

## ILUMINANDO LA BIOLOGÍA DE LAS PLANTAS CON PROTEÍNAS FLUORESCENTES

por RUBÉN M. BUEY<sup>1</sup> Y MÓNICA BALSERA<sup>2</sup><sup>1</sup>DPTO. MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA, UNIVERSIDAD DE SALAMANCA; <sup>2</sup>INSTITUTO DE RECURSOS

RUBEN.MARTINEZ@USAL.ES; MONICA.BALSERA@CSIC.ES

**Resumen:** En el fascinante mundo de la biología molecular y celular de las plantas, una innovación clave ha revolucionado nuestra capacidad para estudiar y comprender los procesos internos de las células vegetales: las proteínas fluorescentes. Estas proteínas son especiales porque brillan cuando se iluminan con un tipo específico de luz, lo que las convierte en herramientas esenciales para la investigación científica. En este artículo, exploraremos la historia detrás del descubrimiento de las proteínas fluorescentes, cómo se han optimizado con métodos de ingeniería genética e ingeniería de proteínas, algunas de sus aplicaciones en el campo de la biología de plantas y el impacto que tienen en nuestra comprensión del mundo vegetal.

**Abstract:** *In the fascinating world of plant molecular and cellular biology, a key innovation has revolutionized our ability to study and understand the internal processes of plant cells: fluorescent proteins. These special proteins shine when illuminated with specific light, making them essential tools for scientific research. In this article, we will explore the history behind the discovery of fluorescent proteins, how they have been enhanced through genetic and protein engineering, their applications in the field of plant biology and the significant impact they have on our understanding of the plant biology world.*

Palabras clave: proteínas fluorescentes, *GFP*, ingeniería de proteínas, *ROS*, *redox*.

Keywords: fluorescent proteins, *GFP*, protein engineering, *ROS*, *redox*.

## El descubrimiento de las proteínas fluorescentes

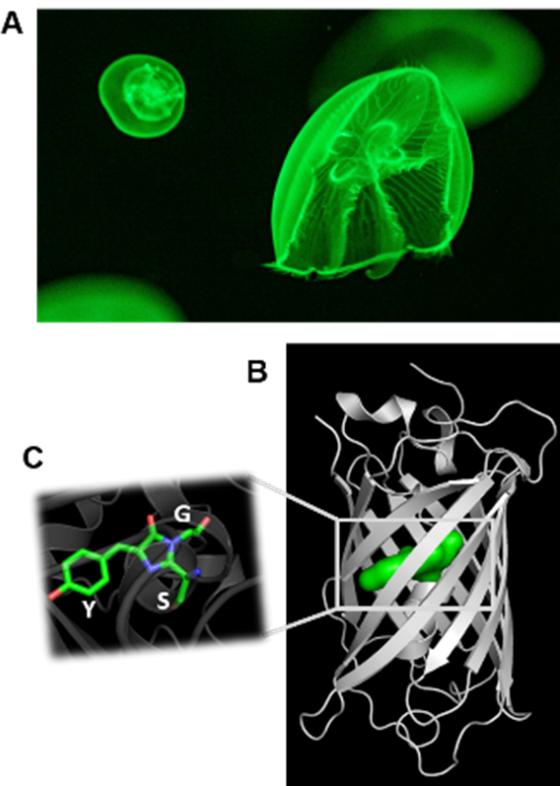
El viaje hacia el descubrimiento de las proteínas fluorescentes comenzó en la década de 1960 al estudiar la bioluminiscencia en los organismos marinos, cuando los científicos encontraron una medusa llamada *Aequorea victoria* que emitía un brillo verdoso en las aguas oscuras del océano (figura 1A). En 1962, el científico japonés Osamu Shimomura logró aislar y caracterizar por primera vez al causante de esta fluorescencia: la proteína verde fluorescente, o *GFP* por las siglas en inglés de *Green Fluorescence Protein* (Shimomura *et al*, 1962). Shimomura descubrió que la *GFP* tenía la capacidad única de emitir luz verde por sí misma, dependiendo exclusivamente de la secuencia de aminoácidos, sin más cofactores ni sustratos (Shimomura, 1979). La *GFP* consta de 238 aminoácidos que se pliegan para adquirir una estructura tridimensional con forma de barril, conocida como “barril  $\beta$ ” (figura 1B). En el corazón de esta estructura se encuentra el cromóforo, que es la región responsable de la emisión de luz verde cuando la proteína se expone a un tipo específico de luz. El

cromóforo de la *GFP* se forma a partir de tres aminoácidos específicos que sitúan en el centro del barril  $\beta$  (figura 1C). Cuando la *GFP* es excitada por luz ultravioleta o azul, el cromóforo absorbe energía y emite luz verde con una luminosidad excepcional.

## Ingeniería de proteínas: creando variantes optimizadas de la *GFP*

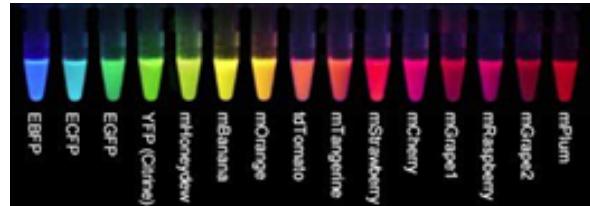
La aplicación en la investigación biológica se hizo evidente varias décadas después de su descubrimiento, cuando los científicos Martin Chalfie y Roger Tsien utilizaron la *GFP* como herramienta para etiquetar y visualizar, mediante microscopía de fluorescencia, las proteínas implicadas en los procesos celulares de los organismos vivos. Este avance marcó un hito en la biología, y permitió que los científicos observaran la actividad celular con una claridad sin precedentes. Desde su descubrimiento inicial, los científicos han aplicado técnicas de ingeniería genética e ingeniería de proteínas para optimizar e incrementar la variedad de proteínas fluorescentes. Mediante la manipulación precisa de la secuencia del ADN del gen que codifica la *GFP* y proteínas similares, los investigadores han logrado ampliar de manera significativa la gama de

colores de estas proteínas, así como optimizar sus propiedades fisicoquímicas para usarlas en la investigación científica (figura 2).



**Figura 1.** GFP de *Aequorea victoria*. (A) Imagen de *Aequorea victoria* tomada por Jane Tan (@jtazan); (B) Estructura de la GFP, formada por once hojas  $\beta$  que forman las paredes del barril. El cromóforo se sitúa dentro del barril, cerca de su centro geométrico; (C) El cromóforo está formado por tres aminoácidos: tirosina (Y), glicina (G) y serina (S).

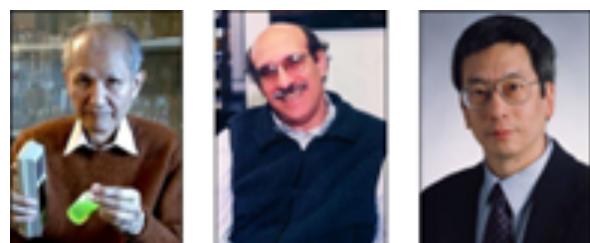
La evolución dirigida de proteínas es una estrategia poderosa que se ha utilizado ampliamente para mejorar las proteínas fluorescentes. Este método, que implica la generación aleatoria de mutaciones en el gen de interés seguido de una selección o cribado para identificar variantes con las propiedades deseadas, ha permitido la creación de proteínas fluorescentes con características específicas optimizadas para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, con esta estrategia se han desarrollado variantes de GFP con mayor brillo, mayor estabilidad térmica o con diversos cambios en el espectro de fluorescencia (Heim *et al.*, 1994). Otro método habitual de ingeniería de proteínas es el diseño racional, que implica el diseño de modificaciones en la proteína a partir de los conocimientos detallados de su estructura y función. Al igual que los métodos de evolución dirigida, esta estrategia ha permitido desarrollar proteínas fluorescentes con propiedades a medida, como cambiar el color de la fluorescencia o mejorar la eficiencia cuántica (Heim y Tsien, 1996).



**Figura 2.** Ejemplos de proteínas fluorescentes generadas por modificaciones sutiles de la estructura de la GFP. Imagen obtenida de la conferencia que Roger Tsien ofreció durante la ceremonia de entrega del premio Nobel (<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/tsien-slides.pdf>).

### Premio Nobel y reconocimiento científico

El impacto revolucionario de las proteínas fluorescentes en la biología no pasó desapercibido y, en 2008, Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien (figura 3) fueron galardonados con el Premio Nobel de Química por su contribución al desarrollo y aplicación de estas herramientas biológicas. Este prestigioso premio reconoció el valor y la importancia de las proteínas fluorescentes en la investigación científica, destacando su papel fundamental en el avance del conocimiento biológico.

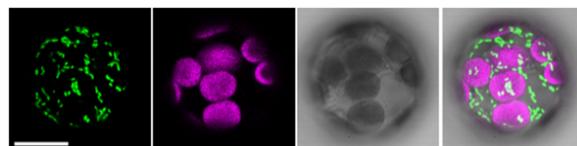


**Figura 3.** Los profesores Osamu Shimomura (Japón), Martin Chalfie (EEUU) y Roger Tsien (EEUU) en una fotografía tomada de la página web del Laboratorio Nacional de Brookhaven (<https://www.bnl.gov/newsroom/news.php?a=110847>).

### Aplicaciones de las proteínas fluorescentes en la biología de las plantas

Las proteínas fluorescentes han sido fundamentales para la investigación molecular y celular de las plantas (Hanson y Köhler, 2001). Permiten el estudio en tiempo real de procesos clave como la fotosíntesis, la división celular, el transporte de nutrientes o las interacciones planta-patógeno, entre otros muchos. La capacidad de ver estas actividades dentro del contexto celular ha conllevado importantes descubrimientos sobre la biología de las plantas. Entre sus muchas aplicaciones, los científicos utilizan proteínas

fluorescentes para rastrear la localización y la dinámica de los orgánulos celulares, como los cloroplastos y las mitocondrias (figura 4). Esto ayuda a conocer la respuesta de las plantas a los estímulos ambientales, como la luz, la temperatura y la disponibilidad de agua.



**Figura 4.** Micrografía de fluorescencia de una célula vegetal (protoplastos del mesófilo) en donde las mitocondrias aparecen marcadas con una proteína verde (panel de la izquierda). En el segundo panel se aprecian los cloroplastos en magenta a través de la auto-fluorescencia que emite la clorofila que contienen. En el tercer panel se muestra una imagen de la célula en campo claro y, por último, en el panel de la derecha, se muestra una superposición de las tres imágenes anteriores. Imagen tomada de Oikawa K *et al*, 2021 (CC BY 4.0).

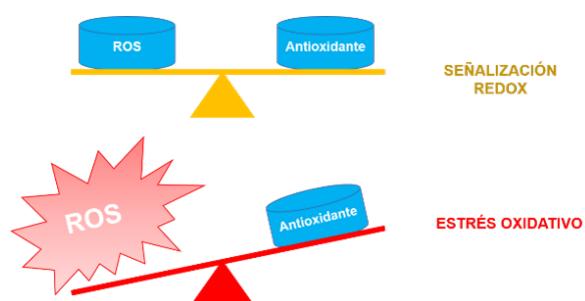
## Aplicaciones en la biología *redox* y estrés en las plantas

Una de las áreas más emocionantes donde las proteínas fluorescentes están siendo utilizadas es en el estudio de los procesos de oxidorreducción biológica (biología *redox*) y las respuestas al estrés, tanto biótico como abiótico, de las plantas. La biología *redox* se refiere al equilibrio dinámico que existe en las células entre las especies reactivas de oxígeno, o *ROS* (por sus siglas en inglés de “*Reactive Oxygen Species*”), inevitablemente producidas por la actividad metabólica celular, y las diferentes moléculas antioxidantes. Este equilibrio, exquisitamente regulado, se mantiene a través de complejas interacciones entre las vías de producción de *ROS* y los mecanismos de eliminación con moléculas antioxidantes (figura 5), y desempeña una función crucial en la regulación de numerosos procesos fisiológicos en los diferentes compartimentos celulares, así como en la respuesta adaptativa de las plantas a su entorno.

## Estudio de las especies reactivas de oxígeno

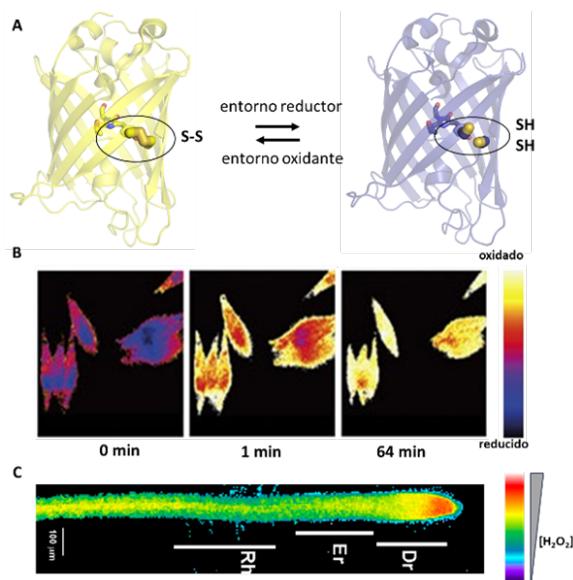
Las *ROS*, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical superóxido ( $O_2^-$ ), son productos derivados del metabolismo que actúan como moléculas mensajeras en diversas vías de señalización celular. Las *ROS* son estrictamente necesarias para la señalización adecuada en respuesta a los estímulos ambientales, pero

un exceso incontrolado de *ROS* puede causar daño oxidativo y estrés celular, que puede llegar a tener consecuencias fatales para la planta. Las proteínas fluorescentes sensibles a las *ROS* han revolucionado nuestra capacidad para monitorizar y visualizar estos eventos en tiempo real dentro de las células vegetales.



**Figura 5.** El equilibrio entre *ROS* y antioxidantes determina si las *ROS* generadas se comportan como reguladores de vías metabólicas y de señalización celular, o como subproductos tóxicos que generan un estrés oxidativo, dañino para la célula.

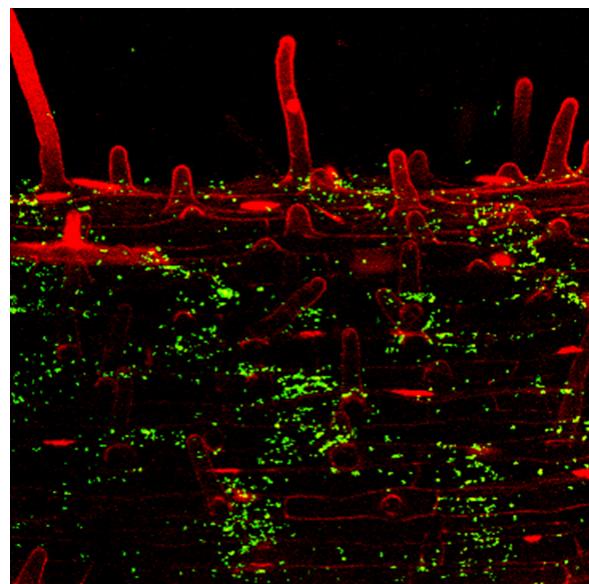
Por ejemplo, se han desarrollado biosensores basados en proteínas que cambian su fluorescencia en respuesta a un aumento de la cantidad de *ROS* en la célula. De esta manera, cuanta más cantidad de *ROS* haya, la célula se encontrará en un ambiente más oxidante que será detectado por el biosensor. Uno de los biosensores más utilizados en plantas es el sensor *redox* de *roGFP* (del inglés, *redox-sensitive GFP*) (figura 6A). Este sensor cambia su fluorescencia en respuesta a los cambios en el estado *redox* dentro de la célula (figura 6B). La utilidad del *roGFP* ha sido demostrada en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, donde se ha utilizado para monitorizar la concentración de  $H_2O_2$  en diferentes compartimentos celulares como el citosol y las mitocondrias. Otro ejemplo de biosensor *redox* ampliamente utilizado es *HyPer* (del inglés, *hydrogen-peroxide sensor*), una proteína fluorescente basada en YFP que detecta específicamente  $H_2O_2$  (Belousov VV *et al*, 2006) (figura 6C). *HyPer* ha sido ampliamente utilizado en estudios de plantas para ver la producción de  $H_2O_2$  durante las diferentes etapas de desarrollo y en respuesta a un estrés ambiental, como la exposición a patógenos o condiciones de sequía (Hernández-Barrera A *et al*, 2013).



**Figura 6.** Biosensores para detectar cambios *redox* en la célula. (A) Las proteínas *roGFP* son variantes de la *GFP* diseñadas para detectar cambios en el estado de oxidorreducción dentro de la célula. En su forma oxidada, estas proteínas forman un puente disulfuro entre dos aminoácidos de cisteína (S-S), mientras que en la forma reducida (B) estas cisteínas se presentan con los residuos sulfhidrilo (SH) libres. Este cambio estructural da lugar a dos formas de la proteína con propiedades fluorescentes diferentes (Hanson *et al.*, 2004); (B) La señal de *roGFP* muestra la respuesta en tiempo real al estrés oxidativo generado tras la exposición de las células a 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Imagen adaptada de van Creveld *et al.*, ISME J, 2015 (CC BY-NC-ND 3.0 DEED); (C) La expresión de *HyPer* muestra la distribución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la raíz de la planta. Imagen tomada de Hernández-Barrera A *et al.*, 2014 (CC BY 4.0 DEED).

## Respuesta al estrés biótico y abiótico

Las plantas están constantemente expuestas a diversos factores estresantes, tanto bióticos (por ejemplo, patógenos microbianos y herbívoros) como abióticos (por ejemplo, altas temperaturas, sequía, salinidad, entre muchos otros). Las proteínas fluorescentes son cruciales para investigar cómo las plantas detectan estos estresantes ambientales y cómo reaccionan ante ellos. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes se utilizan para estudiar la interacción planta-patógeno en tiempo real, con marcadores que iluminan la colonización microbiana en las células vegetales (figura 7) y para estudiar la dinámica de la respuesta inmunitaria de las plantas contra los patógenos.



**Figura 7.** Micrografía en la se observa una cepa bioestimulante de *Rhizobium laguerreae*, que expresa una *GFP* de color verde, mientras coloniza la superficie radicular de lechuga marcada con un colorante rojo. Imagen cedida por el Dr. José David Flores Félix (Dpto. Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca).

## Desafíos y futuro de las aplicaciones en la biología *redox* y el estrés en plantas

Aunque las proteínas fluorescentes han facilitado que se avance significativamente en la comprensión de la biología *redox* y las respuestas al estrés en las plantas, todavía existen desafíos técnicos y biológicos por superar. Por ejemplo, la autofluorescencia natural de las plantas interfiere a menudo con la detección precisa de las señales fluorescentes, sobre todo en las longitudes de onda cercanas al verde. En el futuro, se espera que la combinación de proteínas fluorescentes mejoradas, técnicas avanzadas de imagen y análisis computacional permita abordar nuevos desafíos y profundizar en el conocimiento de cómo las plantas perciben, integran y responden a las señales ambientales en los planos molecular y celular. Esto no solo contribuirá a la ciencia básica, sino que también generará aplicaciones prácticas en la mejora de cultivos para una agricultura más sostenible y resiliente frente al cambio climático.

## Conclusión

Las proteínas fluorescentes han revolucionado nuestra capacidad para estudiar la biología *redox* y las respuestas al estrés en las plantas. Desde la detección de especies reactivas del oxígeno hasta la

visualización de las interacciones entre plantas y patógenos y la monitorización de defensas antioxidantes, estas herramientas han proporcionado mucha información valiosa sobre cómo las plantas se adaptan y sobreviven en los entornos adversos. Gracias a la

investigación innovadora en este campo, las proteínas fluorescentes continúan siendo fundamentales para conocer mejor la biología vegetal y para desarrollar estrategias para mejorar la resistencia de los cultivos y la seguridad alimentaria en un mundo cambiante.

## Referencias

- [1] Belousov V.V., *et al.* Genetically Encoded Fluorescent Indicator for Intracellular Hydrogen Peroxide. *Nat. Methods*, 2006, 281-286. <https://doi.org/10.1038/nmeth866>
- [2] Hanson M.R. and Köhler R.H. GFP imaging: Methodology and Application to Investigate Cellular Compartmentation in Plants. *J. Exp. Bot.*, 2001, 356, 529-539. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.356.529>.
- [3] Hanson M.R., *et al.* Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 13044-13053. <https://doi.org/10.1074/jbc.m312846200>.
- [4] Heim R., *et al.* Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 12501-12504. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12501>.
- [5] Heim R. and Tsien R.Y. Engineering Green Fluorescent Protein for Improved Brightness, Longer Wavelengths and Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Curr. Biol.*, 1996, 178-182. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00450-5).
- [6] Hernández-Barrera A., *et al.* Using Hyper as a Molecular Probe to Visualize Hydrogen Peroxide in Living Plant Cells: A Method with Virtually Unlimited Potential in Plant Biology. *Methods Enzymol.*, 2013, 275-290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405882-8.00015-5>.
- [7] Hernández-Barrera A., *et al.* Hyper, a Hydrogen Peroxide Sensor, Indicates the Sensitivity of the *Arabidopsis* Root Elongation Zone to Aluminum Treatment, *Sensors*, 2015, 855-867. <https://doi.org/10.3390/s150100855>
- [8] Oikawa K., *et al.* Mitochondrial movement during its association with chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Commun. Biol.*, 2021, 292. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01833-8>
- [9] Shimonura O., *et al.* Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59, 223-239. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>.
- [10] Shimonura O. Structure of the Chromophore of *Aequorea* Green Fluorescent Protein. *Febs Lett.*, 1979, 104, 220-222. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80818-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80818-2).
- [11] van Creveld S.G. *et al.* Early Perturbation in Mitochondria Redox Homeostasis in Response to Environmental Stress Predicts Cell Fate in Diatoms. *ISME J.*, 2015, 9, 385-395. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.136>