



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

PRODUCCIÓN DE PRECURSORES ESTEROIDEOS

POR MUTANTES DE LA CEPA

***MYCOLICIBACTERIUM NEOAURUM* B-3805**

ALTERADOS EN EL OPERÓN *IGR*.

PRODUCTION OF STEROID PRECURSORS BY

MUTANTS DERIVED FROM

***MYCOLICIBACTERIUM NEOAURUM* B-3805**

STRAIN ALTERED IN THE *IGR* OPERON.

Patricia Fernández de la Puente

GRADO EN BIOLOGÍA

Julio, 2020

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Esteroides.....	1
1.2.	<i>Mycolicibacterium neoaurum</i>	2
1.3.	Catabolismo de esteroides.....	4
1.4.	Operón <i>igr</i>	5
1.5.	Objetivos	7
2.	MATERIAL Y MÉTODOS	8
2.1.	Microorganismos empleados	8
2.2.	Medios de cultivo.....	8
2.3.	Plásmidos	9
2.4.	Plásmido empleado para la delección de genes	10
2.5.	Transformación de <i>E. coli</i>	12
2.6.	Extracción de plásmidos mediante lisis alcalina	12
2.7.	Electroporación	13
2.8.	Amplificación de DNA mediante PCR	14
2.9.	Electroforesis en geles de agarosa 0,8%	15
2.10.	Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	16
2.11.	HPLC	16
3.	RESULTADOS	17
3.1.	Sustitución del gen de resistencia a la ampicilina por el de la apramicina.....	18
3.2.	Puesta a punto de la PCR	20
3.3.	Comprobación de los mutantes mediante PCR.....	21
3.4.	Análisis por HPLC	23
4.	DISCUSIÓN.....	26
5.	CONCLUSIONES.....	28
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMEN

Mycolicibacterium neoaurum NRRL B-3805 es una bacteria saprófita presente en el suelo, capaz de convertir los fitoesteroides en androsta-4-ene-3,17-diona (AD) y otros productos esteroideos como androsta-1,4-dien-3,17-diona (ADD). Por este motivo, es considerada una cepa de referencia en la biotransformación de fitoesteroides, con el consiguiente interés para la industria farmacéutica. El principal objetivo de este trabajo fue la delección de forma conjunta de los genes *chsE1-chsE2* y *chsH1-chsH2* presentes en el operón *igr*, el cual está involucrado en la degradación de la cadena lateral de los fitoesteroides por parte de la cepa *M. neoaurum* NRRL B-3805. Aunque se intentó la delección de los genes mediante recombinación homóloga empleando diferentes plásmidos, no fue posible la obtención de mutantes. Como segundo objetivo, se puso a punto el método de la purificación de un compuesto con posible interés farmacológico producido por el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*. La purificación se llevó a cabo a partir del sobrenadante del medio de cultivo mediante extracción con diclorometano y evaporación del mismo.

ABSTRACT

Mycolicibacterium neoaurum NRRL B-3805 is a saprophytic bacterium present in soil, capable of converting phytosterols into androst-4-ene-3-17-dione (AD) and other steroid products such as androst-1,4-diene-3,17-dione (ADD). For this reason, it is considered a reference strain in phytosterols bioconversion, with the consequent interest for the pharmaceutical industry. The main objective of this work was the joint deletion of *chsE1-chsE2* and *chsH1-chsH2* genes present in *igr* operon, which is involved in phytosterol side-chain degradation by *M. neoaurum* NRRL B-3805 strain. Gene deletion was tried by homologous recombination using different plasmids, however it was not possible to obtain any mutant. As a second objective, the methodology for the purification of a compound produced by *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2* mutant strain with a possible pharmacological interest was established. The purification was carried out from the culture supernatant by dichloromethane extraction and its subsequent evaporation.

PALABRAS CLAVE

Androsta-4-ene-3,17-diona (AD), bioconversión, esteroides, fitoesterol, *Mycolicibacterium neoaurum*, operón *igr*.

KEYWORDS

Androst-4-ene-3-17-dione (AD), bioconversion, *igr* operon, *Mycolicibacterium neoaurum*, phytosterol, steroids.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Esteroides

Los esteroides son moléculas hidrofóbicas que aparecen de forma natural y presentan un sistema común de anillos de perhidro-1,2-ciclopentanofenantreno. Dicha estructura química puede presentar varias modificaciones, siendo, en el caso de los esteroides, la estructura esteroidea ya mencionada con un grupo β -hidroxilo en el carbono 3 (Galán *et al.*, 2017).

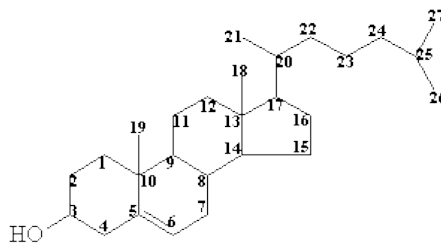


Figura 1. Estructura básica de una molécula de esteroide de 27 carbonos.

Los esteroides se encuentran frecuentemente en la biosfera y son considerados como uno de los compuestos más abundantes en la naturaleza, ya que son componentes esenciales de las membranas celulares de todos los organismos eucariotas (Galán *et al.*, 2017). El colesterol es uno de los esteroides más importantes, ya que juega un papel esencial en la fisiología de los animales al tratarse de un compuesto esencial en la membrana celular y precursor de diversas moléculas, como las hormonas esteroideas o los ácidos biliares (Galán *et al.*, 2017; Meco López *et al.*, 2016). En el caso de los esteroides vegetales, denominados de forma conjunta fitoesteroides, presentan una estructura similar a la del colesterol, con la diferencia de la presencia de un grupo metilo o etilo en el carbono 24 que los diferencian del colesterol (Meco López *et al.*, 2016). En algunas plantas tiene funciones específicas en la proliferación celular, transducción de señales y como moduladores de la actividad de enzimas unidas a la membrana (Volkman, 2003).

Entre los fitoesteroides, el más abundante es el sitosterol (o beta-sitosterol), seguido por el campesterol y el estigmasterol (Meco López *et al.*, 2016).

Los esteroides son considerados ahora como una nueva clase de contaminantes, debido a los efectos producidos en el medio ambiente causados por el incremento en su concentración y a su vez por la actuación de algunos de ellos como disruptores endocrinos (Galán *et al.*, 2017). A pesar de su ubicuidad en la naturaleza, los esteroides son muy recalcitrantes para la degradación microbiana debido al bajo número de grupos funcionales presentes en su estructura y a su extremadamente baja solubilidad en agua (Galán *et al.*, 2017).

El catabolismo micobacteriano de esteroides ha sido investigado ampliamente en varias Actinobacterias que son capaces de catabolizar esteroides y producir intermediarios esteroideos (Fernandes *et al.*, 2003). Algunas micobacterias son productores muy eficientes de androst-4-ene-3,17-diona (androstenediona, AD) y androst-1,4-diene-3,17-diona (androstadienediona, ADD), degradan selectivamente la cadena lateral 17-alquil de los esteroides, dejando intacto el núcleo esteroideo (Marshech *et al.*, 1972).

Los precursores esteroideos obtenidos mediante bioconversión microbiana a partir de esteroides suponen una línea sostenible y económica en la producción de fármacos esteroideos, como por ejemplo mediante la degradación de la cadena lateral de los fitoesteroides, los cuales constituyen una fuente abundante y de bajo coste para la síntesis de fármacos esteroideos (Rodríguez-García *et al.*, 2016).

1.2. *Mycolicibacterium neoaurum*

El género *Mycobacterium* abarca un gran número de organismos Gram-positivos, en forma de bastón, ácido-resistentes del filo Actinobacteria y consta de 188 especies, incluyendo patógenos humanos importantes, así como numerosas especies ambientales. Entre los patógenos humanos se encuentran *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* agentes causales de la tuberculosis y la lepra, respectivamente. En cuanto a las especies ambientales, pueden habitar un amplio rango de nichos ecológicos, como por ejemplo agua, cuerpo, suelo y fluidos metalúrgicos. Las especies micobacterianas presentan diferencias en cuanto a su tasa de crecimiento, lo que permite dividir de forma tosca este género en dos grupos, uno con las bacterias de crecimiento lento (> 7 días para formar colonias) y otro con las bacterias de crecimiento rápido (< 7 días para formar colonias) (Gupta *et al.*, 2018).

En 2018, Gupta *et al.* establecieron una nueva clasificación del género *Mycobacterium*, dividiendo dicho género en 5 nuevos géneros. Los resultados de sus amplios análisis filogenéticos y las numerosas marcas moleculares (o sinapomorfías) identificadas, apoyaban consistente y fuertemente la división de las especies micobacterianas conocidas en 5 clados. Gupta *et al.* propusieron dividir el género *Mycobacterium* en un género modificado *Mycobacterium*, que abarca a los miembros del clado “*Tuberculosis-Simiae*” y cuatro nuevos géneros: *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus*, *Mycolicibacterium* y *Mycobacteroides* que se

corresponden con los clados “*Terrae*”, “*Triviale*”, “*Fortuitum-Vaccae*” y “*Abscessus-Cheloniae*”, respectivamente.

En cuanto a la nueva clasificación propuesta, la mayoría de los patógenos humanos se mantienen en el género corregido *Mycobacterium*, mientras que el género *Mycolicibacterium* está primariamente compuesto por especies ambientales. *Mycolicibacter* y *Mycolicibacillus* también son no-patógenos, excepto asociaciones ocasionales de algunas especies con animales como hospedadores y humanos enfermos. Algunos miembros del género propuesto *Mycobacteroides* son conocidos por estar asociados con infecciones pulmonares, de piel y tejidos blandos; sin embargo, ninguno de ellos está considerado como un importante patógeno que amenace la vida. No obstante, los 5 géneros formarían parte de la familia *Mycobacteriaceae* y sus nombres propuestos guarda una similitud cercana al nombre original del género *Mycobacterium* para evitar confusiones (Gupta *et al.*, 2018).

La bacteria con la que hemos trabajado es *Mycolicibacterium neoaurum*, una bacteria saprófita presente en el suelo. El género *Mycolicibacterium* es un clado monofilético compuesto por especies bacterianas de crecimiento rápido, que tardan menos de 7 días en formar colonias tras el aislamiento primario. La mayoría de las especies son saprófitas y se consideran no patógenas para los humanos, sin embargo se han dado casos de infecciones y enfermedades por miembros de este grupo (Gupta *et al.*, 2018). En concreto, trabajamos con la cepa *M. neoaurum* NRRL B-3805, la cual convierte el fitoesterol en AD, un precursor de múltiples esteroides de 19 átomos de carbono de importancia industrial (Marsheck *et al.*, 1972). Además, esta cepa es capaz de convertir el AD en otros productos esteroideos, incluyendo la testosterona y el ADD (Liu y Lo, 1997).

M. neoaurum NRRL B-3805 es considerada una cepa de referencia en biotransformación de fitoesteroides, siendo capaz de emplear como fuente de carbono otros compuestos como el glicerol, la glucosa y agentes disolventes como el Tween80 (Liu y Lo, 1997). La alta concentración de glucosa afecta a las reacciones de redox, favoreciendo la reducción inhibiendo la oxidación. Asimismo, puede usar la testosterona como producto inicial oxidándola a AD en ausencia de glucosa, ya que usa de forma preferente esta molécula (Liu y Lo, 1997).

1.3. Catabolismo de esteroides

El catabolismo del colesterol producido por *M. tuberculosis* ha sido objeto de estudio debido a su gran importancia en los procesos de infección y patogénesis, ya que es capaz de utilizar los nutrientes del huésped disponibles durante toda la fase de infección (Thomas *et al.*, 2011). La infectividad y la persistencia de este microorganismo requiere la utilización del colesterol celular del huésped (Ouellet *et al.*, 2010). Además, utiliza un conjunto único de enzimas catabólicas homólogas a las necesarias en la β -oxidación clásica de ácidos grasos, pero que son específicas de los sustratos derivados de esteroides (Yang *et al.*, 2015). En el caso de *M. tuberculosis*, el metabolismo del colesterol proporciona a la bacteria moléculas de acetil-CoA y propionil-CoA, que pueden ser empleadas para la producción de energía. Además, podría biosintetizar a partir del colesterol metabolitos derivados, potencialmente valiosos, que pueden contribuir a su supervivencia y virulencia (Yang *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la degradación de la cadena lateral del colesterol, la cual se asemeja a los ácidos grasos ramificados, se lleva a cabo a través de tres ciclos de β -oxidación en una manera análoga al metabolismo graso acil-CoA en mitocondrias y peroxisomas humanos (Yang *et al.*, 2015). El inicio de la β -oxidación requiere la conversión del colesterol en colest-4-ene-3-ona, seguido por la oxidación catalizada por Cyp125 del C-26 del extremo metilo-terminal para aportar el ácido graso inicial, que es activado a tioéster-CoA por la enzima FadD19. El metabolismo completo de la cadena lateral del colesterol resulta en un intermediario esteroideo 17-ceto, así como una molécula de acetil-CoA y dos de propionil-CoA (Yang *et al.*, 2015).

El metabolismo bacteriano de esteroides tiene importancia para entender la influencia en procesos patológicos, como en el caso de *M. tuberculosis*, pero también es importante para el desarrollo de nuevos microorganismos con uso potencial como herramientas biotecnológicas (Galán *et al.*, 2017). Un ejemplo de microorganismo empleado como herramienta biotecnológica es la cepa *M. neoaurum* NRRL B-3805, que proviene del aislamiento previo de un microorganismo presente en el suelo que convertía un derivado del estigmaesterol en ADD (Marsheck *et al.*, 1972). Tras someter dicho aislado a mutagénesis se obtuvo la cepa *M. neoaurum* NRRL B-3805, con una capacidad aumentada de bioconversión y que además producía AD, un compuesto con mayor interés industrial que el ADD, siendo el AD el precursor con mayor uso para varios esteroides C19 (Marsheck *et al.*, 1972).

Las enzimas encargadas de catalizar la degradación de los esteroides son numerosas y se encuentran repartidas por el genoma. Las encargadas de realizar los 3 últimos pasos de degradación de la cadena lateral se encuentran codificadas en el operón de crecimiento intercelular, denominado operón *igr*. Estas enzimas son en las que se basa este trabajo, detallando la estructura de dicho operón a continuación.

1.4. Operón *igr*

El operón de crecimiento intercelular (*igr*) está bien estudiado en *M. tuberculosis*, ya que está relacionado con la patogénesis y la persistencia de la bacteria en macrófagos (Gilbert *et al.*, 2018). El operón *igr* está localizado en un locus de degradación de colesterol con 83 genes y se requiere para el crecimiento *in vitro* en colesterol como única fuente de carbono (Thomas *et al.*, 2011). Los genes del operón *igr* codifican enzimas lipídicas de β -oxidación, sin embargo, no son necesarios para el crecimiento en presencia de ácidos grasos de cadenas pares o impares (Yang *et al.*, 2014). Estas enzimas catalizan el ciclo final de β -oxidación en la degradación de la cadena lateral del colesterol que elimina la fracción propionato del C20 a C22 (Yang *et al.*, 2015).

El operón *igr* está formado por 6 genes que codifican un citocromo P450 (*CYP125A1*), una acil-CoA deshidrogenasa (*chsE1-chsE2*), una hidratasa (*chsH1-chsH2*) y una proteína transportadora de lípidos (*ltp2*) (Figura 2).



Figura 2. Estructura y disposición de los 6 genes, representados con flechas naranjas, que constituyen el operón *igr*.

El complejo ChsE1-ChsE2 cataliza la deshidrogenación de 3-oxo-4-pregnane-20-carboxil-CoA (3-OPC-CoA) a 3-oxo-4,17-pregnadiene-20-carboxil-CoA (3-OPDC-CoA), mientras que el complejo ChsH1-H2 cataliza la hidratación de 3-OPDC-CoA a 17-hidroxi-3-oxo-4-pregnene-20-carboxil-CoA (17-HOPC-CoA) (Figura 3; Yang *et al.*, 2015). Ambos complejos enzimáticos, ChsE1-E2 y ChsH1-H2, presentan una estructura en forma de heterotetrámeros

$\alpha_2\beta_2$ (Yang *et al.*, 2014; 2015). Cabe mencionar que esta estructura ha sido encontrada, hasta el momento, solo en bacterias conocidas con metabolismo de esteroides (Yang *et al.*, 2015). La proteína transportadora de lípidos Ltp2 cataliza la escisión del 17-HOPC-CoA para formar el precursor esteroideo AD y liberar una molécula propionil-CoA (Figura 3; Gilbert *et al.*, 2018). El AD se puede convertir en ADD mediante una deshidrogenación en el carbono 1 catalizada por la enzima KstD (Galán *et al.*, 2017).

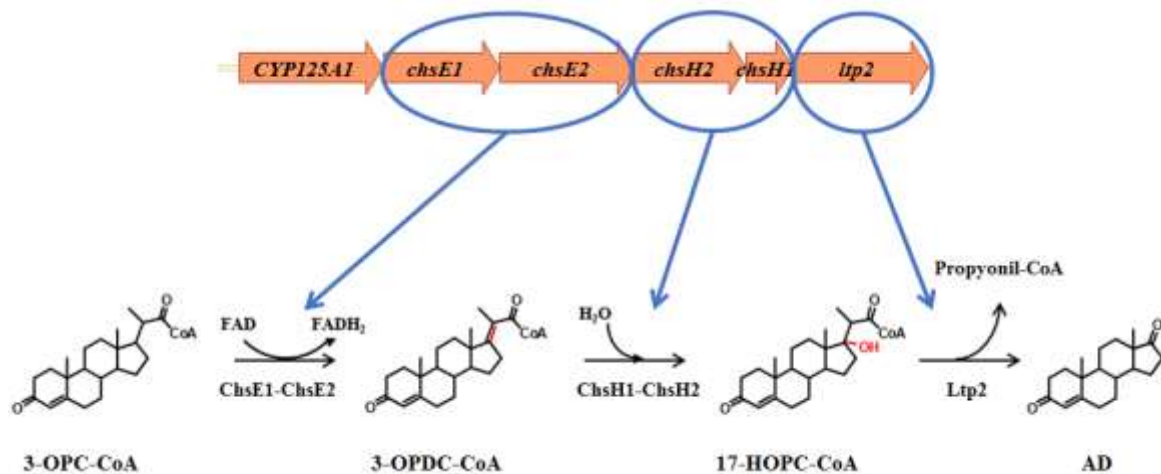


Figura 3. Últimos pasos de la degradación de la cadena lateral de los esteroides, catalizada por las enzimas codificadas por el operón *igr*.

Bernárdez Miranda (2019) obtuvo a partir de la cepa *M. neoaurum* NRRL B-3805, dos mutantes mediante la delección de las parejas de genes codificantes de los complejos proteicos ChsE1-ChsE2 y ChsH1-ChsH2. Con el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2* observó la total ausencia de producción de AD y ADD, así como la aparición de nuevos compuestos esteroideos, mientras que con el mutante *M. neoaurum* Δ *chsE1-E2* sí observó la presencia de los compuestos AD y ADD como en la cepa parental, detectándose igualmente nuevos compuestos esteroideos, aunque en menor número y concentración que con el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*. Los compuestos producidos por ambos mutantes son muy atractivos desde el punto de vista industrial, pero la presencia de numerosos compuestos en un mismo caldo de cultivo supone un importante hándicap para su purificación, ya que dichos compuestos suelen presentar propiedades químicas similares, siendo por tanto difíciles de separar. Con el fin de reducir el número de compuestos producidos por las nuevas cepas se planteó la construcción de un doble mutante.

1.5. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la delección de forma conjunta de los genes *chsE1-chsE2* y *chsH1-chsH2* presentes en el operón *igr* en la cepa *M. neoaurum* B-3805. Con esto se busca profundizar en el estudio de la degradación de la cadena lateral de los esteroides, así como la obtención de un mutante que produzca un reducido número de nuevos compuestos intermediarios que puedan tener interés para la industria farmacéutica. Como objetivo secundario se planteó el profundizar más en el análisis de los compuestos producidos por el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*.

Este trabajo forma parte del proyecto europeo Syntheroids (Synthetic Biology for Industrial Production of Steroids), coordinado por INBIOTEC y en colaboración con otros centros y empresas europeas. Entre sus objetivos se encuentra la obtención de nuevos compuestos intermediarios con interés farmacológico a partir de la degradación de fitoesteroides llevada a cabo por mutantes derivados de la cepa *M. neoaurum* NRRL B-3805.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos empleados

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron las cepas *Mycolicibacterium neoaurum* NRRL B-3805 y *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*, así como *Escherichia coli* DH5 α .

M. neoaurum NRRL B-3805, utilizada como cepa de referencia, fue obtenida por mutagénesis empleando radiación ultravioleta a partir de una bacteria del suelo y es capaz de convertir los fitoesteroles en AD y ADD, así como otros compuestos esteroideos (Marsheck *et al.*, 1972).

M. neoaurum Δ *chsH1-H2* fue obtenida a partir de *M. neoaurum* NRRL B-3805 mediante delección de los genes *chsH1-chsH2* por doble recombinación homóloga (Bernárdez Miranda, 2019) y se empleó para el análisis de los productos de la degradación de fitoesteroles.

E. coli DH5 α (Invitrogene) fue empleada como microorganismo huésped de las construcciones plasmídicas introducidas mediante transformación.

2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para la transformación y crecimiento de *E. coli* fueron LB y TB. Los cultivos se realizaron durante un periodo de tiempo de 18-24 h a una temperatura de 37 °C. En el caso de los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces lisos con una agitación de 250 rpm. En caso necesario, se emplearon distintos antibióticos como marcadores de selección. Para la ampicilina se utilizó una concentración final de 100 μ g/ml, mientras que para la apramicina la concentración utilizada fue de 50 μ g/ml.

Para el crecimiento de *M. neoaurum* se emplearon los medios M3, Myc-MI y Myc-MF, cuya composición se detalla en las Tablas 1, 2 y 3. Para los estudios de producción se empleó el medio Myc-MF, inoculado a su vez con un 10 % de un cultivo obtenido en medio Myc-MI. Ambos medios fueron definidos por uno de los socios del proyecto europeo para el cultivo de *M. neoaurum* B-3805 en un proyecto previo. Por su parte, el medio M3 se utilizó para los experimentos de electroporación (Loraine y Smith, 2017). Los cultivos de *M. neoaurum* se realizaron a 28 °C. En el caso de los cultivos en medio líquido se emplearon matraces indentados, lo que permite una mejor aireación y con agitación orbital de 180 rpm.

Tabla 1. Composición del medio M3. Puede suplementarse con higromicina y sacarosa para formar un medio de selección.

Componente	Cantidad (g/l)
Extracto de levadura	5
Glicerol 90 %	5
Tween 80	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,002
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
Agar (medio sólido)	20
* Higromicina	50-125 µg/ml
* Sacarosa	10 %
pH 7,2	

Tabla 2. Composición del medio industrial de inoculación Myc-MI.

Componente	Cantidad (g/l)
Glucosa	5
Tween 80	1
Peptona de soja	10
Extracto de levadura	5
NaCl	1
pH 7,1	

Tabla 3. Composición del medio industrial de fermentación Myc-MF.

Componente	Cantidad (g/l)
<i>Corn steep solid</i>	5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1
NaNO ₃	1,5
Tween 80	1
Aceite	100
Fitosterol	20
pH 8	

2.3. Plásmidos

El plásmido usado como base para la delección de los genes de interés mediante recombinación homóloga fue pJL020, de 6112 pb (Figura 4). Este plásmido fue diseñado para

poder eliminar genes sin dejar marcadores de selección (Loraine y Smith, 2017). Contiene el origen de replicación *oriColE1*, que es el origen de replicación en *E. coli*, pero no contiene un origen de replicación en *Mycobacterium*, por lo que únicamente puede mantenerse en esta bacteria tras su integración en el genoma. Además, lleva el gen *bla*, que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*, el gen *hygR* que confiere resistencia a la higromicina en *M. neoaurum* y el marcador de contraselección *sacB*. El gen *sacB*, procedente de *Bacillus subtilis*, codifica la enzima levansacarasa que cataliza la hidrólisis de la sacarosa y la síntesis de levanos (polímeros de fructosa de alto peso molecular), cuya acumulación resulta tóxica para las células (Pelicic *et al.*, 1995). La expresión del gen *sacB* en presencia de sacarosa produce la muerte celular por toxicidad.

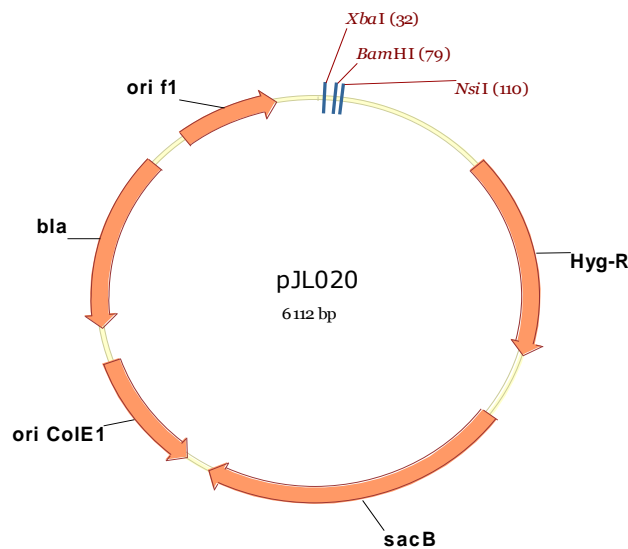


Figura 4. Localización de los genes, orígenes de replicación y lugar de clonación múltiple en el plásmido pJL020, de 6112pb.

2.4. Plásmido empleado para la delección de genes

Para crear el mutante $\Delta chsE1E2-chsH1H2$ se insertaron en la zona de clonación múltiple del plásmido pJL020 un fragmento de 1 Kb corriente arriba y otro de 1 Kb corriente abajo de los genes que se querían deleccionar (*chsE1-E2* y *chsH1-H2*), los cuales se corresponden con parte de los genes *cyp125A1* y *ltp2*, respectivamente (Figura 5). A la hora de diseñar la construcción se tuvo en cuenta que existen 10 pb entre los genes *cyp125A1* y *chsE1*, que se mantuvieron en la construcción entre los genes *cyp125A1* y *ltp2*.

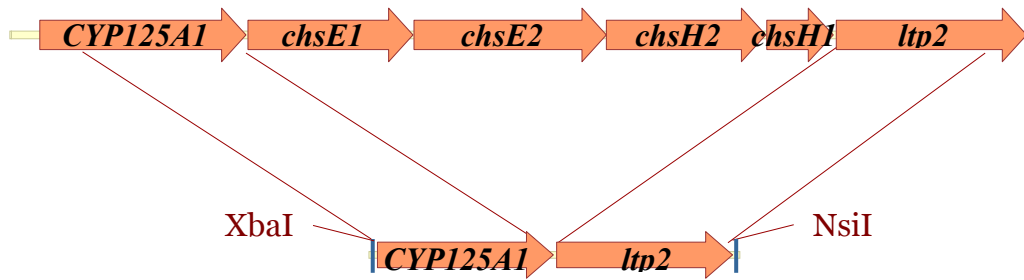


Figura 5. Abajo, fragmento de 2 kb obtenido mediante síntesis química conteniendo 1 kb del gen *cyp125A1* y 1 kb del gen *ltp2*, que constituyen las secuencias de recombinación homóloga para la delección de los genes *chsE1-E2* y *chsH1-H2*, y flanqueados por las dianas para las enzimas de restricción XbaI y NsiI.

El diseño del plásmido para la delección se realizó con el programa Vector NTI 10.3.0 (Invitrogene) y luego se hizo un encargo del mismo a la casa comercial GeneCut (Francia) para su síntesis. Una vez recibido el plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2* (Figura 6), se introdujo en *E. coli* DH5 α mediante transformación.

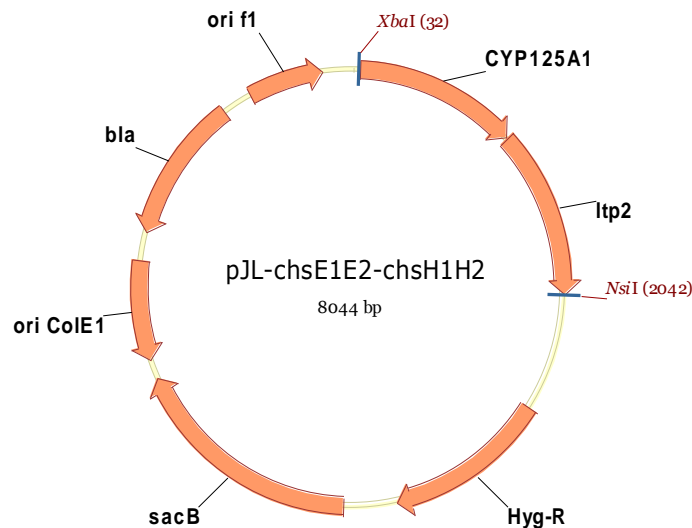


Figura 6. Plásmido final obtenido tras la clonación del fragmento en el plásmido pJL020. Se muestra la localización de los genes, orígenes de replicación y zonas de corte para las enzimas de restricción XbaI y NsiI en el plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2*, de 8044 pb.

Para la obtención del gen *aac(3)IV* que confiere resistencia a la apramicina se empleó el plásmido pRAS (Figura 7), diseñado por el personal de INBIOTEC para la inserción de genes en el cromosoma de bacterias del género *Streptomyces*.

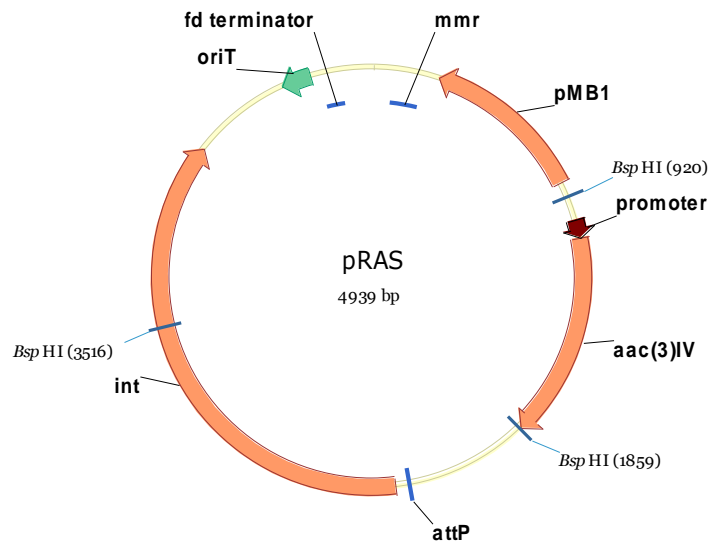


Figura 7. Localización de los genes, origen de replicación y zonas de corte para la enzima de restricción BspHI en el plásmido pRAS, de 4939 pb.

2.5. Transformación de *E. coli*

A un tubo de 1,5 ml conteniendo 100 μ l de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α se añadieron 2 μ l de plásmido y se mezcló suavemente con pequeños golpes con los dedos. Tras incubar las células durante 10 min en hielo, se sometieron a un choque térmico en un termobloque a 42 $^{\circ}$ C durante 90 segundos y se enfriaron inmediatamente después durante 2 min en hielo. Pasado este tiempo se le añadieron 500 μ l de LB y se incubaron las células a 37 $^{\circ}$ C durante una hora para su regeneración. Por último, se sembraron distintas alícuotas en placas con medio LB suplementado con el antibiótico de selección correspondiente.

2.6. Extracción de plásmidos mediante lisis alcalina

La extracción de los plásmidos introducidos en *E. coli* se llevó a cabo mediante lisis alcalina. Para ello se centrifugaron 50 ml de células, crecidas en medio TB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente, durante 10 min a 4000 rpm y a 4 $^{\circ}$ C.

Posteriormente, se resuspendieron en 7,5 ml de GTE (glucosa 0,9 %, Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM) con lisozima (5mg/ml) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 15 ml de una solución de NaOH/SDS recién preparada (NaOH

0,2 M, SDS 1 %), se homogeneizó y se incubó durante 10 min en hielo. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 11,25 ml de acetato potásico frío (acetato potásico 3 M, acetato acético glacial 11,5 %), se agitó bruscamente y se incubó de nuevo durante 10 min en hielo. Tras centrifugar la lisis a 4000 rpm durante 10 min a 4°C, se filtró el sobrenadante a través de algodón y se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol (2-propanol) para la precipitación del DNA, incubando 15 min a temperatura ambiente. El DNA se recogió por centrifugación durante 10 min a 3500 rpm, se resuspendió en 1,5 ml de etanol al 70 % y se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml para centrifugarlo de nuevo a 4 °C y 16.000 g durante 20 min. El etanol se retiró con pipeta y se volvió a dar un pulso de centrifugación para eliminar posibles residuos. El pellet se resuspendió en 600 µl de TE, se añadieron 10 µl de RNasa (10 mg/ml) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

Por último, se empleó el kit comercial *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN) para finalizar la extracción del plásmido y se determinó la concentración de DNA mediante el uso de un NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific).

2.7. Electroporación

La electroporación de *M. neoaurum* se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Loraine y Smith (2017). Para ello se inocularon matraces con medio M3 líquido hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,8-1. Tras incubar los matraces en hielo durante hora y media se lavaron las células con glicerol al 10 % frío y se resuspendieron igualmente en glicerol al 10 % en un volumen final de 1/100 respecto al volumen inicial. Las células se conservaron a -80 °C en alícuotas de 100 µl hasta su uso.

Para electroporar las células con el plásmido, se emplearon cubetas de 2 mm preenfriadas en hielo conteniendo 100 µl de células y un volumen máximo de 5 µl de DNA. Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 1000 Ω, 2500 V y 25 µF. Finalmente las células se recuperaron en 1 ml de medio M3 en tubos eppendorf y se incubaron durante 3 horas a 180 rpm y a 28 °C para su regeneración. Pasado este tiempo se sembraron las células en placas de M3 suplementadas con higromicina (50-125 µg/ml) para la selección de las células transformadas.

2.8. Amplificación de DNA mediante PCR

Para comprobar la delección de los mutantes se empleó la técnica de PCR. Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 4 (Bernárdez Miranda, 2019). En la Figura 8 se puede observar la zona de anillamiento de los diferentes cebadores respecto a los genes del operón *igr*.

Tabla 4. Características de los cebadores empleados para la detección de mutantes por PCR (Bernárdez Miranda, 2019)

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	G+C (%)	Longitud (nt)
Myc-01	TGATCCCAACCCGCACGTCG	63,3	65	20
Myc-02	GGTAGCAACCCAGACCCAGTGTG	62,4	62,5	24
Myc-03	CGGCGGCGACCGAAGGTCTTC	63,5	70	20
Myc-04	TCATCGTCGGAGCGGGAACG	62,6	65	20
Myc-05	GGGACAAGGCGCAGGCCAAG	63,4	70	20
Myc-06	GCACCGCCGCCATAACCGAT	63,4	65	20

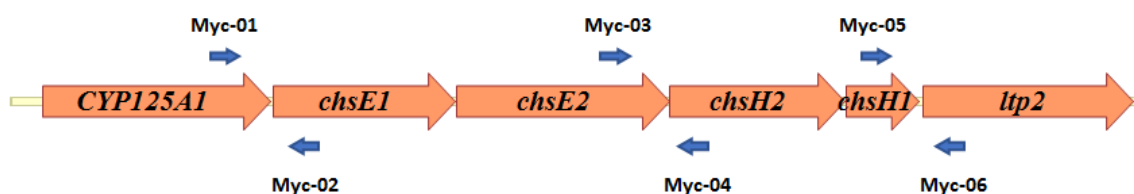


Figura 8. Localización de anillamiento de los distintos cebadores (flechas azules) respecto a los genes del operón *igr* (flechas naranjas). Los cebadores 1, 3 y 5 hibridan en la cadena codificante de los genes y los cebadores 2, 4 y 6 en la cadena no codificante.

En general, las condiciones de reacción de PCR fueron 2 min iniciales de desnaturalización a 96 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 96 °C, 30 segundos a 55-65 °C y 30 segundos de extensión a 72 °C, con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Las concentraciones de los distintos reactivos empleados se muestran en la Tabla 5. Las reacciones contienen DMSO (7 %) debido al alto contenido en G+C de la cepa (superior al 65 %).

Tabla 5. Volúmenes de los reactivos empleados en las reacciones de PCR.

Reactivo	Volumen por reacción (µl)
Flexi Buffer 5x	4
MgCl ₂ (25mM)	2
dNTP (2mM)	2
Primer-1 (20mM)	0,5
Primer-2 (20mM)	0,5
GoTag G2 (Promega)	0,1
DMSO	1,4
DNA	1
MQ	8,5

Para conocer la temperatura óptima de anillamiento de los cebadores Myc-01/Myc-06 se realizó una puesta a punto de la PCR. Para ello se empleó el plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2* como molde y se realizó la PCR en un gradiente de temperatura comprendido entre 55 y 65 °C, manteniendo el resto de las condiciones como las descritas en el párrafo anterior.

Las PCR realizadas para la comprobación de los posibles mutantes se realizó a partir de colonias. Para ello se tomaron muestras de las colonias con un palillo estéril, se resuspendieron en 50 µl de agua MQ, se hirvieron a 100 °C durante 10 min y se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min.

2.9. Electroforesis en geles de agarosa 0,8%

El análisis del DNA mediante electroforesis se realizó en geles de agarosa al 0,8% en solución TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8), con un potencial eléctrico de 100 V durante 1 hora. Como tampón de carga se empleó el que proporciona el fabricante de la enzima GoTaq (5 X Green Go Taq Flexi [Promega]). Para comprobar el tamaño de las muestras se usó el marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA ladder* (Invitrogene).

El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 25 min y se observó la presencia de DNA con luz ultravioleta.

2.10. Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

La purificación de DNA a partir de los geles de agarosa, se realizó empleando el kit comercial *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN). El DNA se eluyó en un volumen final de 20 μ l y se determinó su concentración mediante el uso de un NanoDropTM ND-1000 (Thermo Scientific).

2.11. HPLC

La identificación de los compuestos esteroideos se realizó mediante HPLC. Las muestras obtenidas a partir del sobrenadante del medio de cultivo se filtraron directamente con filtros de PTFE hidrofílicos de 0,22 μ m de tamaño de poro. Para las muestras obtenidas en la fase oleica se realizó una extracción previa con acetato de etilo y el extracto se filtró a través de filtros hidrofóbicos de polipropileno de 0,45 μ m de tamaño de poro. El análisis se realizó con un cromatógrafo Agilent (1100 Series) equipado con una columna C-18 de fase reversa (Nucleosil 100 5 μ m, Phenomenex) termostaticada a 50 °C. Como fase móvil se empleó una mezcla de H₂O (solución A) y acetonitrilo (solución B), ambos conteniendo ácido acético glaciar (0,01 %, v/v). La cromatografía se realizó con un flujo constante de 1 ml/min con gradiente en función del tiempo (Tabla 6). La detección de los compuestos se realizó mediante determinación de la absorción a 240 nm. Como controles se emplearon los precursores esteroideos AD, ADD, 20-HMP y 20-HMPD (Figura 9), disueltos en metanol.

Tabla 6. Porcentaje de solución B a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	% B
0-5	38
5-15	38-84
15-18	84
18-20	84-38
20-25	38

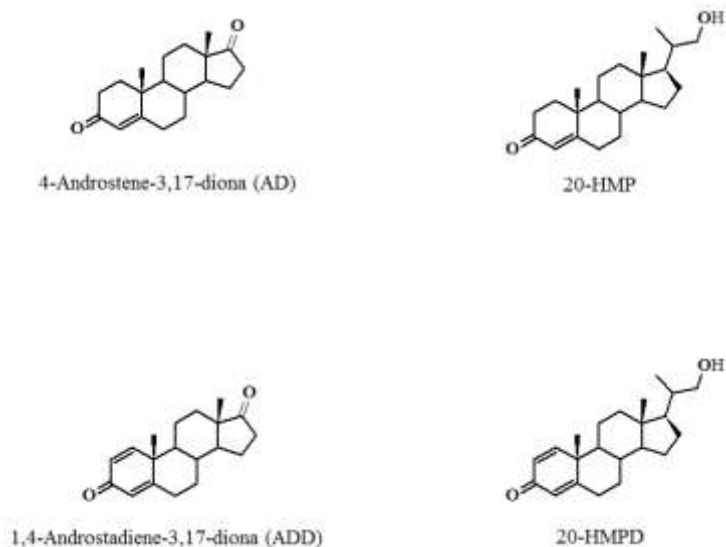


Figura 9. Compuestos empleados como estándares en los análisis de HPLC

3. RESULTADOS

El objetivo principal del presente trabajo era la construcción de un doble mutante con los genes *chsE1-E2* y *chsH1-H2* delecionados para poder comparar el efecto de dicha eliminación con la eliminación de los mismos genes por separado. Para obtener el mutante se diseñó una construcción tal y como se indica en Materiales y Métodos, que fue sintetizada por la empresa GeneCust (Francia). Una vez recibida, se introdujo en *E. coli* por transformación para su amplificación y posterior purificación. El plásmido así obtenido se introdujo en *M. neoaurum* mediante electroporación y las células se sembraron en medio M3 con higromicina (50 µg/ml), concentración recomendada (Loraine y Smith, 2017) y que había funcionado con anterioridad para la selección de mutantes (Bernárdez Miranda, 2019). Tras 72 horas de incubación a 30 °C, se observó una gran cantidad de colonias incluso en el control de electroporación realizado con agua en vez de plásmido. Este hecho se achacó a una pérdida de parte de la actividad de la higromicina en la solución comercial.

Para confirmarlo, se realizaron pruebas de crecimiento de *M. neoaurum* en medio M3 sólido con diferentes concentraciones de higromicina. En concreto se probaron 50, 100, 150, 200 y 250 µg/ml, empleando como control medio M3 sin antibiótico. Tras 48 horas a 30 °C se observó un crecimiento similar al control con 50 µg/ml, mientras que con 100 µg/ml había una reducción significativa del crecimiento (superior al 70 %), desapareciendo con concentraciones de 150 µg/ml o superiores. Finalmente se optó por emplear una concentración de higromicina de 125 µg/ml para que dicho antibiótico resultara efectivo.

En paralelo y como estrategia alternativa, se realizaron pruebas con otro antibiótico de selección, la apramicina, ya que se sabe por experiencia previa del laboratorio que no da problemas de pérdida de actividad ni se producen falsos positivos. Una vez comprobado que *M. neoaurum* era sensible a la apramicina incluso a una concentración de 10 µg/ml, se decidió modificar el plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2* para incluir la resistencia a este antibiótico y poder así usarlo como marcador de selección, tanto en el presente trabajo como en estudios posteriores.

3.1. Sustitución del gen de resistencia a la ampicilina por el de la apramicina

Para diseñar la mejor estrategia para la introducción de un gen de resistencia a la apramicina, se analizaron los mapas genéticos de distintos plásmidos utilizados rutinariamente en el laboratorio, además de los plásmidos pJL020 y pJL-*chsE1E2-chsH1H2*. Así, se determinó que la mejor forma de obtener plásmidos con un gen de resistencia a la apramicina para *M. neoaurum* era reemplazando el gen *bla* de resistencia a la ampicilina por el gen *aac(3)IV* de resistencia a la apramicina, el cual podía obtenerse del plásmido pRAS, empleado habitualmente en *Streptomyces*. Tanto el gen *bla* en el plásmido pJL020 y su derivado pJL-*chsE1E2-chsH1H2* como el gen *aac(3)IV* en el plásmido pRAS están flanqueados por una diana para la enzima de restricción BspHI. Además, esta secuencia no está presente en el resto de los plásmidos pJL020 y pJL-*chsE1E2-chsH1H2*, y solo una vez más en el plásmido pRAS, pero fuera del gen *aac(3)IV* (Figura 10). El gen *aac(3)IV* sirve como marcador de selección tanto para *E. coli* como para *Mycolicibacterium*.

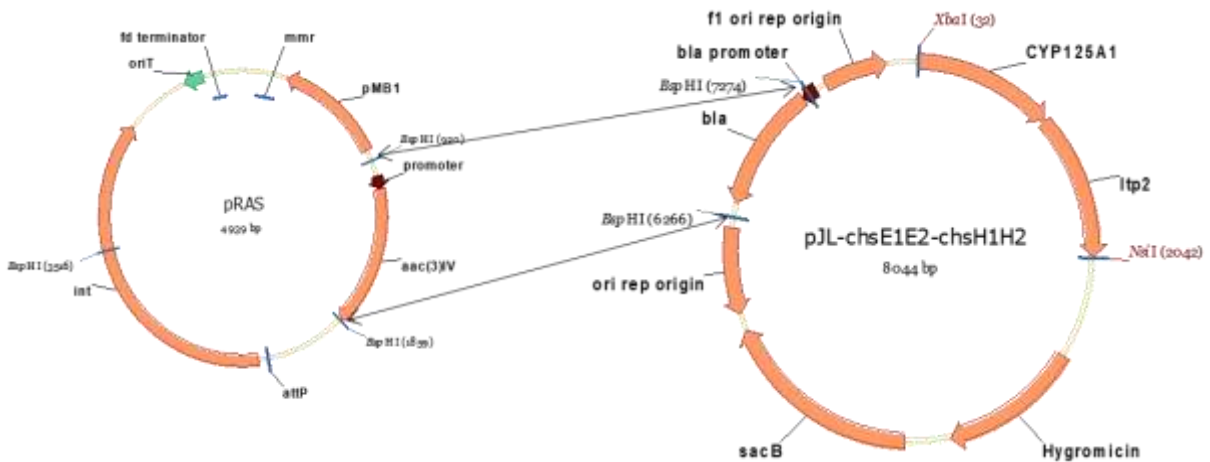


Figura 10. Esquema aclarativo en el que se muestra mediante flechas las zonas de corte por la enzima de restricción BspHI que permiten la sustitución del gen *bla* de resistencia a ampicilina en el plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2* por el gen *aac(3)IV* de resistencia a apramicina obtenido del plásmido pRAS.

Se realizaron diferentes digestiones con la enzima BspHI, tanto de los plásmidos pJL020 y pJL-*chsE1E2-chsH1H2* para eliminar el gen *bla*, como del plásmido pRAS, para obtener el gen *aac(3)IV*. Se realizaron 2 digestiones de cada plásmido (Tabla 7), con distintas cantidades de DNA, incubando las muestras durante 2-3 horas a 37 °C.

Tabla 7. Cantidades empleadas en las diferentes digestiones con BspHI realizadas en un volumen final de 100 μ l.

	DNA (μ l)	H ₂ O MQ (μ l)	Enzima (μ l)	Buffer (μ l)
pJL- <i>chsE1E2-chsH1H2</i> (1,2 μ g/ μ l)	5	82	3	10
pJL- <i>chsE1E2-chsH1H2</i> (1,2 μ g/ μ l)	10	77	3	10
pJL020 (320 ng/ μ l)	20	67	3	10
pJL020 (537 ng/ μ l)	20	67	3	10
pRAS (215 ng/ μ l)	30	57	3	10
pRAS (215 ng/ μ l)	50	37	3	10

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa con de las digestiones para separar los distintos fragmentos de la digestión, se tiñó con bromuro de etidio, se cortaron las distintas bandas de interés y se purificaron empleando el kit comercial *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN). En concreto, el tamaño de las bandas de interés fue de 5104 pb para la digestión del plásmido pJL020, 7036 pb para la de pJL-*chsE1E2-chsH1H2* y 939 pb para *aac(3)IV* (Figura 11).

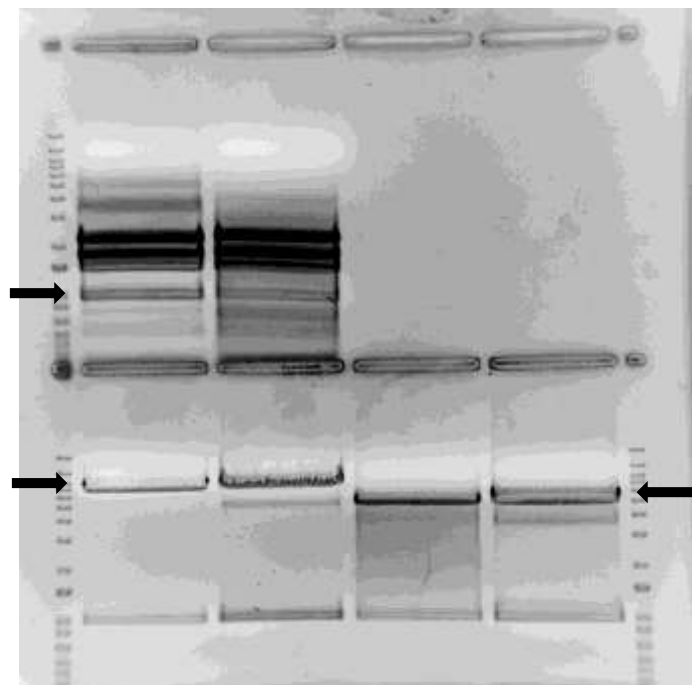


Figura 11. Resultado de las digestiones en gel de agarosa 0,8 %, de arriba abajo y de izquierda a derecha, de los plásmidos pRAS, pJL-*chsE1E2-chsH1H2* y pJL020. Las bandas de interés para realizar la posterior purificación se indican con flechas negras.

Una vez purificadas las bandas se procedió a realizar la ligación de los plásmidos pJL020 y pJL-*chsE1E2-chsH1H2*, usados como vectores, con el inserto conteniendo el gen *aac(3)IV* obtenido del plásmido pRAS. Para ello se empleó la enzima DNA ligasa del fago T4 (Tabla 8).

Tabla 8. Cantidades empleadas en las ligaciones en un volumen final de 10 μ l.

Vector (μ l)		Inserto pRAS (μ l) (215 ng/ μ l)	H ₂ O MQ (μ l)	Buffer (μ l)	Enzima (μ l)
pJL020 (537 ng/ μ l)	1	2	4	2	1
pJL- <i>chsE1E2-chsH1H2</i> (1,2 μ g/ μ l)	1,5	1,5	4	2	1

Las reacciones de ligación se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo que se sometieron a un choque térmico de 65 °C durante 10 min para inactivar la enzima, introduciéndose en hielo inmediatamente después. Tras el choque térmico se emplearon 5 μ l de la reacción de ligación para transformar 100 μ l de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α y se sembraron en medio LB con apramicina. De esta forma se obtuvieron tres clones en total, dos clones con la ligación de pJL020 y uno con pJL-*chsE1E2-chsH1H2*. Los nuevos plásmidos así obtenidos se denominaron pJL020-Apra y pJL-*chsE1E2-chsH1H2*-Apra.

3.2. Puesta a punto de la PCR

Mientras se realizaban los primeros trabajos de electroporación y para poder identificar los mutantes mediante PCR, se realizaron pruebas a diferentes temperaturas con la pareja de cebadores Myc-01/Myc-06 ya que no habían sido probados como pareja anteriormente. Para ello se realizó una PCR en un gradiente de temperatura de anillamiento comprendido entre 55 y 65 °C, empleando como molde el plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2*.

Se observó que la pareja funcionaba a todas las temperaturas (Figura 12), por lo que se optó por emplear la temperatura de anillamiento de 60 °C, la cual fue utilizada para las otras parejas de cebadores (Bernárdez Miranda, 2019).

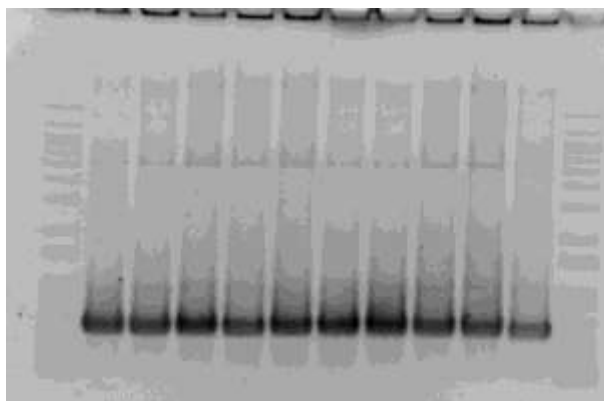


Figura 12. Análisis del producto final de la PCR mediante la electroforesis en gel de agarosa 0,8% con la pareja de cebadores Myc-01/Myc-06 en un gradiente de temperatura de anillamiento comprendido entre 55 y 65 °C, empleando como molde el plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2*. Los 10 carriles se corresponden con un intervalo creciente de temperatura de 1,1 °C aproximadamente.

3.3. Comprobación de los mutantes mediante PCR

La cepa *M. neoaurum* NRRL B-3805 se electroporó con el nuevo plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2*-Apra con las condiciones previamente descritas. El producto de la electroporación se sembró tanto en medio M3 con higromicina (125 µg/ml) como en M3 con apramicina (50µg/ml). De esta forma se obtuvieron 4 colonias en placas de M3 con higromicina, que posteriormente se sembraron por estrías tanto en placas de medio M3 con higromicina como en placas de M3 con apramicina a diferentes concentraciones (50, 25 y 10 µg/ml), así como en placas de M3 con sacarosa al 10 %.

Tras 48 horas de cultivo a 30 °C, se observó que el clon 1 creció en todas las placas (placas con higromicina, con apramicina y con sacarosa), y el clon 2 creció tanto en presencia de higromicina como en presencia de apramicina, mientras que no se observó crecimiento en presencia de sacarosa. En ambos casos, el crecimiento en presencia de apramicina se consideró indicativo de que el plásmido se había integrado en el genoma. Finalmente, con los clones 3 y 4 se observó crecimiento tanto con higromicina como con sacarosa, no así con apramicina, por lo que se consideraron falsos positivos y se descartaron para el análisis.

Los dos clones resistentes a apramicina, se cultivaron en medio M3 líquido suplementado con sacarosa al 10 % para forzar el doble sobrecruzamiento y la pérdida del plásmido, obteniendo así mutantes limpios sin marcador de selección. Tras 48 horas de cultivo se sembraron diluciones en medio M3 sólido con sacarosa (10 %), obteniéndose numerosos clones que posteriormente se replicaron en presencia de apramicina, observándose que todos ellos eran

sensibles a dicho antibiótico, lo que indicaba la pérdida del plásmido. Cuando se produce el doble sobrecruzamiento pueden darse dos casos, que se obtenga el mutante deseado o que la bacteria revierta al genotipo original. Para distinguir unos clones de otros se realizó una PCR de los mismos con la pareja de cebadores Myc-03/Myc-04 (amplifica una banda de 474 pb en el genotipo original) así como con Myc-01/Myc-06 (amplifica una banda de 502 pb en los mutantes). En un primer momento se analizaron 9 clones, amplificándose en todos ellos únicamente la banda de 474 pb con la pareja Myc-03/Myc-04 (Figura 13), lo que indicaba que en todos ellos se había vuelto al genotipo original. Posteriormente se analizaron otros 36 clones únicamente con la pareja Myc-03/Myc-04 (Figura 14), siendo de nuevo todos ellos positivos, no obteniéndose ningún clon correspondiente con el genotipo mutante.

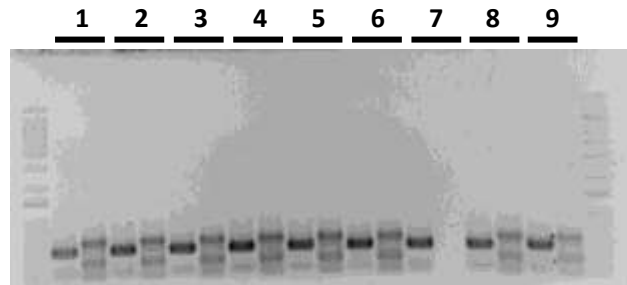


Figura 13. Resultados de PCR en gel de agarosa al 0,8 % de 9 clones resistentes a sacarosa y sensibles a apramicina. El primer carril de cada clon corresponde a la PCR realizada con los cebadores Myc-03/Myc-04, observándose una banda positiva en todos los clones. El segundo carril se corresponde con la PCR realizada con los cebadores Myc-01/Myc-06, observándose bandas inespecíficas y por tanto con resultado negativo.

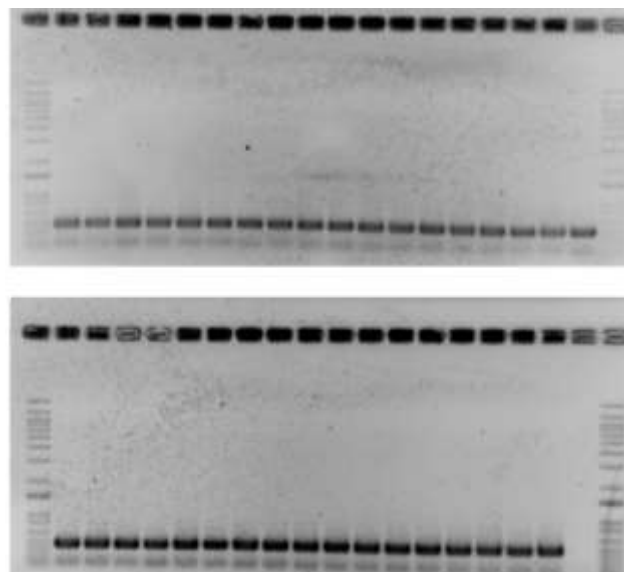


Figura 14. Resultados de PCR en gels de agarosa al 0,8 % de 36 clones analizados con la pareja de cebadores Myc-03/Myc-04. En todos los clones se observa una banda positiva salvo para el último clon que se volvió a analizar, resultando igualmente positiva.

La ausencia de mutantes entre los 45 clones analizados resultó del todo inesperada, ya que teóricamente se podría esperar un 50 % de clones con el genotipo original y otro 50 % con el genotipo mutante. Aunque se disponía de más clones resistentes a la sacarosa y sensibles a la apramicina, no se pudieron analizar debido al estado de alarma generado por la COVID-19. El genotipo de dichos mutantes será comprobado a la mayor brevedad posible.

3.4. Análisis por HPLC

Mientras se intentaba la obtención de los mutantes, se continuó profundizando en el estudio del mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*. Se realizaron cultivos en medio Myc-MF, tomando muestras tanto de la fase oleica como de la acuosa para su análisis mediante HPLC. En la fracción oleica se detectó la presencia de numerosos compuestos (Figura 15, cromatograma rojo), tal y como había descrito anteriormente Bernárdez Miranda (2019), correspondientes a distintos productos de degradación de los fitosteroles. Sin embargo, en la fase acuosa (previamente sin caracterizar) se detectó un pico principal con un tiempo de retención (TR) próximo a 15 minutos (Figura 15, cromatograma verde), que podría corresponderse con alguno de los observados en la fase oleica, mientras que los otros estaban ausentes, posiblemente por ser más hidrófobos que el detectado y quedarse en su totalidad en el aceite. Los picos detectados en el sobrenadante y con un TR en torno a los 2-4 minutos probablemente se correspondan con impurezas presentes en el medio.

Debido a la presencia de un único pico principal en la fase acuosa, se intentó la purificación del mismo empleando diferentes solventes orgánicos. Los solventes empleados fueron acetonitrilo, hexano y diclorometano. En la Figura 16 se muestran los resultados del análisis mediante HPLC de los extractos obtenidos. En el caso del hexano apenas se extrajo compuesto, mientras que con el acetonitrilo se obtuvieron dos picos de tamaño similar, uno en torno a los 15 min de TR y otro en torno a los 4 min de TR, éste último probablemente correspondiente a las impurezas. Sin embargo, con el diclorometano se obtuvo un único pico correspondiente al compuesto de interés, por lo que se siguió la purificación únicamente con este solvente. Para determinar la eficacia de extracción, se analizó también la fracción del sobrenadante tras la extracción con diclorometano (Figura 17), observándose que apenas quedaba compuesto en la fracción acuosa tras un único proceso de extracción con 1 volumen de diclorometano, quedándose además prácticamente el total de las impurezas en dicha

fracción soluble. Finalmente, para eliminar el diclorometano se introdujo la muestra en un rotavapor y tras la evaporación total del mismo, la muestra se disolvió en metanol que es el solvente utilizado habitualmente para el análisis de las muestras mediante HPLC. En este caso se observó un pico estrecho, indicando que no se trata de una mezcla de compuestos con propiedades parecidas, sino de un único compuesto. También se detectó un pequeño pico con un TR de 14,5 minutos, que sí podría ser un compuesto similar al principal. La integración de las áreas de los cromatogramas mostró una pureza del pico principal superior al 95 %. El compuesto purificado finalmente fue enviado a uno de los socios del proyecto para su identificación mediante espectrometría de masas.

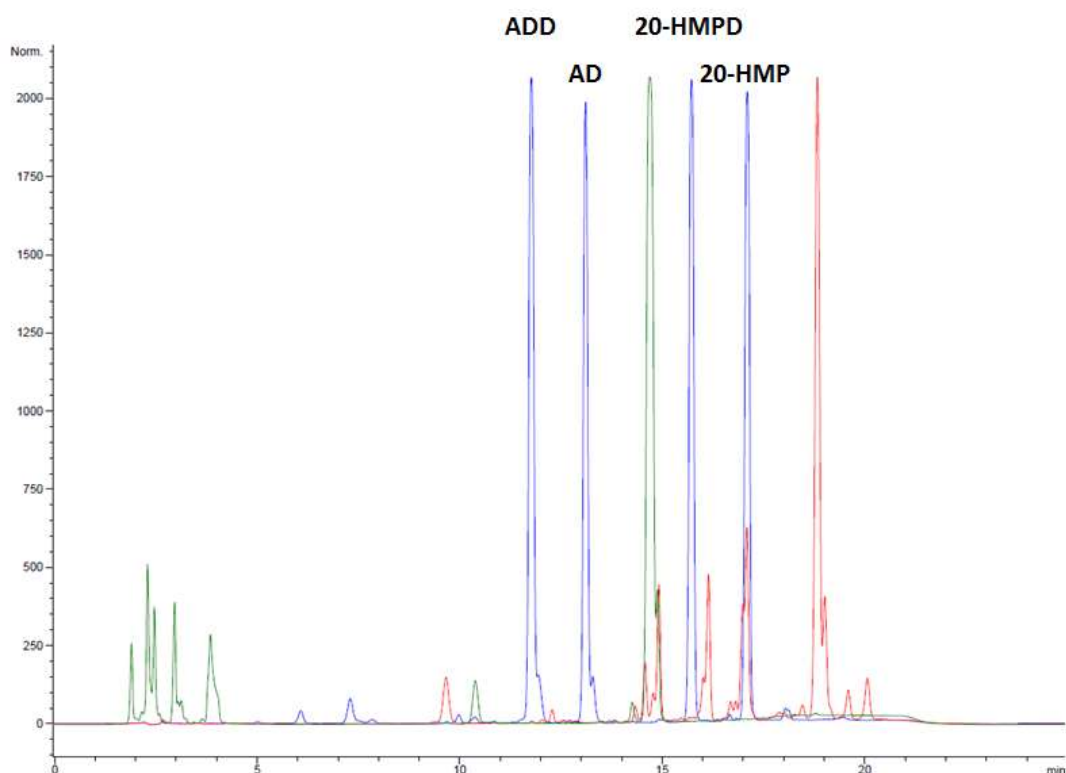


Figura 15. Resultados mediante HPLC obtenidos con muestras obtenidas de cultivos con el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*. En azul se muestran los estándares ADD, AD, 20-HMPD y 20-HMP. En rojo, los compuestos detectados en la fase oleica y en verde, los detectados en la fase acuosa (sobrenadante del cultivo).

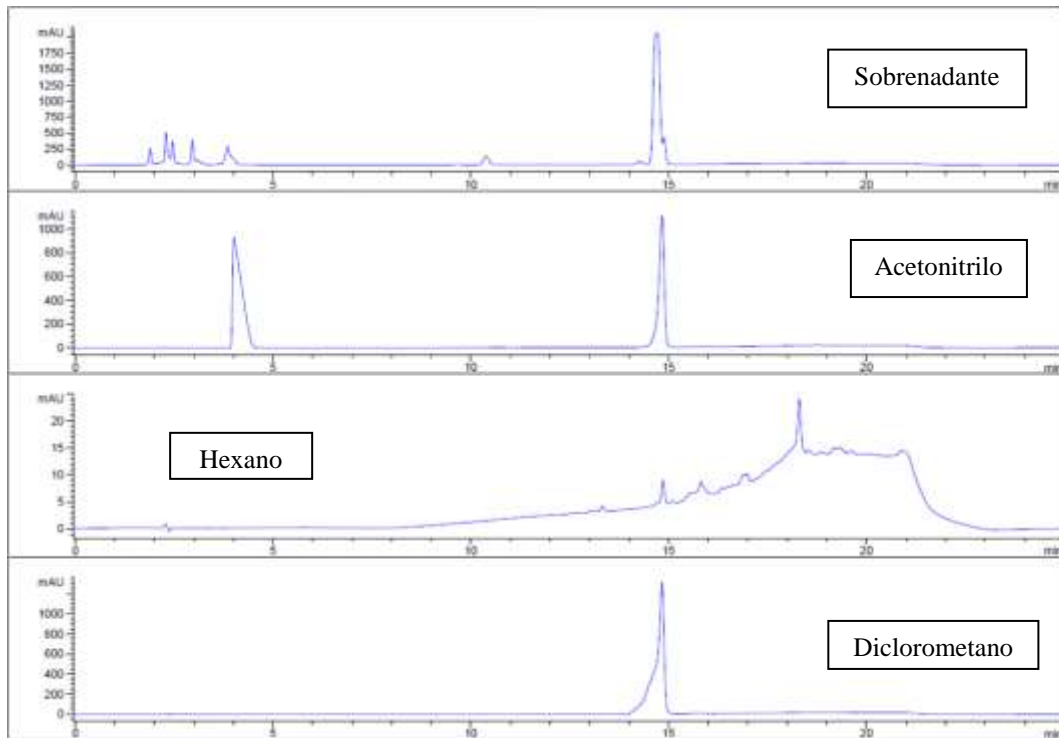


Figura 16. Resultados mediante HPLC obtenidos con el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*. En los gráficos se muestran los compuestos detectados en el sobrenadante del cultivo y las extracciones realizadas empleando los solventes orgánicos acetonitrilo, hexano y diclorometano.

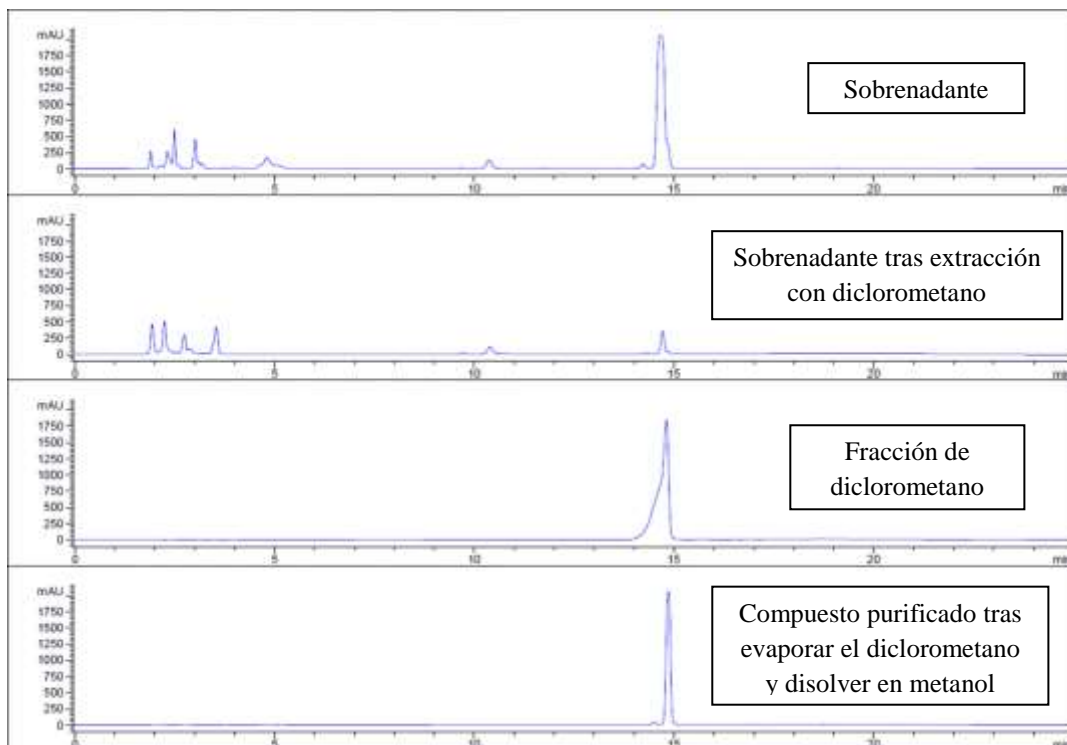


Figura 17. Resultados mediante HPLC obtenidos con el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2* en el que se muestra el proceso de purificación del compuesto sin identificar observado en el sobrenadante del cultivo con un tiempo de retención de 14,5 segundos. Los gráficos representan, en orden descendente: el sobrenadante; el sobrenadante tras la extracción con diclorometano; la fracción de diclorometano y por último el compuesto purificado tras evaporar el diclorometano y su disolución en metanol.

4. DISCUSIÓN

Los problemas surgidos por el uso de higromicina como antibiótico de selección hicieron que fuera necesario realizar una comprobación de la concentración efectiva de la solución comercial del antibiótico. Tras realizar las pruebas con distintas concentraciones, se llegó a la conclusión de que la concentración mínima efectiva como marcador de selección era de 125 µg/ml. Por otro lado, el cambio de higromicina por apramicina como antibiótico de selección en la cepa de *M. neoaurum* NRRL B-3805 tras la electroporación, resultó ser una buena opción viendo los resultados obtenidos. Dicho marcador fue seleccionado debido a la experiencia previa de trabajo en laboratorio del grupo, donde se había visto que la apramicina no produce problemas de falsos positivos ni hay pérdida de efectividad con el paso del tiempo como había ocurrido con la higromicina.

El uso del plásmido pJL-*chsE1E2-chsH1H2*-Apra, en el que se había sustituido el gen de resistencia a la ampicilina por el gen de resistencia a la apramicina, permitió la obtención de colonias de interés en las que se insertó el plásmido en el genoma mediante recombinación simple. Tras forzar el doble sobrecruzamiento cultivando los transformantes en presencia de sacarosa, se obtuvieron numerosas colonias sensibles a la apramicina, lo que implicaba la pérdida del plásmido. Como se ha mencionado en la sección de Resultados, las pruebas de PCR realizadas para la comprobación de los genotipos de estos posibles mutantes crecidos en sacarosa y sensibles a apramicina resultaron positivas con la pareja de cebadores Myc-03/Myc-04 en los 45 casos analizados. Esto significa que todos los clones estudiados habían revertido al genotipo original, lo que podría indicar cierta letalidad para la eliminación del conjunto de los cuatro genes, *chsE1-E2* y *chsH1-H2*. Sin embargo, el hecho de que fuera posible la eliminación de los genes de dos en dos, *chsE1-E2* por un lado y *chsH1-H2* por el otro (Bernárdez Miranda, 2019), hace dudar de dicha letalidad, más teniendo en cuenta que dichos genes se expresan únicamente en presencia de fitoesteroides y la selección se hace en medio M3, el cual carece de fitoesteroides. Una posibilidad es que al tratar de eliminar un fragmento más grande en nuestro trabajo (3,54 kb) que en el estudio previo (2,17 y 1,37 kb para los mutantes Δ *chsE1-E2* y Δ *chsH1-H2*, respectivamente), la frecuencia de sobrecruzamiento sea mucho mayor en el mismo brazo (revertiendo al genotipo original) que en el segundo (dando lugar a la mutación buscada). Por tanto, sería necesario analizar más clones sensibles a la apramicina para obtener al menos un mutante con los cuatro genes delecionados. Dicho análisis estaba previsto como parte del presente trabajo, pero no pudo

realizarse por establecerse el estado de alarma debido a la COVID-19. La comprobación de los mutantes se realizará en cuanto sea posible.

La segunda parte del trabajo se centró en el análisis de los compuestos producidos por el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*. Dicho mutante no produce AD ni ADD y sí produce numerosos compuestos a partir de fitoesteroles que podrían ser de interés para su uso como precursores esteroideos (Bernárdez Miranda, 2019). Al analizar la fase acuosa del medio de cultivo y compararla con la fase oleica, se observó que la mayoría de los compuestos producidos por la cepa mutante se localizaban en esta última, mientras que en la fase acuosa se detectaba un único compuesto. Las distintas pruebas realizadas para su obtención, mostraron que dicho compuesto puede ser purificado mediante extracción con 1 volumen de diclorometano y posterior evaporación del mismo, obteniendo un producto con una pureza superior al 95 % según se desprende de la integración del área del cromatograma, con menos de un 5 % de contaminación correspondiendo a un pico próximo al principal, probablemente otro compuesto de propiedades similares. Queda pendiente la identificación del compuesto para corroborar si realmente tiene interés industrial como precursor en la síntesis de fármacos esteroideos.

Como conclusión final podemos decir que, aunque no se ha conseguido reducir el número de compuestos esteroideos producidos por los mutantes previos de *M. neoaurum* para facilitar su purificación, sí se ha podido describir un sistema de purificación para uno de los compuestos generados por el mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2*, compuesto localizado en el sobrenadante del cultivo, a diferencia del resto de compuestos, localizados en la fase oleica.

5. CONCLUSIONES

- La sustitución de higromicina por apramicina como marcador de selección resultó ser efectiva para *M. neoaurum* NRRL B-3805. Este antibiótico tiene la ventaja de que no produce problemas de falsos positivos ni se da una pérdida de efectividad del mismo con el tiempo, tal y como ocurre con la higromicina.
- No ha sido posible la obtención de mutantes con la delección de los genes *chsE1-E2* y *chsH1-H2*, bien por una posible letalidad causada por dicha delección o bien por una muy baja frecuencia de sobrecruzamiento en brazos diferentes de la construcción empleada para la mutación.
- El mutante *M. neoaurum* Δ *chsH1-H2* produce numerosos compuestos de interés como producto de la degradación de fitoesteroides, los cuales se localizan casi en su totalidad en la fase oleica tras la fermentación. Sin embargo, uno de ellos se localiza principalmente en la fase acuosa, pudiéndose purificar fácilmente mediante extracción con diclorometano y evaporación del mismo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bernárdez Miranda, C. (2019) *Supresión de la actividad de los genes chsE1-E2 y chsH1-H2 de Mycolicibacterium neoaurum B-3805 para la obtención de nuevos precursores esteroideos*. Trabajo de fin de grado. Universidad de León.
- Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M. y Cabral, J. M. S. (2003) "Microbial conversion of steroid compounds: recent developments", *Enzyme and microbial technology*, 32(6), pp. 688-705.
- Galán, B., García-Fernández, J., Felpeto-Santero, C., Fernández-Cabezón, L. y García, J. L. (2017) "Bacterial metabolism of steroids", en Rojo, F. (ed.) *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils and lipids, handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. 1ªed. Suiza: Springer, pp. 1-22.
- Gilbert, S., Hood, L. y Seah, S. Y. K. (2018) "Characterization of an aldolase involved in cholesterol side chain degradation in *Mycobacterium tuberculosis*", *Journal of bacteriology*, 200(2), pp.1-11.
- Gupta, R. S., Lo, B. y Son, J. (2018) "Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera", *Frontiers in microbiology*, 9(67), pp.1-41.
- Invitrogen (2006) *Vector NTI (Versión 10.3.0 [Programa de ordenador]*. Carlsbad California (EEUU): Invitrogen.
- Liu, W. J. y Lo, C. K. (1997) "Production of testosterone from cholesterol using a single-step microbial transformation of *Mycobacterium* sp", *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 19, pp. 269-272.
- Loraine, J. K. y Smith, M. C. M. (2017) "Genetic techniques for Manipulation of the phytosterol biotransformation strain *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805", en Barredo, J. L. y Herráiz, I. (eds) *Microbial Steroids. Methods in molecular biology*. New York: Humana Press, pp. 93-108.
- Marsheck, W. J., Kraychy, S. y Muir, R. D. (1972) "Microbial degradation of sterols", *Applied microbiology*, 23(1), pp. 72-77.
- Meco López, J. F., Pascual Fuster, V. y Solà Alberich, R. (2016) "La utilización de los esteroides vegetales en la práctica clínica: de la química a la clínica", *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, 28(6), pp.283-294.
- Ouellet, H., Guan, S., Johnston, J. B., Chow, E. D., Kells, P. M., Burlingame, A. L., Cox, J. S., Podust, L. M. y Ortiz de Montellano, P. R. (2010) "*Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one", *Molecular microbiology*, 77(3), pp. 730-742.
- Pelicic, V., Reyrat, J. M. y Gicquel, B. (1996) "Expersion of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on *Mycobacteria*", *Journal of bacteriology*, 178(4), pp.1197-1199.
- Rodríguez-García, A., Fernández-Alegre, E., Morales, A., Sola-Landa, A., Lorraine, J., Macdonald, S., Dovbnya, D., Smith, M. C.M., Donova, M. y Barreiro, C. (2016) "Complete genome sequence of '*Mycobacterium neoaurum*' NRRL B-3805, an androstenedione (AD) producer for industrial biotransformation of sterols", *Journal of biotechnology*, 224, pp. 64-65.
- Thomas, S. T., VanderVen, B.C., Sherman, D. R., Russel, D. G. y Sampson, N. S. (2011) "Pathway profiling in *Mycobacterium tuberculosis*: elucidation of cholesterol-derived catabolite and enzymes that catalyze its metabolism", *Journal of biological chemistry*, 286(51), pp. 43668-43678.
- Volkman J. K. (2003) "Sterols in microorganisms", *Applied microbiology biotechnology*, 60, pp. 495-506.
- Yang, M., Guja, K. E., Thomas, S. T., Garcia-Diaz, M. y Sampson, N. S. (2014) "A distinct MaoC-like enoyl-CoA hydratase architecture mediates cholesterol catabolism in *Mycobacterium tuberculosis*", *ACS chemical biology*, 9, pp. 2632-2645.
- Yang, M., Lu, R., Guja, K. E., Wiperman, M. F., St. Clair, J. R., Bonds, A. C., Garcia-Diaz, M. y Sampson, N. S. (2015) "Unraveling cholesterol catabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: ChsE4-ChsE5 $\alpha_2\beta_2$ acyl-CoA

dehydrogenase initiates β -oxidation of 3-oxo-cholest-4-en-26-oyl CoA”, *ACS infectious diseases*, 1, pp. 110-125.

A handwritten signature in blue ink, reading "Patricia", enclosed within a circular flourish.

Fdo.: PATRICIA FERNÁNDEZ DE LA PUENTE