

MI PROYECTO DE TESIS

Mecanismos de resistencia a arsénico por la corinebacteria *Corynebacterium glutamicum*

Efrén Ordóñez del Amo

Área de Microbiología. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León.

eorda@unileon.es.

A pesar de su reconocida fama como potente agente tóxico, el arsénico (As), presente en la Tierra desde su génesis, es utilizado por algunos microorganismos en sus versátiles redes metabólicas: en su forma oxidada en procesos de respiración anaeróbica (arseniato-AsV) o como fuente de energía en estado reducido (arsenito –AsIII-); estos procesos constituirían excepciones en relación con la toxicidad que provoca el arsénico en las seres vivos, por lo que muchos microorganismos desarrollan mecanismos de defensa al arsénico en lo que se conoce como procesos de desintoxicación. Esta capacidad está conferida por genes asociados al cromosoma o a elementos extracromosómicos (plásmidos) de la bacteria. Los genes de resistencia a arsénico están generalmente organizados en operones, siendo los más representativos los formados por unidades transcripcionales de tres (*arsRBC*) o cinco genes (*arsRDABC*). El sistema de tres genes está compuesto por un represor transcripcional de arsénico (ArsR) capaz de actuar en “trans” y que responde a variaciones medioambientales de arsenito. El represor controla la expresión de los genes *arsB* y *arsC*, que codifican respectivamente para una arsenito permeasa (expulsa arsenito de las células; Meng et al., 2004), y una arseniato reductasa (reduce arseniato a arsenito; Mukhopadhyay y Rosen 2002). El sistema de 5 genes, presente en los plásmidos de *E. coli* R773 y R46 (entre otros), presenta el gen *arsA* que codifica para una ATPasa intracelular (forma complejos proteicos con ArsB) y *arsD* que codifica para una chaperona de arsénico (facilita la salida de arsenito por la bomba ArsAB), además de los genes ya indicados anteriormente.

Las corinebacterias han sido objeto de especial análisis en el Área de Microbiología durante más de dos décadas por su interés en procesos biotecnológicos.

Uno de sus representantes, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 el cual está siendo objeto de estudio en la presente Tesis, presenta una inusitada resistencia a formas inorgánicas de arsénico (Mateos et al. 2006; **Figura 1**).

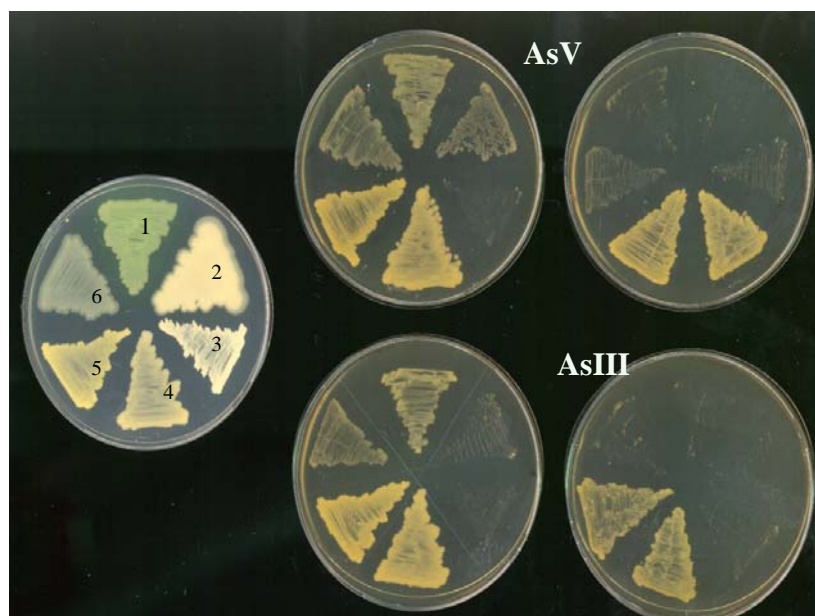


Figura 1. Microorganismos y resistencia a arseniato (*AsV*) y arsenito (*AsIII*). (1) *Pseudomonas*; (2) *Bacillus*; (3) *Staphylococcus*; (4) *Rhodococcus*; (5) *Corynebacterium*; (6) *Escherichia*

En esta bacteria se han localizado dos operones cromosomales implicados en resistencia a arsénico, y cada uno de los operones responde al sistema de operones de tres componentes (*arsRBC*). Sin embargo el aspecto más novedoso ha sido el descubrir que los productos de expresión génica (proteínas) presentan mecanismos de acción distintos a los descritos previamente para otras bacterias. El núcleo central del presente trabajo de investigación lo constituye la caracterización del regulador *ArsR* de *C. glutamicum*; éste controla la expresión global de los operones (*arsI* y *ars2*) en base a la presencia o no de arsenito en la célula (Ordóñez et al; 2005; Ordóñez et al., 2008). Además se ha abordado la caracterización de una nueva clase de arseniato reductasas (*ArsCs*), que depende en su mecanismo de acción del pseudoazúcar mycothiol; esta molécula es exclusiva del grupo de los actinomicetos (microorganismos Gram-positivos) y está implicada en mantener el equilibrio redox en la célula y servir de cofactor en procesos celulares (equivalente al glutatión en otros organismos). Este descubrimiento nos permitirá establecer una nueva subfamilia de arseniato reductasas que utilizan mycothiol y mycorredoxinas en su mecanismo de acción (Ordóñez et al.,

2008). Desde un punto de vista más general se ha caracterizado también el fenotipo proporcionado por los genes para las permeasas de arsenito (*arsB*/ACR3), aunque estos análisis están siendo objeto de otra Tesis Doctoral.

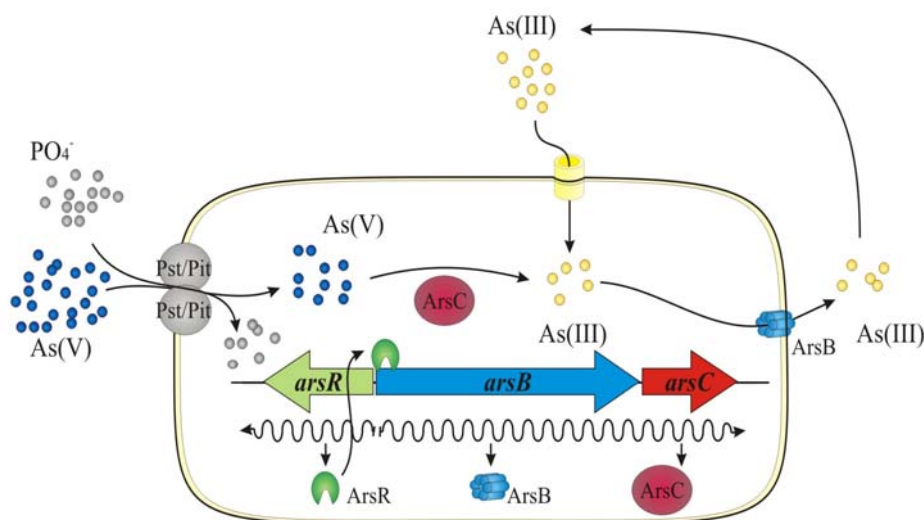


Figura 2. Vías de entrada de AsV, de AsIII y mecanismo molecular de desintoxicación de As en corinebacterias (operón *ars*: *arsRBC*).

En base a todos estos datos se ha establecido la ruta completa de desintoxicación de arsénico en *C. glutamicum* (**Figura 2**), ruta que ha permitido el desarrollo y diseño de microorganismos con elevado potencial para su uso en biorremediación; este segundo objetivo es consecuencia de los análisis básicos efectuados para cada uno de los genes de los operones *ars1* y *ars2* en *C. glutamicum*. Se han obtenido mutantes de *C. glutamicum* capaces de especiar arsénico (formas de arsenito o de arseniato) y mutantes capaces de contener desde 50 a 100 veces más arsénico que la bacteria silvestre original (Feo et al., 2007).

Bibliografía (incluye las publicaciones surgidas del proyecto de tesis).

- Feo JC, Ordóñez E, Letek M, Castro MA, Muñoz MI, Gil JA, Mateos LM, Aller AJ. (2007) Retention of inorganic arsenic by coryneform mutant strains. *Wat. Res.* 41:531-542.
- Meng YL, Liu Z, Rosen BP. (2004) As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279:18334-41.
- Mukhopadhyay R, Rosen BP. (2002) Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ. Health. Perspect.* 5:745-8.

- Mateos LM, Ordóñez E, Letek M, Gil JA. (2006) *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int. Microbiol.* 9:207-15.
- Ordóñez E, Letek M, Valbuena N, Gil JA, Mateos LM. (2005) Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6206-15.
- Ordóñez E, Thiyagarajan S, Cook JD, Stemmler TL, Gil JA, Mateos LM, Rosen BP. (2008) Evolution of metal(loid) binding sites in transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* 283:25706-14.
- Ordóñez E, Van Belle K, De Galan S, Letek M, Gil JA, Wyns L, Mateos LM, Messens J. Arsenate reductase from *Corynebacterium glutamicum* imposes a mycothiol-dependent mechanism. (En preparación.)

Dirigida por:

Dr. Luis Mariano Mateos Delgado (Departamento de Biología Molecular)

Dr. José Antonio Gil Santos (Departamento de Biología Molecular)

Otros miembros del equipo de investigación:

Michal Letek Polberg; María Fiuza y Almudena F. Villadangos

Galería de fotos



El autor de la tesis doctoral Efrén Ordóñez del Amo