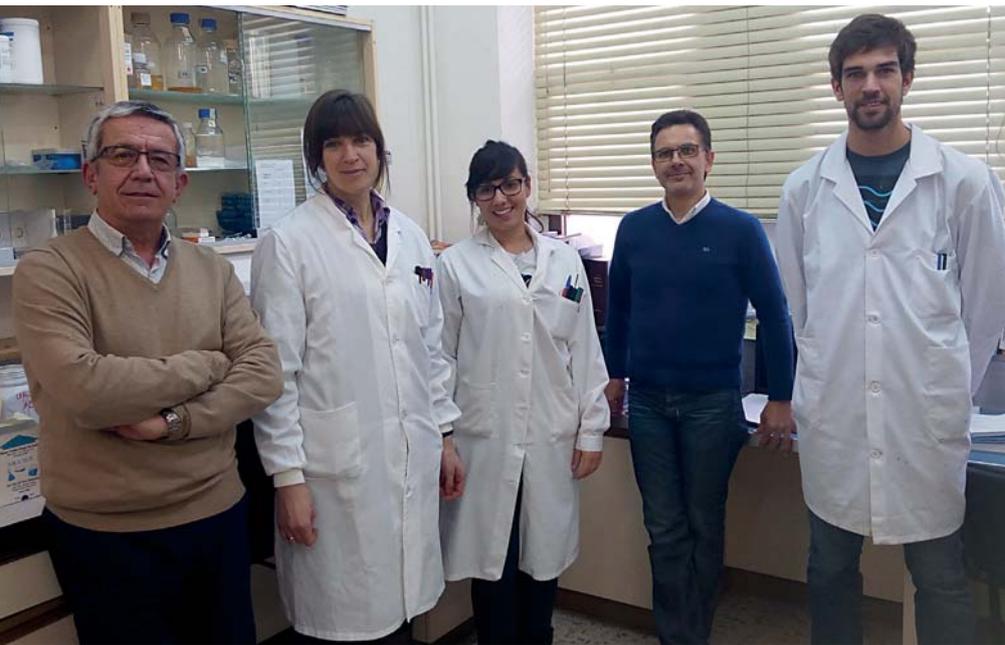


Biología Molecular de Corinebacterias

Luís M. Mateos y José A. Gil



Departamento de Biología Molecular (Área de Microbiología). Universidad de León. Campus de Vegazana s/n. 24071. León.



De izquierda a derecha: José A. Gil, Marta F. Caso, Laura M. Pascual, Luís M. Mateos y Álvaro Mourenza.

Las corinebacterias son microorganismos pertenecientes al grupo de las actinobacterias (bacterias Gram positivas con elevado contenido en G+C). Algunos de sus representantes han sido tradicionalmente bien conocidos por su patogenicidad, como es el caso de *Corynebacterium diphtheriae* agente causante de la difteria; actualmente se están describiendo decenas de especies de corinebacterias como agentes causantes de enfermedades emergentes en individuos inmunosuprimidos. Aparte de este interés médico-sanitario por parte de algunos de sus representantes, ciertas especies de corinebacterias han sido tradicionalmente utilizadas en procesos industriales, como es el caso de *Corynebacterium glutamicum* que recibe el epíteto "glutamicum" por producir de forma natural el aminoácido ácido glutámico; otro aspecto muy relevante de *C. glutamicum* radica en su carencia de patogenicidad, siendo reconocido oficialmente como bacteria GRAS ("Genera-

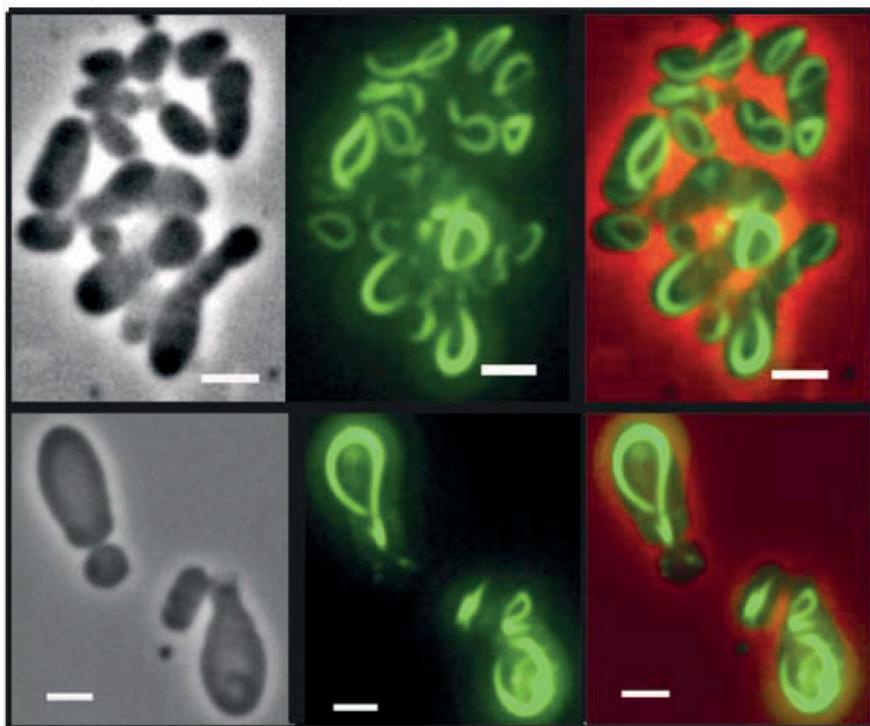
lly Recognized As Safe"). Igualmente, este microorganismo se ha utilizado en procesos de producción de otros metabolitos primarios o en transformaciones metabólicas de interés en el campo de la biología sintética.

Nuestras investigaciones con *Corynebacterium glutamicum* comenzaron en los años 80 en la Universidad de León (Área de Microbiología) dirigido por el Prof. Juan F. Martín. La idea inicial era desarrollar un sistema de manipulación genética en cepas de *C. glutamicum* para incrementar la producción del aminoácido lisina, promovido fundamentalmente por algunas empresas nacionales con interés en producir aminoácidos esenciales para nutrición animal. En esos inicios no había vectores de clonación ni métodos para transformar *Corynebacterium*. No obstante, la experiencia de nuestro laboratorio con otros representantes de actinobacterias (*Streptomyces coelicolor* y

Streptomyces lividans), así como el manejo rutinario de técnicas de biología molecular con la bacteria por excelencia, *Escherichia coli*, nos fueron permitiendo alcanzar los hitos que describimos a continuación; estos hitos van acompañados con referencias de alguna de las publicaciones más representativas de los doctorandos que en su momento las realizaron y que hoy son Profesores en Universidades españolas y extranjeras, investigadores del CSIC, directores de empresas biotecnológicas o Profesores en Institutos de Bachillerato y de Formación Profesional.

1. DESARROLLO DEL SISTEMA DE CLONACIÓN EN *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

El conseguir el desarrollo de un sistema de clonación en una especie bacteriana, necesita vectores de clonación específicos para dicha



Imágenes de contraste de fases, fluorescencia y superposición de ambas en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que sobreexpresa la proteína RsmP (filamento intermedio) fusionada a GFP.

especie y un sistema de introducción de ADN. Esto fue conseguido por Ramón Santamaría (Santamaría *et al.*, 1985) partiendo del plásmido críptico endógeno pBL1 (Santamaría *et al.*, 1984). El plásmido pBL1 (el acrónimo indica la cepa *Brevibacterium lactofermentum*, que luego fue reclasificada dentro de *C. glutamicum*) fue la base para desarrollar una gran cantidad de vectores para la manipulación genética de *C. glutamicum* (Cadenas *et al.*, 1991).

2. CLONACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS

Dado el interés industrial de *C. glutamicum* como productor de aminoácidos, una de las propuestas fue la clonación de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos, labor realizada por un elevado número de estudiantes de doctorado; para ello se trabajó en campos diversos que permitieron la caracterización de los genes implicados en la producción de aminoácidos con interés industrial y esenciales para la dieta animal, tales como triptófano (Guerrero *et al.*, 1994; del Real *et al.*, 1985), treonina (Mateos *et al.*, 1987) y

lisina (Fernández-González *et al.*, 1996), entre otros.

3. LAS CORINEBACTERIAS COMO MODELOS PARA PRODUCIR ENZIMAS EXTRACELULARES

Era conocido el hecho de que *C. glutamicum* no producía enzimas extracelulares y por tanto los medios de cultivo para la producción de aminoácidos deberían contener hidrolizados de proteínas o de azúcares complejos. Los estudios realizados por Sirin Adham mostraron que *C. glutamicum* es capaz de producir de forma heteróloga y secretar al medio de cultivos, grandes cantidades de enzimas xilanasas, amilasas o celulasas de diferentes orígenes (*Streptomyces*, hongos filamentosos), facilitando los procesos de transformación metabólica (Adham *et al.*, 2001).

4. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE DIVISIÓN/ELONGACIÓN CELULAR EN *C. GLUTAMICUM*

El proceso de crecimiento/elongación y división celular de *C. glutamicum* ha sido

un tema científicamente atractivo ya que las corinebacterias en general presentan un modelo de división llamado crepitante (por “chasquido”); igualmente el patrón de elongación celular, con crecimiento apical independiente de MreB (equivalente de actina en muchos procariontes bacilares) y la existencia de una maquinaria de división “minimalista” cuando se compara con la maquinaria de *E. coli*, nos ha permitido realizar propuestas distintas para patrones de crecimiento/división bacteriana. La proteína que organiza el proceso de división celular es FtsZ (equivalente bacteriano de tubulinas) y el gen *ftsZ* fue clonado por Pilar Honrubia (Honrubia *et al.*, 2001). La clonación, caracterización y regulación del resto de los genes del agrupamiento genético implicado en división y síntesis de pared celular (cluster *dcw*) fueron realizados por Angelina Ramos (Ramos *et al.*, 2003), Noelia Valbuena (Valbuena *et al.*, 2007), Michal Letek (Letek *et al.*, 2008) y María Fiuza (Fiuza *et al.*, 2008), con el hecho relevante de describir la presencia de factores proteicos como DivIVA (implicado en crecimiento apical) y proteínas intermedias como RsmP (Fiuza *et al.*, 2010).

5. RESISTENCIA AL METALOIDE ARSÉNICO Y SU BIOCONTENCIÓN

Una de las líneas de trabajo establecida hace una década en nuestro laboratorio fue el estudio de los sistemas de resistencia a metales pesados en corinebacterias. *C. glutamicum* se ha mostrado tradicionalmente como una bacteria “resistente” a factores ambientales, ocupando en ocasiones nichos donde abundan agentes tóxicos/contaminantes. El agente tóxico más relevante desde hace décadas, cuando se analiza su relación abundancia/peligrosidad es el arsénico (<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>). Dado que este tóxico ha estado presente en la Tierra desde su formación, muchos microorganismos han adquirido resistencia a las dos formas frecuentes de arsénico inorgánico (arseniato y arsenito), aspecto ausente en seres vivos más “evolucionados”. *C. glutamicum* es una de las bacterias más resistentes a las formas inorgánicas de arsénico por presencia de varios operones de resistencia que codifican para un regulador/represor (ArsR), una enzima arseniato reductasa (ArsC o Acr2) y la proteína arse-

nito permeasa (ArsB o Acr3). Dichos operones fueron caracterizados por Efrén Ordóñez (Ordóñez *et al.*, 2005) y Almudena F. Villadangos (Villadangos *et al.*, 2011); igualmente se realizaron sistemas de biocontención de arsénico basados en mutantes de *C. glutamicum* carentes de algunas de las actividades enzimáticas anteriormente reseñadas (Feo *et al.*, 2007).

6. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ESTRÉS OXIDATIVO: MICORREDOXINAS

Una de las actividades enzimáticas anteriormente indicadas que estaba implicada en desintoxicar la especie arseniato (As^v) resultó tener un mecanismo de acción Redox diferente a todos los sistemas descritos hasta esos momentos para desintoxicarse de agentes que desencadenen estrés oxidativo; este sistema iba ligado a la molécula micotiol (el equivalente a glutatión en actinobacterias) y a las enzimas micorreductinas, Mrx's (Ordóñez *et al.*, 2009). Fruto de esta descripción, nuestro grupo se propuso la búsqueda de diferentes micorreductinas en *C. glutamicum* y organismos relacionados (*Mycobacterium/Rhodococcus*) con objeto de conocer los procesos metabólicos en los que están implicados estas Mrx's, y principalmente su implicación en recuperar a las células frente a los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno e hipocloritos (Pedre *et al.*, 2015; Mateos *et al.*, 2017).

En los últimos años hemos colaborado con grupos de investigación extranjeros, y a modo de ejemplo, con los Drs. Joris Messens (Bélgica), Virginie Molle (Francia) y Barry P. Rosen (USA).

BIBLIOGRAFÍA

- Adham SA, Campelo AB, Ramos A y Gil JA.** (2001). Construction of a xylanase-producing strain of *Brevibacterium lactofermentum* by stable integration of an engineered *xysA* gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol* 67: 5425-5430.
- Cadenas RF, Martín JF y Gil JA.** (1991). Construction and characterization of promoter-probe vectors for corynebacteria using the kanamycin-resistance reporter gene. *Gene* 98: 117-121.
- Feo JC, Ordóñez E, Letek M, Castro MA, Muñoz MI, Gil JA, Mateos LM y Aller AJ.** (2007). Retention of inorganic arsenic by coryneform mutant strains. *Water Res* 41: 531-542.
- Fernández-González C, Gil JA, Mateos LM, Schwarzer A, Schäfer A, Kalinowski J, Pühler A y Martín JF.** (1996). Construction of L-lysine-overproducing strains of *Brevibacterium lactofermentum* by targeted disruption of the *hom* and *thrB* genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 554-558.
- Fiuzo M, Canova MJ, Patin D et al.** (2008). The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* 283: 36553-36563.
- Fiuzo M, Letek M, Leiba J, Villadangos AF, Vaquera J, Zanella-Cleón I, Mateos LM, Molle V y Gil JA.** (2010). Phosphorylation of a novel cytoskeletal protein (RsmP) regulates rod-shaped morphology in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* 285: 29387-29397.
- Guerrero C, Mateos LM, Malumbres M y Martín JF.** (1994). Directed mutagenesis of a regulatory palindromic sequence upstream from the *Brevibacterium lactofermentum* tryptophan operon. *Gene* 138: 35-41.
- Honrubia MP, Ramos A y Gil JA.** (2001). The cell division genes *ftsQ* and *ftsZ*, but not the three downstream open reading frames YFIH, ORF5 and ORF6, are essential for growth and viability in *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. *Mol Genet Genomics* 265: 1022-1030.
- Letek M, Ordóñez E, Vaquera J, Margolin W, Flärdh K, Mateos LM y Gil JA.** (2008). DivIVA is required for polar growth in the mreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 190: 3283-92.
- Mateos LM, del Real G, Aguilar A y Martín JF.** (1987). Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase (*thrA*) gene of *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucleic Acids Res* 15: 10598.
- Mateos LM, Villadangos AF, de la Rubia AG, Mourrenza A, Pascual L, Letek M, Pedre B, Messens J y Gil JA.** (2017). The arsenic detoxification system in corynebacteria: basis and applications for bioremediation and redox control. *Adv Appl Microbiol* 99: 103-137.
- Ordóñez E, Van Belle K, Roos G, de Galan S, Letek M, Gil JA, Wyns L, Mateos LM y Messens J.** (2009). Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. *J Biol Chem* 284: 15107-15116.
- Ordóñez E, Letek M, Valbuena N, Gil JA y Mateos LM.** (2005). Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl Environ Microbiol* 71: 6206-6215.
- Pedre B, Van Molle I, Villadangos AF, Wahni K, Vertommen D, Turell L, Erdogan H, Mateos LM y Messens J.** (2015). The *Corynebacterium glutamicum* mycothiol peroxidase is a reactive oxygen species-scavenging enzyme that shows promiscuity in thiol redox control. *Mol Microbiol* 96: 1176-1191.
- Ramos A, Honrubia MP, Valbuena N, Vaquera J, Mateos LM y Gil JA.** (2003). Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiology* 149: 3531-3542.
- Real G del, Aguilar A y Martín JF.** (1985). Cloning and expression of tryptophan genes from *Brevibacterium lactofermentum* in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 133: 1013-1019.
- Santamaria R, Gil JA, Mesas JM y Martín JF.** (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J Gen Microbiol* 130.
- Santamaria RI, Gil JA y Martín JF.** (1985). High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J Bacteriol* 162: 463-467.
- Valbuena N, Letek M, Ordóñez E, Ayala J, Daniel RA, Gil JA y Mateos LM.** (2007). Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. *Mol Microbiol* 66: 643-657.
- Villadangos AF, Van Belle K, Wahni K et al.** (2011). *Corynebacterium glutamicum* survives arsenic stress with arsenate reductases coupled to two distinct redox mechanisms. *Mol Microbiol* 82: 998-1014.