

Lisandro Otero

Instituto de Biotecnología Ambiental y Salud (INBIAS),
Conicet-UNRC

Jimena Rinaldi y Hernán R Bonomi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires
(IIBBA), Conicet-FIL

Se hizo la luz para las bacterias

La luz solar es una fuente de energía esencial para la vida. Mediante el proceso de la fotosíntesis se produce alimento, del cual dependen directa o indirectamente casi la totalidad de los seres que habitan el planeta. Además de ser fuente de energía, la luz es una señal ambiental que brinda a los seres vivos información espacial y temporal de enorme importancia para su supervivencia.

La variación cíclica de la luz solar con un período de aproximadamente 24 horas informa a los organismos cuándo comienza el día y cuándo la noche y, de acuerdo con la cantidad de horas de luz y oscuridad en el día, permite estimar la estación del año transitada (días largos y noches cortas en verano, lo contrario en invierno). Por otra parte, *la intensidad y calidad de luz* pueden indicar el

momento del día, ya que en la mañana predominan las longitudes de onda azules respecto de las rojas, mientras que al atardecer esa relación se invierte. También, la intensidad y calidad de la luz pueden informar sobre el entorno, como por ejemplo si una semilla está bajo tierra, si una planta tiene vecinos que le hacen sombra, o, en organismos acuáticos, el nivel de profundidad donde se encuentran. Cuanto más profundo, dominan las longitudes de onda menores (próximos al azul) y más en superficie longitudes de ondas mayores (hacia el rojo). La luz es percibida por fotorreceptores que suelen ser proteínas altamente especializadas. Los fotorreceptores fueron descubiertos primero en plantas y animales, pero sabemos actualmente que están presentes en todos los reinos de la vida.

¿DE QUÉ SE TRATA?

De cómo una señal lumínica recibida por una bacteria es transmitida como señal bioquímica y esta genera una respuesta biológica.

La luz y las bacterias

Por mucho tiempo, las bacterias se consideraron insensibles a la luz, a excepción de las bacterias fotótrofas, las cuales utilizan la luz solar como fuente de energía. En estas, los fotorreceptores controlan la producción de moléculas encargadas de la fotosíntesis y de la captación de luz. El descubrimiento de fotorreceptores en bacterias no fotosintéticas (por ejemplo, *Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*), a comienzos de este milenio, desafió la opinión de que solo los organismos fototróficos eran capaces de percibir la luz. Estudios posteriores en bacterias quimiótrofas han identificado una gran variedad de fotorreceptores (por ejemplo, bacteriofitocromos, criptocromos, fotoliasas, rodopsinas, proteínas LOV, PYP, BLUF). Posteriormente se descubrió en diferentes especies de bacterias quimiótrofas que la luz gobierna el modo de vida a través de los fotorreceptores, por ejemplo, favorece la vida unicelular libre versus las comunidades bacterianas adheridas a superficies (estas últimas conocidas como *biopelículas* o *biofilms*) o interactuando con un *hospedador*.

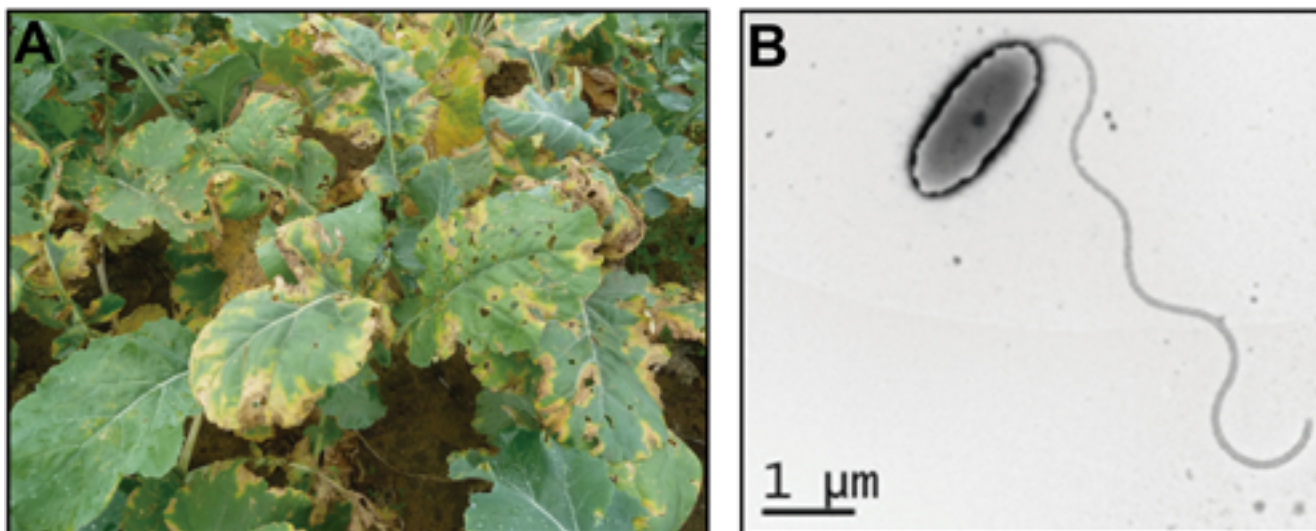
En el Laboratorio de Inmunología y Microbiología Molecular dirigido por Fernando A Goldbaum, de la Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, descubrimos que la luz modula el estilo de vida de bacterias que establecen relaciones mutualistas o parasitarias con distintos hospedadores. En 2007 reportamos que la luz percibida por el fotorreceptor de luz azul tipo LOV en el patógeno *Brucella abortus*, responsable de la brucelosis, incrementa la capacidad de estas bacterias para infectar células del sistema inmune de mamíferos. Luego, en 2012, demostramos que *Rhizobium leguminosarum*, una bacteria simbiote

y beneficiosa del suelo que se asocia con las raíces de la planta leguminosa de la arveja y que forma nódulos en los que fija nitrógeno atmosférico, puede también detectar la luz mediante un fotorreceptor de tipo LOV y estimular su interacción con la planta.

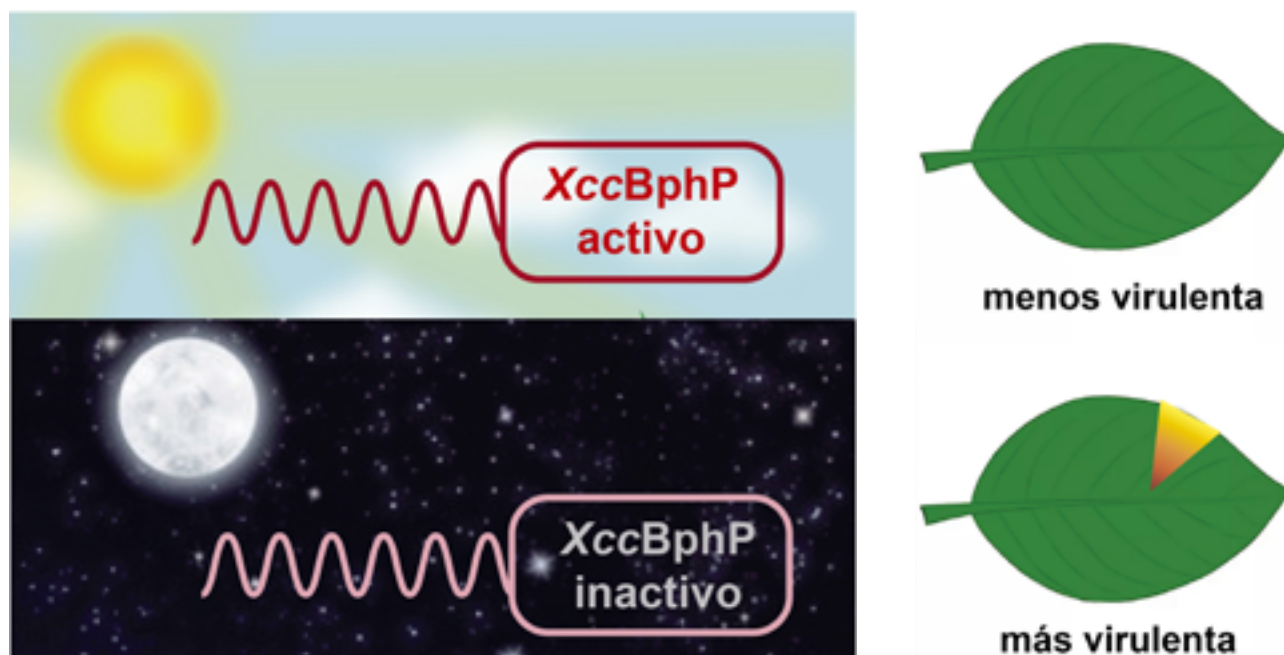
Nuestro enfoque se amplió también hacia proteínas de la familia de los receptores de luz roja llamados *fitocromos*. En 2016 reportamos que la luz afecta la capacidad infectiva de *Xanthomonas campestris*, la principal bacteria fitopatógena responsable de la podredumbre negra en cultivos de plantas crucíferas importantes a nivel mundial, regional y particularmente en la Argentina (por ejemplo, brócoli, repollitos de Bruselas, repollo, coliflor, rábano). Los métodos actuales de control del patógeno siguen siendo esencialmente los mismos que hace décadas, como por ejemplo la utilización de soluciones basadas en cobre sobre los cultivares, eliminando las plantas infectadas y adoptando técnicas preventivas (uso de variedades resistentes, evitar la fertilización en exceso, etcétera). Nuestro laboratorio demostró que *X. campestris* percibe la luz a través de su fitocromo llamado *XccBphP* y que este funciona como regulador de la virulencia. Estos resultados proporcionaron evidencia sobre la participación de un fotorreceptor en un proceso infeccioso.

Los fotorreceptores bacterianos

Los fotorreceptores son proteínas que absorben luz de longitudes de onda dentro del rango UV, visible generalmente a través de la unión de moléculas pequeñas llamadas *cromóforos*. En particular los fotorrecep-



La bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris*. **A.** Lesiones típicas de la infección con *X. campestris* en nabo. Foto de S Scheufele / Universidad de Massachusetts Amherst, Estados Unidos. **B.** Microscopía electrónica de una célula de *X. campestris*, modificada de Vicente y Holub (2013).



Esquema del rol de la luz y del bacteriofitocromo de *X. campestris* en la virulencia de la bacteria. Durante el día, cuando la proporción del bacteriofitocromo XccBphP en estado activo es elevada, la virulencia está inhibida, mientras que durante la noche, cuando la proporción de XccBphP activo disminuye y la del estado inactivo aumenta, la virulencia de la bacteria es más alta.

— VER PARA CREER, TÉCNICAS DE RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE MACROMOLÉCULAS —

La biología estructural es la rama de la biología destinada a describir la estructura y el ensamblaje de las macromoléculas biológicas (principalmente proteínas) para caracterizar a nivel molecular y atómico sus modos de acción. Usando una variedad de técnicas, los científicos logran definir las coordenadas atómicas de las moléculas en tres dimensiones, es decir, la ubicación en el espacio de los átomos que las componen. Con esta información es posible entender cómo se ensamblan y cómo funcionan. Esto ayudó a los investigadores a comprender cómo en los sistemas biológicos los miles de moléculas diferentes de cada célula trabajan coordinadamente. Una analogía sería tomar fotos a los engranajes de una máquina que no sabemos cómo funciona. Integrando toda la información disponible sobre esa máquina, más esas fotos, es posible hacer un modelo detallado de su funcionamiento y mecanismos internos. Esta analogía es válida debido a que las proteínas actúan como 'máquinas moleculares'. Asimismo, los estudios estructurales ayudan a entender cómo las moléculas con formas anómalas dan lugar al mal funcionamiento de procesos biológicos y, como resultado, estos estudios han impulsado nuevos tratamientos para muchas enfermedades.

Existen diferentes técnicas que, a partir de distintos principios físicos, otorgan información estructural con diverso grado de detalle o resolución. Las técnicas más ampliamente utilizadas para obtener información a nivel atómico son la resonancia magnética nuclear (RMN), la cristalografía de rayos x y la microscopía electrónica en condiciones *criogénicas* (cryo-EM, por su sigla en inglés). Todas tienen como resultado final la generación de coordenadas atómicas, es decir, modelos con información acerca de la ubicación espacial de cada átomo que compone la molécula.

En el caso de RMN, la muestra de macromoléculas en solución es sometida a un campo electromagnético generado por un potente imán oscilante. Este campo interactúa con los núcleos atómicos que absorben energía y genera señales características de acuerdo con el entorno en el que se encuentran los núcleos (por ejemplo, la proximidad con otros núcleos o electrones vecinos). Las señales permiten inferir las estructuras o conformaciones más abundantes de la macromolécula.

En cristalografía de rayos X se obtienen *crisales* de proteínas, los cuales son irradiados con rayos X. Este tipo de radiación interactúa con las nubes electrónicas de las moléculas generando *patrones de difracción* en tres dimensiones que son colectados en detectores ultrasensibles. Los patrones de difracción permiten obtener mapas de densidad electrónica de las moléculas cristalizadas y de esa manera resolver sus estructuras tridimensionales.

Más recientemente surgió la técnica de cryo-EM, en la que la muestra es congelada rápidamente en etano líquido a unos -180°C para formar hielo vítreo (no cristalino) pudiendo atrapar proteínas en distintas conformaciones. La muestra es expuesta al microscopio electrónico que utiliza un haz de electrones (en lugar de luz visible, como en los microscopios ópticos), en donde los electrones al atravesar los átomos de la muestra se dispersan ligeramente generando imágenes las cuales se conocen como proyecciones. Debido a que las proteínas quedan ubicadas aleatoriamente en la ultradelgada película de hielo se obtienen numerosas proyecciones 2D desde distintos ángulos, a partir de las cuales mediante cálculos computacionales se genera una reconstrucción 3D precisa de la estructura de la proteína.

tores bacterianos suelen ser proteínas que presentan dos módulos: un módulo fotorreceptor, encargado de la percepción de la luz, y un módulo de salida, es decir con alguna función biológica, por ejemplo con actividad enzimática, unión a ADN, o unión a otras proteínas. Existen en la naturaleza diversos tipos de módulos fotorreceptores que perciben desde la luz ultravioleta hasta el infrarrojo, incluyendo todos los colores intermedios como el azul, verde, amarillo y rojo.

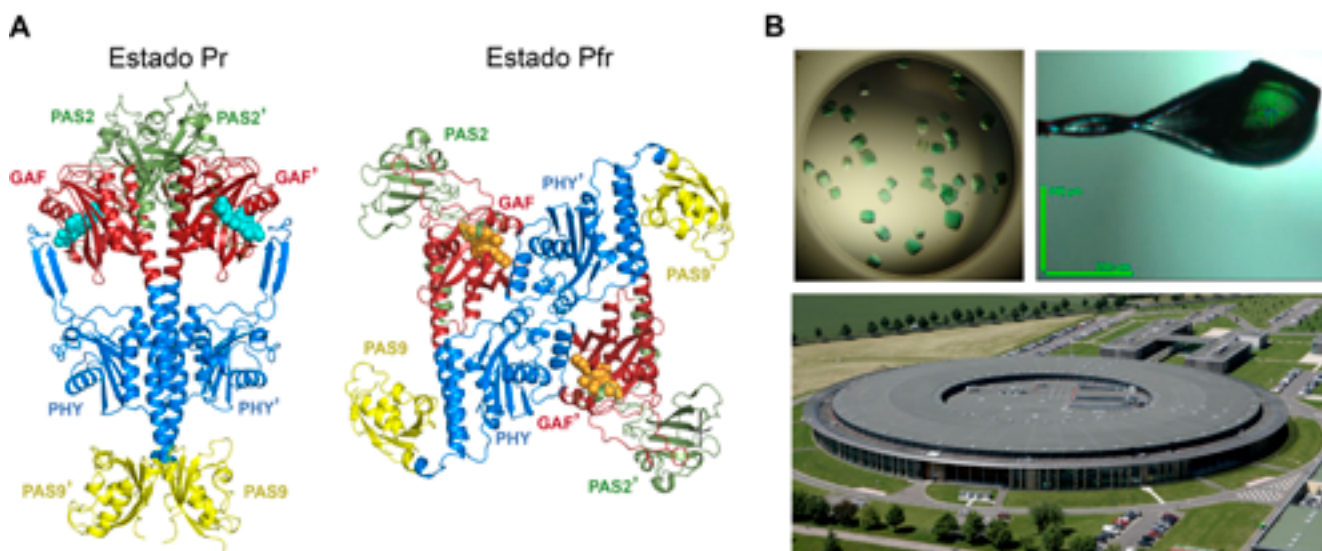


Fotociclo de fitocromos. Los fitocromos alternan entre dos fotoestados principales: el estado Pr que absorbe luz roja y el estado Pfr que absorbe luz del rojo lejano. La luz roja induce la conversión del estado Pr al estado Pfr. La luz del rojo lejano induce la conversión del estado Pfr al estado Pr. En oscuridad, ocurre una conversión lenta hacia el estado Pr o hacia el estado Pfr, dependiendo del tipo de fitocromo que se trate.

Una pregunta central en el campo de los fotorreceptores es cómo una señal física, como la luz, puede ser percibida por una proteína y convertida en una señal bioquímica para posteriormente dar una respuesta biológica. Una característica distintiva de los fotorreceptores es la alternancia entre diferentes estados conformacionales llamados fotoestados. Para poder comprender los mecanismos de percepción de la luz y los cambios funcionales asociados a la fotorrecepción es necesario contar con información estructural del fotorreceptor en los distintos fotoestados. Recientemente, en el laboratorio hemos abordado esta pregunta utilizando a XccBphP como molécula modelo de estudio.


Los bacteriofitocromos

Los bacteriofitocromos son proteínas fotorreceptoras capaces de absorber la luz de color rojo y rojo lejano mediante dos fotoestados principales denominados Pr y Pfr, respectivamente. Para comprender el funcionamiento de esta maquinaria a nivel molecular, nos propusimos describir a XccBphP en sus dos estados fundamentales. Para ello, obtuvimos información estructural a nivel atómico, es decir, desciframos la ubicación tridimensional de los átomos que componen la proteína y cómo ellos cambiaban su posición en la transición entre Pr y Pfr. Esto lo realizamos utilizando la técnica cristalografía de rayos X para



Estructura tridimensional del bacteriofitocromo de *Xanthomonas campestris* en estado Pr y estado Pfr. **A.** Estructuras cristalográficas de XccBphP en ambos estados, tomada de Otero *et al.* (2021). Los diferentes dominios que conforman la proteína están representados en distintos colores: PAS2 en verde, GAF en rojo, PHY en azul y PAS9 en amarillo. El cromóforo biliverdina ubicado dentro del dominio GAF se muestra en esferas cian (Pr) y anaranjadas (Pfr). El módulo fotorreceptor está conformado por la tríada PAS2, GAF, PHY. El módulo de salida, responsable de transmitir los cambios conformacionales impulsados por la luz en una señal fisiológica específica, está constituido por el dominio PAS9. Las estructuras muestran una reorganización del plegado de la proteína entre los dos estados, en donde el Pr tiene una conformación llamada dimérica paralela cabeza-cabeza, mientras que el Pfr una conformación llamada dimérica antiparalela cabeza-cola. **B.** Cristales de XccBphP y su montaje en loops (arriba) para irradiación con rayos X en el sincrotrón SOLEIL de Francia (abajo). Foto Synchrotron SOLEIL/CAVOK Prod.

la que es necesario obtener cristales de la molécula en estudio, exponerlos a rayos X y así obtener patrones de difracción, a partir de los cuales se infiere la estructura de las moléculas que componen cada cristal. Conocer dichas estructuras permitió establecer los cambios conformacionales que ocurren en el fotociclo de XccBpHP cuando alterna entre Pr y Pfr con alta precisión.

Hasta la fecha ningún grupo de investigación en el mundo había sido capaz de caracterizar a nivel atómico los dos fotoestados de un fitocromo en su versión natural y completa, impidiendo generar modelos precisos del funcionamiento de estas proteínas. La descripción estructural y molecular que hemos realizado en XccBpHP descifra uno de los mayores enigmas sobre el mecanismo funcional de fitocromos y abre nuevos horizontes en la caracterización de los procesos que esta familia de fotorreceptores regulan en bacterias, así como también en plantas, hongos y algas. 

LECTURAS SUGERIDAS

BEATTIE GA, HATFIELD BM, DONG H & MCGRANE

RS, 2018, 'Seeing the light: The roles of red- and blue-light sensing in plant microbes', *Annual Review of Phytopathology*, 56: 41-66.

BONOMI HR, TOUM L, SYCZ G, SIEIRA R, TOSCANI AM, GUDESBLAT GE, LESKOW FC, GOLDBAUM FA, VOJNOV AA & MALAMUD F, 2016, '*Xanthomonas campestris* attenuates

virulence by sensing light through a bacteriophytochrome photoreceptor', *EMBO Reports*, 17 (11): 1565-1577.

GOMELSKY M & HOFF WD, 2011, 'Light helps bacteria make important lifestyle decisions', *Trends in Microbiology*, 19 (9): 441-8.

OTERO LH, FOSCALDI S, ANTELO GT, ROSANO GL, SIRIGU S, KLINKE S, DEFELIPE LA, SÁNCHEZ-LAMAS M, BATTOCCHIO G, CONFORTE V, VOJNOV AA, CHAVAS LMG, GOLDBAUM FA, MROGINSKI MA, RINALDI J & BONOMI HR, 2021, 'Structural basis for the Pr-Pfr long-range signaling mechanism of a full-length bacterial phytochrome at the atomic level', *Science Advances*, 7 (48): eabh1097.

VICENTE JG & HOLUB EB, 2013, '*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops', *Molecular Plant Pathology*, 14: 2-18.

OTROS

www.nigms.nih.gov/education/fact-sheets/Pages/structural-biology.aspx

www.nigms.nih.gov/education/Booklets/The-Structures-of-Life/Documents/Booklet-The-Structures-of-Life.pdf

GLOSARIO

Biopelícula o biofilm: película fina y viscosa de bacterias adherida a una superficie.

Calidad de luz: tonalidad o color de la luz. La luz puede describirse desde el punto de vista físico-matemático con una onda periódica. La calidad está relacionada con la longitud de onda o frecuencia.

Condiciones criogénicas: condiciones de temperaturas extremadamente bajas, generalmente aceptadas por debajo de -153°C.

Cristal: forma organizada de la materia en estado sólido en la cual las moléculas se repiten en el espacio de manera regular siguiendo un esquema determinado que se reproduce en forma y orientación.

Fitocromo: proteína pigmentada que se puede encontrar en plantas, bacterias, hongos y algas que actúa como fotorreceptor para la luz roja y roja lejana.

Fotoestado: estado de los fotorreceptores que pueden ser de reposo o excitación y que exhibe propiedades biofísicas y funciones biológicas particulares y definidas.

Fotótrofo: organismo capaz de producir compuestos orgánicos complejos y adquirir energía para alimentar su metabolismo a partir de la luz.

Hospedador: organismo que alberga a otro organismo.

Intensidad de luz: es la cantidad de luz o el flujo luminoso (número de fotones por unidad de área por unidad de tiempo). La luz puede describirse desde el punto de vista físico-matemático con una onda periódica. La intensidad está relacionada con la amplitud de la onda.

Patrón de difracción: patrón característico claro-oscuro en el espacio constituido por puntos, rayas, anillos, etcétera, y creado por la interferencia (constructiva y destructiva) de las ondas lumínicas al propagarse a través de una rendija o una red cristalina.

Proteína: compuesto orgánico complejo constituido por una o más cadenas polipeptídicas, cada una de estas formada por cincuenta o más aminoácidos unidos químicamente.

Quimiótrofo: organismo capaz de utilizar compuestos inorgánicos reducidos como sustrato para obtener energía y utilizarla en el metabolismo respiratorio.

Relación mutualista: relación entre dos especies que resulta beneficiosa para ambas.

Relación parasitaria: relación entre dos especies en la que una de las especies, la parásita, se beneficia del organismo hospedador que resulta perjudicado.

Sincrotrón: Instalación en forma de anillo donde se aceleran electrones a velocidades cercanas a la de la luz para generar un tipo de radiación llamada 'luz de sincrotrón', dentro de la cual se encuentran los rayos X.



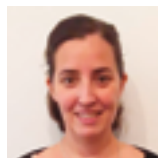
Lisandro Otero

Doctor en ciencias biológicas, Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC).

Investigador adjunto, UNRC-Conicet.

Profesor auxiliar efectivo, UNRC.

lhotero@exa.unrc.edu.ar



Jimena Rinaldi

Doctora en química biológica, UBA.

Investigadora adjunta, FIL-Conicet

jrinaldi@leloir.org.ar



Hernán Bonomi

Doctor en química biológica, UBA.

Investigador adjunto, FIL-Conicet.

hbonomi@leloir.org.ar