of knowledge both in the fields of Biology and Material Science, has become, thanks to the development of cryoelectron microscopy, a powerful structural technique, equivalent to X-ray crystallography or Nuclear Magnetic Resonance. These Nobel awardees, along with other scientists that the Nobel Foundation cannot reward but whose names should not be forgotten, have contributed to transform electron microscopy into a technique capable of resolving the structure of biological molecules at atomic resolution.

**RESUMEN:** La reciente concesión del Premio Nobel de Química 2017 a tres investigadores, Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson, por su contribución al desarrollo de la técnica de la criomicroscopía electrónica, vuelve a poner en actualidad a la biología estructural, que es una pequeña disciplina en términos cuantitativos, pero de enorme influencia en la biología molecular. La microscopía electrónica, desarrollada hace ya más de 80 años y que ha resultado fundamental en la generación de conocimiento tanto en el campo biológico como en el de materiales, ha devenido en una técnica estructural muy poderosa, al mismo nivel que la difracción de rayos X o la Resonancia Magnética Nuclear. Los científicos antes nombrados han contribuido, junto con otros muchos otros que la Fundación Nobel no puede premiar pero cuyos nombres no deben olvidarse, a que la resolución atómica de estructuras biológicas mediante microscopía electrónica sea una realidad.

**Corresponding Author:** jmv@cmb.csic.es

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 4 (2017), pp. 458-464

Se puede decir que la Vida es una serie coordinada de reacciones químicas, conectadas entre sí a distintos niveles, en las que moléculas biológicas de todo tipo (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, azúcares) son transformadas. La mayor parte de los científicos que estudian esas reacciones, es decir las moléculas que son transformadas y las que realizan la transformación, lo hacen de manera reduccionista, analizando su comportamiento desde un punto de vista que podríamos definir como bidimensional, estudiando la naturaleza de los procesos sin tener en cuenta que todas esas moléculas tienen una estructura tridimensional y que las reacciones se llevan a cabo porque se produce una complementariedad en el espacio entre las moléculas involucradas. El estudio de la estructura tridimensional de las moléculas biológicas –la biología estructural antes mencionada– ha influido notablemente en el desarrollo de la biología molecular, con la introducción de conceptos que ahora damos por sentado (1). En este proceso histórico, ciertos descubrimientos y ciertos nombres han ocupado un papel preponderante.

La biología estructural es hija de la revolución que tuvo lugar en la Física en las primeras décadas del siglo XX. El descubrimiento accidental de los rayos X por parte de Wilhelm Roentgen (Premio Nobel de Física de 1901) (2)

abrió un enorme campo para la experimentación física, y en los siguientes años, investigadores como Max von Laue (Premio Nobel de Física de 1914) (3) se dedicaron a estudiar sus extraordinarias propiedades de interacción con la materia. Estas propiedades son más fáciles de estudiar si las moléculas del material sobre el que inciden los rayos X están ordenadas formando cristales tridimensionales. Pronto algunos de esos investigadores se apercibieron de que, siendo la longitud de onda de los rayos X del orden de 1 Å, éstos podían utilizarse para estudiar estructuras con la posibilidad de resolver las distancias entre los átomos de las moléculas. La difracción de rayos X como técnica de análisis estructural había nacido y sus mayores impulsores fueron William y Lawrence Bragg (padre e hijo, Premios Nobel de Física de 1925) (4), quienes utilizaron esta técnica para determinar estructuras de moléculas inorgánicas simples como NaCl y ZnS. La técnica sufrió un continuo desarrollo y permitió pronto no sólo la determinación estructural de compuestos orgánicos más complejos como la penicilina o la vitamina B12, gracias al trabajo pionero de Dorothy Hodgkin (5), sino también el análisis de las primeras moléculas biológicas.

Entre éstas destacan las proteínas, cuya química básica se conocía desde finales del siglo XIX. La mayor parte de

los aminoácidos ya se habían caracterizado para entonces, así como el enlace peptídico que los une, y estaba claramente establecido el papel esencial de las proteínas en multitud de procesos biológicos. Además, varias proteínas habían sido cristalizadas –enzimas proteolíticas como la ureasa y la pepsina (6,7)-, lo que dejaba claro que estaban formadas por moléculas con una única secuencia que daba lugar a la función específica que poseyesen. El concepto de tridimensionalidad de las proteínas –y en realidad de cualquier molécula biológica- comenzó a desarrollarse en esa época gracias a la genialidad y a los resultados de un científico único. Linus Pauling (Premio Nobel de Química de 1954) supo introducir en la Biología conceptos que, provenientes de la Física, comenzaban a utilizarse en la Química, como los del doble enlace, la resonancia, los enlaces débiles –puente de hidrógeno, de van der Waals, interacciones hidrófobas ...- (8). Estos enlaces débiles permiten disponer en tres dimensiones la secuencia de las proteínas que hasta entonces se entendía como una mera sucesión unidimensional de aminoácidos. Pauling no sólo teorizó sobre esta cuestión, sino que realizó experimentos para probar que la destrucción de los enlaces débiles induce la desnaturalización de la proteína y la pérdida de su estructura tridimensional y de su función, sin destruir la secuencia aminoacídica (9). Las proteínas tienen pues una estructura tridimensional que es preciso mantener para realizar su función.

¿Cómo determinar esa estructura? William Astbury, de la escuela de los Bragg, había utilizado la difracción de rayos X con fibras de lana y pelo para mostrar que en las proteínas que las forman existían disposiciones regulares de los aminoácidos (10). Fue otra vez la genialidad de Pauling, quien conocía como nadie la naturaleza del enlace peptídico, las distancias atómicas entre sus componentes –obtenidas mediante experimentos de difracción de rayos X- y la naturaleza química de éstos, quien sugirió la existencia de dos tipos de estructuras, la  $\alpha$ -hélice y la lámina  $\beta$ , que son imprescindibles para el mantenimiento de la estructura tridimensional de las proteínas, gracias a los enlaces débiles que tienen lugar entre átomos de esas estructuras (11,12).

Como se ha comentado anteriormente, la difracción de rayos X había mostrado muy rápidamente la capacidad de determinar la estructura de compuestos simples como sales inorgánicas, y aunque potencialmente podía hacer lo mismo con proteínas, la complejidad y tamaño de éstas hizo en la práctica imposible su resolución hasta que se fueron solventando a lo largo de casi cuarenta años una serie de problemas técnicos. Está fuera de este artículo referirse a esta cuestión, pero sí que muchas de las soluciones vinieron de la mano de o auspiciadas por un científico extraordinario, el austríaco Max Perutz (Premio Nobel de Química de 1962). En los años 30, Perutz llegó a Cambridge para realizar su tesis doctoral y contactó con Lawrence Bragg, entonces en el *Cavendish Laboratory*, para utilizar la difracción de rayos X con compuestos biológicos. Durante las siguientes décadas, y en colaboración con John Kendrew (Premio Nobel de

Química de 1962), trabajó en la determinación estructural de dos proteínas homólogas, mioglobina y hemoglobina. Por influencia de Bragg, Perutz fue el primer investigador del *Laboratory of Molecular Biology* –el primer centro de investigación con ese nombre, fundado en 1947, y que se ha convertido en referencia mundial en el campo de la biología estructural-. Al centro pronto se incorporaron otras luminarias científicas como Francis Crick, James Watson y Hugh Huxley, cuyos trabajos proporcionarían un fuerte impulso a la biología molecular. Después de más de una decena de años, y tras un trabajo ímprobo, Kendrew consiguió determinar la estructura de la mioglobina (13) y Perutz la de la hemoglobina (14). Las dos estructuras permitieron confirmar la existencia de la  $\alpha$ -hélice y además, vista la semejanza entre sus estructuras y su función –las dos proteínas están involucradas en el transporte de  $O_2$  y  $CO_2$ - fue posible concluir que hay una clara relación entre la estructura tridimensional de las moléculas biológicas y su función.

Otras estructuras siguieron en los siguientes años, y entre ellas merece la pena mencionar la del complejo entre la lisozima y un inhibidor que emula su sustrato. La estructura de este complejo, determinada por el grupo de David Phillips en Londres (15), permitió no sólo confirmar la existencia de la lámina  $\beta$  sino la perfecta complementariedad que existe entre las superficies de contacto de la enzima con su sustrato, sin duda otra afirmación de la relación íntima que existe entre la estructura y la función.

Pero sin duda el culmen de la biología estructural, quizás el momento en el que la biología molecular se inicia como disciplina independiente, es la publicación en 1953 del modelo de la doble hebra del ADN, la molécula biológica que almacena y transmite la información sobre la herencia. James Watson y Francis Crick (Premios Nobel de Química de 1962) modelaron la estructura de este polímero con la misma estrategia que siguió Pauling para modelar la  $\alpha$ -hélice y la lámina  $\beta$ , el conocimiento de las distancias entre átomos obtenidas mediante difracción de rayos X y posterior modelado mediante información complementaria procedente de multitud de experimentos bioquímicos (16,17). La estructura modelada, una hermosa doble hélice en el que las dos hebras se ajustan mediante la interacción de las bases complementarias de las dos secuencias, sugirió inmediatamente a sus descubridores la forma en que la información genética se transmite, la copia independiente de las dos hebras mediante un mecanismo que entonces era desconocido.

La difracción de rayos X ha producido desde entonces miles de estructuras tridimensionales de todo tipo de moléculas biológicas y se ha convertido sin duda alguna en la técnica más influyente en el armamento de la biología molecular. Su evolución ha contribuido además al desarrollo de distintas infraestructuras internacionales como las bases de datos o las instalaciones de luz sincrotrón que han ayudado a la internacionalización de la ciencia.

El otro pilar tradicional de la biología estructural ha

sido la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Ya desde los años 70, la labor de grupos como el de Kurt Wüthrich (Premio Nobel de Química en 2002), en el ETH de Zurich, pusieron las bases para la determinación de la estructura tridimensional con resolución atómica de proteínas (y otras macromoléculas) en solución mediante RMN. El principio de esta técnica espectroscópica es la determinación de distancias inter-atómicas y de ángulos dihédricos, entre otros parámetros, para modelar una estructura en base a las restricciones estructurales obtenidas, y Wüthrich la utilizó para determinar en 1982 la estructura atómica del inhibidor de la tripsina pancreática (18). Sin embargo, las capacidades de la RMN, más allá de la pura determinación estructural, han hallado su área de aplicación en los estudios de dinámica estructural, plegamiento de proteínas y, muy especialmente, en el análisis de interacciones. No obstante, a pesar de sus enormes potencialidades, el uso de la RMN ha estado limitado a sistemas de relativa baja masa molecular y ha estado tradicionalmente penalizado por sus largos tiempos de recolección de datos y de resolución de estructuras, si bien se está avanzando considerablemente en todos estos aspectos y, actualmente presenta un futuro muy prometedor.

Mientras que la difracción de rayos X comenzaba a ser utilizada para el análisis de muestras biológicas, otra técnica, la microscopía electrónica, nació a resultas de los desarrollos teóricos producidos durante la misma revolución que tuvo lugar en la Física. Su concepción parte de los estudios de Louis de Broglie (Premio Nobel de Física de 1929), quien formuló la teoría de que los electrones tienen una naturaleza dual corpúsculo/onda. La confirmación de estos estudios tuvo unos claros efectos prácticos: los electrones podían interactuar con la materia –y por lo tanto extraer información de ésta- y ser manejados mediante dispositivos electromagnéticos. Durante los siguientes años, principalmente en Alemania y alrededor de un grupo de la universidad de Berlín liderado por Max Knoll, del que su estudiante de doctorado Ernst Ruska sería el mayor activo, se desarrollaron las primeras lentes electromagnéticas y unos primitivos sistemas de vacío que permitieron generar imágenes en un rudimentario microscopio electrónico de transmisión construido por el grupo en 1931 (19). No se tardó mucho tiempo en utilizar los primeros microscopios electrónicos para observar muestras biológicas, en concreto de virus y bacterias, de la mano de Helmut Ruska, hermano de Ernst (20).

El desarrollo de los microscopios tuvo como mejora fundamental el aumento de voltaje, que posibilitó el uso de radiaciones de longitud de onda más corta y por lo tanto una mayor capacidad de resolución. Un microscopio electrónico de 200 kV emite electrones con una longitud de onda de 0,025 Å y por lo tanto es capaz en principio de resolver detalles subatómicos de las moléculas bajo estudio. Esto es casi cierto desde hace tiempo en el área de Materiales, en el que se estudian estructuras compuestas fundamentalmente de elementos pesados que interactúan entre sí a través de enlaces fuertes: las muestras pueden

irradiarse sin mucho problema y además producen mucho contraste –dispersan más los electrones-(21). En la práctica, y en el campo de la Biología, esto distaba mucho de ser posible hasta hace unos pocos años. El problema fundamental cuando se trabaja con una muestra biológica es que su estructura tridimensional se conserve mientras es irradiada, y es que esa estructura se mantiene como tal gracias a los enlaces de carácter débil que se producen en su interior y con las moléculas de agua que las solvatan, y estos enlaces son destruidos rápidamente por la radiación electrónica. El agua por lo tanto debe mantenerse presente si se quiere tener una imagen fiel de la muestra. Esto representa un problema, pues el microscopio electrónico requiere trabajar en condiciones de alto vacío para que los electrones –que interactúan fuertemente con la materia- atraviesen la columna del microscopio electrónico, irradian la muestra y sean dispersados por ella. El vacío del microscopio haría desaparecer el agua de la muestra –y, de hecho, toda la muestra-. Mantener pues la muestra biológica hidratada dentro del microscopio electrónico parecía una quimera y los investigadores, desde los trabajos pioneros de Helmut Ruska, se dedicaron a intentar remover el agua de las muestras sin que el proceso de deshidratación afectase demasiado a su estructura. Para ello se idearon técnicas de “moldeado” (22-24) en las que el agua es reemplazada por un material que no sólo es más resistente a la radiación sino que también genera más contraste. Estas técnicas son muy agresivas para la muestra y limitan mucho la resolución a la que se las puede analizar, pero facilitaron durante esos años iniciales la visualización de estructuras biológicas (tejidos, células, organelos subcelulares, bacterias, virus, ...). Como ejemplo, sirvan los estudios de Albert Claude, Christian de Duve y George Palade (Premios Nobel de Medicina o Fisiología de 1974) que permitieron describir la estructura de la célula y sus distintos organelos (25,26), o los de Hugh Huxley en el *Laboratory of Molecular Biology* que ayudaron a comprender el mecanismo de contracción del músculo (27). La microscopía electrónica vivió durante el segundo tercio del siglo XX una era dorada como técnica descriptiva, pero durante ese tiempo se realizaron también los primeros estudios que mostraron que dadas las condiciones adecuadas, y mediante técnicas de procesamiento de imagen, se podía recuperar información sobre la estructura tridimensional de las moléculas biológicas bajo estudio. En este campo sobresale la figura de Aaron Klug (Premio Nobel de Química de 1982), también en el *Laboratory of Molecular Biology*. Klug y colaboradores desarrollaron durante la década de los 60 la teoría de la imagen que se produce en un microscopio electrónico. Estos estudios demostraron que la información que se registra corresponde a la proyección del espécimen, en definitiva que existe información tridimensional y que ésta se puede recuperar mediante técnicas de procesamiento de imagen, que aplicaron en un principio a especímenes regulares como virus icosaédricos o colas de bacteriófagos (28-30). Utilizando estas técnicas y en colaboración con David de Rosier, Klug publicó la primera reconstrucción tridimensional de una estructura biológica,

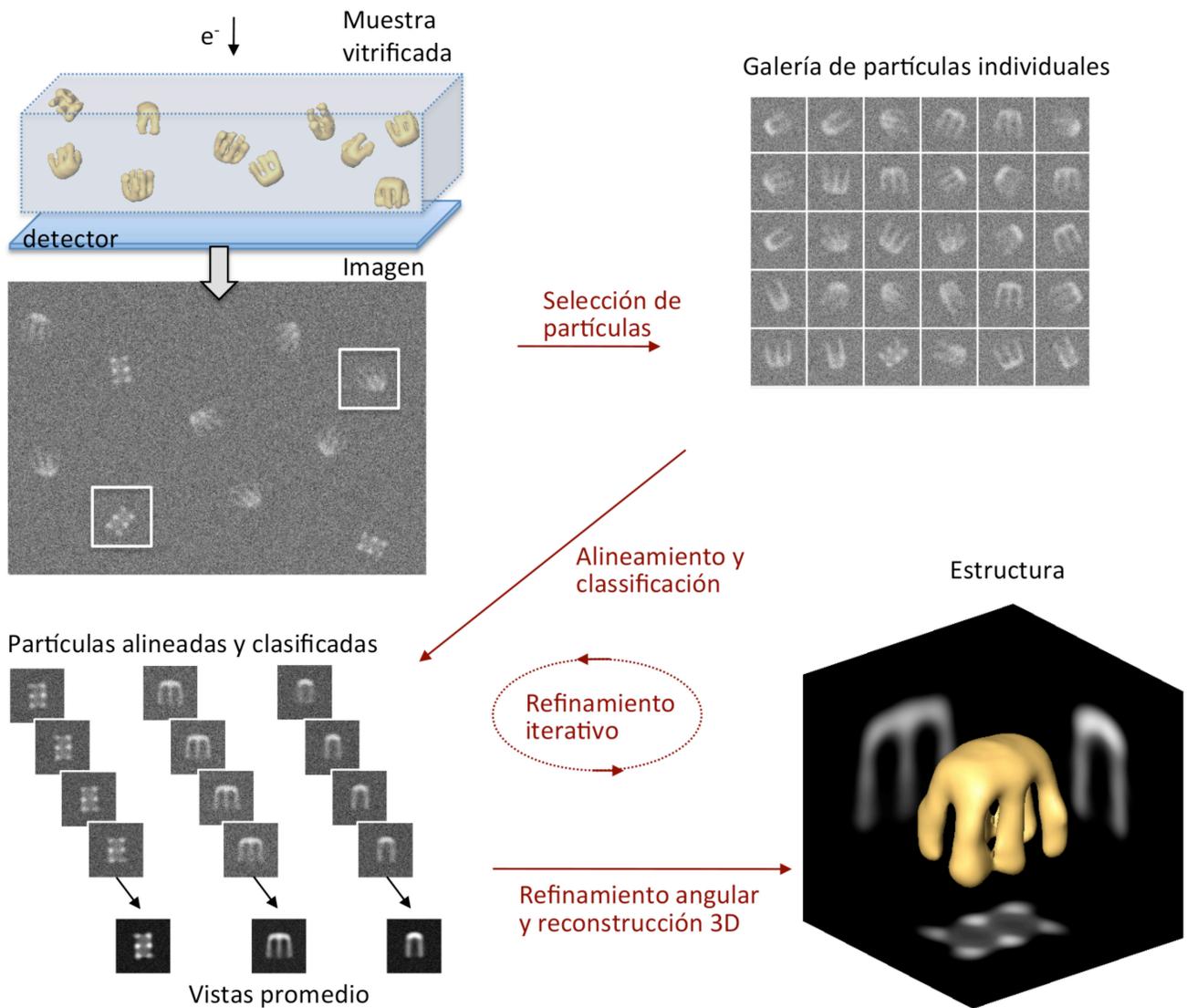
la cola del bacteriófago T4 (31).

Desde inicios de los 70 se había establecido pues la metodología para la determinación tridimensional de estructuras biológicas, pero persistía el problema de la preparación de la muestra, que debía ser deshidratada y tratada con agentes químicos, lo que suponía la destrucción de los detalles de media y alta resolución. ¿Cómo conseguir mantener la muestra hidratada y en condiciones nativas? La genial idea la tuvo a principios de los años 80 el primero de los galardonados con el Premio Nobel de Química de este año, el suizo Jacques Dubochet. Trabajando en el *Biozentrum* de Basilea, estuvo involucrado en los trabajos que allí realizaba Eduard Kellenberger para optimizar los métodos de sustitución del agua en muestras biológicas. Para ello, se estaban empezando a utilizar bajas temperaturas durante el proceso de inclusión en resinas plásticas, minimizando de esta forma la desnaturalización de los componentes celulares. Tras su marcha al Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL, Heidelberg), Dubochet y sus colaboradores continuaron trabajando en el uso de bajas temperaturas para preparar muestras biológicas en microscopía. Su esfuerzo es un claro ejemplo de perseverancia y confianza en la ciencia (tanto a nivel personal como institucional) y, tras muchos años de pruebas y desengaños, consiguieron diseñar un procedimiento para congelar las muestras a muy baja temperatura (por debajo de  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y a gran velocidad, de tal manera que el agua de hidratación se solidifica y forma una capa de hielo amorfa, de naturaleza vítrea (32). A partir de este proceso de vitrificación, que congela la muestra manteniéndola en su estado original, todos los pasos posteriores deben hacerse a baja temperatura, incluyendo la observación en el microscopio electrónico – es por eso que la técnica en su conjunto se llama criomicroscopía electrónica-, y es en este punto donde otro de los Premios Nobel de Química de este año, el británico Richard Henderson –también en el *Laboratory of Molecular Biology* de Cambridge- realizó su primera contribución, ya que estuvo involucrado en el diseño de la instrumentación necesaria para el manejo de las muestras vitrificadas (33).

A decir verdad, Henderson ya había realizado una contribución fundamental en 1975 cuando en colaboración

con Nigel Unwin publicó la primera evidencia de la capacidad de la criomicroscopía electrónica de obtener información estructural a alta resolución (34), al ser capaz de visualizar las  $\alpha$ -hélices de una proteína, bacteriorrodopsina, para lo que se requiere una capacidad de resolución de  $7\text{ \AA}$ . Esta información está lejos de la resolución atómica, pero Henderson persistió durante los siguientes 15 años, y después de resolver toda una serie de problemas técnicos de distinto tipo (otro ejemplo de perseverancia basado en la confianza institucional y la convicción científica personal), pudo por fin determinar la estructura tridimensional de la bacteriorrodopsina a resolución casi atómica ( $3,5\text{ \AA}$ ), una hazaña técnica que demostró la verdadera potencialidad de la técnica (35).

Sin embargo, este estudio y los que les precedieron tenían una fuerte limitación: la estrategia para el análisis de las moléculas requería, como en el caso de la difracción de rayos X, la generación de estructuras ordenadas, fundamentalmente cristales. La alternativa para soslayar este importante cuello de botella es obtener información de las moléculas sin necesidad de tener que generar cristales, y es en el desarrollo de esta estrategia donde el tercero de los Premios Nobel de Química de este año, el alemán nacionalizado americano Joachim Frank, ha realizado la más importante contribución. Frank y colaboradores –trabajando fundamentalmente en el *Wadsworth Centre* de Albany, Nueva York- aplicaron principios de reconstrucción tridimensional tomográfica parecidos a los que se usan en Medicina con la Tomografía Axial Computerizada. Como se ha comentado anteriormente, la imagen que un microscopio electrónico genera de una muestra –por ejemplo, una proteína- corresponde a la proyección bidimensional (como si fuera una 'radiografía') de la estructura tridimensional de esa proteína en la orientación en que ha sido registrada. Si se registran muchas vistas de esa proteína en distintos ángulos –miles e incluso millones- de tal manera que cubran aproximadamente todas las orientaciones, es posible mediante tratamientos matemáticos llevar a cabo un proceso iterativo en el que se determinan las orientaciones de cada una de esas vistas y se utilizan para reconstruir tridimensionalmente la muestra, de manera que se puede determinar la estructura de esa proteína (Figura 1) (36).



**Figura 1. Procedimiento general para la determinación estructural de muestras biológicas.** Las partículas de la muestra bajo estudio (en este caso una chaperona molecular llamada prefoldina) se encuentran dispuestas y orientadas al azar en la muestra vitrificada, y así son registradas por el microscopio electrónico. Se seleccionan y extraen imágenes de partículas individuales. Posteriormente, se alinean y clasifican y las imágenes de partículas de una misma clase se promedian para obtener imágenes de una mayor relación señal/ruido. La orientación relativa de las imágenes promedio se determina mediante técnicas de asignación angular, tras lo cual se realiza una reconstrucción tomográfica que genera la estructura 3D.

A partir de desarrollos de programas de refinamiento angular y reconstrucción tridimensional, Frank y otros grupos como los de Wah Chiu (en el *Baylor College of Medicine*, Houston), Wolfgang Baumeister (en el *Max Planck Institute* de Martinsried, Munich) ó Hong Zou (en la Universidad de California en Los Ángeles) consiguieron determinar las estructuras, primero a resolución subnanométrica y después a otras más cercanas a la atómica, de algunos grandes complejos proteicos como ribosomas o virus icosaédricos, sentando a lo largo de este proceso las bases de la criomicroscopía electrónica como herramienta de análisis estructural. No obstante, las estructuras resueltas a resolución atómica eran pocas y su determinación estaba en manos de un reducido número de investigadores con el talento y los medios suficientes para

atacar los múltiples problemas particulares que surgían con cada muestra.

La criomicroscopía electrónica estaba lejos de ser una técnica estructural rutinaria, con un nivel de estandarización similar al de la cristalografía de proteínas o la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y eso se debía a problemas de carácter técnico. El primero y más importante es el de la radiación electrónica, y es que los mismos electrones que se usan para obtener información sobre la estructura de la muestra acaban produciendo modificaciones estructurales irreversibles en ella. Para evitar este problema hay que reducir la dosis electrónica al mínimo, pero esto era técnicamente un escollo muy importante con la tecnología existente hasta hace poco tiempo, ya que tanto las placas fotográficas usadas hasta

hace 10 años como las cámaras CCD que las sustituyeron no eran lo suficientemente sensibles para reducir la radiación electrónica a los mínimos necesarios. La revolución en la criomicroscopía electrónica ha llegado con el reciente desarrollo de los detectores directos de electrones, basados en la tecnología CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*), en cuyo diseño ha estado involucrado entre otros el propio Henderson (37). Estos detectores son muy sensibles, producen imágenes con una alta relación de señal sobre el ruido y, además, son también extremadamente rápidos en el registro de la información, de tal manera que en un segundo pueden registrar decenas de imágenes –fotogramas-. Esta rapidez permite compensar otro problema asociado con la radiación electrónica, el calentamiento local de la muestra allí donde es irradiada, que produce un movimiento y “difuminado” de la imagen registrada en los antiguos sistemas. Este problema, que destruía la información de los detalles estructurales a nivel atómico, deja de serlo ahora gracias al alineamiento y promediado de los “fotogramas”, que eliminan el difuminado de la información.

El segundo problema técnico es que los programas informáticos que manejaban las imágenes de las moléculas individuales –para su clasificación, promediado, reconstrucción tridimensional- no eran suficientemente buenos en la clasificación de las partículas y en el refinado angular a que se ha hecho mención anteriormente. La solución a este problema ha venido de la mano de la implementación de técnicas de “máxima verosimilitud”, desarrolladas entre otros en el grupo de José María Carazo en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) (38) y llevadas a su máximo nivel por Sjors Scheres (primero en el CNB y luego en el *Laboratory of Molecular Biology*) (39).

A estos dos desarrollos cruciales–los detectores directos de electrones y los programas de “máxima verosimilitud”-, se han unido otras importantes mejoras técnicas que tienen que ver con la automatización en la toma de imágenes y su tratamiento (indispensables para obtener las decenas de miles de proyecciones que se necesitan para resolver las estructuras a nivel atómico), así como en la mejora de la óptica y estabilidad de los propios microscopios electrónicos. La unión de todos estos factores ha dado como resultado lo que ha venido en llamarse la “resolution revolution”, un salto en la calidad de la criomicroscopía electrónica y a una “democratización” de la técnica –lo que ha permitido que decenas de grupos por todo el mundo estén realizando magníficos trabajos a muy alta resolución (40,41)-. La criomicroscopía electrónica ha dejado ya de ser la “hermana pequeña” de las técnicas estructurales y posee una enorme capacidad en la determinación estructural no sólo de pequeñas proteínas sino también grandes complejos macromoleculares. Además, y esto quizás es su mayor ventaja, está perfectamente adaptada para analizar los complejos transitorios que se forman de manera inestable entre conjuntos de proteínas –que son la mayor

parte de los que actúan en la célula– y que en principio no son tratables por difracción de rayos X ó RMN. Lo más interesante, si cabe, es que hay espacio para que la tecnología mejore mucho más, no sólo con el desarrollo de detectores de electrones más eficientes, sino también con mejores sistemas ópticos y con la introducción de otras tecnologías que están siendo implementadas. El camino para los estudios de biología estructural *in situ* en el interior celular es una frontera muy cercana que está siendo abordada ya con gran éxito mediante criotomografía electrónica (42). El futuro que se presenta para la criomicroscopía electrónica no puede ser más prometedor.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a las ayudas del Ministerio de Economía y Competitividad BFU2016-75984 (JMV) y BFU2014-54181 (JLC).

## REFERENCIAS

1. Valpuesta JM. A la búsqueda del secreto de la vida. Una breve historia de la Biología Molecular. Madrid: Hélice-CSIC 2008.
2. Roentgen WC. Ueber eine neue Art von Strahlen. *Annalen der Physik und Chemie* 1898; 64: 1-11
3. Laue M von. *Kritische Bemerkungen zu den Deutungen der Photogramme von Friedrich und Knipping*. *Physikalische Zeitschrift* 1913; 14: 421–3.
4. Bragg WH. X-rays and crystalline structure. *Science* 1914, 40:795-802.
5. Hodgkin DC. The X-ray analysis of the structure of penicillin. *Adv Sci*. 1949; 6:85-9.
6. Sumner JB. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 1926; 69: 435–41.
7. Northrop JH. Crystalline pepsin, 1: Isolation and tests of purity. *J. Gen. Physiol.* 1930; 13:739–66.
8. Pauling L. *The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals: An Introduction to Modern Structural Chemistry*. Cornell University Press 1931.
9. Mirsky AE, Pauling L. On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1936; 22:439-47.
10. Astbury WT, Street A. X-ray studies of the structures of hair, wool and related fibres. I. General. *Trans. R. Soc. Lond.* 1931; A230: 75–101.
11. Pauling L, Corey RB, Branson HR. The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1951; 37:205-11.
12. Pauling L, Corey RB. The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1951; 37: 251-6.
13. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 1958; 181: 662-6.

14. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North AC. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* 1960; 185: 416-22.
15. Johnson LN, Phillips DC. Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Å resolution. *Nature* 1965; 206: 761-3.
16. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-8.
17. Watson JD, Crick FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953; 171: 964-7.
18. Wagner G, Wüthrich K. Amide proton exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution. Studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol.* 1982; 160:343-61.
19. Ruska E. Nobel lecture. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Biosci Rep.* 1987; 7: 607-29.
20. Ruska H, Poppe K, Kausche GA. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie der Seiffertschen Mikroorganismen und des Erregers der Lungenseuche des Rindes. *Z Hyg Infektionskr.* 1947; 127: 201-15.
21. Amos LA, Henderson R, Unwin PN. Three-dimensional structure determination by electron microscopy of two-dimensional crystals. *Prog Biophys Mol Biol.* 1982; 39: 183-231.
22. Williams RC, Wyckoff RWG. Electron shadow micrograph of the tobacco mosaic virus protein. *Science* 1945, 101: 594-6.
23. Pearse DC, Baker RF. Sectioning techniques for electron microscopy using a conventional microtome. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med* 1948; 67: 470-74.
24. Brenner S, Horne RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 1959; 34: 103-10.
25. Palade GE, Claude A. The nature of the Golgi apparatus; parallelism between intercellular myelin figures and Golgi apparatus in somatic cells. *J Morphol.* 1949; 85: 35-69.
26. De Duve C. The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lect.* 1965; 59: 49-87.
27. Hodge AJ, Huxley HE, Spiro D. Electron microscope studies on ultrathin sections of muscle. *J Exp Med.* 1954; 99: 201-6.
28. Caspar DL, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1962; 27: 1-24.
29. Klug A, Berger JE. An optical method for the analysis of periodicities in electron micrographs, and some observations on the mechanism of negative staining. *J Mol Biol.* 1964; 10: 565-9.
30. Klug A, De Rosier DJ. Optical filtering of electron micrographs: reconstruction of one-sided images. *Nature* 1966; 212: 29-32.
31. De Rosier DJ, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. *Nature* 1968; 217: 130-4.
32. Lepault J, Booy FP, Dubochet J. Electron microscopy of frozen biological suspensions. *J Microsc.* 1981; 129: 89-102.
33. Henderson R, Raeburn C, Vigers G. A side-entry cold holder for cryo-electron microscopy. *Ultramicroscopy* 1991; 35: 45-53.
34. Henderson R, Unwin PN. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 1975; 257: 28-32.
35. Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing KH. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol.* 1990; 213: 899-929.
36. Frank J. *Averaging of low-exposure electron micrographs of non-periodic objects.* *Ultramicroscopy* 1975; 1: 159-62
37. Faruqi AR, Cattermole DM, Henderson R, Mikulec B, Raeburn C. Evaluation of a hybrid pixel detector for electron microscopy. *Ultramicroscopy* 2003; 94: 263-76.
38. Scheres SH, Valle M, Nuñez R, Sorzano CO, Marabini R, Herman GT, Carazo JM. Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images. *J Mol Biol.* 2005; 348: 139-49.
39. Scheres SH. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J Struct Biol.* 2012; 180: 519-30.
40. Banerjee S, Bartesaghi A, Merk A, Rao P, Bulfer SL, Yan Y, Green N, Mroczkowski B, Neitz RJ, Wipf P, Falconieri V, Deshaies RJ, Milne JL, Huryn D, Arkin M, Subramaniam S. 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition. *Science* 2016; 351: 871-5.
41. Bartesaghi A, Merk A, Banerjee S, Matthies D, Wu X, Milne JL, Subramaniam S. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of β-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor. *Science* 2015; 348: 1147-51.
42. Beck M, Baumeister W. Cryo-Electron Tomography: Can it Reveal the Molecular Sociology of Cells in Atomic Detail? *Trends Cell Biol.* 2016; 26: 825-837.