

Biología Molecular de corinebacterias: *Corynebacterium glutamicum* como modelo

Almudena F. Villadangos, Luis M. Mateos, José A. Gil

Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León

jagils@unileon.es

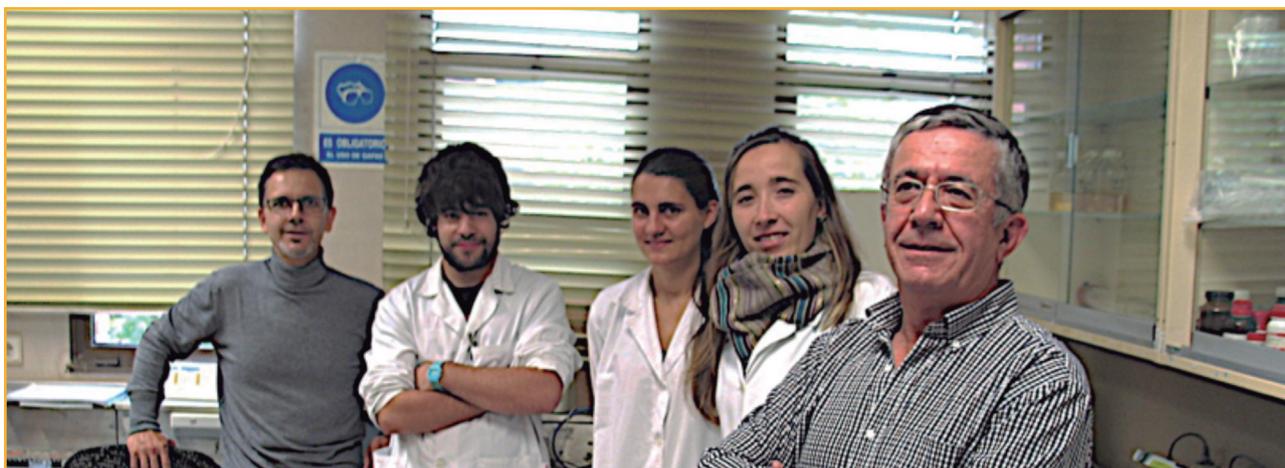


Foto de grupo. De izquierda a derecha. Luis M. Mateos, Alfonso Gonzalo, Miriam Arienza, Almudena F. Villadangos, José A. Gil.

Las corinebacterias son microorganismos Gram positivos del grupo de las actinobacterias que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se localizan en aguas, suelos e incluso en piel y mucosas del hombre y animales. El grupo contiene tanto representantes no patógenos con interés industrial como patógenos, estando filogenéticamente relacionado con representantes de los géneros *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Nocardia*, entre otros, por presentar ácidos micólicos en su pared celular. La tuberculosis y la difteria son las principales enfermedades humanas causadas por actinobacterias (*Mycobacterium tuberculosis* y *Corynebacterium diphtheriae*, respectivamente), aunque en las últimas décadas algunos representantes del género *Corynebacterium* han sido descritos como patógenos emergentes de enfermos intrahospitalarios que presentan cierto grado de inmunosupresión y/o sometidos a tratamientos crónicos. De esta forma se han identificado y descrito decenas de representantes como *C. aurimucosum*, *C. urealyticum*, *C. atypicum*, etc., causantes, en todos los casos, de

patologías en humanos (Mateos *et al*, 2011). Sin embargo, las especies de corinebacterias no patógenas también han sido ampliamente analizadas y estudiadas debido a su gran importancia biotecnológica por la producción de metabolitos primarios (aminoácidos o nucleótidos), secundarios (antibióticos y compuestos antitumorales) o su implicación en la maduración de quesos, o en bioconversión de precursores metabólicos.

El grupo de investigación dirigido por los doctores José A. Gil y Luis M. Mateos, denominado «Biología Molecular de Corinebacterias» (<http://microbio.unileon.es/wordpress>), estudia diversos aspectos de la Biología Molecular de la corinebacteria *Corynebacterium glutamicum*, una actinobacteria que debe el epíteto de especie «*glutamicum*» a su capacidad para producir ácido glutámico. Durante los últimos quince años, el grupo ha centrado su investigación en: a) el estudio de los procesos de división celular en *C. glutamicum*, con objeto de usar esos conocimientos para el diseño de agentes antimicrobianos que controlen enfer-

medades producidas por corinebacterias y micobacterias patógenas; b) el análisis de la resistencia a arsénico en *C. glutamicum* con el objetivo de conocer los sistemas desintoxicantes de metales y su efecto en el estrés celular, y la consecución de microorganismos capaces de ser utilizados como biocontenedores de metales pesados y aplicados en biorremediación.

DIVISIÓN CELULAR

Hemos estudiado el proceso de división/elongación celular de *C. glutamicum* ya que posee una maquinaria de división «minimalista» cuando se compara con la maquinaria de *Escherichia coli* (Figura 1A), es decir, carece de muchas de las proteínas (FtsA, FtsL, FtsN, AmiC, MinCDE, ZipA, MreB...) que se consideran esenciales en la maquinaria de división celular de *E. coli*. Durante estos últimos años hemos estudiado el papel de la proteína DivIVA en el proceso de elongación celular (Letek *et al.*, 2008; Valbuena *et al.*, 2007), así como el papel de las serín-treonin-proteín quinazas en dicho proceso (Fiuza *et al.*, 2008a y 2008b). Asimismo describimos la presencia de un filamento intermedio (RsmP) en *C. glutamicum* regulado por fosforilación e implicado en el mantenimiento de la morfología bacilar (Fiuza *et al.*, 2010).

C. glutamicum muestra un modelo de crecimiento «raro» que le diferencia de los modelos clásicos de *E. coli*, *Bacillus subtilis* o *Streptococcus pneumoniae* (Figura 1B). Los resultados obtenidos con *C. glutamicum* nos permitirán diseñar compuestos que inhiban la división celular en organismos patógenos relacionados como *C. diphtheriae* o *M. tuberculosis*.

RESISTENCIA BACTERIANA A ARSÉNICO

La otra línea de investigación se ha basado en la interacción arsénico-bacterias; el arsénico ha estado presente en la atmósfera desde la formación de la Tierra y los seres vivos han estado sometidos de forma continua a dicho agente, por lo que es bastante frecuente la presencia de sistemas de desintoxicación o resistencia a arsénico (Mateos *et al.*, 2006). *C. glutamicum* no es una excepción y presenta genes de resistencia a arsénico que se agrupan en dos operones *ars*, codificando cada uno de ellos para un regulador/represor (ArsR), una proteína arseniato reductasa (ArsC) y una arsenito permeasa (Acr3). En ausencia de arsenito (la forma reducida del arsénico inorgánico), el regulador ArsR está reprimiendo la expresión del resto de los genes; en su presencia, ArsR tiene mucha afinidad por arsenito y se libera del operador, permitiendo de esta forma la transcripción de los dos genes restantes (Villadangos *et al.*, 2011). Las enzimas arseniato reductasas intracelulares reducen el arseniato a arsenito (este último es muy tóxico), el cual es rápidamente liberado al exterior de la célula por las arsenito permeasas transmembranales (Fu *et al.*, 2009; Villadangos *et al.*, 2012) (Figura 2). A partir de los análisis de los genes y las correspondientes proteínas desintoxicantes, se obtuvieron clones mutantes y recombinantes de *C. glutamicum* capaces de acu-

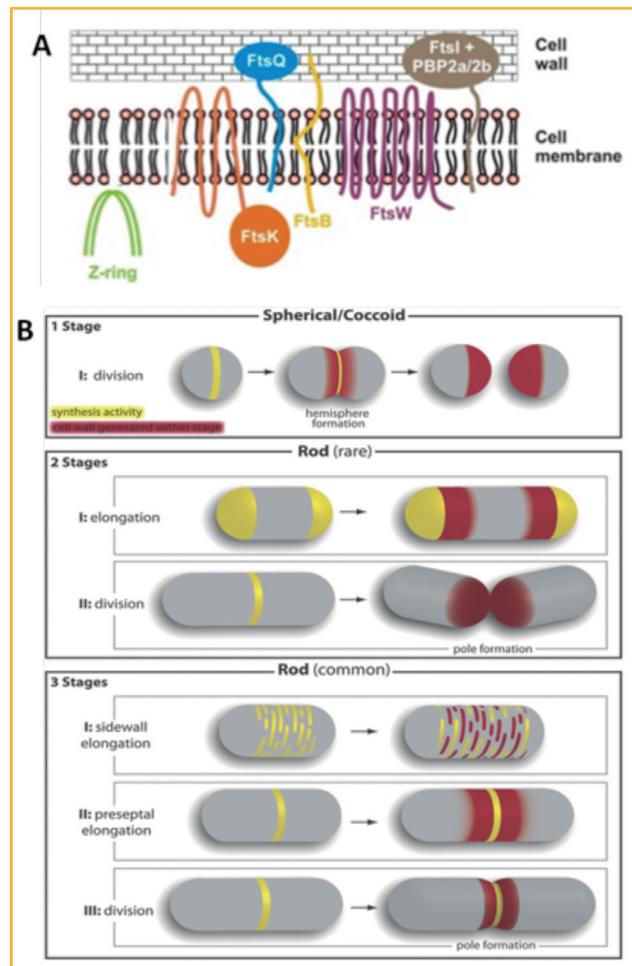


Figura 1. A) Maquinaria de división minimalista de *Corynebacterium glutamicum*. B) Modelos de elongación/división en diferentes bacterias. (1 stage) Crecimiento a nivel del septo de división en bacterias cocoides que carecen de MreB como *Streptococcus pneumoniae* (2 stages). Crecimiento polar en bacterias bacilares que carecen de MreB como *C. glutamicum* o *Mycobacterium tuberculosis*. (3 stages) Crecimiento dirigido por MreB a lo largo de la pared lateral de *B. subtilis* o *E. coli*. El color amarillo muestra los sitios de síntesis de nuevo peptidoglucano y el color rojo muestra el sitio donde se inserta el nuevo peptidoglucano. (<http://jcb.rupress.org/content/179/3/381.full>)

mular hasta 30 veces más arsénico que la cepa silvestre y que podrían ser utilizados en procesos de biorremediación (Ordóñez *et al.*, 2012; Villadangos *et al.*, 2010). Igualmente se han utilizado algunas cepas mutantes de *C. glutamicum* para conseguir bioacumuladores específicos de alguna de las formas inorgánicas de arsénico, bien arsenito o arseniato (Villadangos *et al.*, 2014).

Actualmente, el objetivo principal de la investigación está centrado en el estudio de los mecanismos diferenciales de defensa antioxidante que presentan las actinobacterias, utilizando como modelos *C. glutamicum* y *Rhodococcus equi* (modelo intermedio entre *C. glutamicum* y *M. tuberculosis*). El sistema redox más ubicuo en las células es el

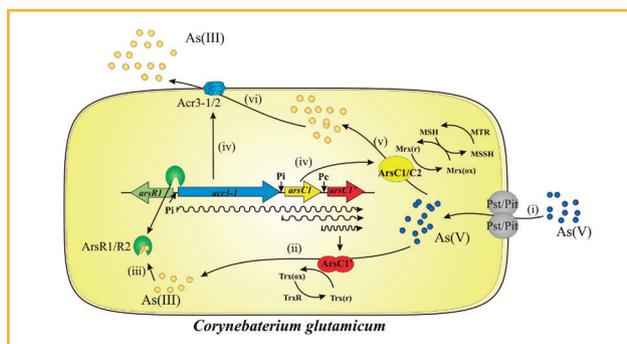


Figura 2. Modelo de resistencia a arsénico en *C. glutamicum*. (i) Entrada de arseniato [As(V)]; (ii) expresión constitutiva de la proteína ArsC1 y reducción de As(V) a arsenito [As(III)]; (iii) unión de As(III) a los reguladores (ArsR1/R2) y desrepresión del operón *ars*; (iv) transcripción de los genes que codifican para las arseniato reductasas (ArsC1/C2/C1'); (v) reducción de As(V) por reductasas ArsC1 y ArsC2 usando el sistema MSH/Mrx1 y (vi) liberación de As(III) formado en la célula a través de las arsenito permeasas Acr3-1/2. (Villadangos *et al*, 2011).

constituido por el sistema tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TrxR), presente en procariontes y eucariontes y constituyendo una primera línea de defensa frente a la oxidación. Sin embargo, los procesos evolutivos han permitido la aparición de otros sistemas redox alternativos que son de diferente naturaleza dependiendo del organismo de que se trate. Estos sistemas alternativos dependen de redoxinas específicas y de compuestos de bajo peso molecular. Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en la descripción de un nuevo sistema redox celular exclusivo de actinobacterias que incluye el pseudoazúcar de bajo peso molecular micotiol (MSH) y la redoxina correspondiente capaz de reconocer de forma específica MSH; esta redoxina se denominó micorredoxina (Mrx) (Ordóñez *et al*, 2009). La «aparición» de este buffer redox diferencial hace que el par MSH/Mrx y/o cualquiera de las proteínas que interactúan con MSH/Mrx (micotiolación) puedan constituir nuevas dianas antimicrobianas susceptibles de ser utilizadas de manera específica para este grupo de microorganismos (Van Laer *et al*, 2012; Van Laer *et al*, 2013). Los estudios basados en el grado de importancia y/o esencialidad de cada una de estas dianas constituyen en estos momentos el grueso de nuestra línea de investigación.

Durante los últimos años nuestro grupo está colaborando con otros grupos de investigación que tienen intereses científicos comunes, y liderados por los investigadores: William Margolin (USA), Klas Flårdh (Suecia), Virginie Molle (Francia), Richard Daniel (UK), Joris Messens (Bélgica), Joern Kalinowsky (Alemania), Barry P. Rosen (USA), Juan Ayala (Madrid) y Jose A. Ainsa (España).

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Fiuza M, Canova MJ, Patin D, Letek M, Zanella-Cleon I, Becchi M, Mateos LM, Mengin-Lecreux D, Molle V, Gil JA. (2008a). 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.

Fiuza M, Canova MJ, Zanella-Cleon I, Becchi M, Cozzone AJ, Mateos LM, Kremer L, Gil JA, Molle V. (2008b). From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J Biol Chem*. 283:18099-18112.

Fiuza M, Letek M, Leiba J, Villadangos AF, Vaquera J, Zanella-Cleón I, Mateos LM, Molle V, Gil JA. (2010). Phosphorylation of a novel cytoskeletal protein (RsmP) regulates rod-shape morphology in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem*. 285:24387-24397.

Fu HL, Meng Y, Ordóñez E, Villadangos AF, Bhattacharjee H, Gil JA, Mateos LM, Rosen BP. (2009). Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem*. 284:19887-19895.

Letek M, Ordóñez E, Vaquera J, Margolin W, Flårdh K, Mateos LM, Gil JA. (2008). DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*. 190:3283-3292.

Letek M, Fiuza M, Villadangos AF, Mateos LM, Gil JA. (2012). Cytoskeletal proteins of actinobacteria. *International J Cell Biol*. doi:10.1155/2012/905832.

Mateos LM, Ordóñez E, Letek M, Gil JA. (2006). *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int Microbiol*. 9:207-215.

Mateos LM, Letek M, Villadangos AF, Fiuza M, Ordóñez E, Gil JA. (2011). Chapter 6: *Corynebacterium*. In: Molecular detection of human bacterial pathogens. Edited by: Dongyou Liu. Taylor y Francis CRC Press. USA. ISBN: 978-1439812389.

Ordóñez E, Van Belle K, Roos G, De Galan S, Letek M, Gil JA, Wyns L, Mateos LM, Messens J. (2009). Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. *J Biol Chem*. 284:15107-15116.

Ordóñez E, Villadangos AF, Fiuza M, Pereira FJ, Gil JA, Mateos LM, Aller AJ. (2012). Modelling of arsenate retention from aqueous solutions by living coryneform double-mutant bacteria. *Environm Chem*. 9:121-129.

Valbuena N, Letek M, Ordóñez E, Ayala J, Daniel RA, Gil JA, 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

Van Laer K, Buts L, Follpe N, Vertommen D, Van Belle K, Wahni K, Roos G, Nilsson L, Mateos LM, Rawat M, van Nuland NA, Messens J. (2012). Mycoredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defence mechanism of Mycobacteria. *Mol Microbiol*. 86:787-804.

Van Laer K, Dziejewska AM, Fislage M, Wahni K, Hbeddou A, Collet JF, Versées W, Mateos LM, Tamu Dufe V, Messens J. (2013). NrdH-redoxin of *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium glutamicum* dimerizes at high protein concentration and exclusively receives electrons from thioredoxin reductase. *J Biol Chem*. 15:7942-7955.

Villadangos AF, Ordóñez E, Muñoz MI, Pastrana IM, Fiuza M, Gil JA, Mateos LM, Aller AJ. (2010). Retention of arsenate using genetically modified coryneform bacteria and determination of arsenic in solid samples by ICP-MS. *Talanta*. 80:1421-1427.

Villadangos AF, Van Belle K, Wahni K, Dufe VT, Freitas S, Nur H, De Galan S, Gil JA, Collet JF, Mateos LM, Messens J. (2011). *Corynebacterium glutamicum* survives arsenic stress with arsenate reductases coupled to two distinct redox mechanisms. *Mol Microbiol*. 82:998-1014.

Villadangos AF, Fu HL, Gil JA, Messens J, Rosen BP, Mateos LM. (2012). Efflux permease CgAcr3-1 of *Corynebacterium glutamicum* is an arsenite-specific antiporter. *J Biol Chem*. 287:723-735.

Villadangos AF, Ordóñez E, Pedre B, Messens J, Gil JA, Mateos LM. (2014). Engineered coryneform bacteria as a bio-tool for arsenic remediation. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-014-6055-2.