



universidad  
de león

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Biología Molecular

Área de Bioquímica y Biología Molecular

**Biotransformación de  
esteroides por  
*Aspergillus nidulans*  
y otras especies fúngicas**

**Lidia Ortega de los Ríos**

**León, 2018**





universidad  
de león

La tesis doctoral titulada “Biotransformación de esteroides con *A. nidulans* y otras especies fúngicas”, ha sido dirigida por el **Dr. José Manuel Fernández Cañón** y el **Dr. José María Luengo Rodríguez** y está inscrita al **Programa de Doctorado de Biología Molecular y Biotecnología**, regulado por el Real Decreto 99/2011.



# BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES POR *Aspergillus nidulans* Y OTRAS ESPECIES FÚNGICAS

## Contenido

Abreviaturas.....	VI
-------------------	----

## INTRODUCCIÓN

<b>1. Esteroides.....</b>	<b>3</b>
1.1. Definición .....	3
1.2. Tipos y funciones.....	3
1.2.1. Esteroles .....	3
1.2.2. Hormonas esteroideas.....	5
1.2.3. Ácidos biliares.....	8
1.2.4. Vitamina D o calciferol y derivados.....	9
1.3. Formación y síntesis en mamíferos .....	9
1.4. Distribución de los esteroides en la naturaleza.....	12
1.4.1. En organismos inferiores:.....	12
1.4.1.1. Bacterias.....	12
1.4.1.2. En hongos.....	13
1.4.2. En organismos superiores .....	14
1.4.2.1. Plantas.....	14
1.4.2.2. Distribución en animales no mamíferos .....	15
1.5. Aplicaciones en la industria farmacéutica .....	15
1.5.1. Como antiinflamatorios.....	16
1.5.2. Como inmunosupresores.....	17
1.5.3. Como anticonceptivos.....	17
1.5.4. Como factores terapéuticos hormonales .....	18
1.5.5. Usos frente al cáncer.....	18
1.5.6. Otros usos .....	19
<b>2. Síntesis de esteroides por la industria farmacéutica.....</b>	<b>20</b>
2.1. Historia de la síntesis de fármacos.....	20
2.2. Procesos empleados para la obtención de compuestos terapéuticos.....	20

2.2.1.	Extracción biológica .....	21
2.2.2.	Síntesis química o modificación química .....	21
2.2.3.	Biotransformación .....	21
2.2.3.1.	Biotransformaciones realizadas con especies silvestres y con otras especies modificadas genéticamente .....	22
2.2.4.	Ventajas e inconvenientes de los diferentes tipos de síntesis.....	23
2.3.	Obtención de esteroides en la actualidad .....	24
<b>3.</b>	<b>Empleo de <i>Aspergillus nidulans</i> y otras especies fúngicas en la síntesis de esteroides .....</b>	<b>27</b>
3.1.	Uso de microorganismos en la industria.....	27
3.1.1.	Historia.....	27
3.1.2.	Microorganismos más relevantes en la síntesis de esteroides .....	28
3.2.	<i>Aspergillus nidulans</i> .....	30
3.2.1.	Uso en ingeniería genética .....	30
3.1.1.	Descripción .....	31
3.1.2.	Aplicaciones para la obtención de esteroides.....	32
3.3.	Otras especies fúngicas .....	32
3.3.1.	<i>Aspergillus ochraceus</i> .....	32
3.3.2.	<i>Rhizopus oryzae</i> .....	33
3.3.3.	<i>Cochliobolus lunatus</i> .....	34
3.4.	Otros microorganismos de interés.....	35
<b>4.</b>	<b>Citocromos P450, CYP450.....</b>	<b>36</b>
4.1.	Definición, descripción y principales características .....	36
4.2.	Citocromos P450 más relevantes en la síntesis de esteroides.....	38

#### HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

<b>1</b>	<b>Hipótesis de trabajo.....</b>	<b>45</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>47</b>

#### MATERIALES Y MÉTODOS

<b>1.</b>	<b>Microorganismos .....</b>	<b>51</b>
1.1.	Bacterias: .....	51
1.1.1.	<i>E. coli</i> .....	51
1.1.2.	Otras cepas bacterianas empleadas.....	51

1.1.3.	Condiciones y medios de crecimiento .....	51
1.2.	Hongos .....	52
1.2.1.	<i>Aspergillus nidulans</i> .....	52
1.2.1.1.	Cepa silvestre .....	52
1.2.1.2.	Cepa yA2, pyroA4, pantoB100 .....	52
1.2.1.3.	Cepa nkuAΔ.....	52
1.2.1.4.	Cepas transformantes.....	52
1.2.2.	<i>Aspergillus ochraceus</i> .....	54
1.2.3.	<i>Cochliobolus lunatus</i> .....	55
1.2.4.	<i>Rhizopus oryzae</i> .....	55
1.2.5.	Medios de crecimiento .....	55
1.2.5.1.	Medio mínimo líquido (MML).....	55
1.2.5.2.	Medio mínimo sólido (MMS).....	55
1.2.5.3.	Medio de esporulación .....	55
1.2.5.4.	Medio de fermentación .....	56
1.2.5.5.	Medio de regeneración.....	56
1.2.6.	Condiciones de crecimiento.....	56
<b>2.</b>	<b>Obtención, manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....</b>	<b>57</b>
2.1.	Obtención de DNA .....	57
2.1.1.	DNA plasmídico.....	57
2.1.2.	A partir de cultivos bacterianos .....	57
2.1.3.	A partir de cultivos fúngicos.....	57
2.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	58
2.3.	Oligonucleótidos.....	58
2.4.	Digestión y ligación .....	59
2.5.	Electroforesis en geles de agarosa .....	59
2.5.1.	Tampón de carga .....	59
2.6.	Obtención de RNA .....	59
2.6.1.	Obtención de RNA total.....	59
2.6.2.	Obtención de RNA mensajero.....	60
2.7.	Síntesis de cDNA.....	60
2.7.1.	De cadena sencilla.....	60
2.7.2.	De doble cadena.....	60
2.8.	Transformación de microorganismos .....	60
2.8.1.	Transformación de <i>E. coli</i> .....	60

2.8.2. Transformación fúngica .....	61
2.9. Secuenciación del ADN .....	62
2.10. Herramientas bioinformáticas.....	62
<b>3. Fermentaciones.....</b>	<b>63</b>
3.1. Condiciones.....	63
3.2. Toma y análisis de muestras.....	63
3.2.1. Extracción .....	63
3.2.2. Análisis por HPLC.....	63
3.2.2.1. Patrones .....	64
<b>4. Expresión y clonación de diferentes genes .....</b>	<b>66</b>
4.1. Transformación dirigida en <i>A. nidulans</i> .....	66
4.1.1. Plásmidos empleados.....	66
4.1.2. Genes objeto de estudio en <i>A. nidulans</i> .....	69
4.1.3. Estrategia seguida para la clonación de genes en <i>A. nidulans</i> .....	70
4.1.4. Selección de transformantes.....	70
4.1.5. Análisis de la expresión .....	71
4.2. Clonación e identificación de proteínas.....	71
4.2.1. Hibridación supresivo-substractiva (SSH).....	71
4.2.1.1. Procedimiento .....	73
4.2.2. Comprobación de los genes candidatos.....	76
4.2.2.1. Realización de KO: PCR de fusión .....	76

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>1. Biotransformaciones de esteroides con cepas silvestres fúngicas.....</b>	<b>81</b>
1.1. <i>Aspergillus nidulans</i> .....	81
1.2. <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	84
1.3. <i>Rhizopus oryzae</i> .....	85
1.4. <i>Cochliobolus lunatus</i> .....	86
1.5. Comparación de la actividad de las cepas silvestres .....	87
<b>2. Obtención de una cepa recombinante de <i>A. nidulans</i> capaz de eliminar la cadena lateral en el C17 del colesterol o fitoesteroides .....</b>	<b>89</b>
2.1. Introducción de CYP11A1 y CYP17A1.....	89
2.2. Introducción de CYP125A3 y CYP142A2 .....	94
<b>3 Clonación de la esteroide 11<math>\alpha</math>-hidroxilasa de <i>Aspergillus spp.</i>.....</b>	<b>97</b>
3.1 Clonación de la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	97

3.1.1	Hibridación Supresivo-Substractiva (SSH).....	97
3.1.2	Elaboración de un KO: PCR de fusión.....	100
3.1.3	Reversión de la actividad.....	103
3.2	Clonación del gen que codifica la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa en <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	105
3.2.1	Identificación de la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de <i>A. ochraceus</i> .....	106
<b>4</b>	<b>Estudio de otras enzimas con actividad esteroide 11-hidroxilasas de otros hongos y su expresión en la cepa KO de <i>A. nidulans</i>.....</b>	<b>113</b>
4.1	Esteroido 11-hidroxilasa de <i>A. ochraceus</i> : CYP68AQ1 y CYP68L8.....	113
4.2	Esteroido 11-hidroxilasa de <i>Rhizopus oryzae</i> : CYP509C12 .....	118
4.3	Esteroido 11-hidroxilasa de <i>Cochliobolus lunatus</i> : CYP103168.....	121
4.4	Comparación de los resultados obtenidos tras expresar los cuatro citocromos en la cepa KO .....	123
<b>5</b>	<b>Expresión en <i>A. nidulans</i> de otras enzimas esteroideas de interés comercial ...</b>	<b>125</b>
5.1	17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa .....	125
5.1.1	17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	125
5.1.2	17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de <i>Cochliobolus lunatus</i> .....	127
5.2	3 $\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa.....	129
5.2.1	3 $\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa de <i>R. ruber</i> Chol-4 .....	130
5.2.2	3 $\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa de <i>P. putida</i> DOC21 .....	131
5.3	3 $\beta$ -hidroxiesteroide- $\Delta$ 5-deshidrogenasa de <i>A. nidulans</i> .....	133
 <b>CONCLUSIONES</b>		
	Conclusiones.....	139
 <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		
	Referencias bibliográficas.....	143

## Abreviaturas

11OHAD – 11-hidroxi-androstenediona	Kb – kilobases (1000 pares de bases)
11OHProg – 11-hidroxi-progesterona	KO – <i>Knock-out</i>
9OHAD – 9-hidroxi-androstenediona	KstD – $3\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2- deshidrogenasa, tipo D
AD – androstenediona, 4-androstene- 3,17-diona	KstH - $3\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa tipo H.
ADD – androstenedienediona, androsta- 1,4-diene-3,17-diona	Kv - kilovoltio
API – <i>active pharmaceutical ingredient</i> ,	LB – Luria-Bertani
cDNA – DNA complementario	LDL – <i>low-density-lipoprotein</i> , lipoproteína de baja densidad
CECT – Colección Española de cultivos- tipo	min – minuto(s)
Cn – carbono n°	MML – medio mínimo líquido
CPHF: ciclopentanoperhidrofenantreno	MMS – medio mínimo sólido
CSIC – Centro Superior de Investigaciones Científicas.	MR – medio de regeneración
CYP – citocromo P450	MS – <i>mass spectrometry</i> , espectrometría de masas
DHEA – dehidroepiandrosterona.	MW – <i>molecular weight</i> , marcador de pesos moleculares
DHT - dihidrotestosterona	NAD - nicotinamida adenina dinucleótido
DNA – ácido desoxirribonucleico	NADP - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
dNTPs – desoxirribonucleótidos	OH – hidroxi, hidroxilo
EAA - esteroides anabólicos androgénicos	pb – pares de bases
FDA – <i>Food and Drug Administration</i> , Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU.	PCR – <i>polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
Fig. - Figura	Prog - progesterona
GMP – <i>genetically manipulated microorganism</i>	RNA – ácido ribonucleico
GPD – gliceraldehído-3-fosfato- deshidrogenasa	mRNA – ácido ribonucleico mensajero
H <sup>+</sup> - proton	RT-PCR – retrotranscriptasa-PCR
HDL – <i>high-density-lipoprotein</i> , lipoproteína de alta densidad.	scc – <i>side chain cleavage</i> , escisión de la cadena lateral
HPLC – <i>High Performance Liquid Chromatography</i> , cromatografía líquida de alta afinidad.	SSH – Supressive Subtractive Hybridization, hibridación supresivo-substractiva.
HSD – hidroxesteroide deshidrogenasa	TR – tiempo de retención
	UPLC-MS – <i>Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>





# INTRODUCCIÓN

---

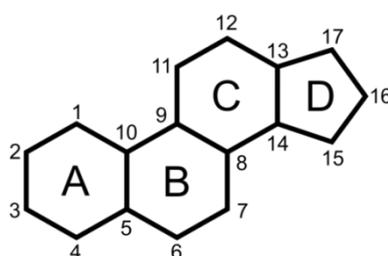
---



## 1. Esteroides

### 1.1. Definición

Los esteroides son un conjunto de lípidos terpenoides derivados del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (en adelante, CPHF) o esterano, que consta de tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano fusionados y nombrados con las letras A, B, C y D (**Fig. 1**) (IUPAC, 1989). A partir de esta estructura básica y mediante la adición de grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo o metilo, entre otros, o bien mediante la formación de dobles enlaces, se forman todas las moléculas de esteroides conocidos. Sus funciones, muy variadas y de gran importancia biológica, les dotan de una relevancia farmacológica y comercial destacada (Watanabe y Hamamura, 2003).



**Fig. 1.** Estructura química del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (CPHF).

El término esteroide fue acuñado en 1936 por Callow para referirse genéricamente a un grupo de compuestos que incluía los esteroides, los ácidos biliares, los cardiotóxicos, las saponinas y las hormonas sexuales (Callow, 1936).

### 1.2. Tipos y funciones

Bajo la denominación de esteroides se agrupan diferentes moléculas, entre las que destacan, por sus funciones, los esteroides, las hormonas esteroideas, los ácidos biliares y la vitamina D.

#### 1.2.1. Esteroides

Los esteroides son un tipo de esteroides que mantienen la estructura del colestano, es decir, el núcleo CPHF con una cadena lateral de ocho átomos de carbono en posición 17 y que poseen, además, un grupo hidroxilo en el carbono 3 (**Fig. 2**). Se trata de compuestos solubles en disolventes orgánicos debido a su hidrofobicidad, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y cuya principal función es la de estabilizar las membranas celulares de animales (colesterol), plantas (fitoesteroides), levaduras y hongos filamentosos (ergosterol) (Fernandes y Cabral, 2007; Hannich et al., 2011).

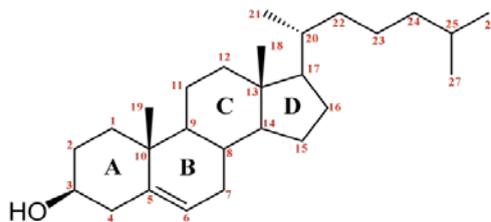


Fig. 2. Estructura química del **colesterol**.

Dentro de esta familia de compuestos, el estero por excelencia es el colesterol (3-hidroxi-5,6-colesteno) (IUPAC, 1989). Se trata de un alcohol policíclico derivado del escualeno que consta de 27 átomos de carbono y que posee un grupo hidroxilo en el carbono 3, en configuración  $\beta$  (Fig. 2). El colesterol, además de ser un estabilizador de la membrana de las células animales (Bloch, 1965, 1983), sirve como precursor de las hormonas esteroideas, de los ácidos biliares y de la vitamina D y de sus derivados (Björkhem y Eggertsen, 2001). En la Fig. 3 se representan los distintos tipos de moléculas de las que es precursor el colesterol.

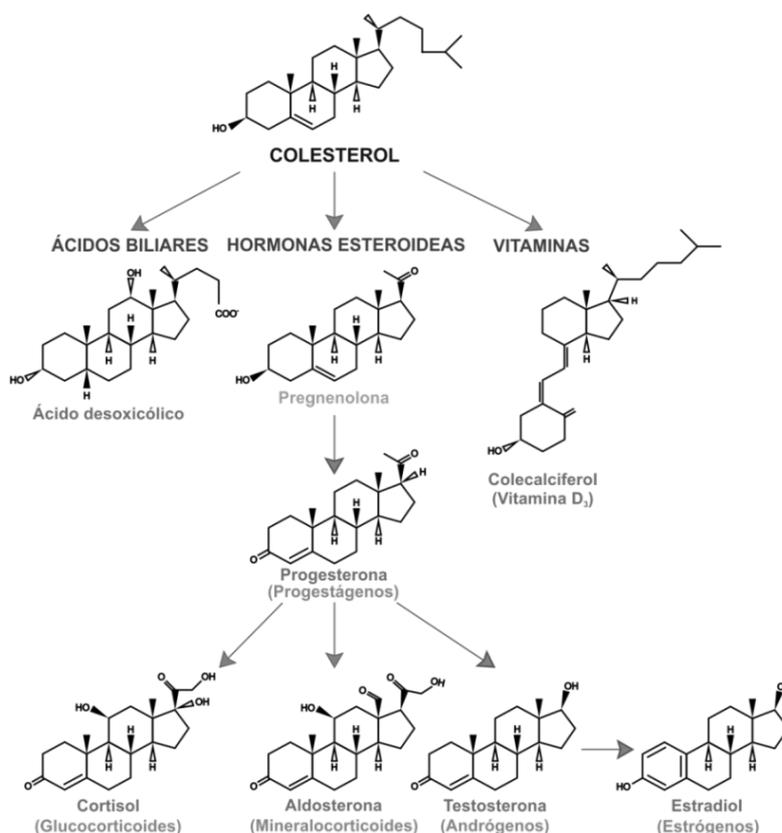


Fig. 3. El colesterol como precursor de otras moléculas de interés biológico (Merino García, 2015)

El colesterol se transporta en el plasma en forma de ésteres asociados a las lipoproteínas. En función de la densidad de las lipoproteínas a las que se une, los complejos de colesterol se denominan LDL (*low density lipoproteins*, en la que el colesterol va asociado a proteínas de baja densidad), y HDL (*high density lipoproteins*,

donde el colesterol está acompañado con proteínas de alta densidad). Las LDL se encargan de distribuir el colesterol desde el hígado al resto de tejidos, de manera que cuando existe un exceso de este tipo de colesterol en plasma, éste puede adherirse a las paredes de las arterias dando lugar a un estrechamiento de las mismas (arterioesclerosis) (Ginter y Simko, 2013); motivo por el que estos complejos son denominados vulgarmente como “colesterol malo”. Por el contrario, las HDL se encargan de transportar el colesterol desde diversos tejidos hasta el hígado, donde será eliminado. Por esta razón, a este tipo de complejos se les conoce como “colesterol bueno”.

En la industria farmacéutica, el colesterol procedente de la grasa de cerdo o de vaca ha sido uno de los precursores empleados para la obtención de esteroides de interés comercial. Sin embargo, como consecuencia de la crisis producida por la encefalopatía esponjiforme bovina (popularmente conocida como crisis de las vacas locas), su uso fue restringido por la FDA y, actualmente, ha sido sustituido por fitoesteroles procedentes de fuentes baratas tales como la soja y el pino, o por determinadas sapogeninas (diosgenina, hecogenina o solasodina) (Bhatti y Khera, 2012).

Los fitoesteroles (esteroles de origen vegetal) más comunes son el  $\beta$ -sitosterol, el estigmasterol y el campesterol (Fig. 4) (Akihisa *et al.*, 1991).

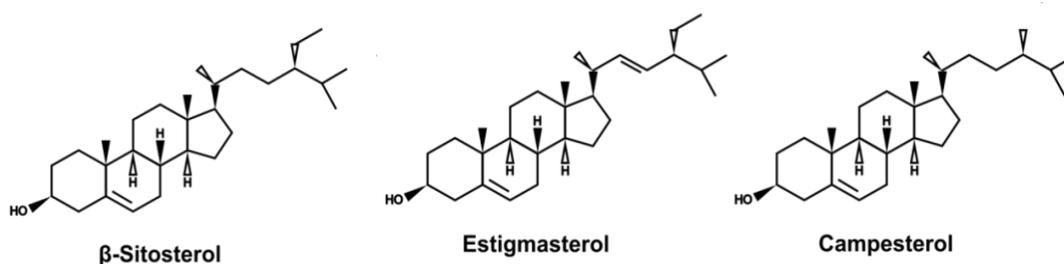


Fig. 4. Fitoesteroles más comunes.

### 1.2.2. Hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas son un conjunto de compuestos biológicos sintetizados en mamíferos a partir del colesterol con un importante papel fisiológico. Atendiendo a sus funciones, las hormonas esteroideas se clasifican en tres grupos (Wang *et al.*, 2011): corticosteroides, hormonas sexuales y esteroides anabolizantes.

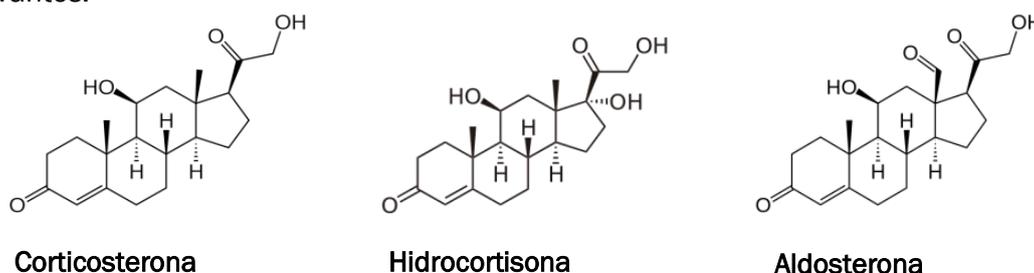
Los corticosteroides son un amplio grupo de hormonas esteroideas que se sintetizan mayoritariamente en las glándulas adrenales de mamíferos. De acuerdo con

sus funciones fisiológicas se distinguen dos grupos: glucocorticoides y mineralocorticoides.

Los glucocorticoides desempeñan funciones destacadas en la regulación del metabolismo y de la respuesta inmune. Entre los glucocorticoides cabe mencionar la corticosterona o la hidrocortisona (también denominado cortisol) cuya principal función es la de secretarse en respuesta al estrés, incrementando el nivel de glucosa en sangre, estimulando el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas y deprimiendo al sistema inmune. Para la industria farmacéutica este grupo resulta de gran interés por sus aplicaciones como antiinflamatorios e inmunosupresores (Hogg, 1992).

Los mineralocorticoides, por su parte, participan en el control de la presión sanguínea y de la homeostasis (Donova y Egorova, 2012). Su representante más importante es la aldosterona y, junto con sus formas sintéticas, pueden resultar atractivos por sus funciones como antidiuréticos.

En la **Fig. 5** se representa la estructura química de los corticosteroides más relevantes.



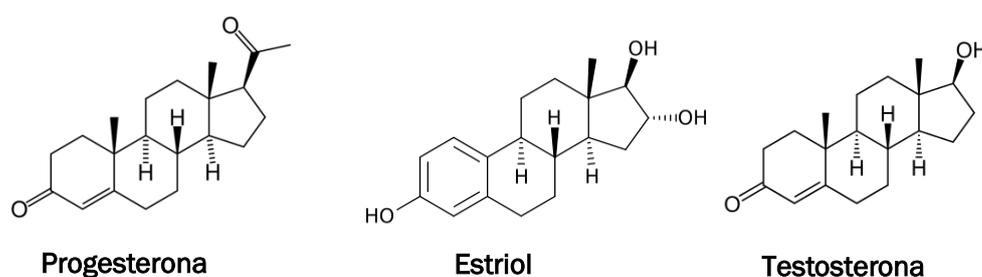
**Fig. 5.** Estructura química de los principales corticosteroides.

En cuanto a las hormonas sexuales, éstas son secretadas mayoritariamente en las gónadas, aunque también lo hacen en las glándulas adrenales e hígado. Dentro de este grupo se incluyen las hormonas femeninas y las hormonas masculinas.

Las hormonas femeninas, conocidas con este nombre por tener efecto feminizante, están involucradas en el ciclo estral y en la gestación. A pesar de aparecer mayoritariamente en las hembras también son sintetizadas por los machos, aunque a concentraciones muchísimo menores. Este grupo está integrado por los progestágenos, de las cuales la progesterona es la más importante, y los estrógenos, cuyo representante es el estradiol junto con su metabolito estriol (Callewaert *et al.*, 2010).

Dentro de los andrógenos u hormonas sexuales masculinas, merecen citarse la testosterona, que es la hormona masculina por excelencia, y otras tales como la androstenediona (AD, 4-androstene-3,17-diona), la dehidroepiandrosterona (DHEA) o los esteroides anabolizantes (Callewaert *et al.*, 2010), que constituyen otro grupo funcional de hormonas esteroideas.

Los esteroides de naturaleza sexual poseen interés farmacéutico puesto que se pueden utilizar como anticonceptivos, en terapias hormonales o para tratar algunas formas de cáncer de mama o de próstata (Wang *et al.*, 2007). En la **Fig. 6** están representadas las principales hormonas sexuales.



**Fig. 6.** Estructura química de los representantes de las hormonas sexuales.

En último lugar, los esteroides anabolizantes, o mejor denominados esteroides anabólicos androgénicos (EAA), son un grupo de esteroides derivados de la testosterona, cuyas actividades virilizantes se ven atenuadas en favor de las anabolizantes. Este grupo está constituido por compuestos que activan el anabolismo y que potencian la musculación, fundamentalmente el desarrollo de músculo esquelético (Fragkaki *et al.*, 2009). Por este motivo, pueden ser empleados para conseguir una hipertrofia e hiperplasia muscular (Vázquez-Mourelle *et al.*, 2015). Este tipo de práctica se realizaba para el engorde fraudulento del ganado, principalmente vacuno (Fuh *et al.*, 2004), y, en el ser humano, para conseguir una hipertrofia muscular. El uso de este tipo de sustancias en el hombre y en el ganado está prohibido en la Unión Europea, ya que la ingesta de carne tratada con anabolizantes puede contener residuos de estas hormonas que originen efectos nocivos para la salud. Entre los efectos adversos derivados de la toma artificial de este tipo de compuestos destaca la génesis de dihidrotestosterona (DHT) y de estrógenos, debido a la aromatización de los derivados de la testosterona (Fragkaki *et al.*, 2009; Vázquez-Mourelle *et al.*, 2015). La DHT es considerada como la responsable de la hipertrofia prostática benigna, de algunas formas de alopecia y acné y de la agresividad. Por su parte, la formación de estrógenos acarrea consigo la retención de líquidos, hipertensión arterial, ginecomastia y atrofia

testicular. No obstante, debido a sus propiedades anticatabólicas y de mejora de la utilización proteica, los esteroides anabolizantes presentan aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de quemados, inmovilizados y de otros pacientes que, al estar debilitados, podrían sufrir atrofia muscular.

### 1.2.3. Ácidos biliares

Los ácidos biliares (ABs) son compuestos derivados del colesterol que poseen en el C17 una cadena alifática ramificada constituida por cinco átomos de carbono terminada en un grupo carboxilo y que, además, pueden incorporar sobre su molécula grupos hidroxilos en diferentes posiciones en configuración  $\alpha$ . Entre los ABs destacan el ácido cólico, el ácido desoxicólico, el ácido quenodesoxicólico y el ácido litocólico (Fig. 7).

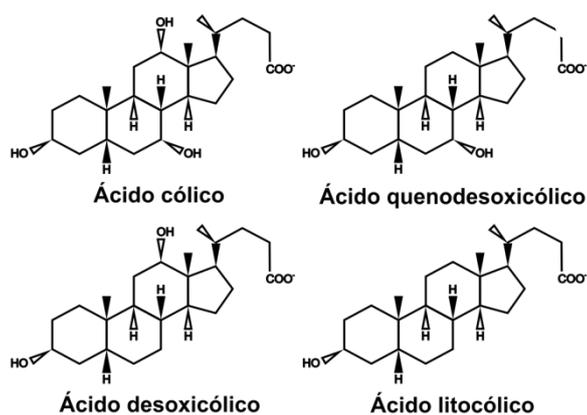


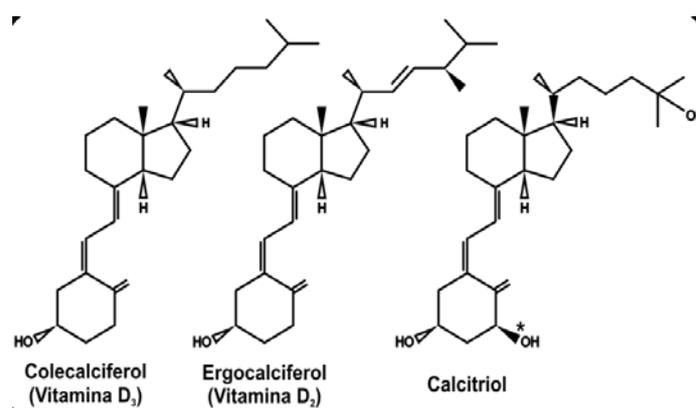
Fig. 7. Principales ácidos biliares sintetizados en el ser humano.

Los ABs son sustancias con importantes funciones fisiológicas, ya que forman sales que actúan como detergentes en el intestino delgado, emulsionando las grasas y permitiendo la acción de las lipasas pancreáticas para que puedan ser absorbidas en el intestino (Wollam y Antebi, 2011). Además, al ser el colesterol su único precursor, los ABs constituyen una posible vía de eliminación del exceso de colesterol a través de las heces (Russell, 2003). Este mecanismo previene la acumulación de triglicéridos y, por tanto, la aparición de lesiones en el hígado y en la vesícula biliar. Por otra parte, los ácidos biliares son reguladores del metabolismo de la glucosa y de la homeostasis de los lípidos y desempeñan un papel importante en la lucha contra determinados agentes infecciosos gastrointestinales (Li y Chiang, 2012). En cuanto a su aplicación en la industria farmacéutica, se ha comprobado que algunos ácidos biliares pueden ser utilizados para tratar algunas enfermedades crónicas del hígado, la obesidad o, incluso, para la diabetes. Actualmente, se están fabricando vacunas por Ingeniería Genética a partir de cepas de *Salmonella* (Typhimurium y Enteritidis) en las que se

modifica su sensibilidad a los ABs para mejorar la situación sanitaria en la producción primaria (avicultura, principalmente) (Paterson *et al.*, 2009).

#### 1.2.4. Vitamina D o calciferol y derivados

Finalmente, la vitamina D o calciferol es un esteroide que puede obtenerse mediante la ingesta de alimentos que la contengan (huevos o leche) o por síntesis, a partir del colesterol en animales, o del ergosterol en plantas. Se trata de una protohormona, es decir, una molécula sin actividad hormonal que necesita ser transformada en la molécula activa (calcitriol) mediante un mecanismo complejo en el que interviene la luz solar (Nelson y Cox, 2004). En la **Fig. 8** se muestran la vitamina D<sub>2</sub>, la vitamina D<sub>3</sub> y el calcitriol.



**Fig. 8.** La vitamina D y sus derivados.

El calcitriol regula los niveles de calcio en riñones y huesos, controla los niveles de calcio y fósforo en sangre y promueve la reabsorción de los mismos a nivel renal e intestinal. También contribuye, junto con la paratohormona, a la mineralización ósea y a la formación del esqueleto. Por este motivo, la deficiencia de vitamina D dificulta el paso de calcio a los huesos, causando enfermedades como el raquitismo en niños (patología caracterizada por una extrema debilidad de los huesos, la deformación de los mismos y, muy frecuentemente, osteoporosis) (Soliman *et al.*, 2013).

### 1.3. Formación y síntesis en mamíferos

La esteroidogénesis o síntesis de esteroides hace referencia únicamente a la síntesis de hormonas esteroideas, que debido a su riqueza funcional es el grupo que posee más aplicaciones desde el punto de vista farmacéutico. A pesar de ello, la síntesis de otro tipo de esteroides, como la del colesterol o de los ácidos biliares sigue un mecanismo paralelo. Para que tenga lugar la esteroidogénesis, se precisa de la síntesis previa de colesterol. Ésta puede acaecer en cualquier célula del organismo pero suele producirse en hepatocitos, corteza adrenal, piel, intestino y arteria aorta.

Esta síntesis entraña un proceso complejo que comienza a partir de moléculas simples tales como el isopreno (Hanukoglu, 1992).

La síntesis de las hormonas esteroideas se lleva a cabo, principalmente, en las glándulas adrenales (suprarrenales en el hombre) y en las gónadas. No obstante, su síntesis también es significativa en otros tejidos como el hepático. La esteroidogénesis se inicia por la acción de ciertos factores intracelulares que dan pie a la hidroxilación y transporte del colesterol hacia la mitocondria de las células que componen los órganos productores. Allí, sufre una eliminación parcial de la cadena alifática situada en el carbono 17 del anillo D, formando pregnenolona (**Fig. 9**). Esta reacción está catalizada por un citocromo mitocondrial P450 (CYP450), denominado en humanos CYP11A1 (también conocido como P450<sub>scc</sub>, por sus siglas en inglés de *side-chain cleavage*) (Halkerston *et al.*, 1961; Ichii *et al.*, 1965). Las reacciones de síntesis de progestágenos, andrógenos y estrógenos a partir de pregnenolona transcurren en el retículo endoplásmico. Sin embargo, la formación de glucocorticoides y mineralocorticoides se lleva a cabo en la mitocondria (Hanukoglu, 1992; Black *et al.*, 1994). Una vez sintetizadas, salen de las células y son transportadas en sangre generalmente unidas a un transportador proteico específico.

Entre las reacciones que trascurren para originar las diferentes hormonas esteroideas destacan (**Fig. 9**):

- Deshidrogenación del grupo hidroxilo del C3/C17. Ésta es una reacción que se precisa para generar un grupo ceto y que está catalizada por la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) y por la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD).
- Hidroxilaciones, en configuración alfa o beta, en distintas posiciones (C17, C11, C21 y otras).
  - o Este tipo de reacciones permite la funcionalización de los esteroides, dotando a los compuestos de mayor polaridad, lo que repercute en su toxicidad, distribución y mecanismos de excreción. Las hidroxilaciones más importantes en la actualidad para la industria de los esteroides son aquellas que introducen grupos -OH en 7 $\alpha$ , 9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 16 $\alpha$  y 17 $\alpha$ .
- Un tercer grupo de reacciones son las que incluyen aquellas responsables de la aromatización de andrógenos (para dar lugar a estrógenos), o las

catalizadas por la 17,20-lyasa que permite pasar, por ejemplo, de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona a androstenediona.

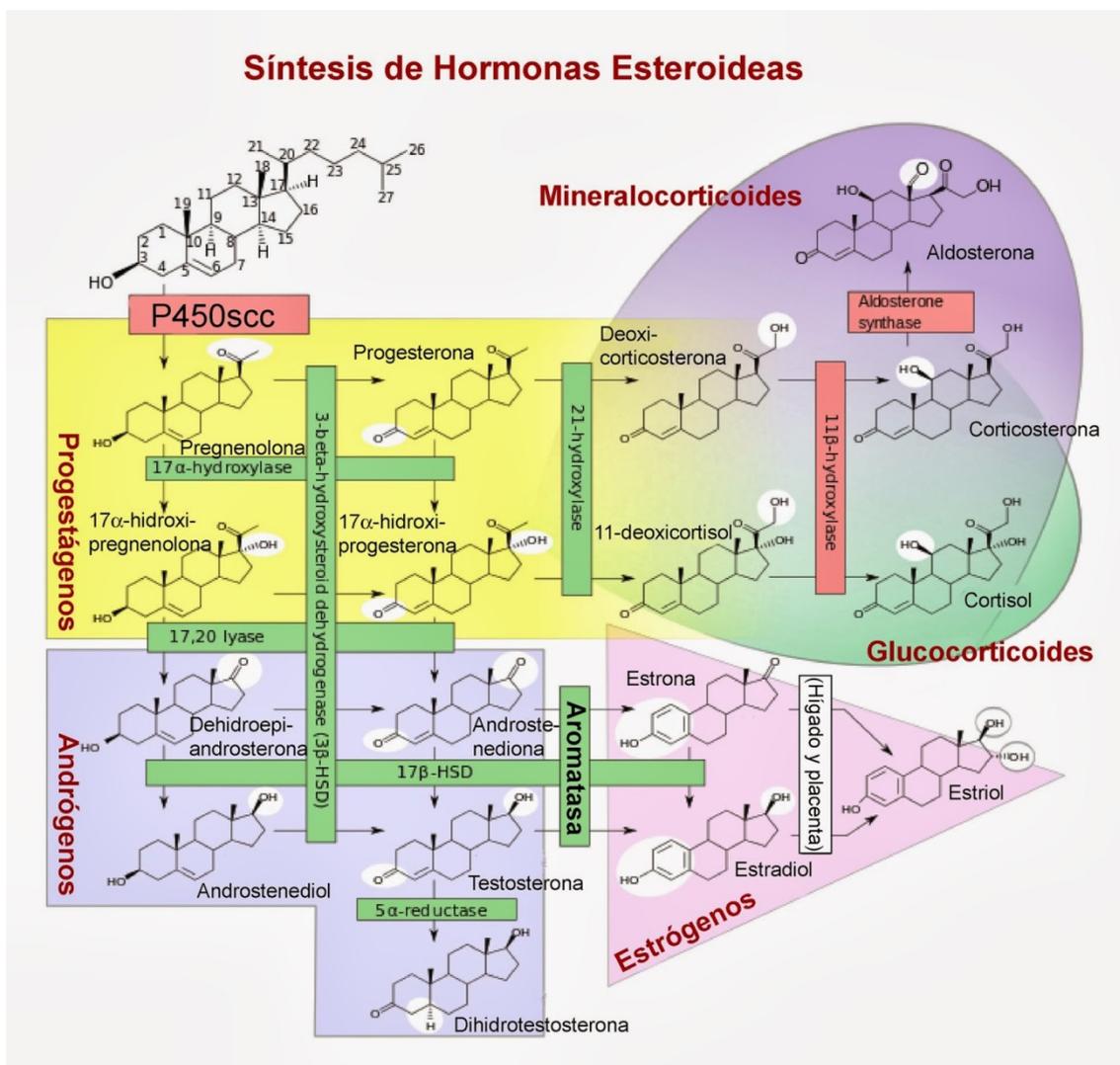


Fig. 9. Esquema que reúne la síntesis de las hormonas esteroideas en mamíferos (Hanukoglu, 1992).

Es interesante señalar que las distintas reacciones que trascurren mediante mecanismos regio- y estereoespecíficos resultan cruciales a la hora de dotar a los compuestos de propiedades farmacológicas. Así, la introducción de un grupo hidroxilo en la posición 11 es esencial para la actividad antiinflamatoria; igualmente, la presencia de un grupo hidroxilo en posición 17 confiere de propiedades androgénicas y la aromatización del anillo A del núcleo esterano posibilita los efectos estrogénicos (Fragkaki *et al.*, 2009; Donova y Egorova, 2012). Las reacciones que conducen a la síntesis de hormonas esteroideas son llevadas a cabo por citocromos P450. En la

**Tabla 1** se recogen los CYP450 que participan en distintas reacciones para introducir modificaciones en el anillo CPHF.

**Tabla 1:** CYP450 encargados de introducir modificaciones sobre el anillo CPHF en humanos.

Nombre del CYP	Actividad sobre el núcleo de esterano	Localización	Referencia
CYP11A1	20,22-desmolasa (escisión de la cadena lateral)	Membrana mitocondrial de distintos tejidos	(Halkerston et al., 1961; Hanukoglu, 1992)
CYP11B1 CYP11B2	11 $\beta$ -hidroxilasa, 18-hidroxilasa, 18-metiloxidasa	Membrana interna mitocondrial de la corteza adrenal / zona glomerulosa	(Hanukoglu et al., 1981)
CYP17A1	17-hidroxilasa, 17,20-liasa	Retículo endoplásmico de la corteza adrenal	(Barnes et al., 1991)
CYP21A1	21-hidroxilasa	Retículo endoplásmico de la corteza adrenal	(Ryan y Engel, 1957)
CYP19A	Aromatasa	Retículo endoplásmico de las gónadas, el cerebro y el tejido adiposo, entre otros.	(Ghosh et al., 2009)

## 1.4. Distribución de los esteroides en la naturaleza

### 1.4.1. En organismos inferiores:

#### 1.4.1.1 Bacterias

Las bacterias no suelen emplear esteroides como estabilizadores de sus membranas. Sin embargo, algunos miembros del género *Trypanosoma*, de forma excepcional, son capaces de sintetizar este tipo de esteroides y esa ruta ha sido empleada como blanco terapéutico para combatir enfermedades producidas por *Trypanosomas spp.* (por ejemplo, la enfermedad de Chagas) (Dixon et al., 1972; Croft et al., 2005; Zhou et al., 2007). Otras bacterias, en lugar de esteroides, utilizan un tipo distinto de triterpenos pentacíclicos denominados hopanoides, derivados del escualeno y de estructura similar a los esteroides, tal y como se refleja en la **Fig. 10**. Su presencia ha sido descrita en algunas especies como *Methylococcus capsulatus* (Bird et al., 1971) y en miembros pertenecientes al género *Staphylococcus* (Hayami et al., 1979).

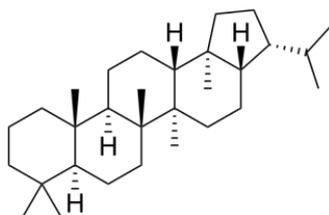


Fig. 10. Estructura molecular del diplopteno, un ejemplo de hopanoide.

#### 1.4.1.2. En hongos

La presencia de esteroides en hongos no ha sido muy estudiada y está prácticamente restringida a la presencia de determinados esteroides con función análoga a la ejercida por el colesterol en animales. Así, el esteroide fúngico por excelencia es el ergosterol (Fig. 11), también producido por plantas (Akihisa *et al.*, 1991; Hannich *et al.*, 2011). Este esteroide aparece en la membrana de las células de hongos desempeñando una función estructural, razón por la que, al no existir este compuesto en animales, sirve como diana terapéutica para la lucha de ciertas micosis.

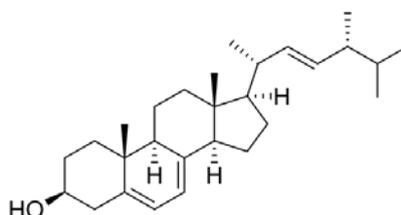


Fig. 11. Estructura química del ergosterol.

Por otra parte, se ha descrito que la mayoría de las hormonas sexuales de los hongos son precursores esteroideos (isoprenoides o terpenos). Dentro de este grupo se incluyen la sirenina, el ácido trispórico, el anteridiol y el oogoniol. Estos dos últimos, además, son constituyentes de la membrana celular y se cree que actúan como factores de crecimiento (Griffin, 1994).

Asimismo, algunas especies de hongos endofíticos (que crecen interactuando con determinadas plantas) han desarrollado la capacidad de sintetizar moléculas de interés farmacológico al igual que sus plantas hospedadoras. Entre las funciones que presentan estas sustancias se incluyen actividades antimicrobianas, citotóxicas o insecticidas (Zhao *et al.*, 2011). Algunos de estos compuestos, como ocurre con la diosgenina, son de origen esteroideo, y debido a su similitud estructural con las hormonas esteroideas constituye, junto con los fitoesteroides, la molécula de partida en la mayoría de procesos industriales dirigidos a la obtención de esteroides con interés farmacéutico (Balandrin, 1996).

## 1.4.2. En organismos superiores

### 1.4.2.1. Plantas

Como ya se ha mencionado, las plantas poseen esteroides estructurales semejantes al colesterol, denominados fitoesteroides. Entre los más importantes se encuentran el  $\beta$ -sitosterol, el estigmasterol y el campesterol (Fernandes y Cabral, 2007). Estas moléculas son empleadas por la industria farmacéutica para la obtención de esteroides de interés comercial debido a su escaso coste y a la gran disponibilidad de los vegetales a partir de los que se obtienen (soja y pino, principalmente).

Por otra parte, se han descrito un gran número de metabolitos secundarios que son sintetizados por diversas especies vegetales y cuya estructura es de naturaleza esteroidea. Algunos de los más representativos son los brasinoesteroides, los alcaloides esteroideos o los glicósidos esteroideos.

En primer lugar, los brasinoesteroides son considerados las hormonas vegetales y entre sus funciones se encuentran el desarrollo y diferenciación de tejidos vasculares y reproductivos o la participación en la floración, senescencia y fotomorfogénesis (Clouse y Sasse, 1998; Bajguz, 2007). Otro de los grupos de esteroides vegetales son los glicósidos esteroideos. Dentro de este grupo se incluyen las saponinas y los glicósidos cardiotónicos. Las saponinas son los esteroides más numerosos del reino vegetal y entre las especies capaces de sintetizarlos se incluyen el ajo, el espárrago, la berenjena, el pimiento o el tomate. Estos compuestos, sin embargo, no son exclusivos de los vegetales, ya que también se encuentran en algunos animales como los equinodermos. Todas las saponinas poseen una elevada capacidad detergente si bien su función no ha sido bien establecida, aunque existen evidencias acerca de sus propiedades antimicrobianas, insecticidas y antifúngicas (Francis *et al.*, 2002). Dentro de este grupo se encuentran algunos ginsenosídeos como la dioscina (Fig. 12), presente en varios tubérculos de diferentes especies de ñame (género *Dioscorea*).

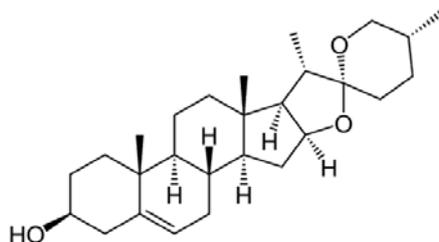


Fig. 12. Estructura química de la diosgenina, saponina de la dioscina.

El otro grupo que compone los glicósidos esteroideos son los glicósidos cardiotónicos, denominados así por su efecto sobre la contracción cardíaca.

Concretamente, tienen una acción inotrópica positiva. Además, algunos de los integrantes de este grupo ejercen un efecto estimulante sobre la proliferación y diferenciación celular y a otros se les atribuyen propiedades antitumorales (Orlov *et al.*, 1999; Ramirez-Ortega *et al.*, 2006).

Otros esteroides de origen vegetal son los alcaloides esteroideos. Todos los compuestos pertenecientes a esta categoría poseen un núcleo esteroideo y un heterociclo nitrogenado, por lo que poseen características típicas de esteroides y de alcaloides. A este grupo pertenecen la solanina o la tomatina, sintetizados por plantas pertenecientes al género *Solanum* (Yoshimitsu *et al.*, 2000).

#### ***1.4.2.2. Distribución en animales no mamíferos***

Los compuestos esteroideos, además de estar presentes en forma de colesterol en todas las células de origen animal, también aparecen bajo diferentes estructuras. En el caso de los mamíferos, las funciones más relevantes ya se han citado en el apartado 1.2 de este epígrafe. En otros grupos, como los insectos, existen algunos esteroides (ecdisteroides) con actividad hormonal. Estas moléculas son las encargadas de activar la transcripción de los genes que intervienen en la puesta en marcha del proceso de muda en muchas especies de hexápodos (Kang y Bashirullah, 2014).

Por otra parte, algunas especies de anfibios y aves presentan las batracotoxinas. Estos compuestos, de origen esteroideo, son algunos de los venenos más potentes conocidos. No obstante, estas sustancias no son sintetizadas por anfibios o aves sino que proceden de determinados insectos que son tomados con la dieta y que ellos utilizan como veneno (Dumbacher *et al.*, 2004, 2008). Asimismo, este tipo de compuestos esteroideos pueden actuar a modo de feromonas con fines sexuales o territoriales en algunos peces teleósteos (Sorensen *et al.*, 2005).

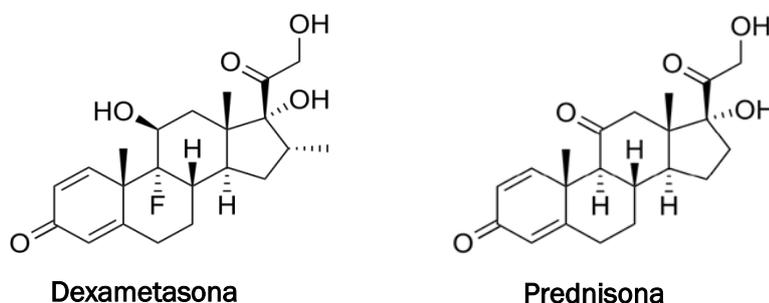
### **1.5. Aplicaciones en la industria farmacéutica**

En la actualidad, la industria farmacéutica relacionada con los esteroides se ha convertido en una importante línea de tratamiento para el cuidado de la salud humana y de los animales, existiendo alrededor de 300 fármacos esteroideos aprobados hasta la fecha. En el mercado de la industria farmacéutica, la facturación de esteroides ocupa el segundo puesto, sólo por detrás de los antibióticos (Lerner, 1994; Donova y Egorova, 2012) y la producción anual de los mismos excede el millón de toneladas con un mercado mundial que alcanza un valor próximo a los 10.000 millones de dólares (Donova y Egorova, 2012).

### 1.5.1. Como antiinflamatorios

Dentro de las hormonas esteroideas, los glucocorticoides son el grupo de sustancias que posee función antiinflamatoria. Esta acción se debe a su efecto sobre la disminución del número de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos en sangre periférica, lo cual reduce la capacidad de respuesta ante antígenos de distinta naturaleza. Estos compuestos también son capaces de reducir directa e indirectamente la presencia de moléculas inflamatorias tales como prostaglandinas, leucotrienos o ciclooxigenasa 2 (Rhen y Cidlowski, 2005; Franca *et al.*, 2011).

En el ser humano, los glucocorticoides por excelencia son el cortisol, la cortisona y la corticosterona. No obstante, a nivel farmacéutico está mucho más extendido el uso de glucocorticoides sintéticos como la dexametasona o prednisona (**Fig. 13**). Todas estas moléculas, con capacidad antiinflamatoria, poseen como característica común la presencia de un hidroxilo en posición 11 en el núcleo CPHF. Por esta razón, todos los procesos que conducen a la introducción de un grupo -OH en esa posición son de gran interés para la industria farmacéutica (Donova y Egorova, 2012).



**Fig. 13.** Estructura química de la dexametosa y prednisona.

En cuanto a sus usos, los glucocorticoides suelen emplearse para su aplicación tópica con el fin de combatir afecciones cutáneas que provocan prurito, rubor o sequedad así como para el tratamiento de alergias cutáneas o eczemas. También están indicados en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide. No obstante, el uso continuado de estos compuestos puede acarrear efectos adversos. De todos ellos, el más grave es el síndrome de Cushing de origen iatrogénico, caracterizado por alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono y de las proteínas, hipertensión, debilidad muscular y dando lugar a un edema generalizado. El uso prolongado puede también desembocar en un estado de inmunodepresión pronunciado (Franca *et al.*, 2011). También son frecuentes otros efectos secundarios tales como cataratas u osteoporosis. Para evitar el desarrollo de estos efectos es

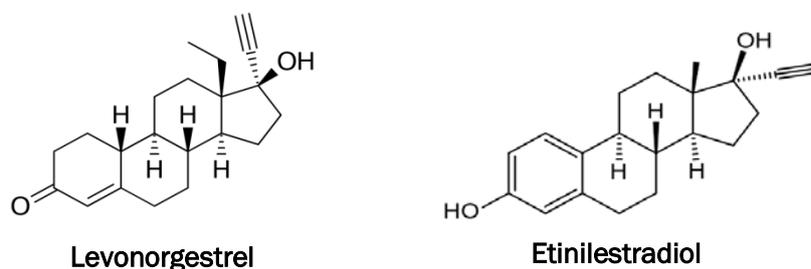
conveniente evitar un uso prolongado de estos compuestos y retirar paulatinamente su administración.

### 1.5.2. Como inmunosupresores

Los glucocorticoides también se usan como inmunosupresores; en este sentido, podría decirse que el efecto inmunosupresor es una extensión de su acción antiinflamatoria. Para esta aplicación suelen emplearse corticoides sintéticos de uso prolongado tales como la betametasona o la dexametasona. Están indicados en el tratamiento de enfermedades de tipo autoinmune o en aquellas que aparecen tras trasplantes o infusiones sanguíneas (Rhen y Cidlowski, 2005). Puesto que usualmente los tratamientos con estos compuestos son prolongados, su empleo debe vigilarse muy cuidadosamente y ajustar lo máximo posible la dosis con el fin de evitar el desarrollo de efectos adversos.

### 1.5.3. Como anticonceptivos

La anticoncepción hormonal es un método basado en el mecanismo natural femenino que impide el solapamiento de dos embarazos simultáneos. De esta forma, al administrar de manera exógena hormonas femeninas se produce un efecto de retroalimentación negativo entre hipófisis y ovarios, inhibiéndose la síntesis de gonadotropinas, lo que desencadenaría, en circunstancias normales, el embarazo (Blumenthal y Edelman, 2008). Existen diferentes tipos de anticoncepción hormonal, que según la vía de administración pueden ser: oral, transdérmica o vaginal. Para conseguir el efecto deseado se suelen administrar una combinación de una progestina (derivados de la testosterona o progesterona como el levonorgestrel - **Fig. 14**) y un estrógeno sintético (etinilestradiol - **Fig. 14** - o mestranol) (Sivin *et al.*, 1998).



**Fig. 14.** Estructura química del levonorgestrel, derivado sintético de la progesterona, y del etinilestradiol, derivado del estradiol, empleados en combinación como anticonceptivos hormonales.

El uso de anticonceptivos hormonales está indicado para el tratamiento de dismenorreas, ovulaciones dolorosas, acné o metrorragias (Blumenthal y Edelman, 2008). No obstante, el empleo de estos compuestos está asociado a un riesgo

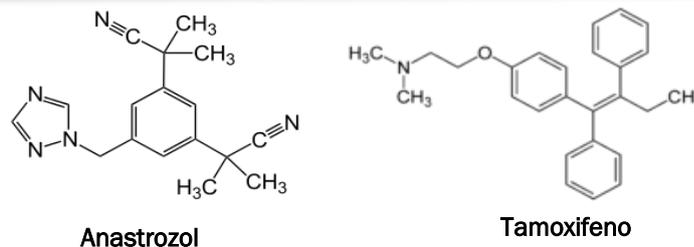
cardiovascular; motivo por el que se desaconseja su uso en personas con hipertensión arterial o antecedentes de dolencias cardíacas o ictus (Grossman Barr, 2010). Por el contrario, el uso de este tipo de anticoncepción reduce la incidencia de cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario o quistes ováricos, entre otros, mientras que no muestra interacciones con el cáncer de mama (Celentano *et al.*, 1987; Samson *et al.*, 2016).

#### **1.5.4. Como factores terapéuticos hormonales**

Las terapias hormonales, de sustitución o reemplazo, es un tratamiento médico consistente en la aportación exógena de ciertas hormonas. Una de las terapias de este tipo más habituales es la administración de hormonas sexuales. Este tipo de tratamientos está indicado en mujeres con menopausia temprana o quirúrgica, para evitar efectos indeseables como la osteoporosis (Shuster *et al.*, 2010). También está recomendada en casos de extirpación ovárica o testicular por motivos traumáticos o procesos cancerosos, o para el tratamiento de transexuales. En estos casos, se administran derivados de la progesterona y/o estradiol o derivados androgénicos (Myers y Meacham, 2003). Pueden existir, también, terapias hormonales de otra naturaleza, como son las basadas en la administración de corticoides como consecuencia de procesos tumorales bilaterales en las glándulas adrenales (Agha *et al.*, 2004).

#### **1.5.5. Usos frente al cáncer**

El uso de esteroides en casos de cáncer puede presentar dos vertientes: acompañando a un tratamiento quimioterápico, para reducir sus efectos adversos (mejora del apetito, eliminación de náuseas, reducción del dolor o reacciones de hipersensibilidad) o como tratamiento ante diversos tipos de cáncer con dependencia hormonal (Kitamura *et al.*, 2015). Este uso se emplea frente a determinados tipos de cáncer de mama, en los que los estrógenos estimulan su crecimiento, mientras que los andrógenos pueden provocar una reducción en el tamaño del tumor (Xu y Lin, 2016). No obstante, el uso de andrógenos en mujeres puede dar pie a la aparición de efectos masculinizantes por lo que hoy en día se tiende al uso de inhibidores de la aromatasa, como el anastrozol (**Fig. 15**), que impiden la síntesis natural de estrógenos a partir de andrógenos en el ovario (Ingle *et al.*, 2015). Estos fármacos pueden ser empleados en combinación con los moduladores selectivos de receptores estrogénicos tales como el tamoxifeno (Wozniak *et al.*, 2007). Una aplicación paralela se da en los casos de cáncer de próstata dependientes de andrógenos.



**Fig. 15.** Estructura química del anastrozol, inhibidor de la aromatasa, y del tamoxifeno, modulador selectivo de los receptores de estrógenos, como ejemplos de fármacos empleados en sustitución de los andrógenos en el cáncer de mama dependientes de estrógenos.

#### 1.5.6. Otros usos

Además de los usos ya mencionados, los esteroides pueden presentar otras aplicaciones de interés en medicina humana. Así, se ha descrito su uso para la prevención de enfermedades coronarias (Frye y Leonard, 1999), como agentes antifúngicos (Chung *et al.*, 1998) o como compuestos con actividad antiviral. Recientemente, ha sido descrita la existencia de un glicósido efectivo contra diferentes clases de herpesvirus (Arthan *et al.*, 2002). Además, algunos esteroides como la DHEA y otros esteroides (pregnano- y androstano-derivados) son considerados como neuroesteroides, por actuar como moduladores alostéricos de receptores implicados en la neurotransmisión, interfiriendo en la excitabilidad neuronal por medio de una interacción directa con la superficie celular (Reddy, 2003; Eser *et al.*, 2006).

## 2. Síntesis de esteroides por la industria farmacéutica

### 2.1. Historia de la síntesis de fármacos

La industria farmacéutica surgió por la necesidad de obtener compuestos terapéuticos de manera sintética y a mayor escala. Los orígenes de esta industria se remontan a la época en la que los boticarios desarrollaron la farmacognosia, es decir, la aplicación de plantas completas o partes de plantas secas para obtener sustancias de interés médico. Algunas medicinas, como las preparadas a partir de la quina, de la belladona, de la digitalina o del opio resultaban muy efectivas, aunque las formas farmacéuticas obtenidas solían ser poco homogéneas y presentaban grandes variaciones de unas extracciones a otras. La irregularidad de las extracciones se corrigió a partir de 1820, cuando el químico francés Joseph Pelleterier logró aislar un alcaloide activo de la corteza de la quina, al que denominó quinina. Tras éste, se aislaron otros alcaloides como la atropina (obtenida de la belladona) o la estricnina (de la nuez vómica) (Boussel *et al.*, 1983). Los avances de Pelleterier, junto con los de otros investigadores, posibilitaron la estandarización y comercialización de estas medicinas. Una de las primeras empresas dedicadas a la extracción y purificación de alcaloides a nivel industrial fue la farmacia de T.H. Smith en Edimburgo, Escocia (Boussel *et al.*, 1983).

Otro hito importante para la industria farmacéutica tuvo lugar en 1828, año en el que el químico alemán Friedrich Wöhler, sometiendo a altas temperaturas el cianato de amonio, consiguió producir urea, un compuesto orgánico que hasta entonces se pensaba que solo podía ser extraído de fuentes vegetales o animales. Esta síntesis sentó las bases para la obtención de otros compuestos orgánicos de gran interés biológico a partir de compuestos inorgánicos (Boussel *et al.*, 1983; Malerba y Orsenigo, 2002). Así, el primer fármaco sintético fue la acetofenidina, comercializada en 1885 como analgésico por la empresa Bayer, de Leverkusen (Alemania), bajo la marca Phenacetin® (precursor del futuro paracetamol). A este precursor del paracetamol le siguieron otros como el ácido acetilsalicílico en 1899, sintetizado por el Dr. Felix Hoffmann (Malerba y Orsenigo, 2002). Estos descubrimientos establecieron los pilares para la obtención de fármacos de naturaleza muy diversa, muchos de los cuales siguen siendo empleados en nuestros días.

### 2.2. Procesos empleados para la obtención de compuestos terapéuticos

Dentro los procedimientos utilizados para la obtención de fármacos en la industria farmacéutica se distinguen tres tipos de abordajes: extracción biológica (a

partir de compuestos naturales), síntesis química y obtención mediante biotransformaciones (Li *et al.*, 2004).

### 2.2.1. Extracción biológica

La extracción biológica como método de obtención de fármacos con interés para la industria es más bien anecdótica ya que se emplea muy poco. Este procedimiento es el más antiguo y se basa en la extracción de compuestos naturales a partir de plantas u otros organismos. Normalmente, se emplean disolventes orgánicos a los que se someten diferentes partes del organismo diana y posteriormente se procede a su purificación y concentración (Li *et al.*, 2004). Para la síntesis de esteroides a nivel industrial, este método de obtención carece de relevancia por su complejidad y escaso rendimiento.

### 2.2.2. Síntesis química o modificación química

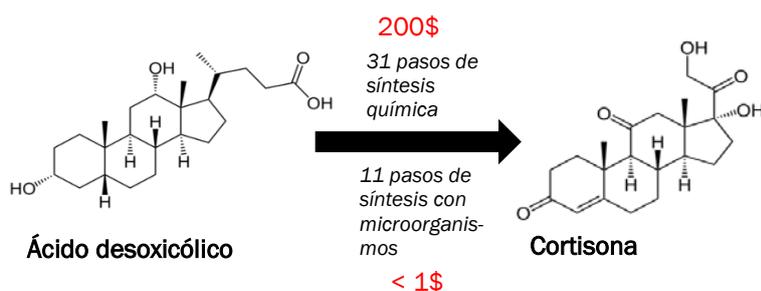
Los procesos basados en la síntesis química persiguen la modificación de productos activos por medio del empleo de diferentes compuestos químicos (orgánicos e inorgánicos) con la finalidad de dotar a las moléculas resultantes de determinadas propiedades físicas y farmacológicas (Li *et al.*, 2004). La síntesis química de compuestos esteroideos implica la introducción de grupos metilo, hidroxilo, carbonilo o carboxilo en determinadas configuraciones espaciales ( $\alpha/\beta$ ) en un carbono concreto del núcleo esterano. Debido a la especificidad requerida de las reacciones, se trata de un proceso largo, tedioso, costoso y, en líneas generales, de bajo rendimiento (Bensasson *et al.*, 1999).

### 2.2.3. Biotransformación

La biotransformación, por su parte, es una forma de modificación artificial que aprovecha la capacidad que presentan algunas enzimas de ciertos microorganismos para realizar modificaciones químicas sobre compuestos específicos (Sih *et al.*, 1968).

Dentro de éstas, la biotransformación de esteroides es uno de los mejores ejemplos de la aplicación de técnicas biotecnológicas en los procesos industriales a gran escala de manera muy rentable. El estudio en este campo se inició en torno a la década de 1950 con el descubrimiento de un hongo perteneciente al género *Rhizopus*, que era capaz de introducir específicamente en la molécula de progesterona un grupo hidroxilo, con configuración  $\alpha$ , en la posición 11 (Gabinskaia *et al.*, 1971). La progesterona se obtenía mediante síntesis química a partir del estigmasterol presente en la soja. Este hecho posibilitó la supresión de varios pasos de síntesis requeridos hasta entonces; pasando a realizarse la hidroxilación en C11 en un solo paso. Este

descubrimiento fue decisivo para explicar el posterior desarrollo de la biotransformación como método de síntesis de esteroides con actividad biológica. Otro ejemplo que sirve para ilustrar el importante avance que supuso este hallazgo, fue la síntesis de cortisona. En 1949, la obtención de 1 g de cortisona implicaba 31 reacciones de síntesis química a partir del ácido desoxicólico. Sin embargo, la biotransformación de desoxicólico en cortisona empleando *Rhizopus arrhizus* y *Aspergillus niger* permitió reducir el proceso a 11 pasos de síntesis, lo que posibilitó rebajar el coste de 200 dólares hasta menos de 1 dólar (Carballeira et al., 2009) (Fig. 16).



**Fig. 16.** Esquema representativo de la síntesis de cortisona partiendo de desoxicolato bien mediante síntesis química o bien empleando microorganismos que faciliten la biotransformación.

Las reacciones empleadas para la obtención industrial de derivados del esterano corresponden a tres tipos: hidroxilación, deshidrogenación y oxidación. Pueden darse otro tipo de reacciones como son la hidrogenación, la epoxidación o la hidrólisis de ésteres, aunque con una frecuencia mucho menor (Fernandes y Cabral, 2007). Otro proceso que también suele llevarse a cabo es la degradación parcial de esteroides; concretamente, la degradación de la cadena lateral presente en los fitoesteroles o en el colesterol. Siguiendo este procedimiento se obtienen compuestos que se usan como intermediarios en la producción de esteroides con interés farmacéutico (Fernandes et al., 2003; Fernandes y Cabral, 2007; Malaviya y Gomes, 2008).

### ***2.2.3.1. Biotransformaciones realizadas con especies silvestres y con otras especies modificadas genéticamente***

Actualmente, la biotransformación de esteroides empleando microorganismos se lleva a cabo, mayoritariamente, con especies silvestres, es decir, con cepas que no han sufrido modificaciones genéticas. Esto se debe a que el sector industrial es poco proclive a la introducción de nuevas técnicas que requieran una elevada inversión en investigación y en la puesta a punto de procesos de escalado en los que se describen la intervención de microorganismos recombinantes (microorganismos manipulados

genéticamente o GMP) para la obtención de esteroides. Tal es el caso de la producción de 9-hidroxi-androstenediona (9OHAD) a partir de colesterol mediante el uso de una cepa de *Rhodococcus erythropolis*, en la que se han suprimido de los genes *kstD1* y *kstD2* de su ruta metabólica. Estos genes codifican las 3-cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasas y hacen posible la acumulación de este compuesto (9OHAD) como producto final (van der Geize *et al.*, 2001, 2002).

Por otra parte, hay ejemplos de clonación de genes que ponen de manifiesto la obtención de bacterias recombinantes con capacidad para biotransformar esteroides. Así sucedió con la introducción de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa microsomal bovina en *Escherichia coli* (Barnes *et al.*, 1991) o de la clonación del citocromo bovino P450c17 en la misma bacteria con el fin de hidroxilar la progesterona y la pregnenolona, también en posición 17 y configuración  $\alpha$  (Shet *et al.*, 1997). La clonación y expresión de los genes que codifican los citocromos P450 capaces de realizar modificaciones sobre esteroides también se ha llevado a cabo en levaduras (Dumas *et al.*, 1996; Bureik *et al.*, 2002; Naumann *et al.*, 2010; Hull *et al.*, 2017). A modo de ejemplo, cabe citar las investigaciones llevadas a cabo por Szczebara y colaboradores en las que, por medio de la introducción de 13 genes, consiguieron la obtención de hidrocortisona a partir de fuentes de carbono simples en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Szczebara *et al.*, 2003).

#### **2.2.4. Ventajas e inconvenientes de los diferentes tipos de síntesis**

De manera general, podemos apuntar que la síntesis química es un método mucho más laborioso que la biotransformación debido a la complejidad que acarrea la realización de reacciones químicas concretas sobre determinados sustratos. Este tipo de reacciones, además, precisan catalizadores que, habitualmente, son metales pesados y cuyo uso conlleva no solo un riesgo para la salud de los trabajadores sino también debido a la contaminación provocada por la emisión y vertido de residuos (Malaviya y Gomes, 2008).

En el caso particular de la obtención industrial de esteroides, la compleja estructura de este grupo de sustancias hace que su síntesis química entrañe gran complejidad, siendo necesaria, en muchas ocasiones, la elaboración previa de intermediarios en los que hay que proteger químicamente ciertos grupos que luego han de ser regenerados, implicando que los procesos sean largos, costosos y, en la mayoría de los casos, muy laboriosos (Bensasson *et al.*, 1999). No obstante, los inconvenientes derivados de la síntesis química suelen ser solventados eficazmente por las

biotransformaciones microbianas, puesto que éstas permiten superar los obstáculos de especificidad y purificación requeridos y evitan, asimismo, el uso de metales pesados como reactivos, haciendo que el proceso sea rápido, eficaz y mucho más rentable. A pesar de ello, la obtención de esteroides mediante biotransformaciones también presenta algunas limitaciones tales como bajos rendimientos o la aparición de subproductos que obligan a la posterior purificación del sustrato deseado, ya que los microorganismos utilizados no suelen ser suficientemente específicos.

### **2.3. Obtención de esteroides en la actualidad**

Hoy día, la obtención de esteroides a nivel industrial se basa en la combinación de tecnologías microbianas y químicas. Por lo tanto, la industria farmacéutica de esteroides utiliza conjuntamente la síntesis química y los métodos biológicos, aprovechando las ventajas de cada una y proporcionando las herramientas adecuadas para la producción a gran escala de análogos de esteroides naturales o modificados (Fernandes *et al.*, 2003).

El sustrato de partida más empleado en la actualidad en la industria es la diosgenina, un tipo de sapogenina (Hanson, 2005). Solo en China, la producción anual de diosgenina alcanza la cifra de 5.000 toneladas (Wang *et al.*, 2011). La posterior obtención de esteroides de interés farmacéutico puede realizarse mediante síntesis química o mediante métodos microbianos (Wang *et al.*, 2007). Alternativamente, desde 1980, cada vez está ganando más importancia el uso de esteroides naturales como materiales de partida para la síntesis industrial de derivados esteroideos (Donova y Egorova, 2012). Entre ellos destacan los fitoesteroides, que se obtienen de la soja o del pino, procedentes de restos originados por la industria agrícola, alimentaria o la involucrada en la elaboración de papel (Malaviya y Gomes, 2008). El colesterol también llegó a emplearse como precursor pero, debido a su origen animal (de grasa de cerdo o vaca) y, como consecuencia de la crisis por la encefalopatía espongiforme bovina, su empleo ha sido prohibido por la FDA.

Partiendo de los fitoesteroides, los intermediarios más destacados obtenidos mediante biotransformación incluyen (Donova y Egorova, 2012):

- Esteroides C19: tales como la AD, la androstenedionona (ADD, androsta-1,4-diene-3,17-diona), la 9OHAD, la testosterona y la boldenona.
- Esteroides C22: tales como la 20-hidroximetil pregna-4-en-3-ona o 20-carboxi-pregna-4-en-3-ona.

De entre todos ellos, los intermediarios más comercializados son la AD y la ADD (aproximadamente 1.000 millones de dólares por año) debido a su capacidad para producir corticosteroides, mineralocorticoides o anticonceptivos orales con interés comercial y que son obtenidos mediante una única reacción de biotransformación usando, en la mayoría de los casos, *Mycobacterium smegmatis* (Donova y Egorova, 2012). Por otra parte, entre los APIs (*active pharmaceutical ingredient*) más comercializados hoy en día se encuentran la hidrocortisona, 6 $\alpha$ -metil prednisolona, dexametasona y drospirenona (Donova y Egorova, 2012). Todos ellos poseen propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras con excepción de la drospirenona que es un anticonceptivo oral.

En la **Fig. 17** se representa una de las posibles opciones que se siguen en la industria farmacéutica para la obtención de compuestos esteroideos de interés. En este esquema se representan algunos de los compuestos finales que son producidos, entre los que se encuentran sustancias empleadas para tratamientos hormonales, caso de la estrona y sus derivados, la testosterona y sus derivados o la progesterona y sus derivados; otros empleados para la anticoncepción, como la drospirenona (1,2-dihidrospirenona) o la deltenona de etileno (antagonista competitivo de la progesterona y empleado como anticonceptivo de urgencia o abortificante) y los requeridos para tratamientos inmunosupresores o antiinflamatorios, representados por la hidrocortisona.

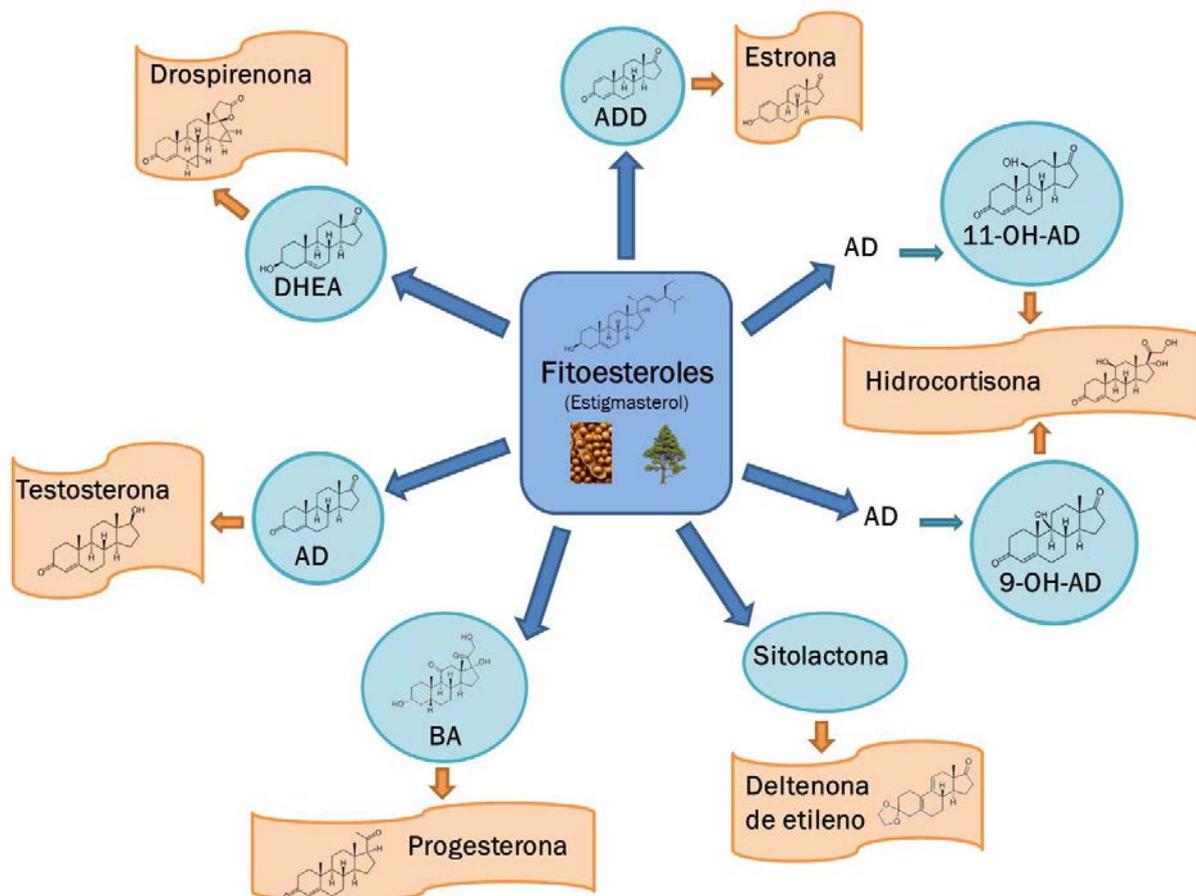


Fig. 17. Esquema que refleja una posible vía de síntesis de esteroides en la industria farmacéutica. Información aportada por la compañía Gadea Biopharma®.

### 3. Empleo de *Aspergillus nidulans* y otras especies fúngicas en la síntesis de esteroides

#### 3.1. Uso de microorganismos en la industria

##### 3.1.1. Historia

En la actualidad, el uso de microorganismos está ampliamente arraigado en los diferentes tipos de industrias. Así, por ejemplo, la industria alimentaria utiliza fermentos (como *Lactobacillus spp.* o *Saccharomyces cerevisiae*) para la elaboración de productos lácteos o cerveza, entre otros. La industria farmacéutica emplea distintos microorganismos que posibilitan la obtención de fármacos con aplicación médica (caso de los antibióticos) mientras que la industria química los usa para la obtención de papel, la obtención de biocombustibles o la eliminación de combustibles en ecosistemas contaminados.

Los primeros descubrimientos acerca de la utilización de microorganismos beneficiosos para el hombre surgieron con la invención de la cerveza, el pan, el vino o el vinagre. Estos hallazgos datan entre los 6000 - 1000 años antes de Cristo (Waites *et al.*, 2013). Ya en el siglo XX, uno de los hitos que puso en relieve el empleo de microorganismos a nivel industrial lo encontramos tras el descubrimiento de la producción de ácido cítrico por parte de diferentes miembros del género *Aspergillus*. En 1917 fue el americano James N. Currie quien describió la producción de este ácido por parte de *Aspergillus niger*. Este hecho supuso un gran avance para la industria alimentaria norteamericana ya que eliminaba la necesidad de importación de cítricos procedentes de países mediterráneos (Shu y Johnson, 1947; Neuwirth, 1950; Trussell, 1950). El ácido cítrico no solo tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria y de bebidas sino también en la industria farmacéutica, al poder ser utilizado como conservante de muestras sanguíneas o en la elaboración de cosméticos, debido a su actividad antioxidante. Currie trasladó esta idea a Pfizer Corp. donde se desarrolló e implementó la fermentación que daba lugar a la obtención de ácido cítrico (Prescott *et al.*, 1982).

Sin embargo, si existe un acontecimiento que marcó claramente el desarrollo de la Microbiología Industrial tal y como la concebimos en la actualidad, éste fue el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928. La penicilina es una sustancia bacteriolítica producida, entre otros microorganismos, por hongos

filamentosos pertenecientes a los géneros *Penicillium* y, en menor cantidad, por *Aspergillus* (Fleming, 1929).

Tras su descubrimiento, las primeras purificaciones y ensayos clínicos en ratones se llevaron a cabo por Ernst Boris Chain y Walter Florey, en el *Sir William Dunn School of Pathology* de la Universidad de Oxford. Éstos liofilizaron los exudados de cultivos de hongos e inyectaron el sustrato resultante en ratones para verificar que no era tóxico. El proceso de purificación fue posteriormente mejorado a cargo del bioquímico Norman Heatley y la eliminación de impurezas fue realizada por Sir Edward Abraham utilizando la cromatografía en columna de alúmina. En 1941, Heatley y Moyer lograron mejorar 10 veces la producción de penicilina permitiendo también la reducción del coste de la dosis: el precio bajó de 20\$ por dosis en julio de 1943 a 0,55\$ por dosis en 1946 (American Chemical Society and Royal Society of Chemistry, 1999).

El impacto que tuvo el uso de la penicilina sobre la medicina hizo necesario su obtención a gran escala, mediante fermentaciones, lo cual no solo propició el desarrollo de nuevas técnicas y procedimientos que lo hicieran posible, sino que también permitió el desarrollo de otros antibióticos y de otras moléculas tales como aminoácidos o enzimas. Además, el desarrollo de microorganismos seleccionados genéticamente (aunque no recombinantes) hizo posible la aparición de microorganismos superproductores en los que se incrementaba la producción de las sustancias de interés comercial, disparando la rentabilidad y productividad de los procesos industriales.

### **3.1.2. Microorganismos más relevantes en la síntesis de esteroides**

El empleo de microorganismos para la obtención de esteroides con fines comerciales se inició en la década de 1950, como ya se ha mencionado, con el fin de introducir un grupo hidroxilo en la posición 11 y en configuración  $\alpha$  del núcleo esterano, gracias a la acción específica del hongo *Rhizopus spp.* (Gabinskaia et al., 1971). En la siguiente tabla (**Tabla 2**) se enumeran los microorganismos más relevantes para la obtención industrial de esteroides de interés farmacéutico.

**Tabla 2:** Relación de microorganismos utilizados para la realización de modificaciones sobre el núcleo de CPHF en la industria.

Micorganismo	Actividad sobre núcleo de esterano	Referencia
<i>Mycobacterium spp.</i>	Escisión de la cadena lateral	(Lee y Liu, 1992; Smith <i>et al.</i> , 1993)
<i>Aspergillus spp.</i>	11 $\alpha$ -hidroxilación 6 $\beta$ -hidroxilación	(Capek <i>et al.</i> , 1963; Fernandes <i>et al.</i> , 2003)
<i>Rhizopus spp.</i>	11 $\alpha$ -hidroxilación	(Fernandes <i>et al.</i> , 2003; Petrič <i>et al.</i> , 2010)
<i>Cochliobolus spp.</i>	11 $\beta$ -hidroxilación 14 $\alpha$ -hidroxilación	(Huang <i>et al.</i> , 1989; Suzuki <i>et al.</i> , 1993)
<i>Streptomyces spp.</i>	16 $\alpha$ -hidroxilación	(Pérez <i>et al.</i> , 2005)

Sin embargo, se han descrito muchos más microorganismos capaces de realizar modificaciones sobre el núcleo de esterano, alguno de los cuales se recogen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** Relación de otros microorganismos con capacidad de introducir modificaciones sobre el anillo de esterano.

Micorganismo	Actividad sobre núcleo de esterano	Referencia
<i>Thamnostylum piriforme</i>	14 $\alpha$ -hidroxilación 9 $\alpha$ -hidroxilación	(Hu <i>et al.</i> , 1995)
<i>Mucor griseocyanus</i>	14 $\alpha$ -hidroxilación 7 $\alpha$ -hidroxilación 6 $\beta$ -hidroxilación	(Hu <i>et al.</i> , 1995)
<i>Fusarium culmorum</i>	12 $\beta$ -hidroxilación 15 $\alpha$ -hidroxilación	(Kołtek y Swizdor, 1998)
<i>Saprolegnia hypogyna</i>	17 $\alpha$ -hidroxilación 17, 20-liasa 17 $\beta$ -HSD	(Khallil y Mostafa, 1996)
<i>Bacillus stearithermophilus</i>	20 $\alpha$ -hidroxilación 6 $\beta$ -hidroxilación 6 $\alpha$ -hidroxilación	(Al-Awadi <i>et al.</i> , 2001)

### **3.2. *Aspergillus nidulans***

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por Micheli y consta en la actualidad de más de 180 especies, entre las que se encuentran microorganismos altamente patógenos, como *A. fumigatus*, u otras especies con aplicaciones en la agricultura, farmacia, ciencia o industria, tales como *A. niger*, *A. oryzae* o *A. nidulans* (Ward *et al.*, 2006). La gran diversidad de los miembros del género *Aspergillus* queda constatada por haber detectado su presencia en localizaciones tan diferentes como el cuello de aligátors, fuel de aviación, momias egipcias, productos plásticos o baños de vapor. Debido a esta gran versatilidad nutricional son capaces de emplear distintas fuentes de carbono y son muy ubicuos. Por este motivo, juegan un papel destacado en la degradación de un gran número de compuestos orgánicos naturales, entre los que se encuentran los compuestos que son objeto de estudio en este trabajo: los esteroides.

La versatilidad de los miembros pertenecientes a este género ha hecho que ciertas especies como *A. nidulans*, *A. niger* y *A. oryzae*, hayan sido objeto de estudios genéticos y moleculares y, además, que hayan sido empleados en la industria como productores a gran escala de proteínas fúngicas y de mamíferos así como de ciertos metabolitos (Ward *et al.*, 2006). Asimismo, *A. nidulans* tiene la capacidad de sintetizar pequeñas cantidades de penicilina, por lo que también ha sido empleado como organismo modelo para abordar estudios acerca de la producción de este antibiótico, debido a que su manejo y manipulación genética son mucho más sencillos que en especies pertenecientes al género *Penicillium* (Brakhage, 1997).

#### **3.2.1. Uso en ingeniería genética**

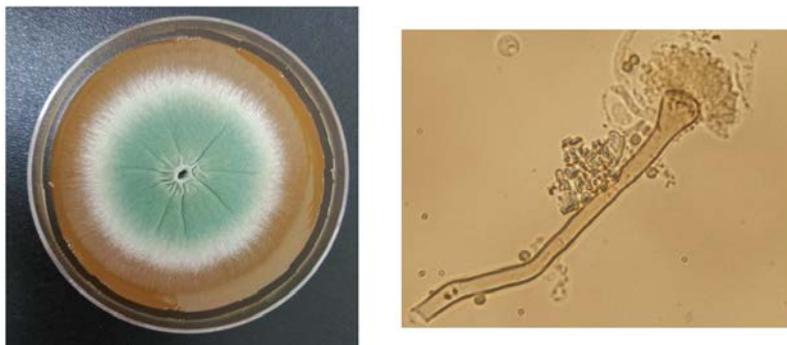
La importancia de *Aspergillus nidulans* como modelo genético de organismos eucariotas persiste hoy en día. Este hecho tiene su origen en el descubrimiento por Guido Pontecorvo del ciclo asexual de este hongo (Pontecorvo *et al.*, 1953). El conocimiento de este proceso sentó las bases para futuras investigaciones sobre los genes implicados en la mitosis o los procesos que conducían a la formación de microtúbulos (Sheir-Neiss *et al.*, 1978; Morris *et al.*, 1979). Treinta años después de este acontecimiento, la Biología Molecular y la Ingeniería Genética llegaron al reino Fungi con la primera descripción de transformación fúngica en *Aspergillus nidulans* (Tilburn *et al.*, 1983). Ya en el siglo XXI, *A. nidulans* pasó a ser uno de los máximos exponentes en genómica al convertirse en el segundo organismo cuyo genoma fue secuenciado por completo (Galagan *et al.*, 2005).

### 3.1.1. Descripción

La buena caracterización del sistema genético de *A. nidulans* junto con su frecuente uso en la industria farmacéutica (por la presencia de enzimas con actividad sobre compuestos esteroideos) han hecho que hayamos elegido a esta especie como organismo de estudio para abordar la biotransformación de esteroides. Para ello, se han seguido dos enfoques, uno que implica su uso como receptor de genes y otro que requiere su uso como donante de genes que codifican enzimas que pueden ser utilizadas en estudios de biotransformación de esteroides.

*Aspergillus nidulans* es un hongo filamentoso perteneciente al filo Ascomycota, incluido en el orden de los Eurotiales. La especie fue descrita por primera vez por Winter en 1884 (Ward *et al.*, 2006). En su forma silvestre, esta especie presenta un color verde oscuro (Fig. 18) y al microscopio óptico la imagen de su conidióforo se asemeja a una vesícula redondeada del que salen, en forma concéntrica, los conidios (Fig. 18).

## *Aspergillus nidulans*



**Fig. 18.** Aspecto de la cepa silvestre de *A. nidulans* cuando el hongo se cultiva en una placa de extracto de malta-agar (izquierda) y una preparación microscópica (derecha).

*Aspergillus nidulans*, como la mayoría de los miembros del género *Aspergillus*, presenta reproducción tanto asexual como sexual, recibiendo el nombre de *Emericella nidulans* en su forma sexual. En la reproducción asexual, el hongo esporula produciendo conidios o esporas asexuales que, tras su germinación, forman el micelio del que saldrán las hifas (Ward *et al.*, 2006). La reproducción sexual tiene lugar cuando las condiciones del medio son pobres y su única manera de sobrevivir es unirse a otros individuos, con los que, al recombinar genes, puedan superar las carencias del medio. Este tipo de reproducción comienza con la agregación de células vegetativas del micelio que forman el cleistotecio tras la fusión de las hifas de las cepas parentales. El

cleistotecio o cuerpo fructífero resultante contiene el asco, dentro del cual están las ascosporas producidas por meiosis (Ward *et al.*, 2006). Estas ascosporas se fusionan dando lugar a células diploides a partir de las cuales originarán esporas que germinarán y formarán el micelio.

### 3.1.2. Aplicaciones para la obtención de esteroides

*Aspergillus nidulans*, como miembro del género *Aspergillus*, posee una esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa y, además, otras enzimas como la 3 $\beta$ -hidroxi- $\Delta$ 5-esteroide-deshidrogenasa (Fernandes *et al.*, 2003), que se encarga de transformar el grupo hidroxilo presente en C3 en un grupo ceto, y de cambiar el doble enlace existente entre los carbonos 5 y 6 al 4 y 5. Asimismo, se conoce que *A. niger* posee una 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (Wortman *et al.*, 2009) encargada de reducir el grupo ceto de C17 a un grupo hidroxilo (tal y como ocurre en la conversión de AD a testosterona). Su presencia en *A. niger* nos hace sospechar su más que probable existencia también en *A. nidulans*.

## 3.3. Otras especies fúngicas

### 3.3.1. *Aspergillus ochraceus*

*Aspergillus ochraceus* es un hongo filamentoso conocido por producir las micotoxinas ocratoxina A y la citrinina (Seifert, 2008). Tradicionalmente, ha sido considerado como un hongo del suelo aunque se ha ido adaptando a otros ambientes, pudiendo parasitar distintas especies ganaderas, ciertos cultivos y algunas especies marinas (Seifert, 2008). En mamíferos, el consumo de alimentos contaminados con altas concentraciones de ocratoxina A provoca, con carácter crónico, efectos neurotóxicos, inmunosupresores, carcinogénicos o teratogénicos (Ward *et al.*, 2006).

Morfológicamente, *Aspergillus ochraceus* muestra un color amarillento al ser cultivado en diferentes medios con mucha presencia de micelio aéreo tal y como se aprecia en la **Fig. 19**. La observación al microscopio, como pasa con *A. nidulans*, muestra el típico conidióforo del género *Aspergillus* aunque en este caso la vesícula es más redondeada (**Fig. 19**).

## *Aspergillus ochraceus*



**Fig. 19.** Aspecto de la cepa silvestre de *A. ochraceus* cuando el hongo se cultiva en una placa de extracto de malta-agar (izquierda) y de una preparación microscópica (derecha).

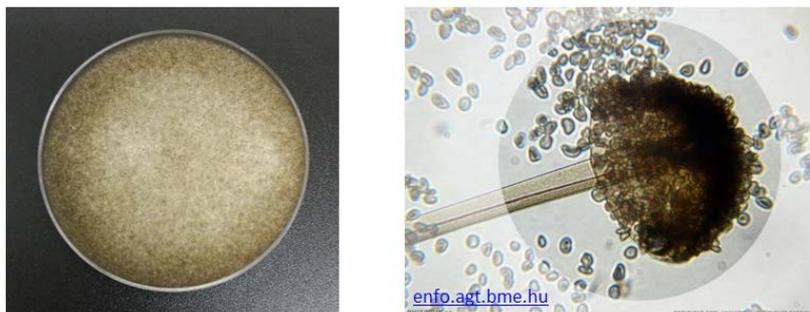
Desde el punto de vista farmacéutico, esta especie ha sido y está siendo empleada por la industria para la introducción en el núcleo CPHF de un grupo hidroxilo en posición 11, en configuración  $\alpha$  (Ghosh y Samanta, 1981). Este proceso está protegido por una patente (Bolten *et al.*, 2007) aunque nunca ha sido utilizada. En la actualidad la patente está caducada por lo que es probable que la identificación del gen responsable fuera errónea. En la industria se emplea la cepa silvestre, o seleccionadas sin mediar la manipulación genética, por lo que resultaría muy interesante la identificación y sobreexpresión del gen que codifica la 11 $\alpha$ -hidroxilación.

### 3.3.2. *Rhizopus oryzae*

*Rhizopus oryzae* es un hongo perteneciente al orden Mucorales, que se encuentra ampliamente distribuido por la naturaleza, fundamentalmente en hábitats donde abunda la materia orgánica. Se trata de un agente patógeno para hortalizas como la zanahoria o para ciertas frutas como la piña o el mango. Además, es un patógeno oportunista del hombre en el que puede provocar mucormicosis, una enfermedad producida por especies de hongos pertenecientes al orden Mucorales, que se caracteriza por el crecimiento de hifas en torno a los vasos sanguíneos (Gryganskyi *et al.*, 2010).

Morfológicamente esta especie muestra un aspecto marronáceo-verdoso y presenta un gran desarrollo de micelio aéreo (**Fig. 20**), es decir, visualmente se aprecian muchas hifas que terminan en un esporangióforo. Al microscopio tienen un aspecto parecido a *A. ochraceus* aunque la distribución de sus conidios es más caótica (**Fig. 20**).

## *Rhizopus oryzae*



**Fig. 20.** Aspecto de la cepa silvestre de *Rhizopus oryzae* cuando el hongo se cultiva en una placa de extracto de malta-agar (izquierda) y de una preparación microscópica (derecha).

Desde el punto de vista de obtención de esteroides, cabe destacar el papel de *Rhizopus spp.* puesto que supuso el inicio del empleo de microorganismos para la industria farmacéutica interesada en la producción de derivados del CPHF que contenían un hidroxilo en la posición 11 y en configuración  $\alpha$ . En *R. oryzae* ha sido descrito el citocromo responsable de esta actividad denominado CYP509C12 (Petrič *et al.*, 2010). Actualmente, su uso sigue vigente aunque en algunos casos ha sido desplazado por miembros del género *Aspergillus* ya que algunas de las especies de este género son capaces de realizar esta reacción con rendimientos más elevados.

### 3.3.3. *Cochliobolus lunatus*

*Cochliobolus lunatus* es un hongo perteneciente al filo Ascomicota y al orden de los Pleosporales. El anamorfo de este hongo, es decir su forma asexual, es conocida como *Curvularia lunata*. Se trata de un hongo fitopatógeno que también puede actuar como patógeno oportunista del hombre y otros animales (da Cunha *et al.*, 2013). En cuanto a su apariencia, cuando se cultiva en medios sólidos, presenta un color marrón verdoso (**Fig. 21**) sin presencia de micelio aéreo por lo que la textura de las esporas queda muy patente. Microscópicamente, se aprecian los conidióforos septados de cuatro en cuatro siguiendo una forma alargada, que nada tienen que ver con el resto de hongos empleados en este trabajo (**Fig. 21**).

Comercialmente, este hongo presenta interés para la industria farmacéutica debido a su capacidad para introducir grupos hidroxilo en posición 11, en configuración  $\beta$ , sobre el anillo de esterano (Huang *et al.*, 1989). No obstante, además de esta hidroxilación, también posee la facultad de introducir grupos hidroxilo en las posiciones 14 y 7 (en configuración  $\alpha$ ) por lo que el empleo de este microorganismo para introducir grupos hidroxilo en  $11\beta$  requiere una fase posterior de purificación del producto de

reacción. Por otra parte, se ha empleado también la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) de este organismo para llevar a cabo la reacción reversible de conversión de AD en testosterona (Rizner *et al.*, 1999), aunque esta enzima es capaz de catalizar reacciones que conducen a la modificación de un gran número de sustratos.

### ***Cochliobolus lunatus***



**Fig. 21.** Aspecto de la cepa silvestre de *C. lunatus* cuando el hongo se cultiva en una placa de extracto de malta-agar (izquierda) y de una preparación microscópica (derecha).

#### **3.4. Otros microorganismos de interés**

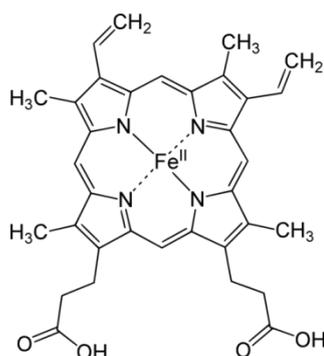
En el marco de la obtención de esteroides de interés comercial, se han estudiado también otras enzimas pertenecientes a diferentes microorganismos no fúngicos con la finalidad de permitir e implementar la síntesis de determinados compuestos mediante biotransformaciones. Así, se ha descrito que *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155, actinobacteria ácido-alcohol resistente no patógena para el hombre, posee dos citocromos (CYP125A3, CYP142A2) implicados en la metabolización del colesterol o fitoesteroides por medio de la hidroxilación del C20 (Frank *et al.*, 2014). Asimismo, la enzima  $3\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa resulta de interés para la producción de esteroides puesto que es la responsable de la oxidación del hidroxilo presente en C2 para transformar AD en ADD. También esa enzima puede catalizar la reacción inversa, es decir, la transformación de ADD en AD. Esta enzima está presente en especies como *Pseudomonas putida* DOC21, codificada por el gen *kstH* (Merino *et al.*, 2013; Barrientos *et al.*, 2015) y en *Rhodococcus ruber* Chol-4, codificada por el gen *kstD2* (Fernández de Las Heras *et al.*, 2009; 2012).

## 4. Citocromos P450, CYP450

### 4.1. Definición, descripción y principales características

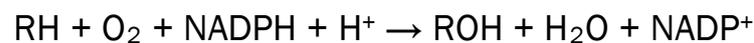
Los citocromos P450 (CYP450) son unas enzimas ampliamente distribuidas por la naturaleza. Se han descrito en bacterias, hongos, plantas, insectos y mamíferos (Urlacher and Girhard, 2012). En el genoma humano existen 57 CYP450, en el del arroz 457, en el hongo *Aspergillus nidulans* 119 y tan sólo 3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Urlacher y Girhard, 2012). Los CYP450 de mamíferos, plantas y hongos están comúnmente asociados a membranas, lo que dificulta su manipulación y/o expresión. Estas proteínas suelen participar en reacciones de síntesis o de degradación de sustancias fisiológicas o xenobióticos que actúan como drogas o que, por haberse acumulado en determinados hábitats, se han convertido en contaminantes ambientales (Nebert, 1979, 1990).

Los CYP450 fueron descubiertos en los años 50 (Garfinkel, 1958). Concretamente, el primer citocromo P450 se identificó en microsomas hepáticos (Omura y Sato, 1962). Inicialmente fueron identificados como “pigmentos” y su máximo de absorción se producía a 450 nm, debido a que se forma un aducto con el monóxido de carbono ( $\text{Fe}^{2+} - \text{CO}$ ) (Urlacher et al., 2004). Por estas dos características los científicos los denominaron “P450”. Este grupo de moléculas representan una superfamilia de monooxigenasas que contienen un grupo hemo de tipo b. Éste es un grupo prostético constituido por un átomo de hierro coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno presentes en los anillos pirrólicos de la porfirina. Además de los citocromos P450, la hemoglobina y la mioglobina son ejemplos de proteínas transportadoras de oxígeno que contienen, como grupo prostético, un grupo hemo de tipo b. En estos casos, el hierro del grupo hemo se encuentra coordinado con una histidina de la proteína, mientras que en los citocromos P450 la coordinación se produce con el grupo tiol de una cisteína. En la Fig. 22 se muestra la estructura del grupo hemo tipo b.



**Fig. 22.** Estructura química del grupo hemo de tipo b compuesto por un átomo de hierro coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno localizado en el en un anillo tetrapirrónico sustituido.

El principal interés de este grupo de proteínas radica en su extraordinaria capacidad de catalizar reacciones de monooxigenación de una manera regio y estereoselectiva (Urlacher y Eiben, 2006). Algunas de las enzimas pertenecientes a esta familia poseen una limitada especificidad de sustrato, sobre todo aquellos que participan en rutas anabólicas, como por ejemplo los que conducen a la síntesis de esteroides en animales y plantas. Los citocromos p450 poseen la capacidad de insertar un átomo de oxígeno, bien por hidroxilación o bien por epoxidación, en enlaces hidrocarbonatados de moléculas aromáticas y alifáticas de una manera totalmente específica (Urlacher *et al.*, 2004), lo cual les otorga un gran interés farmacéutico y químico. De manera general, se puede representar su acción mediante la reacción que se expresa a continuación y en la que R representa al sustrato (Parikh *et al.*, 1997):



Para que tenga lugar la catálisis mediada por los citocromos P450 es imprescindible la existencia de proteínas redox que transfieran los electrones desde el NAD(P)H hasta los citocromos. Sin embargo, no todos los sistemas de CYP450 emplean el NAD(P)H como molécula reductora. Este criterio permite la clasificación de los CYP450 en distintos grupos según el tipo de proteínas donadoras de electrones que utilicen (Urlacher y Eiben, 2006; Hannemann *et al.*, 2007):

- Sistemas P450 microsomales: los electrones son transferidos desde el NAD(P)H vía citocromo P450 reductasa. Este tipo de citocromos se expresan en la membrana del retículo endoplásmico y es el que se da en las especies fúngicas.
- Sistemas P450 mitocondriales: los electrones son transferidos desde el NAD(P)H mediante una flavoproteína denominada adrenoxina.
- Sistemas P450 bacterianos: el sistema donador de electrones se denomina ferredoxina.
- Sistemas P450 CYB5R: los electrones precisados por el citocromo son cedidos por un citocromo b5.
- Otros: existen otros sistemas que no requieren una aportación externa de electrones puesto que ellos mismos tienen esta capacidad reductora.

#### 4.2. Citocromos P450 más relevantes en la síntesis de esteroides

David Cooper y colaboradores fueron los primeros en descubrir la relación de los citocromos P450 con la síntesis de esteroides y demostraron que el monóxido de carbono inhibía la actividad 21-hidroxilasa en los microsomas adrenales (Cooper *et al.*, 1965). Posteriormente, se describieron nuevas implicaciones de los CYP450 en la esteroidogénesis, incluyendo la demostración de la actividad de escisión de la cadena lateral del colesterol a manos de un citocromo P450 en las mitocondrias de las células adrenales (Halkerston *et al.*, 1961; Ichii *et al.*, 1965; Simpson y Boyd, 1966); la identificación de la actividad aromatasa en microsomas de la placenta (Ryan, 1959), así como la purificación de la enzima con actividades 17-hidroxilasa y 17,20-liasa en una única proteína del testículo de cerdos (Nakajin *et al.*, 1981). Con el avance de la Biología Molecular, que posibilitó la clonación de hidroxilasas esteroideas, se identificaron muchos de los genes codificantes de estas enzimas junto con la caracterización de mutaciones en estos genes que provocaban enfermedades humanas. Sin embargo, el estrecho margen de sustratos reconocidos por los citocromos relacionados con la síntesis de esteroides contrasta con el amplio rango de sustratos que admiten aquellos citocromos implicados en la degradación de xenobióticos, como ocurre, por ejemplo, con los citocromos P450 presentes en los hepatocitos que vehiculizan la función detoxificadora del hígado, ya que la bibliografía describe que son solo seis citocromos los implicados en el metabolismo de las medicinas de uso más habitual (Parikh *et al.*, 1997).

Debido a la extraordinaria capacidad de los citocromos para catalizar reacciones de monooxigenación de manera regio y estéreo selectiva, y por su implicación en la síntesis de esteroides, se convirtieron en moléculas dianas para su uso en la industria farmacéutica (Urlacher y Eiben, 2006; Munro *et al.*, 2013; Sakaki *et al.*, 2013). Los citocromos de origen humano fueron los que despertaron mayor interés biotecnológico (Pikuleva y Waterman, 2013). En la **Tabla 1** se recogen los CYP450 más destacados en la síntesis de hormonas esteroideas en humanos.

El traslado de estos citocromos humanos a sistemas heterólogos se antoja complicado debido a su difícil expresión y a la existencia de diferentes localizaciones de expresión, habiendo citocromos de tipo microsomal y otros mitocondriales (Dumas *et al.*, 1996; Duport *et al.*, 1998; Schiffer *et al.*, 2015). De hecho, se han expresado en numerosas ocasiones citocromos P450 humanos relacionados con la síntesis de esteroides en sistemas heterólogos; tal es el caso de la expresión del CYP11A1 en *E. coli* (Shkumatov *et al.* 2006; Vinogradova, *et al.*, 2007). En estas publicaciones se

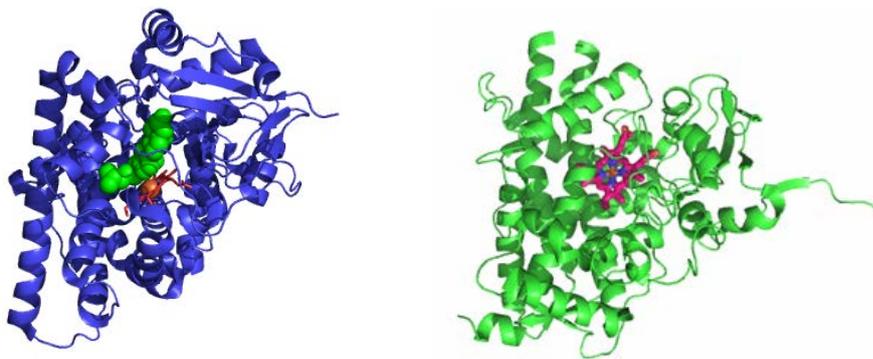
describe la transformación del colesterol a la pregnenolona con un rendimiento muy bajo. Por este motivo, los sistemas más empleados siguen siendo los eucariotas (levaduras), más próximos que los sistemas bacterianos (Szczegara *et al.*, 2003), pero en los que, aun así, la expresión y biotransformación *in vivo* no se produce a niveles adecuados para escalar el proceso a nivel industrial.

Como consecuencia de estas dificultades de expresión de citocromos humanos en sistemas heterólogos, especialmente para los CYP450 mitocondriales, se han empleado también citocromos bacterianos y fúngicos, en lugar de los citocromos de mamíferos, lo cual resulta una interesante alternativa para la producción industrial de compuestos esteroideos (Agematu *et al.*, 2006). No obstante, en estos casos, existe una dificultad añadida a la mera, y ya de por sí complicada, expresión de un citocromo, que es el desconocimiento de los citocromos P450 y de las ferredoxinas/ferredoxina reductasas implicadas. Ello obliga bien al uso de la especie silvestre, limitando de esta forma la capacidad de sobreexpresión del citocromo, o bien, a la identificación y posterior clonación de esas enzimas en el microorganismo apropiado.

Como expondremos en el desarrollo de Resultados, durante este trabajo hemos empleado distintos citocromos P450 de diferentes procedencias con la finalidad de introducirlos y expresarlos en sistemas fúngicos y estudiar su actividad. Así, los citocromos analizados en este trabajo han sido: el CYP11A1 y CYP17A1 de origen humano; los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 procedentes de *Mycobacterium smegmatis* y otros con actividad identificada como de 11-hidroxilación como el CYP509C12 de *Rhizopus oryzae*; el CYP103168 de *Cochliobolus lunatus* y los identificados por nosotros en el desarrollo de este trabajo con esa misma actividad en *A. nidulans* (CYP68L1) y en *A. ochraceus* (CYP68L8). A continuación, se exponen las principales características de los más estudiados.

- **CYP11A1:**

En primer lugar, el CYP11A1 se trata de un citocromo P450 mitocondrial, también denominado P450<sub>scc</sub> (“*side chain cleavage*”) (Halkerston *et al.*, 1961) con gran relevancia debido a que es una de las pocas hemoproteínas en vertebrados capaces de iniciar la esteroidogénesis a partir de colesterol (Pikuleva, 2006; Mast *et al.*, 2011). La función de esta enzima es la de retirar parcialmente la cadena lateral del colesterol hasta originar pregnenolona. En la **Fig. 23** se muestra la estructura tridimensional del CYP11A1 junto con el CYP17A1 de origen humano.



**Fig. 23.** Estructura tridimensional de los citocromos CYP11A1 (azul) y CYP17A1 (verde). Imágenes tomadas del Instituto Sanger.

Esta actividad es muy importante puesto que la transformación previa de colesterol a pregnenolona posibilita la producción de todo el abanico de hormonas esteroideas. La deficiencia congénita de esta enzima da lugar a una hiperplasia adrenal que es letal en ausencia de tratamiento adecuado. En la especie humana, los niveles de expresión de esta enzima son más altos en la corteza adrenal y en el cuerpo lúteo, precisamente allí donde la síntesis de hormonas esteroideas es mayor (Hanukoglu, 1992).

El mecanismo de escisión de la cadena lateral presente en el C17 del colesterol comprende tres reacciones. En primer lugar, el colesterol sufre una hidroxilación en el C22 formando el 22-hidroxicolesterol; seguidamente, ocurre otra hidroxilación en el C20 originando el 20 $\alpha$ ,22-dihidroxicolesterol y, finalmente, se produce una ruptura entre el C20 y C22 resultando en pregnenolona y ácido propiónico (Hanukoglu y Rapoport, 1995). Como molécula donadora de electrones, el CYP11A1 emplea el NADPH a través de la flavoproteína adrenoxina reductasa.

- **CYP17A1**

El citocromo P450 17A1 es una hemoproteína presente en el retículo endoplásmico (**Fig. 23**) del hombre y de otros mamíferos, cuya actividad enzimática 17 $\alpha$ -hidroxilasa sobre el C17 de los esteroides le otorga su denominación (Fisher *et al.*, 1992). No obstante, este citocromo también posee actividad 17,20-liasa que consiste en la ruptura de la cadena lateral a la altura del C20 para, a continuación, formar un doble enlace sobre el C17. Esta enzima fue descubierta en testículo de cerdo por Nakajin y colaboradores (Nakajin *et al.*, 1981) y es abundante en la zona fascicular y reticular de las glándulas adrenales así como en las células de Leydig de los testículos o las células de la teca de los ovarios (Escobar *et al.*, 2011).

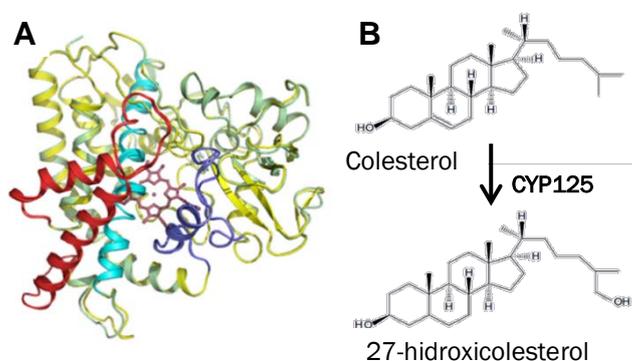
El CYP17A1 puede emplear como sustratos la pregnenolona o la progesterona. Con respecto a su actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa, cuando se emplea la progesterona como sustrato, el CYP17A1 da lugar no solo a la 17-OH-progesterona sino que también forma 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (20-25%) y 11-deoxicorticosterona (DOC) (1%). Sin embargo, en la hidroxilación de la pregnenolona, el CYP17A1 solo produce 17-OH-pregnenolona. En cuanto a la acción 17,20-liasa, la reacción implica la oxidación del enlace C17-C20, y empleando la 17-OH-pregnenolona el citocromo resulta entre 50 y 100 veces más eficiente que cuando utiliza la 17-OH-progesterona como sustrato (Auchus *et al.*, 1998; Flück *et al.*, 2003). En cualquier caso, esta enzima desempeña la transformación de la pregnenolona a la dehidroepiandrosterona (DHEA) así como de la progesterona a la androstenediona en la esteroidogénesis (Hanukoglu, 1992).

- **CYP125A3 y CYP142A2**

Los miembros del género *Mycobacterium spp.* comparten una ruta de degradación del colesterol común que se inicia con la oxidación de su cadena lateral (C17) a cargo de los citocromos P450 de las familias 125 y 142 (Frank *et al.*, 2014). Estos citocromos, CYP125 y CYP142, han sido ampliamente estudiados en *Mycobacterium tuberculosis* y en *M. bovis*, al tratarse de los agentes etiológicos de la tuberculosis humana y bovina, respectivamente. Debido a la importancia que presenta su mecanismo de patogenidad, estos dos citocromos se han utilizado como blanco terapéutico. Ambos se inducen en los macrófagos del hospedador en los que el uso del colesterol resulta esencial para la supervivencia de la micobacteria (McLean *et al.*, 2010). No obstante, para el desarrollo de este trabajo y con el fin de determinar su implicación en la degradación del colesterol y su uso comercial para conseguir la síntesis de esteroides, nosotros hemos empleado los genes que codifican estos citocromos de la especie *Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155* (CYP125A3 y CYP142A2), una especie no patógena para el hombre.

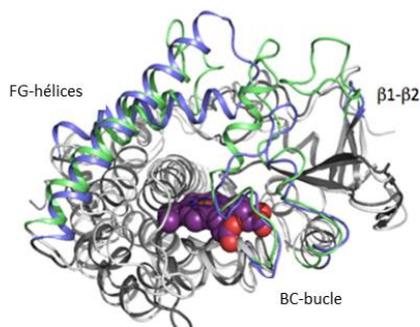
El CYP125 está codificado por un gen localizado en un regulón ampliamente conservado entre diferentes especies de *Rhodococcus spp.* y *Mycobacterium spp.* (van der Geize *et al.*, 2007) en los que es responsable del catabolismo del colesterol. Concretamente, esta enzima se encarga de realizar una hidroxilación en la posición C27 del colesterol (**Fig. 24**), aunque también puede emplear como sustrato el colest-4-en-3-ona (Capyk *et al.*, 2009; McLean *et al.*, 2009). La introducción de un grupo hidroxilo en la posición C27 de la cadena lateral del colesterol posibilita su degradación a través de la reacción de  $\beta$ -oxidación, una

vez oxidado a un grupo carboxilo. Cuando se analiza la interacción del CYP125 con el colesterol, se observa que su cadena lateral se extiende hasta el grupo hemo del citocromo, hecho que permite predecir que esta proteína es responsable de la hidroxilación en el C27 presente en este esteroide (McLean *et al.*, 2009). En la **Fig. 24** se representa la estructura obtenida por cristalografía del CYP125 así como su acción de hidroxilación sobre el colesterol.



**Fig. 24.** A – Imagen tridimensional del CYP125. B – Reacción catalizada por el CYP125 sobre el colesterol consistente en la introducción de un grupo hidroxilo en C27 (McLean *et al.*, 2009).

Al igual que ocurre con el CYP125, el citocromo P450 142 es responsable de una de las etapas enzimáticas que participan en el metabolismo del colesterol y que está conservado en diferentes especies pertenecientes a los géneros *Mycobacterium* y *Rhodococcus*. Esta enzima emplea el colesterol y la colest-4-en-3-ona como sustratos y, según el patrón de óxido-reducción que se use, genera tanto 27-hidroxi-derivados como, mediante sucesivas oxidaciones, ácido 5-colestenoico y ácido colest-4-en-3-ona-27-oico (Driscoll *et al.*, 2010). En la **Fig. 25** se compara la estructura cristalina de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 de *M. smegmatis*.



**Fig. 25.** Superposición de la estructura tridimensional obtenida por cristalografía del CYP125A3 (en verde) y del CYP142A2 (en azul), que refleja la similitud de ambos citocromos (Driscoll *et al.*, 2010).

# **HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

---

---



## 1 Hipótesis de trabajo

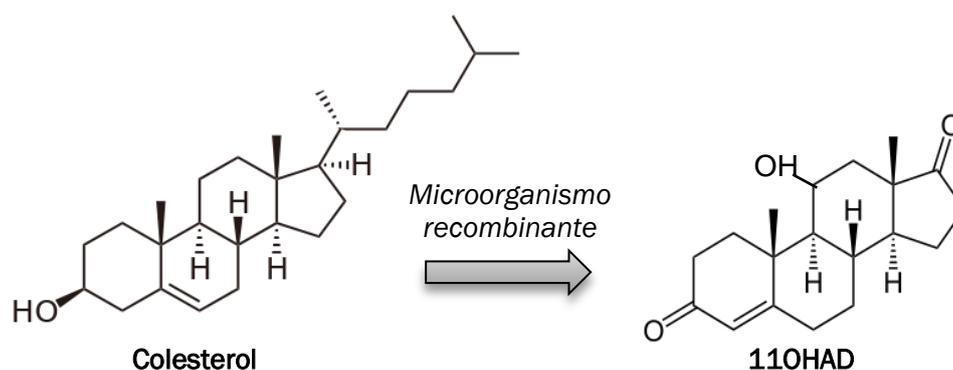
Dada la gran relevancia médica y comercial de los esteroides en la actualidad y la enorme competencia que existe entre las muchas empresas que se dedican a la obtención de estos compuestos, resulta esencial la búsqueda de nuevas vías de síntesis que permitan implementar la rentabilidad y acercar estos fármacos a la población más desfavorecida. En este sentido, la biotransformación de esteroides es, desde hace tiempo, una excelente alternativa a los métodos de síntesis química tradicionales y brinda la oportunidad de aprovechar la capacidad de ciertos microorganismos para introducir modificaciones sobre el núcleo esterano de manera específica, haciendo posible la reducción de los pasos de síntesis, el empleo de catalizadores (metales pesados) y que, en líneas generales, conducen a un método más rápido, eficiente y menos contaminante.

En este trabajo pretendemos ir un poco más lejos utilizando la Ingeniería Genética para obtener microorganismos recombinantes en los que se hayan introducido los genes pertinentes, de manera que dispongamos de un microorganismo capaz de biotransformar, por sí solo, un precursor barato en un esteroide de interés farmacéutico y comercial. De esta manera, no solo evitaríamos el uso de pasos de síntesis química, sino que también se eliminaría la necesidad de realizar varias fermentaciones, disminuyendo considerablemente los costes de estos procesos.

Durante la realización de esta tesis doctoral, nos hemos centrado en el empleo de hongos, en especial aquellos pertenecientes al del género *Aspergillus spp.*, ya que en ellos se ha descrito la presencia de citocromos P450 capaces de actuar sobre el anillo ciclopentanoperhidrofenantreno introduciendo grupos funcionales. Entre todas las actividades enzimáticas presentes en estos hongos, cabe mencionar la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa, capaz de introducir un grupo hidroxilo en posición 11 y en configuración  $\alpha$ . Se trata de una enzima de interés farmacéutico habida cuenta de las propiedades antiinflamatorias que poseen los derivados hidroxilados en la posición C11 del anillo CPHF. Considerando la importancia de esta enzima, se ha empleado, en primera instancia, el hongo *Aspergillus nidulans* como microorganismos modelo, teniendo en cuenta las ventajas que ofrece puesto que ha sido bien caracterizado bioquímica y genéticamente.

El objetivo fundamental de este trabajo es la obtención, en una única fermentación, del compuesto 11 $\alpha$ -hidroxi-androstenediona partiendo de precursores de bajo coste (colesterol o fitoesteroides). Tal y como se muestra en la **Fig. 26**, esta

biotransformación consistiría en la eliminación de la cadena lateral (C17) del esteroide de elección, junto con la introducción de un grupo hidroxilo en posición C11. Para lograr esta meta, se ha planteado, por una parte, la introducción de los genes responsables de la eliminación de la cadena lateral de origen humano (CYP11A1 y CYP17A1) o bacteriano (CYP125A3 y CYP142A2, procedentes de *Mycobacterium smegmatis*). La segunda opción es llevar a cabo la identificación y clonación del citocromo P450 responsable de la 11 $\alpha$ -hidroxilación en *A. nidulans* y *A. ochraceus* para conseguir su sobreexpresión en el propio hongo e introducirlos en un microorganismo que, como *Mycobacterium smegmatis*, fuese capaz de eliminar la cadena lateral de los esteroides.



**Fig. 26.** Biotransformación del colesterol (o fitoesteroides) al compuesto 11OHAD en un solo paso de fermentación que se persigue lograr mediante la creación de un microorganismo recombinante.

Asimismo, se pretenden realizar diversas fermentaciones empleando distintos esteroides como precursores con la finalidad de analizar las biotransformaciones que sobre ellos pueden ocasionar las siguientes especies fúngicas:

- *Aspergillus nidulans*, ya que es la especie modelo objeto de este estudio.
- *A. ochraceus*, por ser el miembro de *Aspergillus* usualmente empleado por la industria farmacéutica.
- *Rhizopus oryzae*, con el fin de comparar su actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa con la de los miembros de *Aspergillus spp.*
- *Cochliobolus lunatus*, puesto que posee una 11 $\beta$ -hidroxilasa.

Por otra parte, se quiere llevar a cabo la clonación de distintas enzimas presentes en ciertos microorganismos (bacterianos o fúngicos) cuya actividad resulta interesante para la obtención industrial de esteroides comerciales. En este caso, se empleará el hongo *Aspergillus nidulans* como organismos receptor de esos genes, para comprobar en él su expresión y la actividad de las enzimas que codifican.

## 2 Objetivos

Tras este planteamiento, para la realización de esta tesis doctoral se han fijado los siguientes objetivos:

1. Estudio de las biotransformaciones que las cepas silvestres de las especies de elección (*Aspergillus nidulans*, *A. ochraceus*, *Rhizopus oryzae* y *Cochliobolus lunatus*) son capaces de realizar.
2. Introducción y expresión en *Aspergillus nidulans* de los genes que codifican los citocromos humanos CYP11A1 y CYP17A1.
3. Introducción y expresión en *A. nidulans* de los genes que codifican los citocromos CYP125A3 y CYP142A2, procedentes de *Mycobacterium smegmatis*.
4. Identificación y clonación del gen que codifica de la 11 $\alpha$ -hidroxilasa presente en *A. nidulans*.
5. Identificación y clonación del gen que codifica de la 11 $\alpha$ -hidroxilasa presente en *A. ochraceus*.
6. Introducción y expresión de los genes que codifican otras enzimas con actividad 11-hidroxilasa en *A. nidulans*, procedentes de *Rhizopus oryzae* y de *Cochliobolus lunatus*.
7. Introducción y expresión de los genes que codifican enzimas con actividad sobre esteroides en *A. nidulans* tanto de origen fúngico como bacteriano.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

---



## 1. Microorganismos

### 1.1. Bacterias:

#### 1.1.1. *E. coli*

Para la construcción y aislamiento de plásmidos se empleó la cepa *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Estados Unidos), cuyo genotipo es *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F- *proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)*]. Estas bacterias se hicieron electrocompetentes utilizando métodos bien conocidos (Miller y Nickoloff, 1995).

#### 1.1.2. Otras cepas bacterianas empleadas

Como cepas donadoras de genes codificantes de enzimas implicadas en el metabolismo de esteroides, se emplearon:

- *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (Snapper *et al.*, 1990).
- *Pseudomonas putida* DOC21, que pertenece a la colección de nuestro grupo de investigación y fue aislada a partir de muestras de suelo próximas a la Universidad de León (Merino *et al.*, 2013).
- *Rhodococcus ruber* Chol-4 (Fernández de Las Heras *et al.*, 2009).

#### 1.1.3. Condiciones y medios de crecimiento

Para el cultivo de bacterias en medio líquido se empleó LB (Luria-Bertani) (Fisher, Alemania) y para su cultivo en medio sólido se utilizó LB-Agar (Sigma, Japón), preparados, ambos, siguiendo las indicaciones del fabricante. La temperatura de crecimiento fue de 37°C.

Como criterio de selección de las cepas transformadas se emplearon una solución de ampicilina a una concentración de trabajo de 150 µg/ml, siendo la concentración *stock* de 100 mg/ml, y una solución de kanamicina, cuya concentración era de 50 µg/ml (concentración de partida de 100 mg/ml).

El medio líquido enriquecido SOC se empleó para cultivar las bacterias después de su transformación mediante electroporación. Este medio se compone (p/v) por: 2% triptona, extracto de levadura al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 10 mM y glucosa 20 mM.

Para la selección blanco-azul de los clones correspondientes a diferentes construcciones, se utilizó LB suplementado con X-Gal a una concentración de 8 mg/L de LB. Para ello se partía de una concentración *stock* del 2% (p/v) en dimetilformamida.

## 1.2. Hongos

### 1.2.1. *Aspergillus nidulans*

#### 1.2.1.1. *Cepa silvestre*

Como cepa silvestre de *Aspergillus nidulans* se empleó la cepa FGSC A4 (*Fungal Genetics Stock Center*), cuyo genotipo es *biA1*, es decir, deficiente en biotina. Esta cepa se tomó como WT (*wild type*) para evitar contaminaciones con otras cepas.

#### 1.2.1.2. *Cepa yA2, pyroA4, pantoB100*

La cepa *yA2, pyroA4, pantoB100* es una cepa de *A. nidulans* que se ha empleado como cepa receptora de genes con el fin de obtener cepas recombinantes. Se trata de una cepa cedida por el Prof. Dr. Peñalva (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España), en la que la mutación *yA2* le da un color amarillo característico de sus esporas. Ésta es una cepa auxótrofa para las vitaminas ácido pantoténico y piridoxina debido a las mutaciones *pyroA4* y *pantoB100* y que fueron utilizadas como marcadores para realizar diversos estudios de integración genética. Para simplificar, durante este trabajo, nos referiremos a ella como “cepa control”.

#### 1.2.1.3. *Cepa nkuAΔ*

Para llevar a cabo la comprobación de la actividad del gen que codifica la 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. nidulans*, se construyó una cepa knock-out (KO). Para ello, empleamos una cepa carente en el gen responsable de la reparación del DNA que es necesario para la recombinación no homóloga, denominado *nkuA* (Nayak et al., 2006). Se trata de una cepa auxótrofa para las pirimidinas (citosina, uracilo y uridina) y la piridoxina, cuyo genotipo es: *nkuAΔ, pyrG89, pyroA4* (Nayak et al., 2006). Además, posee un gen de resistencia al herbicida glufosinato. Durante este trabajo, a esta cepa la denominaremos “nku”.

#### 1.2.1.4. *Cepas transformantes*

Durante el desarrollo de este trabajo hemos construido diversas cepas transformantes de *A. nidulans* partiendo de la cepa control o de la cepa *nku*. En la siguiente tabla (**Tabla 4**) se recogen todas ellas así como una descripción de las mismas.

Tabla 4: Relación de los diferentes transformantes obtenidos durante este estudio.

Cepa transformante	Descripción	Inserto
CYP11A1-1	yA2, <i>pantoB100</i>	Expresa el gen humano <i>CYP11A1</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD (proteína gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa constitutiva).
CYP11A1SP-1	yA2, <i>pantoB100</i>	Expresa el gen humano <i>CYP11A1</i> con el péptido señal del gen <i>PhacA</i> de <i>A. nidulans</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
CYP17A1-1	yA2, <i>pyroA4</i>	Expresa el gen humano <i>CYP17A1</i> en <i>pantoB100</i> desde el promotor de la GPD
CYP125-3	yA2, <i>pantoB100</i>	Expresa el gen <i>CYP125A3</i> de <i>M. smegmatis</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
CYP142-2	yA2, <i>pantoB100</i>	Expresa el gen <i>CYP142A2</i> de <i>M. smegmatis</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
KO	<i>nkuAΔ</i> , <i>pyroA4</i>	<i>CYP68L1</i> interrumpido con <i>PyrG</i> de <i>A. fumigatus</i> en <i>pyrG89</i>
GPD4	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen <i>CYP68L1</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
P400	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen <i>CYP68L1</i> en <i>pyroA4</i> desde un fragmento del promotor inducible de 400 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530
P700	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen <i>CYP68L1</i> en <i>pyroA4</i> desde un fragmento del promotor inducible de 700 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530
P1000	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen <i>CYP68L1</i> en <i>pyroA4</i> desde un fragmento del promotor inducible de 1000 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530
AOp2	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen <i>CYP68AQ1</i> de <i>A. ochraceus</i> en <i>pyroA4</i> desde un fragmento del promotor inducible de 400 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530
A03	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen <i>CYP68L8</i> de <i>A. ochraceus</i> en <i>pyroA4</i> desde un fragmento del promotor inducible de 400 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530
ANAO4	<i>nkuAΔ</i>	Expresa un gen híbrido conteniendo <i>CYP68L1</i> y <i>CYP68L8</i> en <i>pyroA4</i> desde un fragmento del propio promotor inducible de 400 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530

RO-1	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen <i>CYP509C12</i> de <i>Rhizopus oryzae</i> en <i>pyroA4</i> desde un fragmento del propio promotor inducible de 400 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530
CL-1	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen <i>CYP103168</i> de <i>C. lunatus</i> en <i>pyroA4</i> desde un fragmento del propio promotor inducible de 400 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530
17AN-2	<i>yA2, pantoB100</i>	Expresa el gen de la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de <i>A. nidulans</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
KO.17AN-2	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen de la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de <i>A. nidulans</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
17CL-1	<i>yA2, pantoB100</i>	Expresa el gen de la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de <i>C. lunatus</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
KO.17CL-1	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen de la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de <i>C. lunatus</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
KO.AN0765-3	<i>nkuAΔ</i>	Expresa un posible gen de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de <i>A. nidulans</i> (AN0765) en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
KO.AN7575-2	<i>nkuAΔ</i>	Expresa un posible gen de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de <i>A. nidulans</i> (AN7575) en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
Rhod-5	<i>yA2, pantoB100</i>	Expresa 3β-cetoesteroide-Δ1,2-deshidrogenasa de <i>R. ruber</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
KO.Rhod-2	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen de la 3β-cetoesteroide-Δ1,2-deshidrogenasa de <i>R. ruber</i> en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
Pseud-1	<i>yA2, pantoB100</i>	Expresa el gen de la 3β-cetoesteroide-Δ1,2-deshidrogenasa de <i>P. putida</i> DOC21 en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD
KO.Pseud-2	<i>nkuAΔ</i>	Expresa el gen de la 3β-cetoesteroide-Δ1,2-deshidrogenasa de <i>P. putida</i> DOC21 en <i>pyroA4</i> desde el promotor de la GPD

### 1.2.2. *Aspergillus ochraceus*

La cepa silvestre de *A. ochraceus* fue obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 2093).

### 1.2.3. *Cochliobolus lunatus*

La cepa silvestre de *Cochliobolus lunatus* (CECT 2130) fue obtenida desde la misma colección arriba indicada.

### 1.2.4. *Rhizopus oryzae*

La cepa silvestre de *Rhizopus oryzae* (CECT 2672) fue cedida por el grupo de investigación de Prof. Dr. José Luis García del CIB (CSIC, Madrid, España), y corresponde a la cepa ATCC 10404 depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo.

### 1.2.5. Medios de crecimiento

#### 1.2.5.1. Medio mínimo líquido (MML)

Para valorar el crecimiento y para la obtención de micelio se empleó una modificación del medio descrito por Ferrer-Sevillano y Fernández-Cañón en 2007 (Ferrer-Sevillano y Fernández-Cañón, 2007), que denominaremos Medio Mínimo Líquido (MML) y cuya composición es la siguiente:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM  
NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 2% (p/v)  
Mg SO<sub>4</sub>·7(H<sub>2</sub>O), 1 mM  
\*Sales de Hutner: 1 ml

Se completó hasta 1 L con agua destilada, se ajustó su pH a 7 con KOH. Se esterilizó 15 minutos a 120°C. Posteriormente, se añadió una solución de glucosa estéril con el fin de alcanzar una concentración final de 55 mM (1% p/v).

(\*) Las sales de Hutner constan de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 180 mM, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10 mM, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 18 mM, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 7 mM, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 25 mM, (NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 1 mM y EDTA 200 mM. El pH se ajustó a 6,5 - 6,8 con KOH (Hutner et al., 1950).

#### 1.2.5.2. Medio mínimo sólido (MMS)

Para observar el crecimiento en placas se empleó el MML suplementado con un 2% (p/v) de agar bacteriológico. Este medio lo denominaremos en adelante MMS (medio mínimo sólido). Se añadieron los suplementos nutricionales requeridos por cada cepa.

#### 1.2.5.3. Medio de esporulación

Para obtener esporas se emplearon placas que contenían extracto de malta con agar, Condalab (España), que por cada litro de agua destilada, contiene: 1,75 g de

extracto de malta, 2,75 g de dextrina, 2,35 g de glicerol, 0,78 g de peptona y 15 g de agar bacteriológico.

#### **1.2.5.4. Medio de fermentación**

Para evitar posibles variaciones en el pH del cultivo a lo largo de los días que duraba la fermentación, utilizamos MML en el que la concentración de fosfato potásico se incrementó de 10 a 100 mM.

#### **1.2.5.5. Medio de regeneración**

Para realizar las transformaciones fúngicas era preciso emplear un medio que estuviera equilibrado osmóticamente y, por tanto, que evitase que los protoplastos se lisaran. Para ello, se utilizó el denominado medio de regeneración (de protoplastos), consistente en el MMS al que se añadía sacarosa 1 molar (Tilburn *et al.*, 1983).

#### **1.2.6. Condiciones de crecimiento**

Los cultivos sólidos de todas las cepas de *A. nidulans* se incubaron a 37°C y los cultivos líquidos de esta especie fueron cultivados también a 37°C y a 250 rpm. El resto de especies fúngicas (*A. ochraceus*, *Cochliobolus lunatus*, *Rhizopus oryzae*) se incubaron a 27,5°C, con agitación (líquido) o sin ella (sólido).

## 2. Obtención, manipulación y análisis de ácidos nucleicos

### 2.1. Obtención de DNA

#### 2.1.1. DNA plasmídico

La extracción y purificación de plásmidos se realizó empleando los kits comerciales *NucleoSpin Plasmid Extract* (Macherey-Nagel, Alemania). La purificación de fragmentos de DNA, por su parte, fue ejecutada empleando el kit comercial *NucleoSpin gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel), siguiendo las pautas del fabricante.

#### 2.1.2. A partir de cultivos bacterianos

La obtención de DNA a partir de cultivos bacterianos se llevó a cabo, según los fines, bien mediante la lisis de las colonias empleando un buffer de lisis (EDTA 0,1 M, Tris pH 7,6 0,1 M, NaOH 1M, SDS 1%) para el *screening* de plásmidos de las colonias transformantes, o bien, mediante el hervido de las mismas a 98°C, 5 minutos, para experimentos de PCR.

#### 2.1.3. A partir de cultivos fúngicos

La obtención de DNA a partir de cultivos fúngicos se realizó mediante el filtrado del micelio a través de una gasa estéril (Millipore, Estados Unidos), el cual, tras ser resuspendido en TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM), se sonicó con una amplitud del 50% durante 10" (en un equipo *Branson Digital Sonifier 450 Cell Disruptor*) y, posteriormente, fue fenolizado. Para ello, se añadió un volumen de fenol/cloroformo/Tris-HCl (Fisher), pH 8, se agitó y se centrifugó (máxima velocidad) durante 2 minutos. A continuación, se tomó la fase superior (fase acuosa), se descartó el resto y se añadió otro volumen de cloroformo repitiendo el proceso. La fase superior se recogió y, para una mejor calidad del DNA resultante, se precipitó con acetato sódico 2,5 M, pH 5,2.

Además, cuando se precisaba DNA genómico con la calidad necesaria para proceder a la secuenciación del genoma de *A. ochraceus*, se partió de un cultivo líquido del que se obtuvo, por filtración, el micelio. Éste fue congelado a -80°C y, posteriormente, liofilizado. A continuación, se procedió a su fragmentación con una varilla de vidrio. La lisis de las células fúngicas se realizó gracias a la acción del buffer de liofilización (sacarosa 0,5 M, Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 20 mM) y del SDS al 1%. Finalmente, se fenolizó varias veces y se precipitó con acetato sódico 2,5 M pH 5,2.

## 2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (PTC-200 MJ-Research) empleando diferentes tipos de polimerasa según el propósito de la PCR.

- *Phire Hot Start II* DNA polimerasa (Fisher), usada para amplificar fragmentos de rutina, tales como comprobaciones.
- *Phusion High-Fidelity* DNA polimerasa (Fisher), utilizada para amplificar fragmentos con el menor número de errores posible, dada su actividad exonucleasa 3'-5' que le permite hacer correcciones de sus errores sobre la secuencia amplificada.
- Taq polimerasa (Biotools, España), empleada en algún caso para llevar a cabo amplificaciones en las que con la *Phire* o la *Phusion* se formaban bandas inespecíficas.

Las condiciones generales de la PCR requeridas, se recogen en la **Tabla 5**. No obstante, cuando fue necesario, esas condiciones fueron modificadas.

**Tabla 5:** Condiciones de las reacciones de PCR en función de la polimerasa que se había utilizado.

Polimerasa	Desnaturalización inicial	Desnat. por ciclo	Hibridación*	Elongación	Elongación final
<i>Phire</i>	98°C, 2'	98°C, 5''	- °C, 10''	72°C, 10-15''/kb	72°C, 2'
<i>Phusion</i>	98°C, 1'	98°C, 5''	- °C, 10''	72°C, 15-30''/kb	72°C, 2'
<i>Taq</i>	95°C, 2'	95° 20''	- °C, 30''	72°C, 30''-1'/kb	72°C, 5'

(\*) La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se calculó en función de su secuencia, utilizando la herramienta web "*Tm calculator*" de Fisher.

## 2.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados para cada caso en particular y serán especificados en la **Tabla 8**. Fueron suministrados bien por *Integrated DNA Technologies* (IDT, Estados Unidos) o bien por Metabion, de Condalab, empleando una concentración *stock* de 5 µM y final entre 0,1 y 0,5 µM.

## 2.4. Digestión y ligación

Las reacciones de digestión se hicieron empleando enzimas de restricción de distintas casas comerciales, así como sus correspondientes buffers, pero siguiendo siempre las especificaciones de la casa comercial e incubándolas a 37°C durante 2 horas.

Por su parte, las reacciones de ligación se llevaron a cabo empleando la enzima T4 ligasa de Fisher, junto con el buffer proporcionado por el fabricante e incubando a 16°C *overnight*.

## 2.5. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó para el análisis tanto cuantitativo como cualitativo del DNA. El gel de agarosa empleado (Agarose D-1 Low EEO, Condalab) fue elaborado rutinariamente al 1% en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8). Para llevar a cabo la electroforesis, se sumergieron los geles cargados en TAE 1X en las cubetas de electroforesis (BioRad, Estados Unidos) y se aplicó una corriente continua de 5 V/cm. Tras su tinción con bromuro de etidio (Fluka, Estados Unidos, a 0,5 µg/ml), los geles se fotografiaron mediante un dispositivo transiluminador Geldoc (BioRad). Para el análisis de fragmentos de RNA el procedimiento fue el mismo, aunque en lugar de TAE 1X se empleó TBE 0,5X (Tris 65 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 22,5 mM, EDTA 1,25 mM pH 8).

### 2.5.1. Tampón de carga

El tampón de carga se preparó a partir de una concentración 10X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilene cianol, 50% glicerol, 2,5X TAE y 10 mM EDTA 0,5M pH~8).

Los marcadores de peso molecular utilizados como referencia en las electroforesis en gel de agarosa fueron los proporcionados por Fisher (GeneRuler de 1kb). Se añadieron 0,5 µg por gel, lo cual permitió cuantificar, de manera aproximada, las bandas de los fragmentos analizados.

## 2.6. Obtención de RNA

### 2.6.1. Obtención de RNA total

La obtención de RNA total se realizó a partir del micelio obtenido por filtración una vez resuspendido en trizol (TRI Reagent, Sigma), a razón de 1 ml de reactivo por 75 mg de micelio (peso húmedo), siguiendo las pautas del fabricante.

### **2.6.2. Obtención de RNA mensajero**

La purificación del mRNA a partir de RNA total se realizó utilizando el kit comercial de bolas magnéticas *Magnetic Bead Enrichment kit* (Mag-Bind® mRNA Kit, VWR Omega, Estados Unidos).

## **2.7. Síntesis de cDNA**

### **2.7.1. De cadena sencilla**

Para llevar a cabo reacciones de RT-PCR y con el fin de hacer un análisis de expresión a nivel transcripcional, se sintetizó cDNA de cadena sencilla que se amplificó por PCR. Para ello, empleamos el kit comercial *Maxima Minus H First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase* (Fisher), que incluye un tratamiento de DNasas para evitar posibles contaminaciones. La RT-PCR se realizó empleando 2  $\mu$ l del cDNA resuspendido en un volumen final de 25  $\mu$ l, utilizando la Phire polimerasa y siguiendo las pautas marcadas por el protocolo del fabricante (*Maxima Minus H First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase*, Fisher)

### **2.7.2. De doble cadena**

La obtención de cDNA de doble cadena se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Double-Stranded cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen, Estados Unidos), de acuerdo con las directrices marcadas por la casa comercial.

## **2.8. Transformación de microorganismos**

### **2.8.1. Transformación de *E. coli***

Para realizar la transformación en *E. coli*, se utilizaron las células competentes de *E. coli* XL1-Blue (Stratagene). La eficacia de transformación esperada era de  $\geq 5 \times 10^{8-9}$  transformantes por microgramo de DNA del plásmido pUC18, pero esta cifra se redujo a  $10^6-10^7$  transformantes/ $\mu$ g cuando las células habían sido preparadas en nuestro laboratorio.

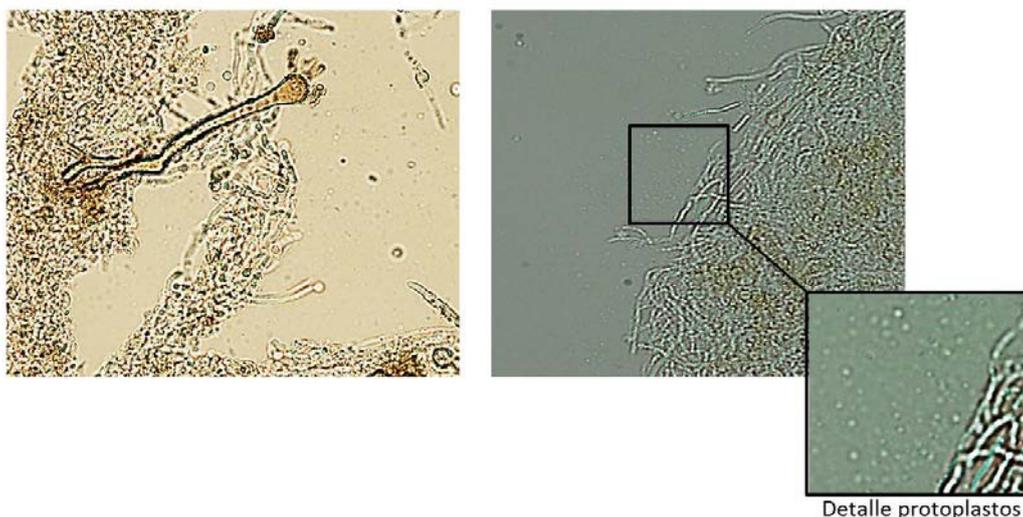
Las transformaciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Miller y Nickoloff, 1995). Se aplicó un pulso de 1,8 kV, durante 5 ms (MicroPulser, Bio-Rad) a una mezcla de células con el producto de ligación (2  $\mu$ l, desalado), después de lo cual se añadió 1 ml de medio SOC atemperado. Esa suspensión se incubó 1 h a 37°C en agitación (250 rpm). Trascorrido ese tiempo, se sembró en placas de LB-agar que contenían el antibiótico correspondiente.

### 2.8.2. Transformación fúngica

La transformación fúngica de las distintas cepas de *A. nidulans* se realizó siguiendo los protocolos descritos por Tilburn en 1983 y Yelton en 1984 (Tilburn *et al.*, 1983; Yelton *et al.*, 1984). Esta técnica consiste en la fusión de protoplastos obtenidos a partir de micelio incubado con la enzima lítica  $\beta$ -glucuronidasa de *Trichoderma harzianum* (de Bekker *et al.*, 2009).

El micelio, cultivado a 28°C, se recogió por filtración con una gasa estéril (Miracloth, Millipore) y se lavó con agua. Una vez filtrado, se resuspendió en TP (tampón de protoplastos: MgSO<sub>4</sub> 1,2 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 5,8) en una proporción de 20 ml/g de micelio escurrido. A la suspensión se añadieron 200 mg de enzima lítica (Glucanex, Sigma) por cada gramo de micelio, junto con 10 mg de BSA (Sigma), también por cada gramo de micelio. La acción de la enzima se mantuvo durante los 120 minutos siguientes (30°C, 120 rpm).

La liberación de protoplastos fue monitorizada al microscopio de manera que, cuando se consideró óptima (**Fig. 27**), se aislaron cubriendo la solución lítica con un mismo volumen de colchón de flotación (sorbitol 0,6 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5) y centrifugando 25 minutos a 4500 rpm a 4°C. Se recogió la interfase, donde estaban los protoplastos, para ser lavados tres veces en ST (Sorbitol 1M + Tris-HCl 10mM) y ser resuspendidos en 200  $\mu$ l de STC (Sorbitol 1M + Tris-HCl 10mM + CaCl<sub>2</sub> 10mM pH 7.5) al que se añadió 5-20  $\mu$ g del DNA transformante. Para facilitar la agrupación y fusión de protoplastos, éstos se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PEG (polietilenglicol 6000 al 60% + Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 + CaCl<sub>2</sub> 10 mM) y se incubó 10 minutos en hielo. A continuación, se añadió 1 ml de PEG y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Los protoplastos se recogieron por centrifugación. Finalmente, se volvieron a resuspender en STC (200  $\mu$ l) y se sembraron en placas de medio de regeneración, que contenían, además, las vitaminas requeridas por la cepa transformante. Las colonias aparecían, usualmente, a las 96 horas.



**Fig. 27.** Microfotografía óptica (40X) de los protoplastos obtenidos en dos preparaciones tras 90 minutos de incubación del micelio en presencia de la enzima lítica. Se aprecian las hifas lisadas por la acción de la enzima con la liberación progresiva de los protoplastos, que poseen forma redondeada e irregular y son traslúcidos.

## 2.9. Secuenciación del ADN

La secuenciación del DNA de las diferentes construcciones fue llevada a cabo en el Servicio de Secuenciación del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León y en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA (SSAD) del CIB-CSIC (Secugen S.L., España), utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Con el objetivo de identificar, por homología, la secuencia codificante de la 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. ochraceus*, se mandó a secuenciar su genoma completo al servicio de secuenciación de Genewiz (Estados Unidos) empleando la secuenciación Illumina® HiSeq™ X Ten.

## 2.10. Herramientas bioinformáticas

Durante el desarrollo de este trabajo se han empleado diversas herramientas bioinformáticas disponibles de manera gratuita a través de internet. Por una parte, los alineamientos y ensamblajes relativos a las construcciones se realizaron por el servicio online de CLUSTAL Omega V2.1 (Sievers *et al.*, 2011), con el NCBI BLAST V2.6.0. (Altschul *et al.*, 1990) del *National Center for Biotechnology Information* y con la herramienta web MultAlin (Corpet, 1988). Las predicciones de posibles cortes de restricción en las secuencias objeto de estudio se llevaron a cabo con la herramienta NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) de *New England Biolabs* (Estados Unidos).

### 3. Fermentaciones

#### 3.1. Condiciones

Con el fin de analizar la producción de esteroides tanto de las cepas silvestres como de las cepas transformantes en las diferentes especies fúngicas de estudio, se realizaron fermentaciones a pequeñas escala (volumen final de 50 – 100 ml) a las que se les añadió el esteroide de estudio y se analizaron las modificaciones introducidas a lo largo de 72 horas mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

Para llevar a cabo estos experimentos, se sembraron las esporas de la cepa objeto de estudio ( $10^7$  esporas/ml) en medio de fermentación en presencia de glucosa al 1% (p/v o 55 mM) junto con el esteroide apropiado (1 g/L, 3-3,5 mM). El cultivo se incubó entre 37°C y 27,5°C, según la especie de la que se tratara, y a 250 rpm. Para analizar la evolución de la biotransformación del esteroide se tomaron muestras a diferentes tiempos (habitualmente, cada 24 h).

#### 3.2. Toma y análisis de muestras

##### 3.2.1. Extracción

Para la toma de muestras, se cogieron 5 ml del cultivo en condiciones de esterilidad que fueron congeladas a -80°C hasta proceder a su extracción. Esta extracción se llevó a cabo añadiendo 3 ml de acetato de etilo y agitando cada muestra para permitir una correcta migración de los compuestos orgánicos (los esteroides) a la fase orgánica (acetato de etilo). Para separar las fases, se sometió a centrifugación a 4.200 rpm durante 10 minutos. A continuación, se tomó 1 ml de los 3 ml originales que componían la fase orgánica y se evaporó en una centrífuga de vacío (Jouan RC 1010). El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de etanol (calidad HPLC, VWR). Previamente a su análisis por HPLC, la muestra fue filtrada con filtros de jeringa de 0,45  $\mu$ m para eliminar cualquier resto sólido que pudiera afectar a la columna.

##### 3.2.2. Análisis por HPLC

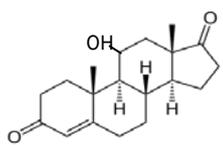
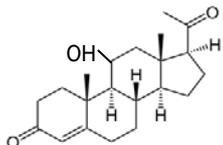
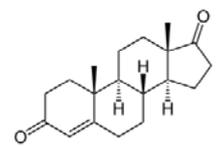
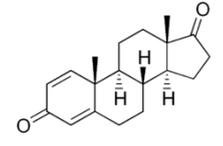
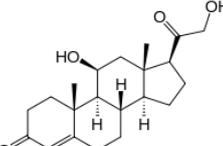
Para analizar las diferentes muestras se empleó un equipo de HPLC Alliance 2695 (Waters, Estados Unidos) equipado con un detector fotodiodo array 996 (Waters) de longitud de onda variable UV-visible, con una columna Kromasil C18 (Supelco, Sigma) de 5  $\mu$ m (250 x 4,6 mm) con una precolumna Nucleosil C18 5  $\mu$ m (10 x 4,6 mm). Como fase móvil, de rutina, se usó acetonitrilo/agua (60:40) a un flujo isocrático de 1,5 ml/min. La fase móvil se elaboró filtrando ambos componentes y se sonicó para evitar posibles restos de aire en la fase que dañaran la columna. La detección de los productos de reacción se llevó a cabo a una longitud de onda de 240 nm, aunque en

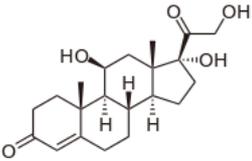
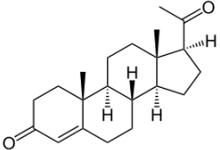
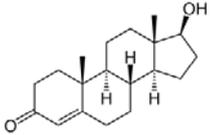
algunas ocasiones la detección se realizó a 210 nm (para la detección de pregnenolona).

### 3.2.2.1 Patrones

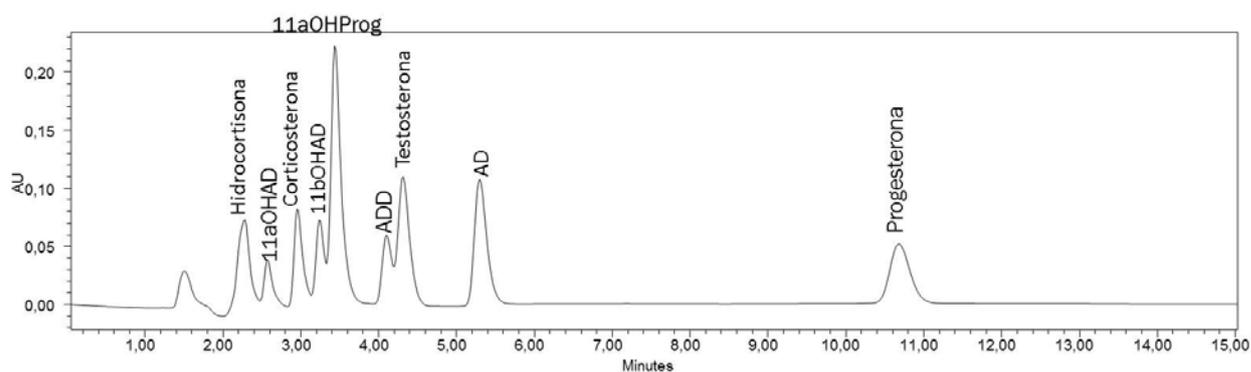
Se emplearon patrones de los esteroides más habituales en este tipo de estudios así como sus correspondientes 11-hidroxi-derivados, cuando se disponía de ellos. Los compuestos esteroideos empleados fueron: AD, ADD, pregnenolona, progesterona, testosterona, androsterona, corticosterona, hidrocortisona, 11-hidroxi-AD (11 $\alpha$ OHAD y 11 $\beta$ OHAD) y 11-hidroxi-progesterona (11 $\alpha$ OHProg). En la **Tabla 6** se recogen los tiempos de retención de esas moléculas y su estructura química. Todos los patrones fueron preparados a una concentración de 0,5 mg/ml.

**Tabla 6:** Tiempos de retención y estructura de los diferentes patrones empleados en este estudio.

Compuesto	Estructura química	Tiempo de retención (min)
11 $\alpha$ OHAD		2,6
11 $\beta$ OHAD		3,2
11 $\alpha$ OHProg.		3,4
AD		5,3
ADD		4,2
Corticosterona		3

Hidroclortisona		2,2
Progesterona		10,8
Testosterona		4,3

Asimismo, durante el transcurso de este estudio hemos podido comprobar que el 11 $\alpha$ -hidroxi-derivado de la testosterona presenta un tiempo de retención de 2,1 minutos; mientras que el 11 $\alpha$ -hidroxi-ADD tiene un tiempo de retención de 2,3 minutos. Además, es importante mencionar que la pregnenolona tiene un tiempo de retención de 10,6 min pero no se muestra en el cromatograma puesto que se lee a 210 nm (ya que no absorbe a 240 nm). En la **Fig. 28** se observa un cromatograma con los picos correspondientes a estos compuestos.



**Fig. 28.** Análisis cromatográfico (HPLC) de los diferentes esteroides utilizados como patrones. La determinación se realizó a 240 nm.

## 4. Expresión y clonación de diferentes genes

### 4.1. Transformación dirigida en *A. nidulans*

#### 4.1.1. Plásmidos empleados

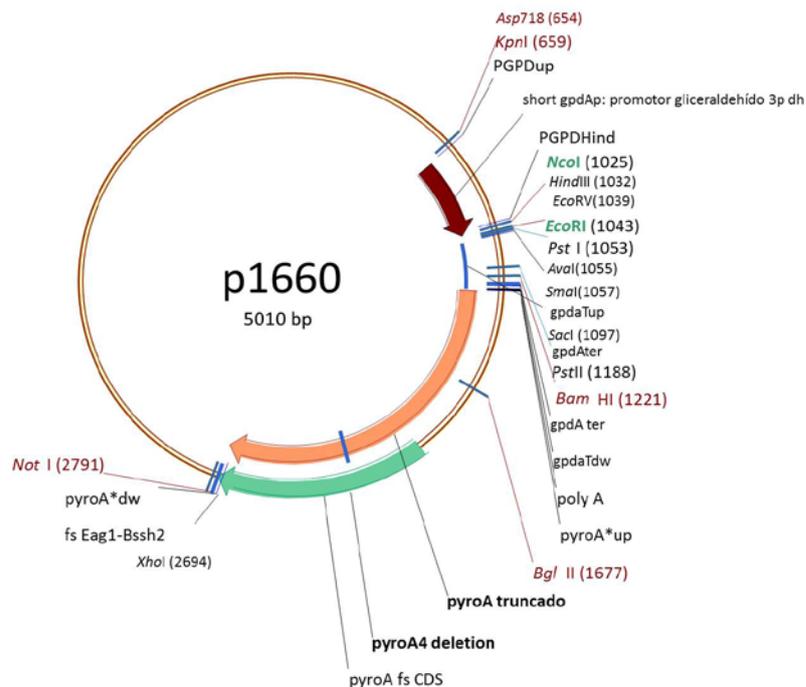
Para el desarrollo de este trabajo se emplearon los vectores de clonación recogidos en la **Tabla 7**.

**Tabla 7:** Relación de vectores de expresión empleados durante este trabajo.

Nombre	Descripción	Referencia
pBluescrip SK(+)	Vector de expresión bacteriana, derivado de fásmido escindido de lambda ZAP, con un cassette de resistencia a ampicilina y la secuencia de la $\beta$ -galactosidasa que permite la selección de colonias por blanco/azul.	Stratagene
pTZ57R/T (pTZ)	Vector de expresión bacteriana, que contiene el promotor T7, un cassette de resistencia a ampicilina y la secuencia de la $\beta$ -galactosidasa que permite la selección de colonias por blanco/azul	Thermo Fisher Scientific
pJET1.2	Vector de expresión bacteriana, que contiene el promotor T7, un cassette de resistencia a ampicilina y con un inserto letal que solo permite la recuperación efectiva de plásmidos con inserto	Thermo Fisher Scientific
p1660	Vector de expresión de <i>A. nidulans</i> , que contiene el promotor constitutivo de la GPD y el gen truncado <i>pyroA4</i>	Colección Dr. M. A. Peñalva (CIB-CSIC, España)
p1911	Vector de expresión de <i>A. nidulans</i> , que contiene el promotor constitutivo de la GPD y el gen truncado <i>pantoB100</i>	Colección Dr. M. A. Peñalva (CIB-CSIC, España)
p1660'	Vector de expresión de <i>A. nidulans</i> que contiene el promotor inducible de 400 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530 y el gen truncado <i>pyroA4</i>	Este trabajo
P700	Vector de expresión de <i>A. nidulans</i> que contiene el promotor inducible de 700 pb <i>upstream</i> del ATG del gen AN8530 y el gen truncado <i>pyroA4</i>	Este trabajo
P1000	Vector de expresión de <i>A. nidulans</i> que contiene el promotor inducible de 1000	Este trabajo

pb upstream del ATG del gen AN8530 y el gen truncado *pyroA4*

Para la clonación de los distintos genes que codifican las enzimas estudiadas en este trabajo se utilizaron los vectores p1660 y p1911 (colección del Prof. Dr. M.A. Peñalva, CIB-CSIC), ambos derivados del pBluescrip SK(+). La peculiaridad de estos vectores radica en que contienen un gen truncado implicado en la biosíntesis de las vitaminas piridoxina, *pyroA* (p1660) y ácido pantoténico, *pantoB* (p1911), lo cual permite no solo el uso de estas vitaminas como criterio de selección, sino también la integración dirigida del inserto en un lugar concreto del genoma del hongo, evitando efectos derivados de la integración inespecífica en distintas posiciones. Así, el plásmido p1660 contiene el gen truncado *pyroA* que complementa la delección de ese mismo gen presente en las cepas *yA2*, *pyroA4*, *pantoB100* (cepa control) y *nkuAΔ*, *pyrG89*, *pyroA4* (cepa *nku*). El gen *pyroA* codifica una enzima implicada en la biosíntesis de la vitamina piridoxina. Este plásmido también incluye un promotor constitutivo de la proteína GPD y el terminador de transcripción del mismo gen (Fig. 29).



**Fig. 29.** Estructura y componentes del vector p1660 empleado para la transformación de diferentes cepas de *A. nidulans* con el gen truncado *pyroA4* que permite originar la prototrofia para piridoxina.

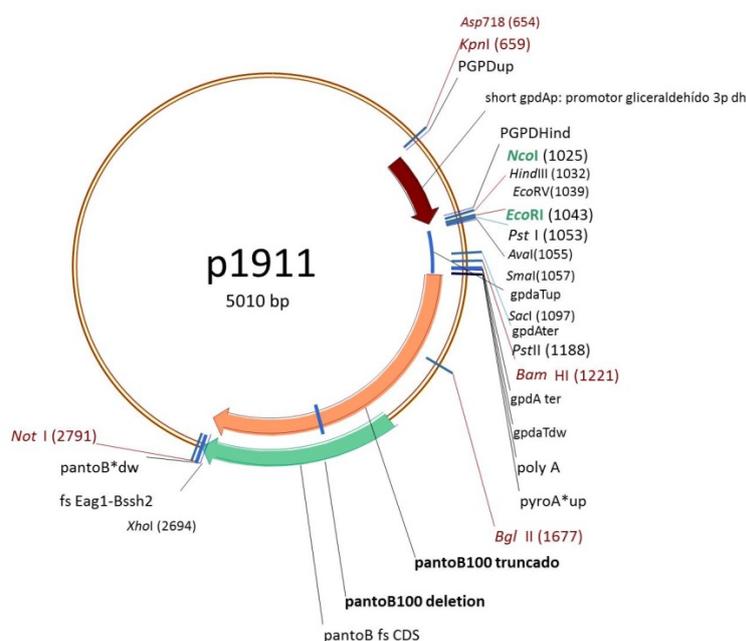
Cuando se transformaron las cepas receptoras de *Aspergillus nidulans* (control o *nku*, Fig. 30) con este plásmido, nos aseguramos de que la integración ocurriese en el sitio deseado ya que el gen *pyroA* truncado del vector complementaba la delección del

alelo *pyroA4*, presente en las cepas receptoras. Las integraciones en otros puntos del genoma no permitieron el crecimiento de los transformantes en un medio carente de piridoxina. Por ello, como criterio de selección se empleó la prototrofia para la piridoxina.



**Fig. 30.** Cepas receptoras de *A. nidulans* empleadas durante este trabajo. A la izquierda, la cepa denominada “control”, mutante de color amarillo (*yA2*) y que posee los marcadores de piridoxina (*pyroA4*) y ácido pantoténico (*pantoB100*). A la derecha, la cepa nombrada como “nku”, por tener mutado el gen *nkuA*, que posee los marcadores de auxotrofia para pirimidinas (*pyrG89*) y piridoxina (*pyroA4*) (ver apartado 1.2.1.2 y 3 de Materiales y Métodos).

Por su parte, el plásmido p1911 es igual al p1660 con la salvedad de que, en lugar de contener un gen truncado codificante para la piridoxina, lo tiene para el ácido pantoténico, es decir, posee un gen truncado *pantoB*. Como criterio de selección cuando transformamos la cepa control (*yA2, pyroA4, pantoB100*) se empleó la prototrofia para el ácido pantoténico. En la **Fig. 31** se muestra su estructura.



**Fig. 31.** Estructura y componentes del vector p1911 empleado para la transformación de la cepa control de *A. nidulans* con el gen truncado *pantoB100* que permite originar prototrofia para el ácido pantoténico.

#### 4.1.2. Genes objeto de estudio en *A. nidulans*

Durante el desarrollo de este trabajo se han introducido en *A. nidulans* diversos genes que codifican proteínas con interés farmacéutico y que estaban implicadas en la síntesis de esteroides. Para ello, se emplearon los plásmidos de expresión mencionados en el apartado anterior con el fin último de mejorar la rentabilidad de los procesos industriales de obtención de esteroides. En la **Tabla 8** se recoge una lista de los genes utilizados durante este trabajo así como los oligonucleótidos usados como cebadores que habían sido diseñados para su clonación.

**Tabla 8:** Relación de los genes clonados en *A. nidulans* en este trabajo y secuencia de los oligonucleótidos empleados para su amplificación.

Descripción	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>
<i>CYP11A1</i> humano NC_000015.10	<b>CYP11F:</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-gacaccatggtggccaagggtcttccccacgctc-3'	<b>CYP11R:</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-ccggaattctcactgctgggtgcttctctgg-3'
<i>CYP17A1</i> humano NC_000010.11	<b>CYP17F:</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-gccaccatgggggagctcgtggctctcttgctg-3'	<b>CYP17R:</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-ccggaattcttaggtgctaccctcagcctg-3'
<i>CYP125A3</i> de <i>M. smegmatis</i>	<b>CYP125-5':</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-ctagcccatggccacgccgaacatcccttc-3'	<b>CYP125-3':</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-cctcgaattctcagtgccgaccggcagg-3'
<i>CYP142A2</i> de <i>M. smegmatis</i>	<b>CYP142-5':</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-gactcccatggcgagatgctcaccaggcc-3'	<b>CYP142-3':</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-gcgggaattctctacgccagcacaggcgcc-3'
<i>CYP68AQ1</i> de <i>A. ochraceus</i>	<b>110HpAO-5':</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-cattaccatggccttctcactgggct-3'	<b>110HpAO-3':</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-gcgggaattctcagcatcctggtattg-3'
<i>CYP509C12</i> de <i>R. oryzae</i>	<b>CYP509-5':</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-gagaaaaggagtgacccatggcgatgg-3'	<b>CYP509-3':</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-ccaagcttccctagaattctctagat-3'
<i>CYP103168</i> de <i>C. lunatus</i>	<b>11bOH.CL-5':</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-ctaattccatggatccccagactgtcgggct-3'	<b>11bOH.CL-3':</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-cctcgaattcttactacactaccctctttaaagcca-3'
Posible 3 $\beta$ -HSD de <i>A. nidulans</i> : AN0765	<b>AN0765F:</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-gactcccatggacatcaagttcgtctctg-3'	<b>AN0765R:</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-gcgggaattctcaccaaccctctcc-3'
Posible 3 $\beta$ -HSD de <i>A. nidulans</i> : AN7575	<b>AN7575F:</b> corte <i>HindIII</i> (5') 5'-gactcaagcttatgactacaaaagcgacctaccatg-3'	<b>AN7575R:</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-gcgggaattctcactgcccttttttacc-3'
Posible 17 $\beta$ -HSD de <i>A. nidulans</i> : AN6450	<b>17bAN-5':</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-gactccatggcgctcggcggaaa-3'	<b>17bAN-3':</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-gcgggaattctctatgccatccccctg-3'
17 $\beta$ -HSD de <i>C. lunatus</i>	<b>17bCL-5':</b> corte <i>NcoI</i> (5') 5'-gactcccatggcgacgtggagaacgcct-3'	<b>17bCL-3':</b> corte <i>EcoRI</i> (3') 5'-gcgggaattcttagcgccgcccgtcca-3'
<i>kstD2</i> de <i>R. ruber</i>	<b>RhodkstD2F:</b> corte <i>NcoI</i> (5')	<b>RhodkstD2R:</b> corte <i>EcoRI</i> (3')

<b>Chol-4</b>	5'-gactcccatggcgaccaatcccgtaccggt-3'	5'-gctgggaattcagcgggacttcgctggc-3'
<b>kstH de <i>P. putida</i> DOC21</b>	<b>PseudkstHF:</b> corte <i>Hind</i> III (5') 5'-gactaagcttatgacggctcaagttcagttcaatccg-3'	<b>PseudkstHR:</b> corte <i>Eco</i> RI (3') 5'-gctgggaattcagcggcctcccggccag-3'

#### 4.1.3. Estrategia seguida para la clonación de genes en *A. nidulans*

La clonación de los diferentes genes y posterior introducción en *A. nidulans* se llevó a cabo mediante la amplificación, digestión y ulterior ligación de los mismos en los plásmidos de expresión p1660 y p1911 (apdo. 4.1.1. de Materiales y Métodos). En todos los casos, la amplificación se realizó partiendo de los oligonucleótidos específicos diseñados a tal fin (**Tabla 8**). En cada uno de ellos introducimos los cortes de restricción pertinentes.

En primer lugar, se llevó a cabo la amplificación del inserto y, posteriormente, se procedió al aislamiento de la banda con el tamaño esperado tras un análisis por electroforesis en gel de agarosa. El inserto purificado, con el kit comercial *NucleoSpin gel and PCR clean-up* de Macherey-Nagel, fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas, junto con el vector de clonación y, seguidamente, se ligaron (ver apartado 2.4 de Materiales y Métodos). El siguiente paso fue la transformación en *E. coli* por electroporación (apartado 2.8.1. de Materiales y Métodos), con el objetivo de obtener un plásmido que permitiera su secuenciación. Una vez comprobada la secuencia, se eligió un clon que no contuviera mutaciones para proceder a la transformación fúngica (apartado 2.8.2. de Materiales y Métodos).

#### 4.1.4. Selección de transformantes

Tras la transformación fúngica, para seleccionar los transformantes, hay que tener en cuenta que *Aspergillus nidulans* es un hongo polinucleado, por lo que en las colonias transformantes habrá núcleos + (llamamos así a los recombinantes) y núcleos - (designamos de este modo a los no recombinantes). Sin embargo, las esporas son mononucleadas por lo que para seleccionar los núcleos recombinantes, fue necesario obtener colonias aisladas procedentes de una única espora, a partir de las colonias transformantes primarias. La selección se realizó en medio mínimo suplementado con las vitaminas que fueron necesarias según la cepa esperada. Esta selección se completó mediante el aislamiento de DNA de las cepas transformantes (ver apartado 2.1.3. de este epígrafe) y se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos a fin de certificar que el inserto introducido estaba en el DNA genómico del hongo transformante. Tras la amplificación del inserto, se secuenció de nuevo a fin de asegurar su validez y constatar la ausencia de mutaciones en el mismo.

#### 4.1.5. Análisis de la expresión

Las cepas transformantes que se obtuvieron durante este trabajo fueron analizadas mediante un estudio de la expresión de los genes clonados tanto a nivel transcripcional como valorando los productos generados en las fermentaciones como consecuencia de una actividad enzimática concreta.

Por una parte, la expresión a nivel transcripcional se valoró mediante la realización de una RT-PCR que permitiera analizar si se estaba sintetizando el mRNA correspondiente al gen insertado. Para ello, se obtuvo RNA total, conforme al apartado 2.6.1 de esta sección. Posteriormente, se obtuvo el cDNA de cadena sencilla (ver apartado 2.7.1) y se amplificó por PCR empleando unos oligonucleótidos específicos. La amplificación fue analizada en un gel de agarosa y se comparó con la expresión de un fragmento del gen que codifica la proteína gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GPD), una proteína de expresión constitutiva en *A. nidulans* que empleamos como control positivo. Por su parte, el estudio de la actividad enzimática se realizó, indirectamente, valorando mediante fermentación la estructura de los compuestos esteroideos que se acumulaban en los caldos (ver apdo. 3 de Materiales y Métodos).

## 4.2. Clonación e identificación de proteínas

### 4.2.1. Hibridación supresivo-substractiva (SSH)

El gen responsable de la 11 $\alpha$ -hidroxilación no había sido identificado en *A. nidulans*. Por ello, con el fin de identificarlo, se llevó a cabo una técnica de substracción. Anteriormente, en nuestro laboratorio, se había clonado, por primera vez, la enzima fenilacetato 2-hidroxilasa siguiendo una técnica de substracción en columna (Fernández-Cañón y Peñalva, 1995). Actualmente, las técnicas de PCR permiten hacer una selección de cDNAs substraídos de forma más rápida y sencilla por lo que se realizó una hibridación supresivo-substractiva (en inglés, SSH), siguiendo el protocolo descrito por Diatchenko y colaboradores (Diatchenko *et al.*, 1999). Esta técnica es válida para la identificación de genes inducibles y está basada en la obtención de cDNAs inducidos (micelio cultivado en presencia del inductor - AD, en nuestro caso) y otros no inducidos. Posteriormente, se sometieron a una hibridación de manera que las secuencias presentes en ambas poblaciones de cDNAs (codificantes de proteínas constitutivas) podían ser descartadas puesto que hibridaban entre sí; mientras que solo aquellas secuencias que aparecían en condiciones de inducción permanecían libres como cDNA de cadena sencilla (cDNA substraído) (Diatchenko *et al.*, 1999). En nuestro caso, comprobamos que la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa era inducible en *A.*

*nidulans* (ver apartado 3.1.1. de Resultados y Discusión) por lo que esta técnica era apta para proceder a su identificación.

La selección de los cDNAs inducidos (cDNAs+) no hibridados fue posible gracias a la unión a adaptadores que permitieron la amplificación exponencial de los cDNAs de interés (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos. Como se aprecia en la Fig. 32, el cDNA+ se separa en dos poblaciones, estando una de ellas unida al adaptador 1 y la otra, al adaptador 2. Tras una primera hibridación, con exceso de cDNA no inducido (cDNAs-), los cDNAs+ unidos al adaptador 1 y 2, por separado, originaron una población de cDNAs+ no hibridados (hebras tipo a), además de poblaciones de cDNA hibridados entre inducidos y no inducidos (hebras tipo b, c y d). Para la segunda hibridación se mezclaron todos los tipos de hebras y se volvió a añadir cDNA- en exceso. Como resultado, encontramos los cuatro tipos de hebras anteriores (a-d) pero también las hebras de tipo e, correspondientes con poblaciones de cDNA+ unidas al adaptador 1 y al adaptador 2, que habían hibridado entre sí (Fig. 32).

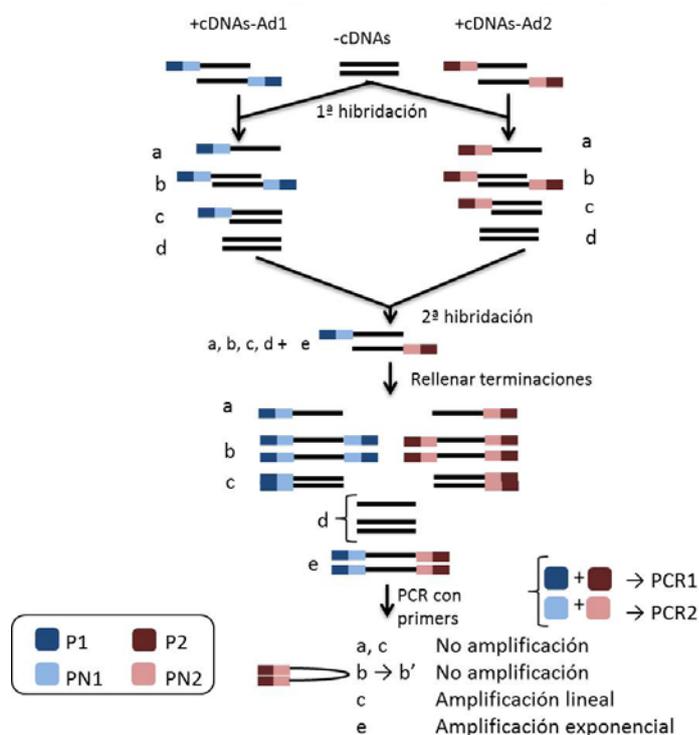


Fig. 32. Representación esquemática del procedimiento para la hibridación supresivo-substractiva (Diatchenko *et al.*, 1999).

Posteriormente, hubo que rellenar las terminaciones por complementariedad mediante un proceso de elongación inicial, catalizado por una polimerasa, de manera que en las hebras tipo e, los adaptadores 1 y 2 pasaron a estar presentes en ambos extremos. Estos adaptadores contenían los oligonucleótidos con los que realizamos las

amplificaciones. El adaptador 1 contenía los oligonucleótidos P1 (azul oscuro) y PN1 (azul claro) mientras que el adaptador 2 contenía los oligonucleótidos P2 (granate) y PN2 (rosa). Con estos oligonucleótidos (**Tabla 9**) se llevaron a cabo dos amplificaciones consecutivas. Para la primera se utilizaron los oligonucleótidos externos (P1 y P2) y para la segunda, los oligonucleótidos más internos (PN1 y PN2). Estas amplificaciones nos permitieron seleccionar las hebras tipo e ya que eran las únicas capaces de amplificarse exponencialmente por tener los dos adaptadores en ambos extremos.

**Tabla 9:** Secuencia de nucleótidos de los adaptadores 1 y 2 junto con la secuencia de los oligonucleótidos diseñados a partir de los adaptadores.

<b>ADAP1</b>	
5-GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT-3	
P1: 5-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3	PN1: 5-TCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT-3
<b>ADAP2</b>	
5-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGAATTCTGCGGATCCCGGT-3	
P2: 5-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3	PN2: 5-AGGGAATTCTGCGGATCCCGGT-3

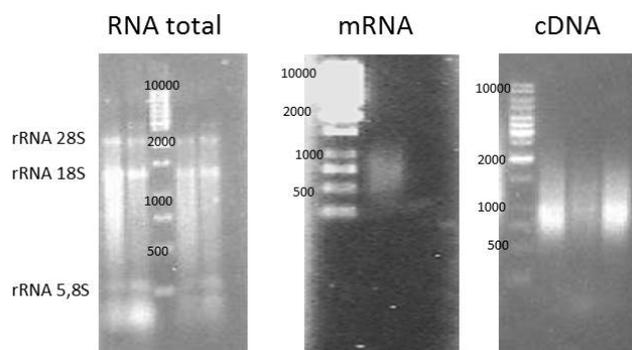
#### 4.2.1.1 Procedimiento

El procedimiento de SSH consta de cuatro pasos:

1. Inducción de la enzima: búsqueda y establecimiento de las condiciones que permiten la inducción de la enzima.
2. Aislamiento de RNA, mRNA y síntesis de cDNA (inducido y no inducido).
3. Sustracción: Hibridación supresivo-substractiva que permite la selección de cDNAs que solo aparecen en condiciones de inducción.
4. Clonación y secuenciación: clonación de las secuencias substraídas en el vector apropiado y su consiguiente secuenciación y comparación con el genoma recogido en la base de datos de *A. nidulans*.

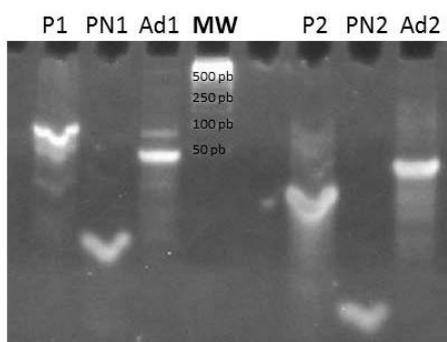
En primer lugar, para la obtención de cDNA inducido y no inducido se cultivaron dos matraces que contenían 100 ml de medio de fermentación y 1% (p/v) de glucosa con la cepa silvestre de *A. nidulans*. Tras 12 horas de crecimiento, se añadieron 150 mg de AD al cultivo inducido y nada al no inducido. Después de otras 12 horas de incubación, se recogió el micelio de ambos matraces por filtración. El aislamiento y la obtención de RNA y mRNA y síntesis de cDNA, a partir del micelio inducido y sin inducir, se realizaron siguiendo los pasos indicados en los apartados correspondientes (2.6 y 2.7 de Materiales y Métodos). En la **Fig. 33** se muestran los gels de agarosa

realizados para analizar la calidad y el tamaño del RNA total, del RNA mensajero y del cDNA obtenido a partir de micelio inducido (la calidad del micelio no inducido fue semejante).



**Fig. 33.** De izquierda a derecha, RNA total, RNA mensajero y cDNA obtenidos a partir de micelio inducido para la realización de la técnica SSH. El RNA total es de buena calidad puesto que se aprecian los RNA ribosómicos de 28S, 18S y 5,8S. El RNA mensajero presenta un tamaño medio entre 500 y 1500 pb, al igual que el que aparece para el cDNA.

Antes de la sustracción, se procedió a la elaboración de los adaptadores y su ligación al cDNA+. El adaptador 1 fue preparado mediante la ligación de los oligonucleótidos P1+PN1 y el adaptador 2 por ligación de los oligonucleótidos P2+PN2 (Fig. 34). Durante las hibridaciones, los adaptadores podían hibridar entre sí por complementariedad. Para evitar este efecto y permitir que se soltasen con la primera desnaturalización, los oligonucleótidos P1 y P2 estaban desfosforilados en su extremo 5'.



**Fig. 34.** Gel de acrilamida utilizado para el análisis de los adaptadores formados a partir de la ligación de los oligonucleótidos P1+PN1 (adaptador 1) y P2+PN2 (adaptador 2), por la acción de una ligasa T4. De izquierda a derecha: Carril 1- P1+P1, carril 2- PN1 + PN1, carril 3- P1+PN1 (adaptador 1), carril 4 - marcador de pesos moleculares, carril 5- P2+P2, carril 6- PN2+PN2 y carril 7- P2+PN2 (adaptador 2).

La sustracción se realizó por medio de dos hibridaciones. Para la primera, se hibridaron, por un lado, cDNA- en exceso (600 ng) con el cDNA+ (25 ng) unido al adaptador 1 (ad1); y, por otro lado, el cDNA- en exceso con el cDNA+ unido al

adaptador 2 (ad2). Ambas hibridaciones se precipitaron por separado con acetato sódico 3 M y se resuspendieron en 5  $\mu$ L de buffer SSH (Tris-HCl pH 8,3 50 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 20 mM y PEG 8000 10% p/v.). Una vez precipitadas, se desnaturalizaron a 98°C durante 5 min y se hibridaron a 68°C durante 24 h. Para la segunda hibridación, se mezclaron los dos tubos de la primera hibridación con el adaptador 1 y 2, respectivamente, y se añadió cDNA- en exceso y desnaturalizado (la adición de cDNA- extra es importante para asegurar que todo el cDNA+ de cadena sencilla no estaba hibridado debido a la falta de complementariedad y no a que no hubiera suficiente cDNA- para hibridar). La reacción de hibridación se realizó a 68°C durante 30 h, añadiendo aceite mineral en la superficie de la reacción para evitar su evaporación. Trascurrido el tiempo, se añadieron 10  $\mu$ L de TE y 10  $\mu$ L de cloroformo y se centrifugó a 10.000 x g 3 min para eliminar el aceite. Las hebras de cDNA inducidas resultantes de la segunda hibridación, es decir, el cDNA substraído (hebras tipo e, **Fig. 32**), se amplificaron (2  $\mu$ L de la reacción) con los oligonucleótidos específicos para poder ser diferenciado de aquellas otras hibridadas con el cDNA no inducido, tras una elongación inicial a fin de completar las terminaciones de las hebras tipo e con ambos adaptadores en los extremos 5' y 3'.

Las reacciones de PCR se realizaron con la *Phire Hot Start II DNA Polymerase*, que deja extremos romos en las hebras amplificadas para así poder realizar su clonación en el vector pBlueScript SK+ (pBS) abierto con *EcoRV* (enzima que deja extremos romos tras su digestión). Las condiciones fueron las siguientes:

- PCR 1 con P1 and P2, a una concentración de 0,2  $\mu$ M. Se requirió una extensión inicial para completar las terminaciones. Condiciones: 75° 5', (98° 5', 68° 10'', 72° 30'')x30, 72° 2'.
- PCR 2 con PN1 and PN2, a una concentración de 0,2  $\mu$ M. El producto de la PCR 1 fue diluido 10 veces y se empleó 1  $\mu$ L para la PCR 2. Condiciones: 98° 2', (98° 5'', 72° 35'')x20, 72° 2'.

La clonación y la secuenciación se llevaron a cabo para identificar los cDNAs substraídos (que habían aparecido debido a la presencia de AD). Para ello, se purificó el producto de la PCR 2 con el kit *PCR clean-up*, se ligó al vector de clonación pBS abierto por digestión con *EcoRV*, y se transformó en *E. coli* en placas de LB-ampicilina con X-Gal. Los clones transformantes fueron comprobados mediante lisis y digestión para ver que tenían inserto y secuenciación de 50 de ellos.

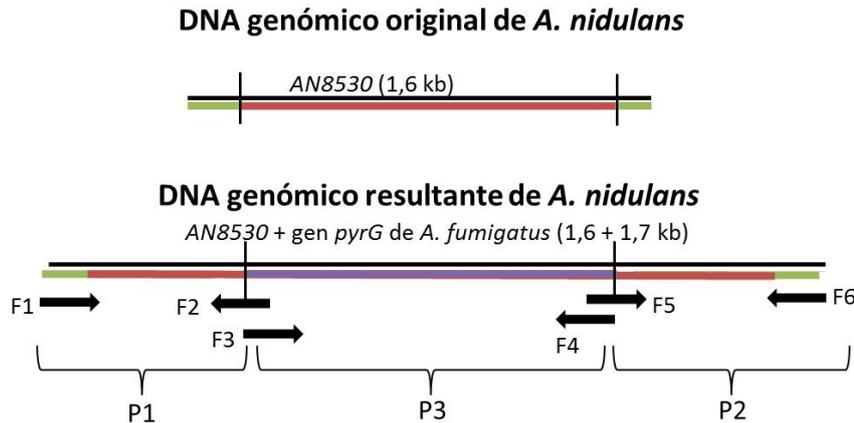
#### 4.2.2. Comprobación de los genes candidatos

Gracias a la secuenciación de los clones resultantes obtuvimos una serie de genes candidatos que podrían ser los responsables de la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. nidulans*. Con la finalidad de verificar cuál de ellos era responsable, se llevaron a cabo dos comprobaciones. La primera consistió en una primera criba donde se eligieron los cuatro genes candidatos que más veces habíamos observado en las secuenciaciones y que estaban o bien relacionados con el metabolismo de esteroides o bien habían sido identificados como CYP. Con estos genes candidatos se realizó una RT-PCR para ver cuál se amplificaba solo bajo condiciones de inducción y no lo hacía en las carentes de inducción, es decir, se trata de un análisis que permitió determinar la expresión a nivel transcripcional (ver apartado 3.1.1. de Resultados y Discusión). Una vez que pudimos elegir un único gen candidato, se obtuvo una cepa *knock-out* (KO) para ese gen con el fin de comprobar definitivamente que el gen candidato era el correcto, esperando que la cepa resultante no fuera capaz de hidroxilar diversos compuestos esteroideos en la posición 11, configuración  $\alpha$ .

##### 4.2.2.1. Realización de KO: PCR de fusión

Para la obtención de una cepa KO se llevó a cabo una PCR de fusión que nos permitió obtener un fragmento de DNA que interrumpía la secuencia codificante de nuestro gen candidato para la 11 $\alpha$ -hidroxilasa y, así, obtener una cepa no funcional para esta actividad. La cepa KO se obtuvo siguiendo el protocolo descrito por Szewczyk y colaboradores (Szewczyk *et al.*, 2006). Para construir esta cepa usamos como cepa receptora la cepa denominada como nku (ver apdo. 1.2.1.3 de Materiales y Métodos) (Nayak *et al.*, 2006).

Para ejecutar la PCR de fusión fue preciso identificar las zonas flanqueantes del gen candidato junto con la elección de un marcador de selección. De esta manera, mediante recombinación homóloga, la construcción lineal que contenía el marcador de selección interrumpiría el gen candidato en el genoma dando lugar una cepa recombinante KO para ese gen. En nuestro caso, el marcador de selección elegido fue el gen *pyrG* de *A. fumigatus*. Elegimos el gen de *A. fumigatus* en lugar del de *A. nidulans* para evitar una posible reparación por recombinación homóloga del alelo *pyrG69* de *A. nidulans*. En la **Fig. 35** se representa el diseño del fragmento lineal obtenido por PCR de fusión a partir del DNA genómico de *A. nidulans*. También se incluyen los oligonucleótidos diseñados para la construcción del fragmento.



**Fig. 35.** Representación esquemática de la construcción del fragmento de fusión de PCR que permite la obtención de la cepa KO concerniente al gen AN8530 de *A. nidulans* (Szewczyk *et al.*, 2006).

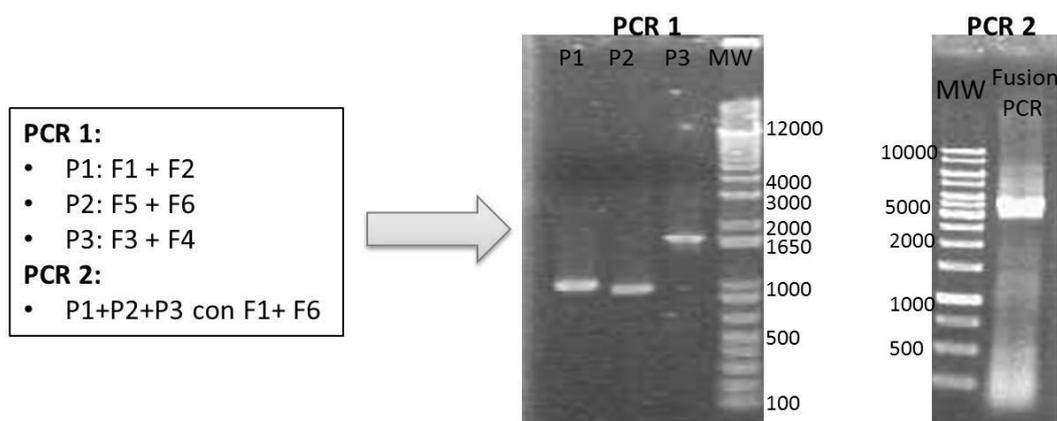
Para la obtención de la banda de fusión (**Fig. 35**) se amplificó la región P1 con los oligonucleótidos F1 y F2 (el oligonucleótido F2 incluye el principio de la secuencia del gen *pyrG*). Paralelamente, se amplificó la región P2 con los oligonucleótidos F5 y F6 (el oligonucleótido F5 incluye el final de la secuencia del gen *pyrG*). En tercer lugar, la región del gen *pyrG* (P3) de *A. fumigatus* se amplificó con los oligonucleótidos F3 y F4. En la **Tabla 10** se recogen las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para realizar la PCR de fusión. Para las reacciones de PCR empleamos la enzima *Phire Hot Start II DNA Polymerase*. Los oligonucleótidos se añadieron a una concentración de 0,3  $\mu$ M. Los productos de PCR (P1, P2 y P3) se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Fig. 36**), y se purificaron usando el kit *NucleoSpin gel and PCR clean-up*.

**Tabla 10:** Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para llevar a cabo la construcción del fragmento de fusión.

Fragmento	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>
P1	<b>F1</b> 5'-GCGGCCGGGACTGGAGTTGAGC-3'	<b>F2 (*)</b> 5'-GAAGAGGGTGAAGAGCATTGTTGAGG GGCTATCCATGGTGTGACAGAGTTG-3'
P2	<b>F5 (*)</b> 5'- <u>CCTACCAGTCATCTAGCAAGTGAGGT</u> GCAAGTGGTGCA GGGTTGAC TG-3'	<b>F6</b> 5'-GCCGCGGACAAGGTCCAGAG-3'
P3	<b>F3 (*)</b> 5'- <u>CCTCAAACAATGCTCTTCACCTCTTC</u> -3'	<b>F4 (*)</b> 5'- <u>ACCTCACTTGCTAGATGACTGGTAGG</u> -3'

(\*) La secuencia de los oligonucleótidos subrayada se corresponde con parte de la secuencia del gen *PyrG* de *A. fumigatus*.

Una vez que los tres fragmentos de fusión habían sido purificados (P1, P2 y P3), se procedió a realizar la PCR de fusión partiendo de 0,7 ng de P1, 0,7 ng de P2 y 1,3 ng de P3 (la proporción de cada fragmento se hizo de acuerdo a su tamaño para que fueran equivalentes en molaridad). Al igual que para la primera PCR, se empleó la *Phire Hot Start II DNA Polymerase* y la concentración de los oligonucleótidos fue de 0,4  $\mu$ M. El análisis del producto resultante (5 kb) se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (**Fig. 36**). A partir de la banda de agarosa, se purificó el fragmento con el kit comercial *NucleoSpin gel and PCR clean-up* y se procedió a transformar la cepa *nkuA $\Delta$  de *A. nidulans* (ver apdo. 1.2.1.3 de Materiales y Métodos) usando el fragmento lineal.*



**Fig. 36.** Amplificación de los fragmentos P1, P2 y P3 en la PCR1 y PCR de fusión (PCR2) partiendo de los tres fragmentos utilizados para obtener la banda de fusión.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---



## 1. Biotransformaciones de esteroides con cepas silvestres fúngicas

Los esteroides son moléculas derivadas del ciclopentanoperhidrofenantreno que cumplen importantes funciones en muchos seres vivos (ver apdo. 1 de la Introducción). Por esta razón, muchas empresas farmacéuticas han abordado la síntesis de estos compuestos. Para ello, se han seguido dos estrategias diferentes. La más antigua consiste en la obtención de estas moléculas mediante síntesis química. La otra, más moderna, pretende obtener compuestos de interés médico mediante el empleo de microorganismos utilizando procesos de fermentación. La síntesis química, aunque con menores costes asociados, presenta inconvenientes derivados del tiempo requerido para llevar a cabo las reacciones y debido, además, al uso de reactivos que actúan como contaminantes medioambientales. Por ello, la producción de esteroides utilizando microorganismos es considerada como un método más limpio y eficiente y puede ser enmarcado dentro de la conocida Biotecnología Verde.

En este sentido, hasta hace pocos años, la obtención microbiana de esteroides se realizaba mediante el empleo de cepas silvestres, bien de naturaleza bacteriana (como *Mycobacterium smegmatis*) o fúngica (como *Rhizopus spp.* o *Aspergillus spp.*). Hoy en día, el desarrollo de la Ingeniería Genética y el conocimiento de los genomas de muchos de estos microorganismos ha hecho posible el uso de cepas recombinantes que conducen a la síntesis de esteroides mediante procesos de biotransformación. Aunque, de momento, los costes de estos procesos son mayores que los requeridos para la síntesis química, habida cuenta de las dificultades relacionadas con la implantación de nuevas tecnologías en la industria, se trata de una aproximación tecnológica con gran futuro.

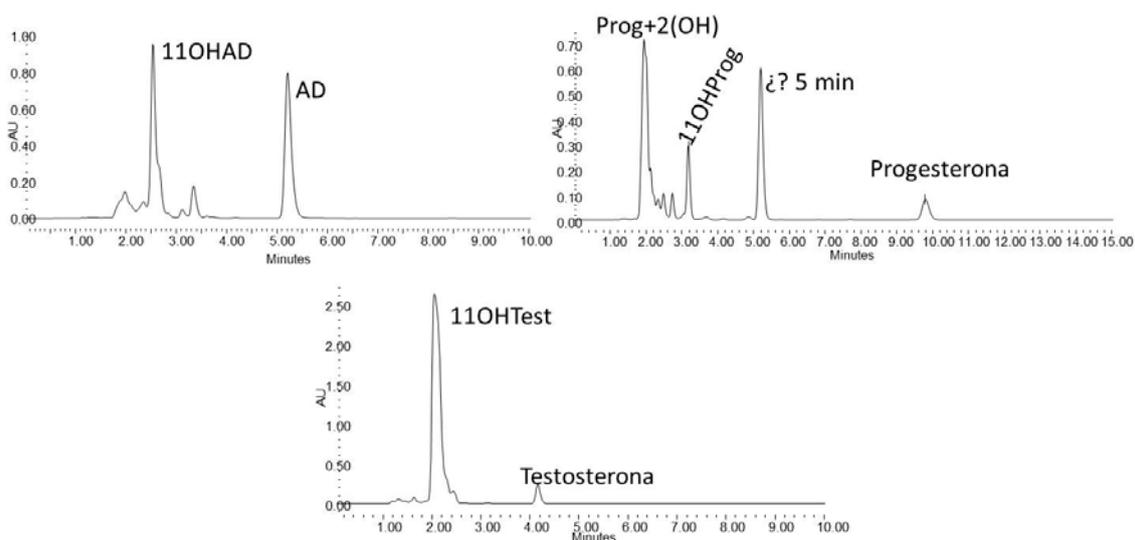
Por este motivo, en esta tesis hemos abordado como objetivo el estudio de las biotransformaciones que distintas especies fúngicas (*A. nidulans*, *A. ochraceus*, *R. oryzae* y *C. lunatus*) ejercen sobre tres compuestos esteroideos: androstenediona (AD), progesterona y testosterona (a una concentración de 1 g/L, 3 – 3,5 mM). La finalidad de este estudio ha sido comprobar el potencial que poseen estas cuatro especies fúngicas para hidroxilar el núcleo esteroídico en C11 así como para introducir otras modificaciones que pudieran resultar de interés comercial.

### 1.1. *Aspergillus nidulans*

La bibliografía describe que los miembros del género *Aspergillus* son capaces de realizar una 11 $\alpha$ -hidroxilación sobre diversos compuestos esteroideos (Capek *et al.*, 1963; Fernandes *et al.*, 2003). Por ello, hemos realizado diferentes fermentaciones

con *A. nidulans* (cepa silvestre) usando como sustratos AD, progesterona y testosterona. Una vez realizadas las fermentaciones, se procedió a la extracción de compuestos orgánicos de los caldos de cultivos y a su posterior análisis mediante HPLC (ver apartado 3.2. de Materiales y Métodos).

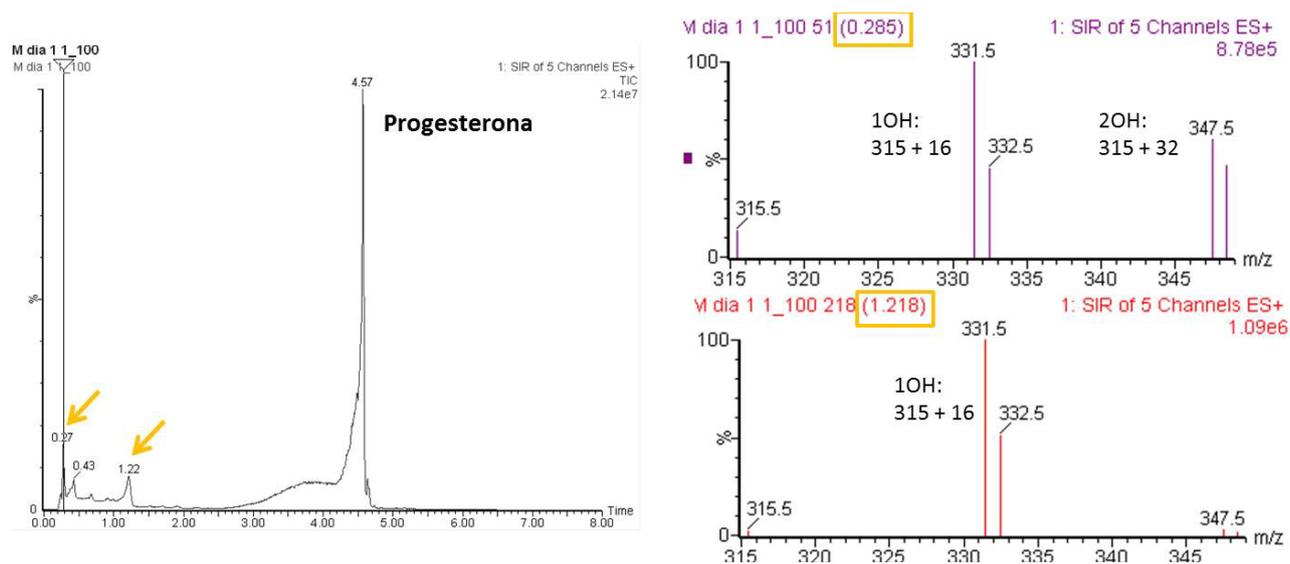
En la **Fig. 37** se observa que tras 72 h de crecimiento, *A. nidulans* era capaz de transformar AD en 11 $\alpha$ -hidroxi-AD (11 $\alpha$ OHAD) con un rendimiento superior al 50%. Además, ésta es una reacción específica ya que no se aprecia la formación de otros productos en una proporción detectable. Cuando se añadió progesterona, *A. nidulans* era capaz de biotransformarla prácticamente en su totalidad en otros compuestos de distinta naturaleza (**Fig. 37**). Por una parte, se observa un pico que coincide con el patrón de 11 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (minuto 3,4). Entre las 24 y 48 horas, este compuesto se acumulaba y era mayoritario, pero a las 72 horas se transformaba a otros subproductos cuyo tiempo de retención (TR) era de 2 min. Por otra parte, se aprecia un tercer pico (TR 5 min) que podría tratarse de AD. Sin embargo, esta posibilidad fue descartada ya que se añadió esta sustancia a la muestra y verificamos que no coincidían sus tiempos de retención. Finalmente, se realizaron las fermentaciones en presencia de testosterona (**Fig. 37**). En este caso, todo el esteroide se transformó a un único compuesto identificado como 11 $\alpha$ -hidroxi-testosterona.



**Fig. 37.** Cromatogramas obtenidos mediante análisis por HPLC de las muestras de las fermentaciones en las que se había incubado la cepa silvestre de *A. nidulans* (72 h) en presencia de AD, progesterona y testosterona.

Para intentar establecer la estructura del compuesto que poseía un TR de 2 min y que se obtenía en la fermentación llevada a cabo en presencia de progesterona, se realizó un análisis ulterior por UPLC-MS (*Ultra High Performance Liquid*

Chromatography acoplado a espectrometría de masas) en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. El método de ionización empleado fue ES+ (*electrospray ionization in positive ion mode*), por lo que se obtuvieron iones protonados de peso molecular + 1. Gracias a este estudio, se comprobó que el compuesto liberado en el minuto 2 correspondía a una combinación de 11-hidroxi-progesterona con otro compuesto. La masa de 331,5 g/mol mostrada en la Fig. 38 (color morado) corresponde a 314+1 g/mol de la progesterona más 16 g/mol del grupo hidroxilo. Junto a este compuesto, y seguramente debido a un efecto de arrastre, aparecía otra molécula cuyo peso molecular era 347 g/mol (que se corresponde con la progesterona de 315 g/mol más dos hidroxilos de 32 g/mol, Fig. 38 en morado). Además, el compuesto que en nuestras condiciones de análisis tenía un tiempo de retención semejante a la AD (TR 5 min), se trataba de una molécula que poseía un grupo hidroxilo en una posición distinta a C11 (Fig. 38, rojo). En la Fig. 38 se muestra el cromatograma obtenido por UPLC de la muestra y el posterior análisis, por separado, de cada pico por espectrometría de masas. Aunque no podemos asegurar qué otros derivados hidroxilados se estaban formando a partir de la progesterona, podría suponerse que fuesen derivados hidroxilados tanto en C11 y C17 (configuración alfa) tal y como describió Zohri en el año 2000 (Zohri, 2000).



**Fig. 38.** Análisis por UPLC-MS del producto acumulado cuando se cultiva la cepa silvestre de *A. nidulans* en presencia de progesterona tras 72 h de cultivo. En la imagen se aprecia que el primer pico (0,285 min) es el resultado de la mezcla de un compuesto con una masa de 335 g/mol (315+16, con un hidroxilo), junto con otro con una masa de 347 g/mol (315 + 16 + 16, con dos hidroxilos). El pico de TR 1,218 min se corresponde a un producto con un único grupo hidroxilo, de masa 331 g/mol.

En resumen, podemos decir que *A. nidulans* es capaz de biotransformar tanto la AD como la testosterona con una eficiencia superior al 50%; sin embargo, cuando se

emplea la progesterona, se observa que además de la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa, se producen otras modificaciones que dificultan la extracción de la 11 $\alpha$ -hidroxiprogesteroa.

### 1.2. *Aspergillus ochraceus*

Como miembro del género *Aspergillus*, *A. ochraceus* es capaz también de introducir un grupo hidroxilo en la posición C11 de diversos compuestos esteroideos. No obstante, *A. ochraceus* hidroxila mucho más eficazmente que *A. nidulans*, motivo por el cual es utilizado industrialmente. Por ello, esta especie es la más apropiada para abordar la identificación y clonación del gen que codifica la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa. Cabe recordar que, tal y como ya se señaló en la Introducción, en un primer abordaje hemos empleado *A. nidulans* como especie modelo puesto que se trata de un hongo ampliamente caracterizado en Biología Molecular, que ha permitido desarrollar posteriormente el trabajo con *A. ochraceus*.

En la Fig. 39 se muestran los tres cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC de las muestras de las fermentaciones llevadas a cabo con *A. ochraceus* en presencia AD, progesterona y testosterona (3 - 3,5 mM). En los tres casos, se aprecia que la mayor parte de los sustratos son transformados a sus derivados 11 $\alpha$ -hidroxilados, excepto en el caso de la progesterona en el que se forma, aunque en menor proporción que en *A. nidulans*, el compuesto con dos grupos hidroxilo y cuyo TR era 2 min. No obstante, llama la atención que, con la progesterona, no se formaba el compuesto que poseía un TR de 5,2 min, lo que sugiere que la reacción de hidroxilación en C11 llevada a cabo en esta especie es mucho más específica que la de *A. nidulans*.

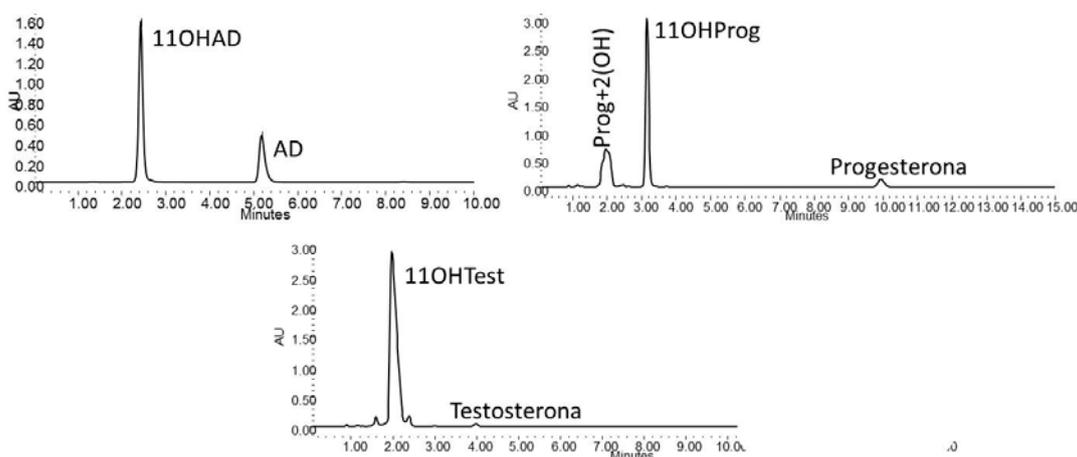


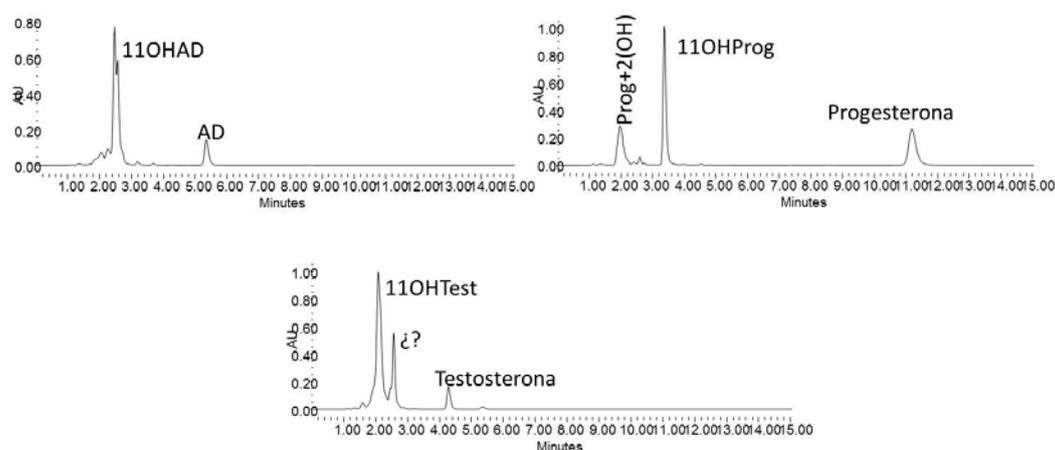
Fig. 39. Cromatogramas correspondientes al análisis mediante HPLC de las muestras obtenidas de las fermentaciones de *A. ochraceus* tras 72 h de cultivo en presencia de AD, progesterona y testosterona (3 - 3,5 mM).

A la vista de los cromatogramas, y en comparación con los de *A. nidulans* (Fig. 37), se constata la mayor eficiencia de *A. ochraceus* como microorganismo productor de 11 $\alpha$ -hidroxi-derivados, en presencia de AD, progesterona y testosterona.

### 1.3. *Rhizopus oryzae*

Diferentes estudios realizados con el hongo *R. oryzae* han descrito la existencia de una 11 $\alpha$ -hidroxilasa (Fernandes *et al.*, 2003; Petrič *et al.*, 2010). De hecho, fue con miembros del género *Rhizopus* con los que se inició, en la década de los 50, el uso de biotransformaciones como método de obtención industrial de esteroides (Gabinskaia *et al.*, 1971). Sin embargo, los rendimientos de transformaciones obtenidos son menores que los conseguidos con miembros del género *Aspergillus*.

Al igual que con las especies anteriores, también se han realizado fermentaciones en presencia de AD, progesterona y testosterona (3 – 3,5 mM) y el análisis mediante HPLC de los distintos compuestos acumulados se indican en la Fig. 40.



**Fig. 40.** Cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC de las muestras obtenidas de las fermentaciones realizadas con *Rhizopus oryzae* después de 72 h de crecimiento en presencia de AD, progesterona y testosterona.

Como se aprecia en la imagen (Fig. 40), *Rhizopus oryzae*, en presencia de AD, es capaz de formar 11 $\alpha$ OHAD de manera bastante elevada, aunque también forma otro compuesto desconocido cuyo tiempo de retención es muy cercano al de 11 $\alpha$ OHAD (2,7 min frente a 2,5 min de la 11 $\alpha$ OHAD) lo cual hace de este microorganismo menos útil para la industria a la hora de obtener 11 $\alpha$ OHAD. Este compuesto desconocido podría tratarse de un 6 $\beta$ -hidroxi-derivado tal y como señalan Petrič y colaboradores (Petrič *et al.*, 2010). Por otra parte, al añadir progesterona como sustrato, observamos que se forma tanto 11 $\alpha$ -hidroxiprogestero como el otro compuesto que aparecía también en

las fermentaciones realizadas con los miembros pertenecientes al género de *Aspergillus* (TR 2 min) y que se trata de la molécula de la progesterona en la que se han introducido dos hidroxilos. La eficacia de esta reacción es bastante alta aunque no se alcanzaron los rendimientos descritos en *A. ochraceus*. En último lugar, en presencia de testosterona, *R. oryzae* genera 11 $\alpha$ -hidroxi-testosterona pero también otro compuesto desconocido que no hemos observado con ninguna de las dos especies estudiadas de *Aspergillus*. Este compuesto, al igual que sucedía con la AD, podría tratarse de un 6 $\beta$ -hidroxi-derivado (Petrič *et al.*, 2010).

#### 1.4. *Cochliobolus lunatus*

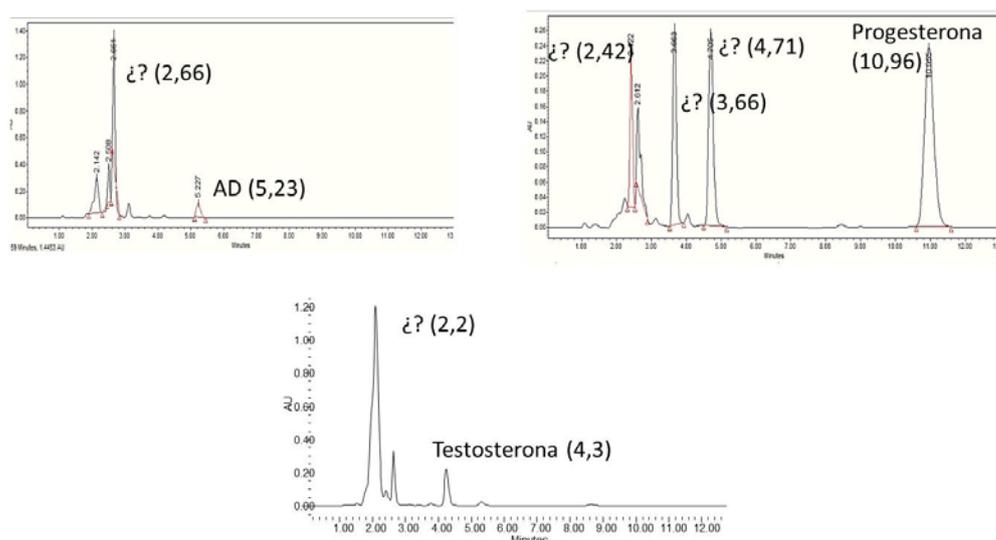
El hongo *C. lunatus* tiene la capacidad de introducir un grupo hidroxilo en la posición C11 pero que en este caso es en configuración  $\beta$ . Esta reacción tiene un elevado interés comercial ya que es la que se produce en los mamíferos durante la síntesis de glucocorticoides con propiedades antiinflamatorias. No obstante, el inconveniente de este hongo es que, junto con la hidroxilación en la posición C11 (configuración  $\beta$ ), realiza también otra en el C14, en configuración  $\alpha$  (Huang *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1993), que interfiere notablemente en la purificación de los 11 $\beta$ -hidroxi-derivados.

Para verificar la actividad descrita, se realizaron tres fermentaciones que contenían AD, progesterona y testosterona y cuyo análisis mediante HPLC se muestra en la **Fig. 41**. A la hora de interpretar los cromatogramas resultantes, hay que tener en cuenta que los 11-hidroxi-derivados que se esperaban no corresponden con los patrones anteriormente señalados, ya que el hidroxilo está en configuración  $\beta$ , lo cual modifica su TR. Disponemos de un patrón de 11 $\beta$ -hidroxi-AD (Sigma), pero no tenemos ni de progesterona ni de testosterona en sus correspondientes formas hidroxiladas en la posición 11 en configuración  $\beta$ , por lo que no podremos comparar ese producto con moléculas de estructura conocida.

Por una parte, en presencia de AD (**Fig. 41**), observamos que se formaba un compuesto mayoritario cuyo TR era de 2,66 min, que no se correspondía con el patrón de 11 $\beta$ OHAD (con TR de 3,2 min, **Tabla 6**), pero que es muy cercano al tiempo de retención de la 11 $\alpha$ OHAD (2,6 min). Por ello, podría tratarse de un derivado de la AD que poseyese un hidroxilo en otra posición, quizás en la 14 $\alpha$ , como se describe en la bibliografía (Huang *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1993).

En relación con los compuestos generados tras la incubación con progesterona, observamos que *C. lunatus* es capaz de realizar diversas modificaciones sobre este

sustrato puesto que se forman un número importante de productos (Fig. 41). De todos ellos, y en comparación con los derivados en posición 11 $\alpha$ , el pico con TR de 3,66 min es el que más se aproxima a la 11 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (3,4 min), por lo que pudiera también tratarse de otro hidroxi-derivado de la progesterona en otra posición. Cuando las fermentaciones se llevaron a cabo en presencia de testosterona, *C. lunatus* forma un compuesto cuyo TR es 2,2 min, muy cercano al asignado para la 11 $\alpha$ -hidroxi-testosterona. Como en casos anteriores, dado que Huang y colaboradores han descrito la presencia de actividad 14 $\alpha$ -hidroxilasa en *C. lunatus* podríamos suponer que el compuesto cuyo TR es de 2,2 min fuera la 14 $\alpha$ -hidroxi-testosterona (Huang et al., 1989).



**Fig. 41.** Cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC de las muestras de las fermentaciones de *C. lunatus* realizadas en presencia de AD, progesterona y testosterona, después de 72 h de incubación.

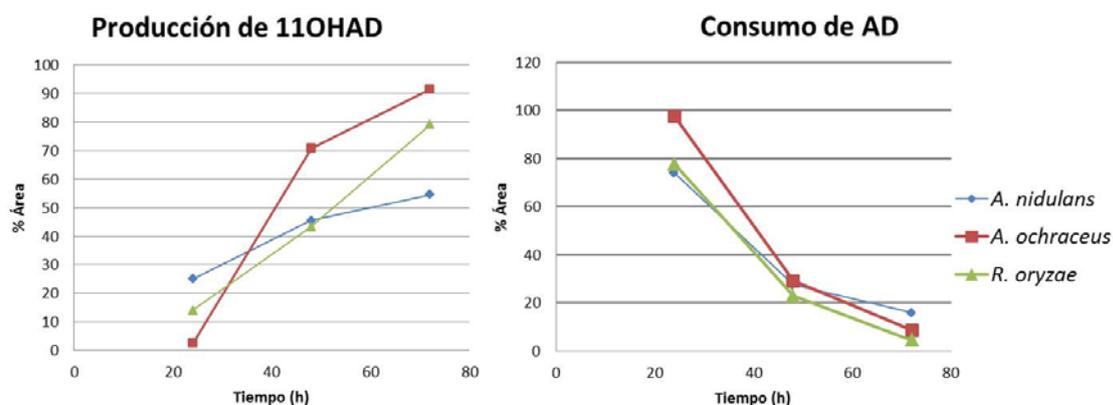
### 1.5. Comparación de la actividad de las cepas silvestres

Una vez establecidas las actividades que presentan las cepas silvestres de las cuatro especies objeto de estudio, hicimos una comparación entre ellas para conocer cuál hidroxilaba más eficazmente la posición 11 de la molécula de AD.

Para ello, empleamos los datos obtenidos en las fermentaciones en presencia de AD, ya que la obtención de 11OHAD era realmente el objetivo más destacado de este trabajo. La comparación se llevó a cabo mediante la elaboración de una gráfica en la que se observa la evolución tanto de la producción de 11OHAD como el consumo de AD (Fig. 42), expresado como el porcentaje del área del pico de 11OHAD respecto al resto de áreas de los picos que se registran en el cromatograma. De igual modo, se obtuvo el porcentaje del área de AD consumida. Expresando la actividad en forma de

porcentaje en lugar de en términos absolutos, evitamos posibles interferencias por un crecimiento diferente del hongo durante la fermentación de manera que, realmente, se comparó la proporción de AD consumida frente a la proporción de 11OHAD producida.

En estos estudios comparativos se decidió excluir a *Cochliobolus lunatus* puesto que el pico mayoritario que formaba no se correspondía con el patrón de 11 $\beta$ -hidroxi-AD que disponíamos.



**Fig. 42.** Comparación de la capacidad de la 11 $\alpha$ -hidroxilación de *A. nidulans*, *A. ochraceus* y *R. oryzae* sobre AD. A la izquierda se muestra la producción de 11 $\alpha$ OHAD por parte de los tres hongos frente a la proporción de AD consumida (gráfico de la derecha).

Como observamos en la imagen (**Fig. 42**), la especie que mayor porcentaje de 11 $\alpha$ OHAD produce es *Aspergillus ochraceus*, ya que a las 72 h había transformado el 91,38% frente al 79,13% de *Rhizopus oryzae* y el 54,5% de *A. nidulans*. Sin embargo, teniendo en cuenta el consumo de AD, encontramos que *R. oryzae* es el hongo que más AD ha consumido, lo cual nos indica que la AD se está biotransformando en otros intermediarios distintos del 11 $\alpha$ OHAD, que afectan a la capacidad de bioconversión por parte de esta especie. Cabe destacar, además, que la síntesis de 11 $\alpha$ OHAD en *A. ochraceus* experimentó una evolución muy llamativa, ya que pasó de ser el que menos 11 $\alpha$ OHAD había formado después de 24h de cultivo (2,61%), a ser el mayor productor a las 48 horas (70,88%).

Por tanto, teniendo en cuenta los gráficos comparativos correspondientes a la **Fig. 42**, podemos afirmar que el mejor productor de 11 $\alpha$ OHAD es *A. ochraceus*, motivo por el cual cada vez es más habitual su uso por parte de la industria farmacéutica en detrimento de *R. oryzae*.

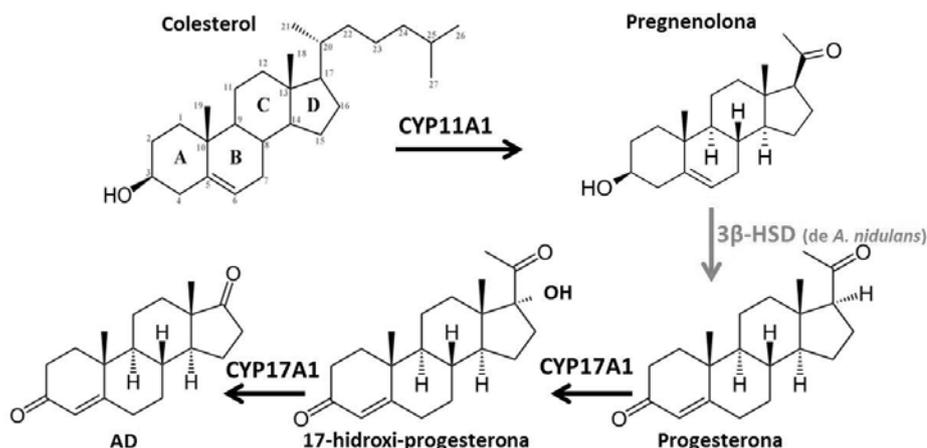
## 2. Obtención de una cepa recombinante de *A. nidulans* capaz de eliminar la cadena lateral en el C17 del colesterol o fitoesteroides

Uno de los objetivos más ambiciosos planteados en este trabajo fue la obtención de un microorganismo recombinante capaz de transformar, mediante una única fermentación, un sustrato de bajo coste (colesterol o fitoesteroides) en 11OHAD, un importante intermediario para la obtención de esteroides de interés comercial. De esta manera, se reducirían notablemente los costes y conseguiríamos no solo un producto más rentable sino también menos contaminante y más asequible para los consumidores de estos fármacos. La consecución de este objetivo se intentó alcanzar a través de la creación de una cepa recombinante de *A. nidulans* que fuera capaz de realizar esta transformación, aprovechando su capacidad para introducir grupos hidroxilos en posición 11 del núcleo CPHF. Para ello, era necesario que pudiera transformar el colesterol en AD, tal y como realiza *Mycobacterium smegmatis*. Para dotar a nuestro hongo con esta capacidad, se probaron dos vías:

- Introducción de los genes que codifican las enzimas responsables de transformar el colesterol en AD en humanos. Éstos son los genes *CYP11A1* y el *CYP17A1*.
- Introducción de los genes responsables de esta reacción en *M. smegmatis*. Estos genes son *CYP125A3* y *CYP142A2*.

### 2.1 Introducción de *CYP11A1* y *CYP17A1*

En el ser humano, el *CYP11A1* es la enzima responsable de la transformación de colesterol en pregnenolona por medio de una actividad 20,22-desmolasa (Halkerston *et al.*, 1961); mientras que el *CYP17A1* es la enzima responsable de la transformación de la progesterona en AD por medio de una actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 17,20-liasa (Barnes *et al.*, 1991). Para que la transformación del colesterol en AD fuera efectiva, se precisa de la transformación de pregnenolona en progesterona. Esta reacción es catabolizada por la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, que está descrita en *A. nidulans* (Fernandes *et al.*, 2003). Todas estas reacciones se indican en la **Fig. 43**.



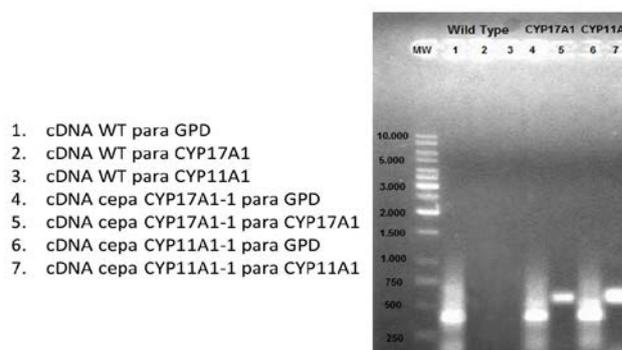
**Fig. 43.** Reacciones correspondientes a las diferentes biotransformaciones que se esperaban alcanzar en la cepa recombinante de *A. nidulans* en la que se habían introducido y expresado los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*.

Sin embargo, había que tener en cuenta que la ejecución con éxito de este experimento no era sencilla por diversos motivos. En primer lugar, porque la expresión de proteínas humanas en sistemas heterólogos (como en *A. nidulans*) se antoja complicada como ya se ha observado en la expresión del *CYP11A1* en *E. coli* (Shkumatov et al. 2006; Vinogradova, et al., 2007). En esas publicaciones se describe que aunque la cepa recombinante transformaba el colesterol en pregnenolona, el rendimiento era muy bajo. Por ejemplo, Vinogradova et al. describieron la obtención de 3,4 nmol de pregnenolona por cada nmol del citocromo. Por su parte, Shkumatov et al. consiguieron 0,04 nmol de pregnenolona por mg de proteína, lo que supone 450 veces menos que con el purificado de la corteza adrenal. A ello se le añadía la diferencia de patrones de expresión entre los citocromos, puesto que el *CYP11A1* es mitocondrial y, en *Aspergillus*, no hay estudios acerca de la ruta de importación de proteínas a la mitocondria.

A pesar de todos estos posibles inconvenientes, se procedió a la clonación, por separado, del *CYP11A1* y el *CYP17A1*. Por un lado, el *CYP11A1* fue introducido en el vector de expresión p1660; mientras que el *CYP17A1* fue clonado en el p1911 (ver apartado 4.1.3. de Materiales y Métodos). Una vez que las construcciones estaban hechas, se procedió a su transformación sobre la cepa control de *A. nidulans*. Para el *CYP11A1*, obtuvimos transformantes protótrofos para la piridoxina, ya que el gen truncado *pyroA* presente en el p1660 habría complementado el alelo truncado del *pyroA4* de la cepa control. A estas cepas transformantes las denominamos *CYP11A1*-1, *CYP11A1*-2 y *CYP11A1*-3. Igualmente, para el *CYP17A1* se obtuvieron transformantes protótrofos para el ácido pantoténico, a los que denominamos *CYP17A1*-1 al 5.

La comprobación de la idoneidad de los transformantes se realizó de varias formas. En primer lugar, se llevó a cabo la selección de transformantes por aislamiento de colonias y crecimiento en medios específicos, de forma que los transformantes del CYP11A1 precisaban de la presencia de ácido pantoténico en su medio pero no de piridoxina, y al contrario que los transformantes del CYP17A1. Asimismo, se extrajo el DNA de los transformantes a partir de micelio de las cepas obtenidas con el fin de realizar una amplificación por PCR que fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa. En ella observamos la amplificación de una banda que se correspondía con el tamaño esperado para el inserto y que mandamos a secuenciar como comprobación adicional.

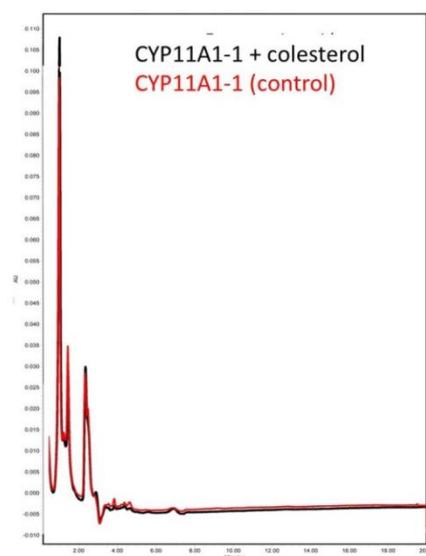
Por otro lado, para verificar si los citocromos eran capaces de expresarse en el hongo, se realizó un análisis a nivel transcripcional por RT-PCR (ver apartado 4.1.5. de Materiales y Métodos). Para ello, se obtuvo cDNA, con oligodT, de la cepa WT y de las dos cepas transformantes CYP11A1-1 y CYP17A1-1. Con estos cDNAs se comparó la amplificación de una secuencia específica de los citocromos con un fragmento del gen *GPD* (codificante para la proteína constitutiva con la misma denominación y empleada a modo de control positivo de expresión). Partiendo del cDNA de la cepa WT, se hicieron tres reacciones de PCR: con los oligonucleótidos para el fragmento del gen *GPD*, para un fragmento del gen *CYP11A1* y para un fragmento del *CYP17A1*. Con el cDNA obtenido de la cepa CYP11A1-1, se realizó una PCR para amplificar un fragmento tanto del *GPD* como del *CYP11A1*. En tercer lugar, a partir del cDNA de la cepa CYP17A1-1 se llevó a cabo una amplificación de la *GPD* y del gen *CYP17A1*. En la Fig. 44 se muestra la electroforesis en gel de agarosa obtenida del análisis de las reacciones resultantes de la RT-PCR. En ella se aprecia que el cDNA de la cepa WT sólo muestra expresión del gen *GPD*, la cepa CYP17A1-1 presenta expresión tanto del *GPD* como del *CYP17A1* y la cepa CYP11A1-1 expresa los genes *GPD* y *CYP11A1*.



**Fig. 44.** Análisis de la expresión a nivel transcripcional de los genes *CYP11A1* y el *CYP17A1*. Gel de agarosa de las reacciones de RT-PCR realizadas para verificar la expresión a nivel transcripcional de los transformantes CYP11A1-1 y CYP17A1-1.

No obstante, lo que realmente nos interesaba era verificar la actividad enzimática de cada citocromo, es decir, si la cepa CYP11A1-1 era capaz de biotransformar el colesterol en pregnenolona y si la cepa CYP17A1-1 podía pasar la progesterona a AD. Para ello, se realizaron fermentaciones incubando las cepas transformantes en presencia y ausencia del sustrato y esos resultados se compararon con los obtenidos con la cepa silvestre, con la finalidad de conocer si la actividad que observábamos era consecuencia del citocromo adicionado o por la propia actividad del hongo.

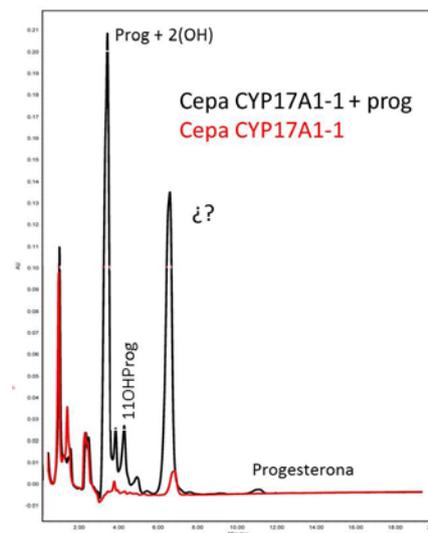
En la **Fig. 45** observamos los cromatogramas resultantes del análisis por HPLC de la fermentación de la cepa CYP11A1-1 en presencia (negro) y ausencia (rojo) de colesterol. Cabe mencionar que en este cromatograma no aparece el pico correspondiente al colesterol puesto que con la fase móvil empleada (acetronitrilo 60:40 agua) el colesterol, al contrario que el resto de compuestos empleados en este estudio, era demasiado apolar para poder ser eluido por la columna, por lo que se precisaba de un lavado posterior con cloroformo para eliminarlo de la misma. En cualquier caso, los picos resultantes de la fermentación realizada en presencia de colesterol eran exactamente los mismos que se detectaron en su ausencia, lo cual indica que se corresponden a otros compuestos que nada tienen que ver con la biotransformación de colesterol.



**Fig. 45.** Cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC de las muestras de la fermentación de la cepa CYP11A1-1 de *A. nidulans* (contenido el gen *CYP11A1*) cultivado en presencia y en ausencia de colesterol.

Respecto a la actividad del CYP17A1, en la **Fig. 46**, se compararon los cromatogramas obtenidos con la cepa CYP17A1-1 en presencia (negro) y ausencia

(rojo) de progesterona. Se aprecian una serie de picos al principio del cromatograma que aparecían tanto en presencia como en ausencia de la progesterona, por lo que no pueden ser derivados de ésta. Asimismo, observamos que la progesterona se biotransformaba a otros compuestos que se correspondían con los ya observados en la actividad de la cepa silvestre (**Fig. 37**), pero que no eran AD. Por ello, podemos deducir que la actividad que observamos no se debe a la acción del CYP17A1 sino a las enzimas propias de *A. nidulans* (hidroxilasas, principalmente).



**Fig. 46.** Cromatogramas resultantes del análisis por HPLC de las muestras de la fermentación de la cepa transformante CYP17A1-1 con y sin progesterona.

Estos datos ponen de manifiesto las diferencias en el funcionamiento de los citocromos P450 entre un sistema humano y otro fúngico. Quizás, nuestros resultados podrían mejorarse introduciendo toda la maquinaria necesaria para el funcionamiento de los citocromos mitocondriales, incluyendo la flavoproteína adrenoxina reductasa. Sin embargo, dada la complejidad que suponía la puesta a punto de esa maquinaria enzimática, se decidió crear una nueva cepa conteniendo CYP11A1 modificado en su N-terminal con un péptido señal procedente del gen *phacA* de *A. nidulans* (Mingot *et al.*, 1999), que hiciera que el citocromo fuera enviado al retículo endoplásmico del hongo para favorecer su funcionamiento.

La elaboración de esta cepa siguió un proceso paralelo al ya explicado para la obtención de la cepa recombinante conteniendo el gen *CYP11A1*, con la salvedad de que se diseñó un oligonucleótido *forward* para la amplificación del citocromo que incluía la secuencia codificante para el péptido señal. La cepa resultante recibió el nombre de CYP11A1-SignalP1. Para su comprobación, se siguieron los mismos pasos descritos anteriormente. El gen se expresaba a nivel transcripcional pero no se

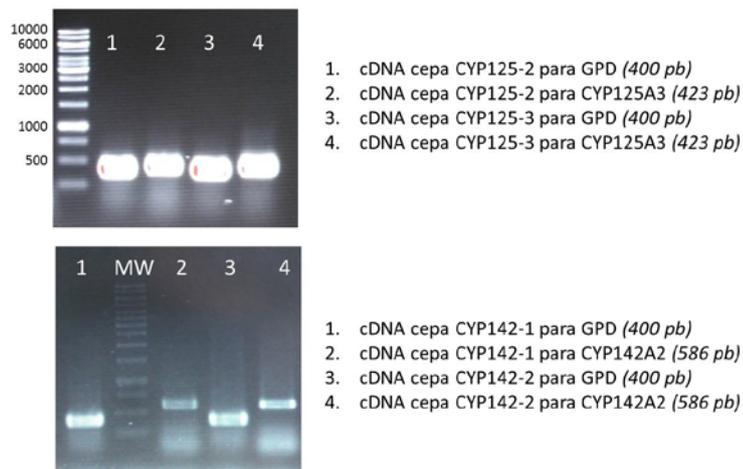
apreciaba actividad enzimática frente al colesterol al realizar una fermentación y analizar las muestras por HPLC. Por ello, se decidió probar la expresión de otros citocromos bacterianos como alternativa para la producción industrial de compuestos esteroideos.

## 2.2 Introducción de CYP125A3 y CYP142A2

Como consecuencia de la falta de un resultado positivo en el experimento anterior, se decidió probar la expresión en *A. nidulans* de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2, responsables de la transformación de colesterol en AD en *Mycobacterium smegmatis* (ver apartado 4.2. de la Introducción).

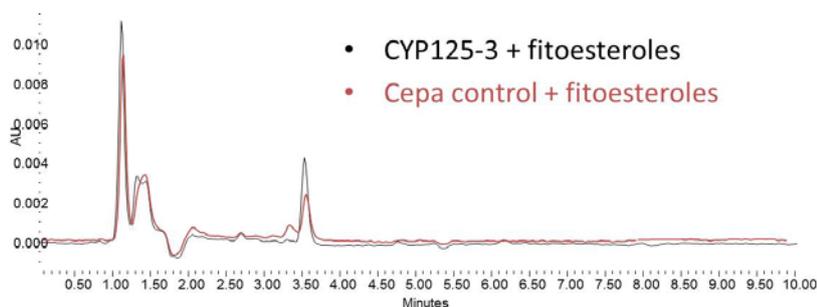
Los genes codificantes de estos citocromos fueron cedidos por el grupo de investigación del Prof. Dr. José Luis García (CIB-CSIC, Madrid, España). Puesto que en este caso no se trata de dos citocromos complementarios, sino que ambos catalizan la misma reacción, su clonación y expresión se llevó a cabo en el plásmido p1660. Tras su amplificación, digestión, ligación y transformación en *E. coli*, un clon de cada construcción fue escogido para ser introducido en la cepa control sobre el gen truncado *pyroA4*, obteniendo transformantes auxótrofos para el ácido pantoténico pero protótrofos para la piridoxina (ver apdo. 4.1.1 de Materiales y Métodos).

Su comprobación se efectuó siguiendo los pasos descritos anteriormente (ver apartado 4.1.4. de Materiales y Métodos), de manera que para elaborar la construcción conteniendo el gen *CYP125A3* nos quedamos con los transformantes CYP125-2 y CYP125-3 y, para la que contenía el *CYP142A2*, con el CYP142-1 y el CYP142-2. Se verificó, asimismo, la expresión transcripcional a través de la presencia de mRNA (ver apartado 4.1.5. de Materiales y Métodos). En la **Fig. 47** se muestran los geles de agarosa correspondientes a las RT-PCRs de cada uno de los transformantes empleando unos oligonucleótidos que sirven para amplificar un fragmento del gen *GPD* y otros que amplifican fragmentos de los citocromos de estudio. En la figura se aprecia que existe expresión a nivel transcripcional en todos los transformantes conteniendo el *CYP125A3* y el *CYP142A2*, respectivamente.



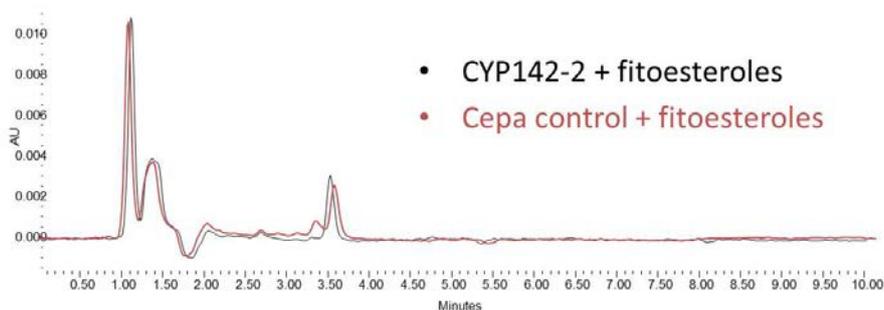
**Fig. 47.** Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de RT-PCR utilizadas para analizar la expresión transcripcional de las cepas transformantes conteniendo los genes *CYP125A3* y *CYP142A2*.

El siguiente abordaje fue el análisis de la actividad enzimática de las cepas transformantes mediante fermentaciones. Para ello, se hizo una fermentación con la cepa CYP125-3 en comparación con la cepa control y, a ambas, se les añadieron fitoesteros. En la **Fig. 48** observamos que los picos que aparecen son, además de pequeños, exactamente los mismos que aparecen en los cromatogramas correspondientes a la cepa control por lo que, de nuevo, se deduce la falta de resultados positivos del experimento.



**Fig. 48.** Cromatogramas correspondientes al análisis mediante HPLC de las muestras obtenidas de la fermentación llevadas a cabo con la cepa CYP125-3 incubada en presencia de fitoesteros (negro) en comparación con los correspondientes a las de la cepa control con fitoesteros (rojo).

Por otra parte, se realizó otra fermentación empleando la cepa CYP142-2 e incubándola en presencia de fitoesteros. Al igual que en el caso anterior, en la **Fig. 49** observamos la misma actividad por parte de la cepa transformante CYP142-2 que con la cepa control, lo que sugiere que el citocromo insertado no era capaz de ejercer su función para iniciar la metabolización del colesterol. Es relevante recordar que en estos cromatogramas (**Fig. 48** y **49**) no se observa el pico correspondiente a los fitoesteros puesto que la fase móvil que empleamos (acetonitrilo 60: 40 agua) no es capaz de eluir estos compuestos tan apolares a tiempos de retención razonables.



**Fig. 49.** Cromatogramas obtenido tras el análisis por HPLC de las muestras correspondientes a la fermentación realizada con la cepa CYP142-2 incubada con fitoesteroles (negro) en comparación con la cepa control también cultivada con fitoesteroles (rojo).

La falta de resultados positivos también puede explicarse por las diferencias existentes entre el funcionamiento del sistema citocromo P450 entre bacterias (procariotas) y hongos (eucariotas) ya que, a pesar de tratarse en ambos casos de proteínas citosólicas ancladas a la membrana, tienen mecanismos de acción diferentes. Una posible solución sería la introducción del sistema reductor ferredoxina que emplea el propio *M. smegmatis* en el hongo *A. nidulans* con el objetivo de mejorar y permitir que los citocromos ejerzan su actividad. Estos experimentos están siendo realizados actualmente por otro miembro de nuestro grupo de investigación.

En cualquier caso, teniendo en cuenta la falta de resultados positivos a la hora de obtener una cepa capaz de pasar el colesterol a 11 $\alpha$ OHAD, al menos por el momento, se procedió a la identificación y clonación de la enzima 11 $\alpha$ -hidroxilasa presente en *A. nidulans* para examinar su potencial introducción en *M. smegmatis* y obtener, así, un microorganismo recombinante capaz de realizar la biotransformación de fitoesteroles en 11OHAD en un solo paso de fermentación.

### 3 Clonación de la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *Aspergillus spp.*

La clonación de la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de un miembro del género *Aspergillus* entraña un interés destacado desde el punto de vista industrial dado que, potencialmente, puede ser empleada para la creación de microorganismos recombinantes que permitan la obtención de intermediarios, como 11 $\alpha$ OHAD, importante para la síntesis de esteroides antiinflamatorios.

En este estudio se realizó, en primer lugar, la identificación y clonación de la 11 $\alpha$ -hidroxilasa presente en *A. nidulans*, ya que se trata de un hongo ampliamente caracterizado y empleado en Ingeniería Genética y en Biología Molecular y cuyo genoma está completamente secuenciado. Sin embargo, la especie diana para la identificación de esta enzima es *A. ochraceus*, puesto que esta especie es el productor industrial y debido a que su actividad es mucho más elevada (Fig. 42). Por ello, se ha clonado este gen en *A. nidulans*, lo que ha permitido, por identidad de proteínas entre especies, identificar el gen codificante responsable de esta actividad en *A. ochraceus*.

#### 3.1 Clonación de la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *Aspergillus nidulans*

En primer lugar, cabe mencionar que la identificación de esta enzima en *A. nidulans* no fue posible por comparación bioinformática con la enzima descrita en *Rhizopus oryzae* (Petrič *et al.*, 2010) porque la identidad entre proteínas era baja debido a la distancia filogenética entre ambas especies. Por ello, la identificación y clonación del gen codificante de la enzima 11 $\alpha$ -hidroxilasa se realizó mediante una técnica de hibridación substractiva descrita por Diatchenko y colaboradores (Diatchenko *et al.*, 1999). Una vez identificado el hipotético gen, se hizo una cepa *knock-out* (KO) para ese gen con el objeto de verificar que realmente el gen identificado era el responsable de esa actividad.

##### 3.1.1 Hibridación Supresivo-Substractiva (SSH)

Aprovechando que *A. nidulans* es un organismo totalmente secuenciado, la técnica de elección para identificar la enzima de interés fue la hibridación supresivo substractiva (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1999), que permite el aislamiento de fragmentos de cDNAs inducidos en determinadas condiciones de crecimiento, que son clonados y secuenciados para, posteriormente, a través de un análisis bioinformático, seleccionar genes candidatos (por su inclusión en la superfamilia de citocromos P450 o su relación con el metabolismo de esteroides). El fundamento de esta técnica está recogido en el apartado 4.2.1. de Materiales y Métodos.

Antes de comenzar con el procedimiento, fue necesario verificar si la actividad esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *Aspergillus nidulans* era desempeñada por una enzima inducible o constitutiva. Para ello, se sembraron dos cultivos de la cepa silvestre de *A. nidulans*. A uno de esos cultivos se le incubó durante 12 h en presencia de AD (que actuó como compuesto inductor), mientras que el otro cultivo fue incubado el mismo tiempo pero en ausencia de AD (cultivo no inducido). Partiendo del micelio de estos dos cultivos, se llevó a cabo una nueva fermentación añadiendo AD como sustrato y se monitorizó su conversión a 11 $\alpha$ OHAD, tomando muestras durante las tres primeras horas. La actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa queda reflejada en la Fig. 50, en la que se compara el área de 11 $\alpha$ OHAD entre el cultivo inducido y no inducido. Como se aprecia en la imagen, existen diferencias claras en la formación de 11 $\alpha$ OHAD entre el cultivo inducido y el no inducido durante las primeras horas de crecimiento, lo cual muestra que se trata de una enzima inducible y que, por tanto, permite la ejecución de la técnica SSH.

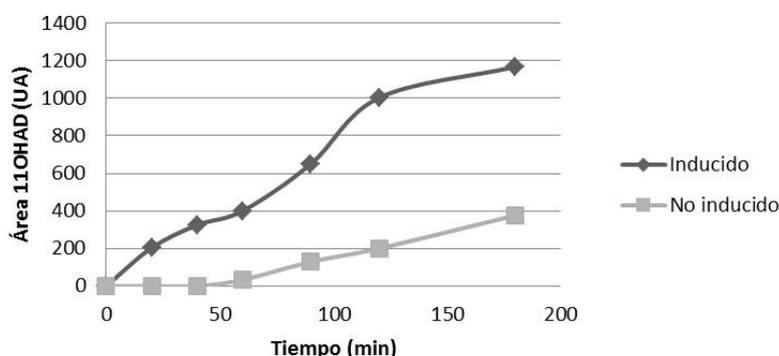


Fig. 50. Inducción de la eesteroides 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. nidulans*. Gráfico en el que se compara la diferencia de producción de 11 $\alpha$ OHAD entre un cultivo inducido con AD y otro no inducido.

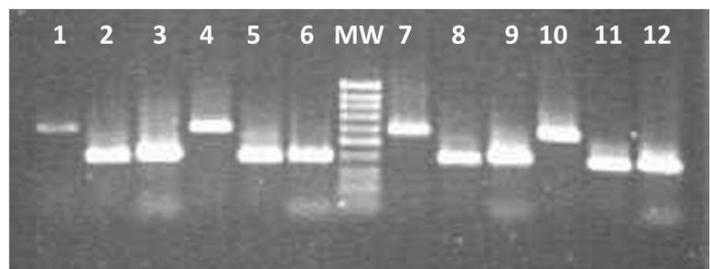
Una vez comprobado que la actividad enzimática era inducible, aplicamos la técnica SSH. Su procedimiento está explicado en el apartado 4.2.1.1. de Materiales y Métodos. Tras la clonación de los fragmentos de cDNA extraídos en el vector comercial pBlueScript SK+, se mandaron a secuenciar 50 clones. Entre todos ellos, se seleccionaron cuatro que, bien por su semejanza con citocromos P450 y/o su relación en el metabolismo de esteroides, podían ser los responsables de la 11 $\alpha$ -hidroxilación.

Sobre estos genes candidatos se realizó un primer cribado llevando a cabo una RT-PCR en la que se comparó la presencia de cDNA de esos genes bajo condiciones de inducción y de no inducción y, asimismo, en comparación con la presencia de cDNA para un fragmento del gen *GPD* (empleado a modo de control positivo). Para ello, se diseñaron oligonucleótidos delimitando una región de aproximadamente 500 pb de

cada gen candidato y se siguió el procedimiento recogido en el apartado 4.1.5. de Materiales y Métodos.

En la **Fig. 51** se muestra el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa del cDNA obtenido de las reacciones de la RT-PCR para dos de los genes candidatos encontrados (*AN8530* y *AN0918*) bajo condiciones de inducción (en presencia de AD, progesterona y testosterona) y sin inducir. También se muestra, en esas mismas condiciones, la expresión del gen *GPD*, codificante para la proteína constitutiva con el mismo nombre. En la imagen se aprecia que solo en el caso del *AN8530* aparece una banda mucho más tenue bajo condiciones de no inducción, en comparación con las reacciones hechas con el cDNA inducido, mientras que el *AN0918* se está expresando continuamente independientemente de si se realiza en presencia o en ausencia de los sustratos inductores.

1. cDNA no inducido para AN8530
2. cDNA no inducido para AN0918
3. cDNA no inducido para GPD
4. cDNA inducido con AD para AN8530
5. cDNA inducido con AD para AN0918
6. cDNA inducido con AD para GPD
7. cDNA inducido con progesterona para AN8530
8. cDNA inducido con progesterona para AN0918
9. cDNA inducido con progesterona para GPD
10. cDNA inducido con testosterona para AN8530
11. cDNA inducido con testosterona para AN0918
12. cDNA inducido con testosterona para GPD



**Fig. 51.** Análisis de la expresión de los genes *AN8530*, *AN0918* y *GPD*. Gel de agarosa para las reacciones de RT-PCR de los genes *AN8530*, *AN0918* y *GPD* empleando cDNA no inducido e inducido con AD, progesterona y testosterona.

De manera más específica, se decidió llevar a cabo una RT-PCR solo para el gen *AN8530* y para el gen *GPD*, empleando cDNA no inducido, inducido con AD, con progesterona y con testosterona. La **Fig. 52** recoge el gel de agarosa realizado para analizar las reacciones de RT-PCR en la que se observa cómo en condiciones de no inducción no hay expresión del *AN8530*, pero sí la hay en presencia de AD, progesterona y testosterona. La expresión del fragmento del gen *GPD* se produce en todos los casos.

1. cDNA no inducido para AN8530
2. cDNA no inducido para GPD
3. cDNA inducido con AD para AN8530
4. cDNA inducido con AD para GPD
5. cDNA inducido con progesterona para AN8530
6. cDNA inducido con progesterona para GPD
7. cDNA inducido con testosterona para AN8530
8. cDNA inducido con testosterona para GPD



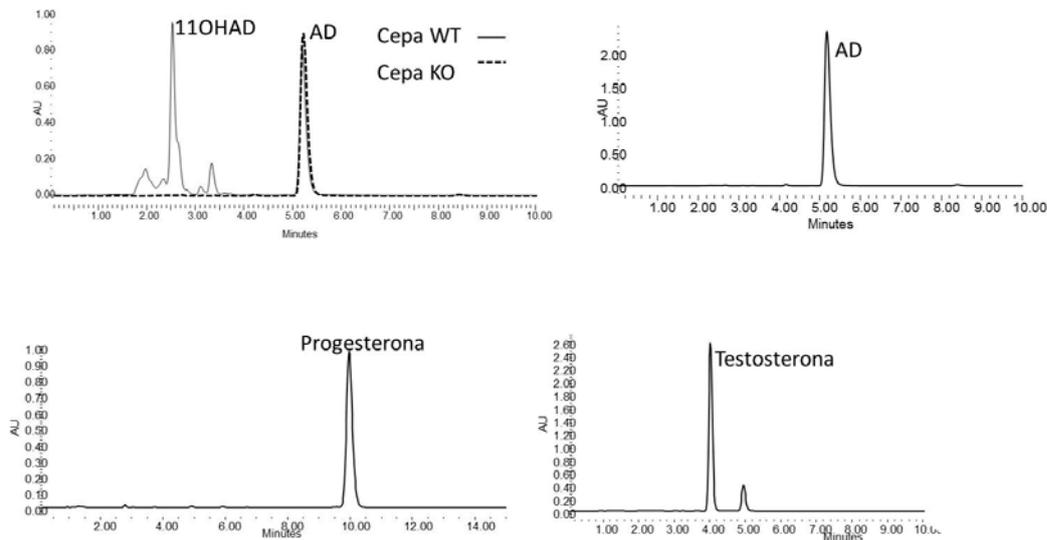
Fig. 52. Análisis de la expresión del AN8530 y GPD en distintas condiciones. Gel de agarosa de las reacciones de RT-PCR para los genes AN8530 y GPD.

En base a este *screening*, y también puesto que en los clones secuenciados apareció varias veces, decidimos elegir el AN8530 como gen candidato para codificar la 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. nidulans* (Ortega de los Ríos *et al.*, 2017).

### 3.1.2 Elaboración de un KO: PCR de fusión

Con el objetivo de confirmar si el gen AN8530 era el gen que codificaba la actividad esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. nidulans*, se puso en marcha la construcción de una cepa KO en la que se interrumpió la secuencia del gen AN8530 para eliminar su actividad enzimática y, así, impedir la formación de 11 $\alpha$ -hidroxi-derivados. Para ello, se construyó un fragmento de fusión siguiendo el protocolo descrito por Szewczyk y colaboradores (Szewczyk *et al.*, 2006), cuyo fundamento y desarrollo está recogido en el apartado 4.2.2.1. de Materiales y Métodos.

Tras la construcción del fragmento y su transformación a la cepa nku (ver apdo. 1.2.1.3 de Materiales y Métodos), obtuvimos una cepa resultante protótrofa para las pirimidinas y auxótrofa para la piridoxina. Además, puesto que se trata de una cepa resistente al glufosinato, también se comprobó que crecía en presencia de este herbicida. Posteriormente, se verificó la presencia del inserto en el DNA codificante de la supuesta hidroxilasa a partir de micelio transformante y se valoró su actividad *in vivo* por fermentación, en la que no se esperaba observar 11 $\alpha$ -hidroxilación sobre los sustratos añadidos. En la Fig. 53 se muestran los cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC de la fermentación de la cepa KO al añadir AD, progesterona o testosterona como sustratos tras 72 h de crecimiento. También se muestra un cromatograma (arriba a la izquierda) en el que se comparan los picos obtenidos en una fermentación realizada con la cepa WT (negro) y con la cepa KO (punteado), a las que se añadía AD.



**Fig. 53.** Cromatogramas obtenidos tras analizar, medianter HPLC, las muestras de la fermentación realizadas con la cepa KO incubada con AD, progesterona y testosterona como sustratos. Además, se incluye arriba a la izquierda la comparación entre la actividad de la cepa KO (punteado) con la cepa WT (negro) sobre la AD.

Como se aprecia en esta figura (**Fig. 53**), los cromatogramas muestran que no existe actividad  $11\alpha$ -hidroxilasa ya que no se forman ninguno de los  $11\alpha$ -hidroxi-derivados que aparecen en la **Fig. 37**, lo cual refleja que el gen candidato, AN8530, es realmente el único responsable de la actividad esteroide  $11\alpha$ -hidroxilasa en *Aspergillus nidulans* (Ortega de los Ríos *et al.*, 2017). Asimismo, cabe destacar que en el caso de la progesterona, sustrato con el que más derivados se producían en la cepa WT, no aparecía ninguno en la cepa KO, lo cual demuestra que el resto de los compuestos observados (**Fig. 37**) se trataban de derivados de la  $11\alpha$ -hidroxi-progesterona.

Tras mandar la secuencia del gen AN8530 al Dr. Nelson (gestor de la base de datos de los CYP450, <https://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) para su caracterización y denominación como citocromo P450, éste le otorgó la denominación de CYP68L1 (Nelson, 2009). A continuación, se muestra la secuencia del gen AN8530 (**Fig. 54**) en la que se compara la secuencia genómica y del cDNA para delimitar los intrones. No obstante, hemos observado que existe una diferencia a la hora de delimitar un intrón entre la secuencia de cDNA anotada en la base de datos y la que nosotros hemos secuenciado. En el cDNA de la AN8530 secuenciada por nosotros aparece un fragmento que la base de datos identifica como intrón pero que nosotros hemos secuenciado como parte del cDNA. Esta región se muestra en la **Fig. 54** de color azul. Tras haber secuenciado este fragmento como cDNA en 5 clones distintos y coincidir con la secuencia para la  $11\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus* (ver apdo. 3.2.1 de

Resultados), asumimos que nuestra identificación es correcta por lo que suponemos que existe un error en la anotación de la base de datos.

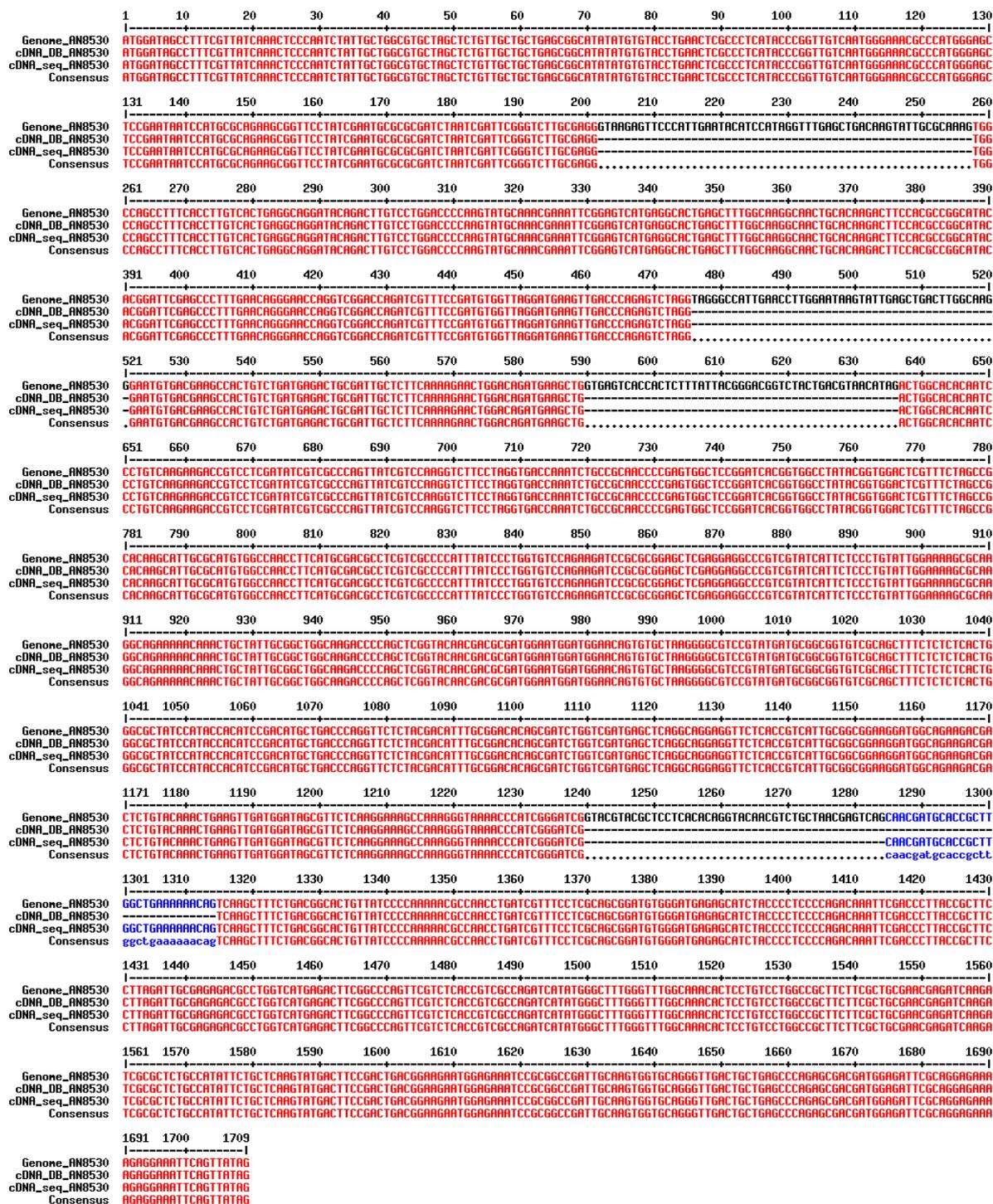


Fig. 54: Alineamiento de la secuencia de nucleótidos en la que se comparan la secuencia genómica del AN8530 (Genome\_AN8530), la secuencia de cDNA que viene anotada en la base de datos (cDNA\_DB\_AN8530) y la secuencia de cDNA que nosotros hemos secuenciado (cDNA\_seq\_AN8530). Este alineamiento ha sido realizado con la herramienta web Multalin (Corpet, 1988).

### 3.1.3 Reversión de la actividad

Después de haber identificado el gen que codifica la enzima 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. nidulans* y haber comprobado, a través de la creación de una cepa KO, que es el responsable de la actividad buscada, procedimos a revertir su actividad para finalizar el proceso de caracterización del gen AN8530. Para ello, se llevó a cabo la clonación de este gen en el vector p1660 (que posee el gen truncado *pyroA*) en la cepa KO (a la que le quedaba libre el marcador *pyroA4*).

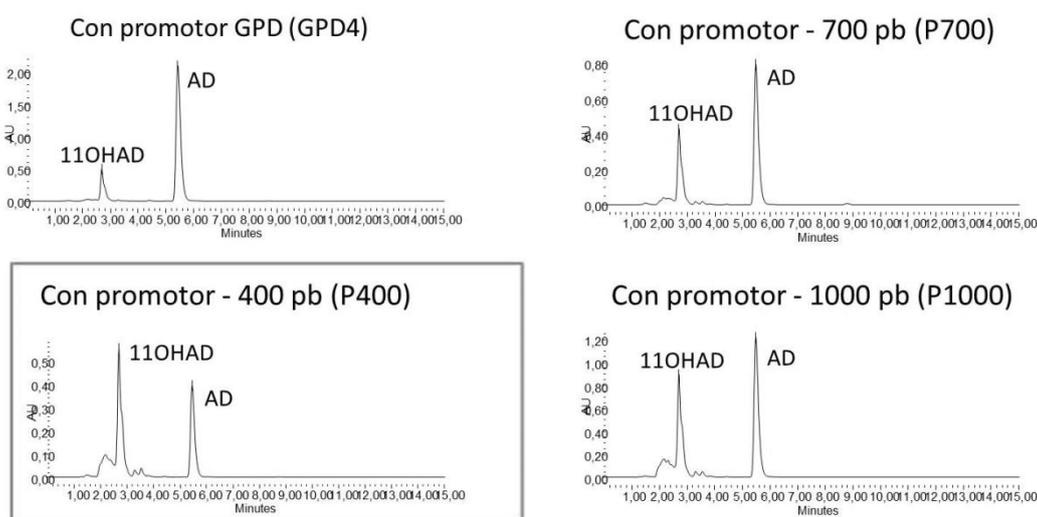
Sin embargo, para intentar conseguir mejores resultados de reversión, se decidió hacer modificaciones sobre el promotor que contiene el plásmido de expresión p1660. Así, se estudió la expresión del gen AN8530 en los siguientes plásmidos de expresión (Tabla 7):

- P1660 que posee el promotor constitutivo de la GPD, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.
- P1660' que tiene el promotor inducible de 400 pb *upstream* del ATG del gen AN8530.
- P700 que contiene el promotor inducible de 700 pb *upstream* del ATG del gen AN8530.
- P1000 que posee el promotor inducible de 1000 pb *upstream* del ATG del gen AN8530.

Para obtener todas estas construcciones se partió de la construcción del p1660 conteniendo el gen AN8530 (denominada 11OHAN-p1660). En esta construcción, el inserto estaba incluido entre los cortes de restricción *NcoI* y *EcoRI*, mientras que el promotor estaba situado entre *KpnI* y *NcoI*. Por ello, para fabricar el resto de construcciones se procedió al diseño de oligonucleótidos específicos conteniendo un corte *KpnI* en el extremo 5' y un corte *NcoI* en el 3' para cada una de las secuencias que usamos como promotores. Posteriormente, se amplificaron los promotores inducibles a partir de DNA genómico de *A. nidulans* y, tras ser amplificados y digeridos, fueron ligados en la construcción 11OHAN-p1660 (también digerida y purificada con *KpnI* y *NcoI*). Posteriormente, se realizó la transformación sobre *E. coli* y, tras su secuenciación, se procedió a realizar la transformación en la cepa KO con un clon que no contenía mutaciones (ver apartado 2.8.2. de Materiales y Métodos).

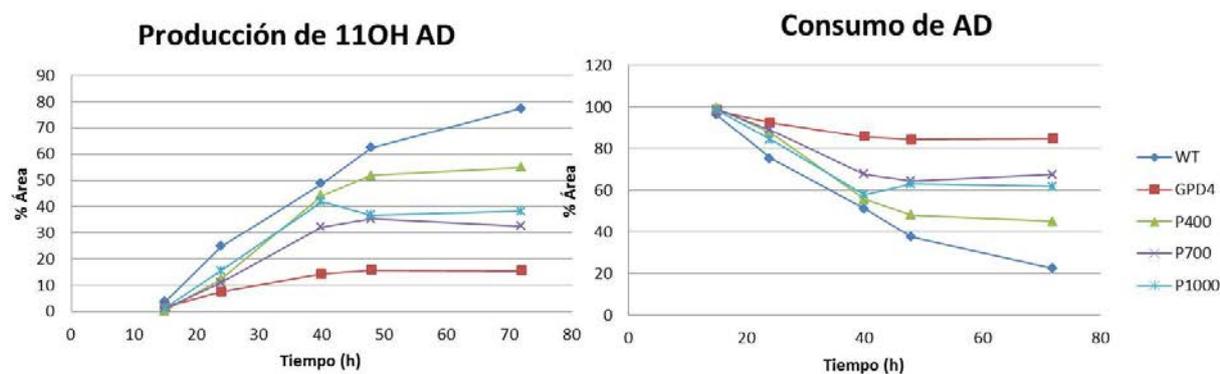
Los transformantes resultantes de cada construcción (11OHAN-p400, 11OHAN-p700 y 11OHAN-p1000) fueron seleccionados y verificados mediante el análisis de su crecimiento en medios específicos y también por amplificación (ver apartados 4.1.4. y

4.1.5. de Materiales y Métodos). Cabe mencionar que en este caso el análisis de la expresión por RT-PCR no se llevó a cabo puesto que no esperábamos observar diferencias que permitieran poder ser visualizadas en un análisis electroforético de los productos de la RT-PCR. Por ello, se prefirió realizar, directamente, el estudio de su actividad *in vivo* de modo que el análisis por HPLC ofreciera resultados más exactos y fiables. Para ello, se realizó una fermentación comparando la producción de 11 $\alpha$ OHAD a partir de AD, en las diferentes cepas de *A. nidulans* bajo los promotores de la GPD, -400 pb, -700 pb y -1000 pb de AN8530. En la Fig. 55 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante análisis por HPLC a partir de las muestras de las fermentaciones realizadas con las cuatro cepas que contenían el gen AN8530 tras 72 h de crecimiento en presencia de AD.



**Fig. 55.** Comparación de la reversión de la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa bajo distintos promotores en *A. nidulans*. Cromatogramas obtenidos tras el análisis mediante HPLC de las fermentaciones realizadas con las cepas revertidas con el *CYP68L1* que se expresaban bajo el control de los promotores de la GPD (cepa GPD4), -400 pb (cepa P400), -700 pb (cepa P700) y -1000 pb (cepa P1000) de la AN8530. En todos los casos se añadió AD.

En la imagen (Fig. 55) se aprecia que la construcción que mejor funciona para convertir AD en 11 $\alpha$ OHAD es aquella que contiene el promotor inducible de -400 pb del gen AN8530 (11OHAN-p400), superando, incluso, la cantidad producida al sustrato de partida (AD), hecho que no ocurre con el resto de cepas. No obstante, de manera más específica, en la Fig. 56 se compara el porcentaje de 11 $\alpha$ OHAD producida por parte de las cuatro cepas transformantes con respecto a la cepa WT, como máxima actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. nidulans* que cabría esperarse. Igualmente, se compara la proporción de AD consumida. En ambos casos, se analizó el porcentaje del área del pico correspondiente respecto al total de picos que aparecen en el cromatograma.



**Fig. 56.** Comparación en la producción de 11 $\alpha$ OHAD frente al consumo de AD por parte de las cepas recombinantes que poseían los plásmidos con los distintos promotores y con la cepa WT.

En la **Fig. 56** observamos que, tras la cepa WT, la cepa con el promotor inducible de - 400 pb (P400) es la que mejor funciona, puesto que es donde mayor porcentaje de 11 $\alpha$ OHAD se produce y menor porcentaje de AD queda disponible. Asimismo, el empleo de las otras dos cepas con los promotores inducibles (P700 y P1000) también permite obtener buenos resultados (>30%). Sin embargo, si hay algo que llama la atención es que la cepa en la que menos 11 $\alpha$ OHAD se forma es la que actúa bajo el promotor constitutivo de la GPD (GPD4). Este hecho no deja de sorprendernos ya que cabría esperar que el plásmido p1660 produjera una expresión más marcada y, por tanto, también una mayor actividad, al estar bajo la acción de un promotor constitutivo. Una posible explicación para la escasa producción de 11 $\alpha$ OHAD podría ser que al expresarse en exceso, diera pie a la formación de agregados que dificultasen su actividad. No obstante, podría deberse a que, sencillamente, el promotor de la GPD no fuera capaz de inducir la transcripción del gen de manera tan eficiente como lo hace el promotor con el que funciona normalmente en *A. nidulans*.

### 3.2 Clonación del gen que codifica la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *Aspergillus ochraceus*

Una vez que el *CYP68L1* fue completamente caracterizado, se procedió a la búsqueda por identidad de proteínas de la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus* que, tal y como habíamos visto en la **Fig. 42**, era mucho más eficiente que *A. nidulans*. Sin embargo, *Aspergillus ochraceus* es un hongo cuyo genoma no estaba secuenciado, lo cual dificultó la identificación por identidad. Para solventarlo, se procedió a la amplificación, por PCR, de una posible 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus* a partir de la secuencia codificante del *CYP68L1* junto con las secuencias codificantes equivalentes en otras especies próximas (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. terreus* y *A. niger*, **Fig. 57**), sobre las que se diseñaron oligonucleótidos degenerados en las zonas con mayor homología.

Posteriormente, se secuenció el genoma completo de *A. ochraceus* y se buscó el gen completo a partir de las regiones amplificadas.

No obstante, está descrita una esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus* (Bolten *et al.*, 2007), CYP68AQ1, que nunca se ha utilizado y cuya patente está caducada desde el segundo año de su creación. Más adelante (ver apartado 4.1. de Resultados y Discusión), se recogen los resultados de un análisis donde se muestra que nosotros no hemos sido capaces de comprobar tal actividad en esa enzima. Por ello, continuamos con la línea que habíamos planteado para la identificación y caracterización de la 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus*.

### 3.2.1 Identificación de la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus*

Las primeras aproximaciones para la identificación de la 11 $\alpha$ -hidroxilasa de esta especie se llevaron a cabo mediante el alineamiento de la secuencia del CYP68L1 de *A. nidulans* con otras secuencias equivalentes de especies filogenéticamente cercanas (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. terreus* y *A. niger*), recogido en la Fig. 57. A partir de este estudio comparativo, se buscaron las regiones con mayores similaridad entre nucleótidos (por ejemplo, la zona de unión al grupo hemo) entre las cinco especies y, con ellas, se diseñaron oligonucleótidos degenerados en los que, gracias a un código, una misma letra se corresponde con dos o tres bases nitrogenadas distintas. Esto hizo posible que una misma secuencia recogiera las posibles diferencias de secuencia entre dos o más de las especies mencionadas. La Tabla 11 indica el código con las correspondencias entre bases nitrogenadas y la letra asignada para el diseño de los oligonucleótidos.

**Tabla 11:** Correspondencias entre letras y bases nitrogenadas en el diseño de oligonucleótidos degenerados.

R	Y	M	K	S	W	H	B	V	D	N
A/G	C/T	A/C	G/T	C/G	A/T	A/C/T	C/G/T	A/C/G	A/G/T	A/T/G/C

Se diseñaron un total de 9 oligonucleótidos degenerados, cuatro de ellos *forward* y cinco *reverse*. Se realizaron PCRs con distintas combinaciones partiendo del DNA genómico de *A. ochraceus* (obtenido de acuerdo con el apartado 2.1.3. de Materiales y Métodos). El análisis electroforético de los productos obtenidos por PCR mostró que la reacción puesta con los oligonucleótidos AO1 y AO8 amplificaba una banda cercana a las 550 bp, que era el tamaño esperado. La secuencia del AO1 (*forward*) era GAYGCSATGSARTGGWTGGA, mientras que la de AO8 (*reverse*) era

GCRAARAABCGNCCVGRACARGMRTG. Las secuencias molde para el diseño de estos oligonucleótidos degenerados están resaltados en la Fig. 57 y la correspondencia de la secuencia de estos oligonucleótidos degenerados (A01 y A08) en el genoma de *A. ochraceus*, se recoge en la Fig. 58 (color rojo).

AF	ATGTTGGGCGATCTTTTCGAAAGTGATTGACCAATAATTCGGTCAC----ACTC--CTG	54
AOR	ATGTTGGGCGATCTTTTCGAAAGTGATTGACCAATAATTCGGTCAC----ACTC--CTG	54
AN	---ATGGATAGCCTTT-CG-----TTATCAAACCTCCCAATC-T---ATTG--CTG	40
AT	-----ATGCTCGATACGGTGACAGAACTACCCAGA-TGGGACCTC----ATCAGTCTG	48
ANIG	ATGTTTCGCTG-CCACATCATATCATACTTAGCCAAGTTGGTGCCACCCCGATGGATCTG	59
	* * * * *	
AF	ATCACGG-TAGCAGTGGCAGCAATTGCCCTACATTTATCT-TCCCCAAAGTC----GAAC	108
AOR	ATCACGG-TAGCAGTGGCAGCAATTGCCCTACATTTATCT-TCCCCAAAGTC----GAAC	108
AN	G-CGTGC-TAGCTCTGTT-GCTGCTGAGCGGCATATATGTGTACCTGAACTC----GC-C	92
AT	ATCGGTC-TTTCCGTATATCCACT---TTGTTTTTCTTCTCTCCCATTCCAAAGATC	104
ANIG	GGCGCCATTTTAGCAGCAGTTTTTCTTCTGGCTTCTAAGCGCTCCGTCCCTC---AAGAC	116
	* * * * *	
AF	CTCCCACT-AGTGAACGATAAGAAGC---CGTGGGAATTCCGATACACAAAGGCGCGAAA	164
AOR	CTCCCACT-AGTGAACGATAAGAAGC---CGTGGGAATTCCGATACACAAAGGCGCGAAA	164
AN	CTCATAACCGGTTGTCAATGGGAAACGCCCATGGGAGCTCCGAATAATCCATGCGCAGAA	152
AT	TCCATTCCCTTGATCAATGGGAAAGGAACCC'TGGAGTTGAGTTCGTCCAACGCAAAGAA	164
ANIG	TTCCCTTCTGTATCAACCAAAGACGGCGATTTGAGATCGGAAGCCTGGGATCTTTAAA	176
	* * * * *	
AF	ACGCTTCTTGGCCAACGCACATAATCTTATCAAAGCAGGGCTC-GCAAAGGCACCGGCTT	223
AOR	ACGCTTCTTGGCCAACGCACATAATCTTATCAAAGCAGGGCTC-GCAAAGGCACCGGCTT	223
AN	GCGGTTCTTATCGAATGCGCGCGATCTAATCGATTGCGGCTT-GCGAGGTGGCCAGCCT	211
AT	ACGTTTTCTTGGCGATGCTGGTAACTTATCAAGATCGGCCTGAGCAAGGCTAGC-GTTA	223
ANIG	GCGGTTCTTCAAGGATGCACATGGCTTGGTCAGGGCTGGACTCAGTCAGGGCAGC-GCCT	235
	* * * * *	
AF	TCCGGATTGTAACGGGGAATGGGAAGAGGGTTGTTCTAGACGCGAAATATGCTAATGAGC	283
AOR	TCCGGATTGTAACGGGGAATGGGAAGAGGGTTGTTCTAGACGCGAAATATGCTAATGAGC	283
AN	TTACCTTGTCACGAGGCAGGATACAGACTTGTCTGGACCCCAAGTATGCAAACGAAA	271
AT	TTCGCCTGGTCTCAGACAACGACGTCAAGACTGTGCTCCATCCGAAATACGTCAACGATA	283
ANIG	TTTACCTCTATTCGGAATTCGGGCCGAAGATCGTGCTCGCTTCAAAATATGCAGATGACT	295
	* * * * *	
AF	TCCGAAGTCACGATGATTTGAGCTT--CGGCCCCACACCGCGAATTTATTTCCACGCC--	340
AOR	TCCGAAGTCACGATGATTTGAGCTT--CGGCCCCACATCGCGGATAATTTCCACGCC--	340
AN	TTCCGAGTCATGAGGCACTGAGCTT--TGGCAAGGCAACTGCACAAGACTTCCACGCCG--	328
AT	TTCCAAGCCATCTGCGCTGAGCTT--CGGCACAGCATCCAGAAGGAATTCATGCCGA	341
ANIG	TCCGAGCCATCATGCAATTAAGCTTGCTGG--ATGCTGTGGCAGAAGAATACCACGCC--	352
	* * * * *	
AF	-----ATATAAGCGGGTTCCAGCCGTTCAAACAGGGTTCCAACGACGATGAGATCTATCA	395
AOR	-----ATATACGCGGGTTCCAGCCGTTCAAACAGGGTTCCAACGACGATGAGATCTATCA	395
AN	-----GCATACACGGATTTCGAGCCCTTTGAACAGGGAACCAGGTCGGACAGATCGTTTC	383
AT	TGCCGGTATCCATGGGTTTGAACCCCTTCAAACAAGGCTCGACTGCTGGCGAAATCTTTCA	401
ANIG	-----ATATTCGAGGCTTTGATCCTTCAACCGGGACCC-----GGCT--ATCATCAT	398
	* * * * *	
AF	AAATGCCGTGCGGATGAAACTGACTCAGAGTCTTGGGAATCTCACACAGCCGCTCGTTGA	455
AOR	AAATGCCGTGCGGATGAAACTGACTCAGAGTCTTGGGAATCTCACACAGCCGCTCGTTGA	455
AN	CGATGTGGTTAGGATGAAGTTGACCCAGAGTCTAGGGAATGTGACGAAGCCACTGTCTGA	443
AT	ATATGCTGTCCGGACCAAGTTGACTCAAAGTCTCGAG-----TGG	441
ANIG	AGATATGGTGCGCATGAAATTGACACCACATTTGGA-----A	435
	* * * * *	
AF	CGAAACACTAGTTGCACTTCAGACATATTGGACAGATGATACCAATTTGGCAGCCATCCC	515
AOR	CGAAACACTAGTTGCACTTCAGACATATTGGACAAATGATACCAATTTGGCAGCCATCCC	515

Resultados y discusión

AN	TGAGACTGCGATTGCTCTTCAAAGAAGCTGGACAGATGAAGCTGACTGGCACACAATCCC	503
AT	C-----ATGAGGTTGATCTGCGAGC-GTCC-	465
ANIG	C-----TGAAGCCCA---ACATGC-----	451
	*** * * *	
AF	TCTTAAGTCCAATATTCAGAAAGTCGTGCGCCAGTTGTCTTCAAGGATCTTCTTGGGCGA	575
AOR	TCTTAAGTCCAATATTCAGAAAGTCGTGCGCCAGTTGTCTTCAAGGATCTTCTTGGGCGA	575
AN	TGTCAGAAGACCGTCTCGATATCGTCGCCCAGTTATCGTCCAAGGCTTCTTCTAGGTGA	563
AT	-----ATCCTTGGCATAAGTCGCTCAGCTCTCGTCACGAGTATTTCTGGGCGA	512
ANIG	-----TCGATCTAATTTCCAGACTGACATCGAGAGTGTTCCTCGGGGA	494
	* * * * * * * * * *	
AF	TCAGATATGCCGCAACCCGAACGGCTCCGCATAACAGTTGACTATACAGTCGACGCCTT	635
AOR	TCAGATATGCCGCAACCCGAACGGCTCCGCATAGCAGTTGACTATACAGTCGACGCCTT	635
AN	CCAAATCTGCCGCAACCCCGAGTGGCTCCGGATCACGGTGGCCTATACGGTGGACTCGTT	623
AT	CCAGATCTGCCGGAATCCCGACTGGCTCCGTATTACGGTCAACTATACGGTCGACTCCTT	572
ANIG	GAAGCTATATCGCAACCCGAGTGGCACCCTCACGGCTGGTTACGCCCTCCACACATT	554
	* * * * * * * * * *	
AF	TAAGGCGGCTGAGGAGTTACGGCTGTGGCCGAAGGCCTTC---CGAGCAATCGTTGCCCT	692
AOR	TAAGGCGGCTGAGGAGTTACGGCTGTGGCCGAAGGCCTTC---CGAGCAATCGTTGCCCT	692
AN	TCTAGCCGCACAAGCATTGCGCATGTGGCCAA---CCTTCATGCGACGCCTCGTCGCCCC	680
AT	TATTGTGCTCAGGATCTCCGTCCTGCGCCCAAGCCCTG---CGTCCACTCGTAGCTAA	629
ANIG	CATGTCAGCTCTATTCTCCGGATGTTCCACGATGCACC---CGACCCCTTGTGTCCAA	611
	* * * * * * * * * *	
AF	GTTCTCCCATCGTGTGCA-AAGATCCGAGCTGAATTACAGGAAGCGCAAGACATCATCA	751
AOR	GTTCTCCCATCGTGTGCA-AAGATCCGAGCTGAATTACAGGAAGCGCAAGACATCATCA	751
AN	ATTTATCCC-TGGTGTCCAGAAGATCCGCGCGGAGCTCGAGGAGGCCCTCGTATCATTC	739
AT	CTTTTGCCTTCCGTCGGG-AAGATCCGAAGTGAAGTTCGCGGAAGCCAGCAATCATCA	688
ANIG	CTTGCTACCATTCTGCCGC-AAGATGCGCAAGGAGCTCCAAGAAGCAAAAGACATCATCA	670
	* * * * * * * * * *	
AF	GACCAGTACTCGACGCCAGACGTAA---AGACAAACAGGCTGCGTTATCGGCTGGAAAGG	808
AOR	GACCAGTACTCGACGCCAGACGTAA---AGACAAACAGGCTGCGTTATCGGCTGGAAAGG	808
AN	TCCCTGTATTGGA---AAAGCGCAAGGCAGAAAAACAACACTGCTATTGCGGCTGGCAAGA	796
AT	CACCGGTTCTTGA---GGAGCGCCGAAATCCAAGGAGACACAAGTTAGAGAAGGTCGGA	745
ANIG	CCCCGGTCTGTCGAAGAAAGACGGAC---CGCCAAGCAAGACGCCATCCGTCAAGGAAAGG	727
	* * * * * * * * * *	
AF	AACCGGAACGGTACAACGATGCCATGCAATGGTTGGAAGAATGCGCAAAGGGTCGCTCTT	868
AOR	AACCGGAACGGTACAACGATGCCATGCAATGGTTGGAAGAATGCGCAAAGGGTCGCTCTT	868
AN	CCCAGCTCGGTACAACGACGCGATGGAATGGATGGAACAGTGTGCTAAGGGGCGTCCGT	856
AT	CCCCGGAGCGTTATGTCGACGCGATGGAATGGATGGAAGGAGTCCGCTGAAGGTCGCCCT	805
ANIG	AGCCCGAACGCTACGTTGACGCGATGGAATGGATGGAAGAATGCGCAAAGGCCGCTCTT	787
	* * * * * * * * * *	
AF	ATGAACCTGCGTTTGGACAGTTGACATTCTCTGTTGCTGCCATCCATACAACCTCCGATA	928
AOR	ATGAACCTGCGTTTGGACAGTTGACATTCTCTGTTGCTGCCATCCATACAACCTCCGATA	928
AN	ATGATGCGGCGGTGTCGACAGTTTCTCTCTCTACTGGGCGCTATCCATACCACATCCGACA	916
AT	ACGACCCTGCGGTGGCGCAACTCTCTCTTTTCGCTTGGGCTATCCATACCACGTCGGATA	865
ANIG	ACGACCCGACCTTGCTCAGATATCACTCACACTCGCAACTATACATACTACATCGGACC	847
	* * * * * * * * * *	
AF	TGCTGACTCAAGTACTCTATGATCTCTGTGGTCGTG-ATGCATTGATTACAGGCTCTACGT	987
AOR	TGCTGACTCAAGTACTCTATGATCTCTGTGGTCGTG-ATGCATTGATTACAGGCTCTACGT	987
AN	TGCTGACCCAGGTTCTCTACGACATTTGCGGACACA-GCGATCTGGTTCGATGAGCTCAGG	975
AT	TGCTCACTCAGGCCCTCCTCGATCTCTGCGGCAAGG-ATGATCTCATCAAGGAGCTCCGT	924
ANIG	TGCTTACACAGACACTCTTCTACCTC-GCGGAAAGGGACGAAATCATCGTGGCGCTACGA	906
	*** * * * * * * * * *	
AF	GAAGAAGTGATTACGGT-AGTGCAGGAAGAAGGGTGGACGAAGCCAACTTTATACAAGTT	1046
AOR	GAAGAAGTGATTACGGT-AGTGCAGGAAGAAGGGTGGACGAAGCCAACTTTATACAAGTT	1046
AN	CAGGAGTTCTCACCGTCAATGCG-GCGGAAAGGATGGCAGAAGACGACTCTGTACAAACT	1034
AT	GAAGAGATCGTAACGGTCAATC-CAAGGGGAGGGCTGGAAGAAGACCACCTTGTACAAGTT	983
ANIG	AACGAAGTAATCACAGT-TCTGCAAGGGGATGGATGGTCCAAGTCCACTTTCAACAATCT	965
	* * * * * * * * * *	

AF	GAAGCTTATGGATAGTGTGCTAAAAGAAATTCAGCGTCTTAAACCGATTAGCGTGGTCTC	1106		
AOR	GAAGCTTATGGATAGTGTGCTAAAAGAAAGTCAGCGTCTTAAACCGATTAGCGTGGTCTC	1106		
AN	GAAGTTGATGGATAGCGTTCTCAAGGAAAGCCAAAGGGTAAAACCCATCGG-----	1085		
AT	AAAGCTTATGGACAGTGTGTTGAAGGAGAGCCAGCGATTGAAGCCCCTAAGCATCGCTTC	1043		
ANIG	GAAGCTCATGGATAGCATCTTAAAGGAAAGCCAACGGCTAAAACCGCACAAATATGGTCCG	1025		
	*** * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
AF	TATGCAGCGGGTTGCCACGGCCGATCTCAGGTTGTCCGATGGTACTTTTATCCCTAAAGG	1166		
AOR	TATGCAGCGGGTTGCCACGGCCGACCTCAGGTTGTCCGATGGTACTTTTATCCCTAAAGG	1166		
AN	-----GATCG-----TCAAGCTTTCTGACGGCACTGTTATCCCCAAAA	1124		
AT	CATGAGACGTCTCGCATCGGAGGATGTGAAACTCTCCGACGGAACATCATCCCCAAAGGG	1103		
ANIG	AATGAGACGCTTCGCACAAGAAGACGTGACCCCTCCGACGGAACCGTCTTCCCAAAGG	1085		
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
AF	CACGTTCTTGGCCGTGTCCAGCGACCGCATGTGGGACTCAGAA-ATATACCCTAACCCCC	1225		
AOR	CACGTCCTTGGCCGTGTCCAGCGACCGCATGTGGGACTCAGAA-ATATACCCTAACCCCC	1225		
AN	CGCCAACCTGATCGTTTCTCGCAGCGGATGTGGGA-TGAGAGCATCTACCCCTCCCCAG	1183		
AT	GTCGAGTCTCTTCGTCTCTAGTGACAACATGTGGGACCCT-AGCGTATATCTCTGATCCTG	1162		
ANIG	ATCGATCTCAGTCTCACCAGTACCGGTTCTAAAACCTGCGCGAGACGCCCGGTACGAGACTATGG	1144		
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
AF	TTGAGTTCGATGGCTACCGGTTCCCTGAAGCTACGCGAACTTCCCTGGACACGAGACCTCTG	1285		
AOR	TTGAGTTTGATGGCTACCGGTTCCCTGAAGCTACGCGAACTTCCCTGGACACGAGACCTCTG	1285		
AN	ACAAATTCGACCCCTACCGCTTCCCTAGATTGCGAGAGACGCCTGGTCATGAGACTTCGG	1243		
AT	AGAAATTCGACCCCTATCGGTTCCCTCAGGCTGCGCGAGATCCCAGGCCATGAAACCTCAG	1222		
ANIG	AGCATTCGACGCATACCGGTTCTAAAACCTGCGCGAGACGCCCGGTACGAGACTATGG	1204		
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
AF	CGCAAGTTGTGTCTCCATCACCAGGAGCATATGGGCTTCGGGTTTCGGCCGT	1345		
AOR	CGCAAGTTGTGTCTCCATCACCAGGAGCATATGGGCTTCGGGTTTCGGCCGT	1345		
AN	CCCAGTTTCGTCTCACCCTCGCCAGATCATATGGGCTTTGGGTTTGGCAAA	1303		
AT	CTCAGCTGGTGTCCGCATCTCCGGAACACATGGGCTTTGGATTTCGGGAAG	1282		
ANIG	CTCAGGCAGTTTCGACTACGCCTCAGCATTTGGCTTTTCGGGTTGGGAAAG	1264		
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
AF	CGGGTCGGTTTTTCGC	CATCAACGAGGTCAAATTCGCGTGTGTATAGCTTGTGTAAGT	1405	
AOR	CGGGTCGGTTTTTCGC	CATCAACGAGGTCAAATTCGCGTGTGTATAGCTTGTGTAAGT	1405	
AN	CTGGCCGCTTCTTCGC	TGCGAACGAGATCAAGATCGCGCTCTGCCATATTCTGTCTCAAGT	1363	
AT	CCGACGGTTCTTTCGC	GGTCAACGAGATCAAATAGCCCTGTGCCATATTTTGTGTAAGT	1342	
ANIG	CTGGCCGATTCTTTCGC	GATCGCATTTGCTTAAAATCATTTCTGTGTATATTCTTCTGGAGT	1324	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
AF	ACGAATTCAGTTGGCTGA----	TGGG----	TCTGTGCCCCGC-GCAA-CGAAGTT-TGG	1454
AOR	ACGAATTCAGTTGGCTGA----	TGGG----	TCTGTGCCCCGC-GCAA-CGAAGTT-TGG	1454
AN	ATGACTTCCGACTGACGGAAGAATGGAGAAATCCGCGCCGATTGCAAGTGGTGCA-GGG	1422		
AT	ATGACATTCGCTTGCAGG-----	GGGT---	TATACG-CCGGC--AAAACGAAGAATGGG	1391
ANIG	ATGACTTTAAAATAGCTGA----	TGGG-----	TGGAGCCCGACGGTGA-GGAAGTACGGG	1374
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
AF	TTTCTCATTCAAATCAGATCCGACGACGAAACTCATGATTAGACGGCGACAAGAGGAA--	1512		
AOR	TTTCTCATTACATCAGATCCGACGACGAAACTCATGATTAGACGGCGACAAGAGGAA--	1512		
AN	TTGACTGCTGAGCCAGAGC-GACGATGGA-----	GATTTCGAGGAGAAAAGAGGAA--	1473	
AT	AATCTCGTTGGACGTGGACCCATTGGCGAGGCTCTTGGTGAAGCGTTCGACAGGAGGAG--	1449		
ANIG	TTTCAT-ATGGCAGGCGGATCCGGTGGCGAAGGTGTCTGTTTCGGAGAAGGAAGGAGGAGTT	1433		
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
AF	-ACTGTTCTGTGA	1524		
AOR	-ACCGTTCTGTGA	1524		
AN	-ATTCAGTTATAG	1485		
AT	-ATTTGCTCTAG	1461		
ANIG	TACTATCTTGTGA	1446		
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			

Fig. 57. Alineamiento de las secuencias equivalentes al CYP68L1 donde AF es *A. flavus*, AOR es *A. oryzae*, AN es *A. nidulans*, AT es *A. terreus* y ANIG es *A. niger*, realizado con la herramienta web CLUSTAL Omega 2.1 (Sievers et al., 2011). Se muestran, también, resaltados sobre el texto, los oligonucleótidos A01 (forward, entre los nucleótidos 826 y 845 de *A. flavus*) y A08 (reverse, entre los nucleótidos 1336 y 1361 de *A. flavus*), con los que se logró amplificar la primera secuencia.

El fragmento amplificado con los oligonucleótidos degenerados A01 y A08 fue secuenciado y sirvió de molde para poder diseñar, sobre el DNA genómico de *A. ochraceus*, dos oligonucleótidos internos a ese fragmento (AOSG5 - *forward* y AOSG3 - *reverse*, recogidos en la Fig. 58). Posteriormente, se hizo una genoteca sobre el DNA de *A. ochraceus* que clonamos en los vectores comerciales pBlueScript SK(+) y pJET1.2 (Tabla 7), lo que permitió avanzar en la identificación de la secuencia (*chromosome walking*) partiendo de los oligonucleótidos ya identificados (AOSG5 y AOSG3) en combinación con los oligonucleótidos propios de los vectores. Sin embargo, tras realizar diversas genotecas, no fuimos capaces de identificar el gen completo como consecuencia de las limitaciones que presentaba la técnica. En la Fig. 58 se muestra la secuencia del gen candidato para codificar la 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. ochraceus* junto con los oligonucleótidos que fuimos diseñando gracias a estas aproximaciones.

TGGTTGACCTTCCTTTCTGTGAAGACGGATTAATATGATTAAGAAGTGATCTTCGGCTACTCTATCTATATAATTTCCGT  
 GCATTGCGAACACCTAGCTTATCATGGGGTCAAACCTCTTGACAGTACAGGTCTCATTATGATGCTCCAGTATTCACGAC  
 GTATTATTCCTCTGATCCCATTGTGGTGACAGGCGTACTTGCACTACTGCTACTTGCCTTCTCTACTGAGTTCAAGC  
 CAGAACCTCCTCTTGGTCAACGGAAGGAGGGTTTTGAGATTGGCTTGCCTGCGCTGCGAAGAAACGTACCTCTACAATG  
 CGAGATCACTAATTGCCCAAGTCTGAAGAAGGTATGGCTGGCTATAATATTTCTTCTATTGACCTCAAGCTAACAAGTG  
 TACTTCTCTCTAGTCGTCATCTTCAAATAGTACCGACAATGGCCGCAAAACTGTCTAGCCCCAAGTTATGCAAA  
 CGAAATTCGAAACCATCCGACCTGAGTTTTGGACATGAAACAGGGCGGGATTTCACCTCCACATTTATGGTTTGAGC  
 CGTTTCGGCAGGGAACGATGCCGGACCAGATGTTCAAGATGCTGTGCGTATGAAATTGACACAGAGTTGGTAAGC  
 GTTCTAAACCAAGCAAGGATTTTCAGCACGAGTGGTTGGCACTGACTATGTAAGGAGCAGTGTGACTAAACATTGTGCG  
 GATGAGACTACCGTTGCCCTGAGGCTCTACTGGACTGATGAGCCCGTGAGTTTTGCGGTACATGTCAGCGGTTGTATTA  
 CTAACCGGGCCTAGATTGGCATTCTATTACACAAAAGACACAATCTTGAAGCTTGCGCCAGCTCTCATCGAAGGTGT  
 TTCTGGGTGACAGGATCTGTCGCGACCCCAACTGGCTTGAATTACTGTCGACTATACAGTTGACTCGTTTATGGCTGCT  
 CAATCCCTGCGAATGTGGCTCGCTGCTTCTGCTCCCTTGTGCTAGATTACTACCGTCTTGCAGCAAAATTCAGACCGAA  
 CTTGAGGATGCCCACAACTTATCAATCCTGTACTGCGGAGCGTGAAGCAGAAAAGCAGCCCGGCTCAACAAGGA  
 CTGACCCCAACGCTACACAGACGCGATGGAGTGGATGGAACAGTGTGCTAAAGGTCGACCGTACGATGCCGGGGCT  
 GCACAACCTTCTCTCCCTTGCAGCCATTACTACTCCGATATGATCACCCAGGTGCTGTATGACCTTTGCGGGAAG  
 GACGAACTGGTGAAGCTCTACGTGAAGAGGCTCGTACTGTTATTCAAGCAGACGGCTGGCAAAAGACCACACTCTATA  
 AACTCAAACCTATGGATAGTATGCTGAAAGAGAGTCAACGGTTGAAACCGACTAGTGTGGTATGTATCAGCTTCCTAA  
 CCTCAAATTAAGAGCTAACAAGATACGTGCAAGTTTCTATGAGACGCTCGCAATGAAGACTGTCACCTTGTGACAGCGAA  
 CTGTAATTTCAAAAGGCACTTCGATCTTTGTCTCCGGCAACAGATGTGGGACCCCGAAGTCTATCCCGACCCCGACAGG  
 TTTGATGATATCGATTCTACGACTGCGGAGACCTGGCAGTGAACCTCGGCCCAATTGGTTTCGGTCTCCCA  
 GCACTTGGGATTTGGTCTGGGGAAGCATGCTTGCCTGGCCGATTCTTCGCTGCTAATGAGATCAAAATCGCGCTTTCGC  
 ACATTCTGCTGAAATATGACTTACAGGCTACCAGCAGGTAACCTCAACATATATATGGGAGCCGAGGTTGTGCA  
 GATCCTTTTGCAAAATTGAAATTAGGCGGAGAACTCCGACATTGAACTATGAGGCTGGGATAGGTTTATCAATTG  
 ACATGTGATCATGTATTCTTACTTATGTGGACATCATTTCATAGAGGCATGGGTGACTCCGTTTGAAGAACCAAACT



Fig. 58. Fragmento del genoma de *A. ochraceus* correspondiente con la región identificada del CYP68L8. Se muestran, además, los oligonucleótidos empleados en esta técnica.

Por ello, se decidió mandar a secuenciar el genoma de *A. ochraceus* para poder localizar la secuencia completa del gen codificante para la enzima responsable de la

11 $\alpha$ -hidroxilación en esta especie. Para la secuenciación, se extrajo DNA genómico (ver apartado 2.1.3. de Materiales y Métodos) y se mandó a secuenciar al servicio de secuenciación de genes de GeneWiz® (ver apartado 2.9. de Materiales y Métodos). Con el genoma del hongo secuenciado, pudimos alinear y ensamblar las secuencias y completar la secuencia del gen codificante para la supuesta esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus* (Fig. 59A y 59B). Este gen guardaba un 68% de identidad con el gen *CYP68L1*, fue enviado para ser caracterizado como citocromo P450 al Dr. Nelson y fue denominado *CYP68L8* (Nelson, 2009). En la Fig. 59A se recoge un alineamiento entre las secuencias de nucleótidos del *CYP68L1* y del *CYP68L8* (*A. nidulans* y *A. ochraceus*, respectivamente) y en la Fig. 59B el alineamiento se corresponde a su secuencia de aminoácidos.

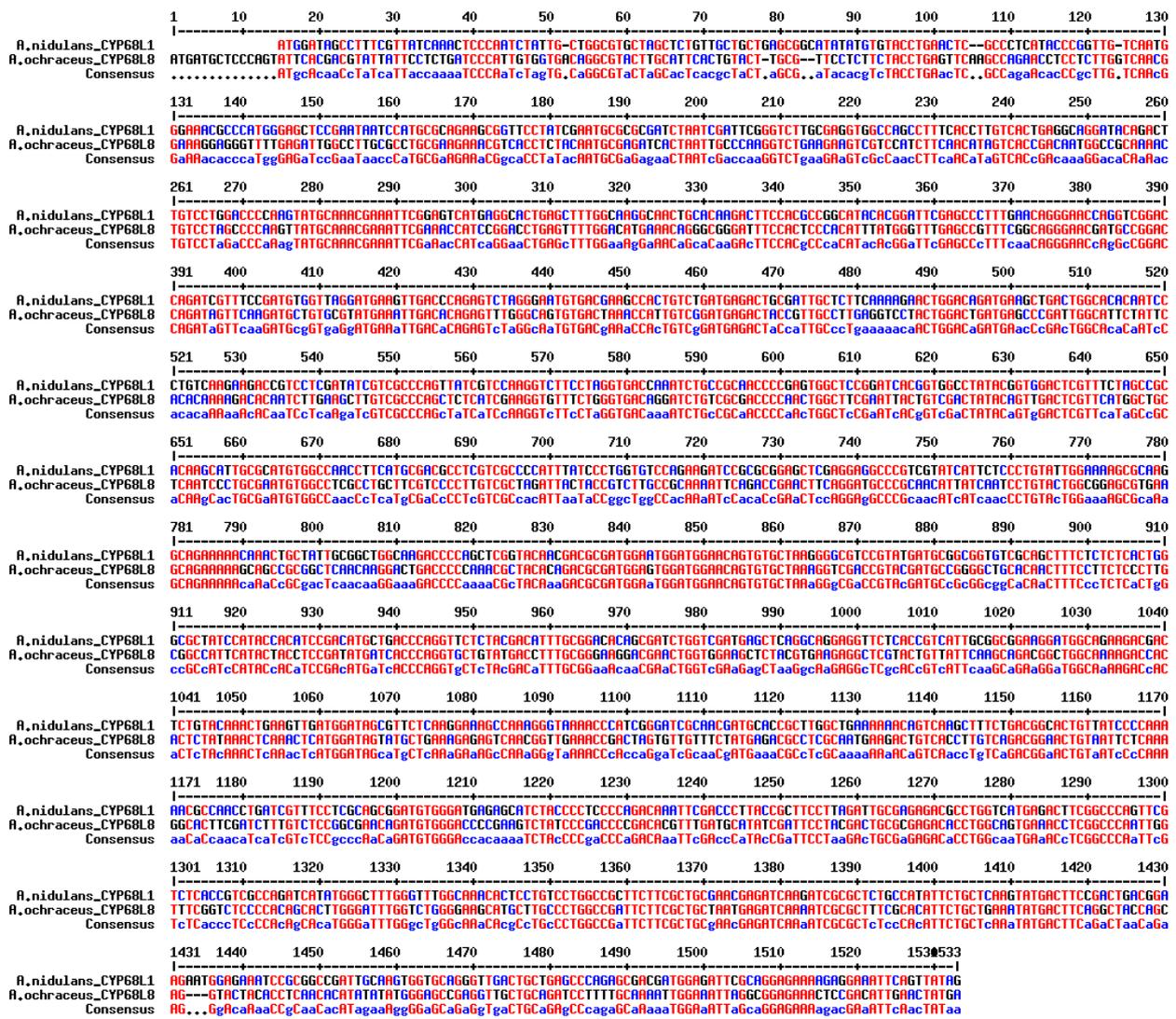
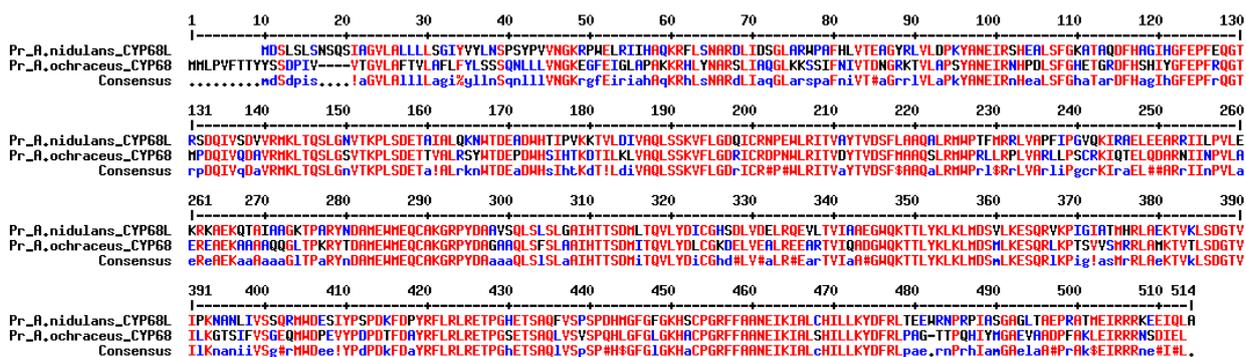


Fig. 59A. Comparación de la secuencia de nucleótidos del *CYP68L1* (de *A. nidulans*) frente al *CYP68L8* (de *A. ochraceus*) realizado con la herramienta web MultAlin (Corpet, 1988).



**Fig. 59B.** Comparación de la secuencia de aminoácidos del CYP68L1 (de *A. nidulans*) frente al CYP68L8 (de *A. ochraceus*) realizado con la herramienta web MultAlin (Corpet, 1988). Los alineamientos han sido obtenidos con la herramienta web MultAlin en la que se representan en rojo los nucleótidos o aminoácidos iguales en ambas secuencias, en azul, los de propiedades similares y en negro los no coincidentes.

Las Fig. 59A y 59B muestran la homología que existe tanto entre las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los citocromos CYP68L1 y CYP68L8. En el caso de la secuencia de aminoácidos (Fig. 59B) la identidad es del 64% entre ambos.

## 4 Estudio de otras enzimas con actividad esteroide 11-hidroxiilasas de otros hongos y su expresión en la cepa KO de *A. nidulans*

Aprovechando que disponíamos de una cepa carente de la actividad esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa, hemos decidido emplear esta cepa como un sistema modelo para expresar otras esteroide 11-hidroxiilasas identificadas en otras especies fúngicas. Entre ellas cabe destacar la de *A. ochraceus* (tanto la secuencia patentada - Bolten *et al.*, 2007 - como la propuesta por nuestro grupo), la de *Rhizopus oryzae* (CYP509C12) (Petrič *et al.*, 2010) y la 11 $\beta$ -hidroxilasa, (CYP103168) de *Cochliobolus lunatus* (Ogawa, *et al.*, 2015).

Para llevar a cabo este estudio se empleó el plásmido p1660' (con el promotor inducible de - 400 pb *upstream* desde el ATG del gen AN8530) como vector de clonación para transformar la cepa KO. El proceso seguido es el que se describe en el apartado 4.1.3. de Materiales y Métodos.

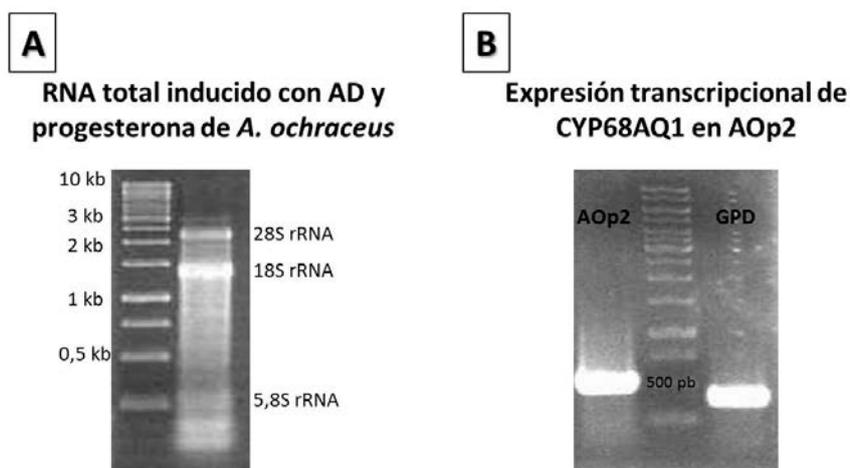
### 4.1 Esteroide 11-hidroxiilasa de *A. ochraceus*: CYP68AQ1 y CYP68L8

En *A. ochraceus*, la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa, correspondiente al citocromo CYP68AQ1, estaba protegida por una patente (Bolten *et al.*, 2007). Por ello, se procedió a comprobar si esa enzima era realmente capaz de promover la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en nuestra cepa KO de *A. nidulans*, ya que sospechábamos que se trataba de una identificación errónea puesto que la patente (caducada) nunca llegó a ser explotada a nivel industrial. Para ello, se llevó a cabo la síntesis de cDNA de *A. ochraceus*, previa obtención de RNA total, partiendo de micelio inducido con AD y progesterona, ya que suponíamos que, tal y como ocurría en *A. nidulans*, la 11 $\alpha$ -hidroxilasa fuera una enzima inducible. Este protocolo se recoge en los apartados 2.6.1. y 2.7.1. de Materiales y Métodos. La calidad del RNA total se muestra en una electroforesis en gel de agarosa con TBE en la que se cargaron 3  $\mu$ l de muestra (**Fig. 60A**). En ella se aprecian las bandas correspondientes al RNA ribosómico de diferentes tamaños.

La amplificación del gen *CYP68AQ1* se hizo con cDNA en lugar de con DNA genómico para evitar que la presencia de intrones dificultase su procesamiento por parte del organismo receptor (*A. nidulans*). A partir de ese cDNA, se procedió a la amplificación de la secuencia codificante utilizando oligonucleótidos específicos (**Tabla 8**). A continuación, se prosiguió con la estrategia de clonación (ver apartado 4.1.3 de Materiales y Métodos) y una vez secuenciada la construcción, se llevó a cabo la transformación fúngica de la cepa KO. La cepa resultante era protótrofa para la

piridoxina ya que gracias a la integración correcta del plásmido, había ganado la capacidad para sintetizar esta vitamina. Esos transformantes se denominaron AOp1-6.

La comprobación de los diferentes transformantes incluía su selección y posterior siembra en medios específicos (MMS y MMS con glufosinato, en este caso). Además, partiendo del micelio de cada cepa transformante, se realizaron PCRs con el fin de amplificar el inserto y secuenciarle y constatar la presencia del gen *CYP68AQ1* sin mutaciones en la cepa receptora. Se valoró también la expresión de este gen a nivel transcripcional a través de una RT-PCR en comparación con la expresión gen *GPD* (codificante para una proteína constitutiva, a modo de control positivo). En la **Fig. 60B** se muestra la electroforesis en gel de agarosa correspondiente a las reacciones de la RT-PCR, esperándose para el gen *CYP68AQ1* un fragmento con un tamaño de 517 bp y para el gen *GPD*, un fragmento de 400 pb.



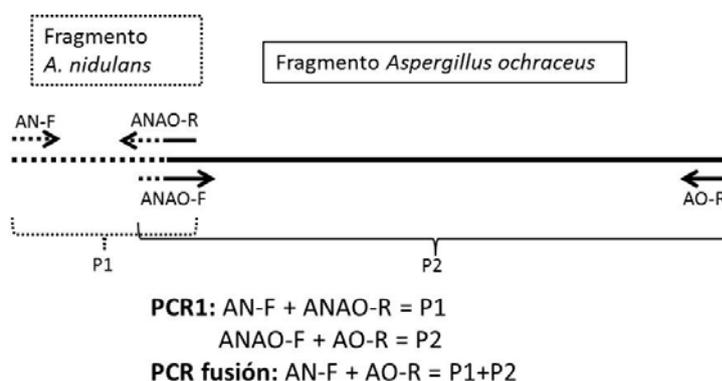
**Fig. 60.** **A** – Análisis por electroforesis en gel de agarosa del RNA total obtenido a partir de micelio inducido de *A. ochraceus*. **B** – Análisis por electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de RT-PCR realizadas sobre el transformante AOp2 para verificar la expresión a nivel transcripcional del *CYP68AQ1*.

Una vez comprobado que existía transcripción del gen, se realizó una fermentación para comprobar la capacidad de hidroxilación de la cepa transformante en presencia, conjuntamente, de AD y de progesterona. Es importante resaltar que, en primera instancia, se efectuó una fermentación a 37°C, temperatura de crecimiento de *A. nidulans*. No obstante, ya que la temperatura óptima de crecimiento de *A. ochraceus* es 27°C y que sería posible que sus enzimas funcionaran mejor a esa temperatura, decidimos realizar otra fermentación a una temperatura intermedia (32°C). En la **Fig. 62** se muestran los cromatogramas correspondientes a las muestras obtenidas a partir de fermentaciones, tras 72 h de crecimiento, de la cepa AOp2 (arriba) realizada en presencia de AD y progesterona a 37°C (izquierda) y a 32°C (derecha). En ambos casos,

se observó que no existía ningún tipo de actividad ya que los sustratos no se modificaban. Gracias a este estudio pudimos confirmar que el CYP68AQ1 descrito por Bolten y colaboradores (Bolten *et al.*, 2007) no poseía la actividad esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa descrita o, de haberla, que esa actividad era tan escasa que nuestro sistema analítico no fue capaz de detectarla.

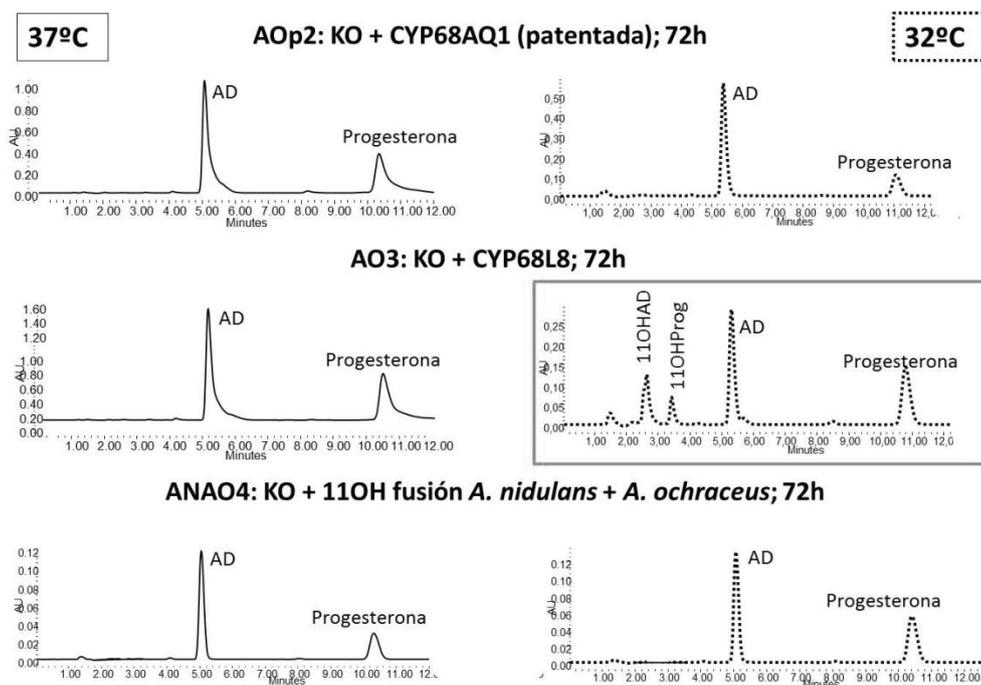
Sin embargo, quedaba pendiente de confirmar si el gen que nuestro grupo había identificado como 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. ochraceus* (CYP68L8), era el responsable de codificar esta actividad. Como es habitual, la clonación del gen CYP68L8 se llevó a cabo en el vector de clonación modificado p1660' sobre el marcador de la cepa KO, *pyroA4*, de manera que obtuvimos transformantes prototrófos para la piridoxina. Sobre los transformantes, se realizaron las comprobaciones pertinentes y seleccionamos el clon A03 para estudiar su actividad enzimática mediante fermentación. Al igual que con la proteína patentada, se realizó una fermentación con AD y progesterona, conjuntamente, y se incubaron a 37°C y a 32°C. En la **Fig. 62** se muestran los cromatogramas resultantes del análisis por HPLC de las muestras correspondientes a las fermentaciones realizadas con la cepa A03 (centro) cuando se incubaba a 37°C (izquierda) o a 32°C (derecha). En ellas se aprecia que a 37°C el CYP68L8 no era capaz de biotransformar ni la AD ni la progesterona, mientras que a 32°C sí que se formaban los correspondientes 11 $\alpha$ -hidroxilados, aunque con un rendimiento no muy elevado (<20%).

Finalmente, con la intención de lograr un mejor funcionamiento del CYP68L8, se modificó la secuencia señal de inserción de la proteína en el retículo endoplásmico a fin de posibilitar una mejor funcionalidad a la temperatura de crecimiento óptima para la cepa receptora (37°C). Para ello, se construyó un fragmento de fusión que contenía los primeros 70 aminoácidos del CYP68L1 y el resto de la secuencia de la 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus*. Para realizar este experimento se siguió el protocolo descrito por Szewczyk y colaboradores (Szewczyk *et al.*, 2006), ya explicado en el apartado 4.2.2. de Materiales y Métodos. En la **Fig. 61** se representa un esquema del fragmento de fusión construido que contenía los primeros 270 nucleótidos del gen CYP68L1 (*A. nidulans*) y los 1300 últimos nucleótidos del gen CYP68L8 (*A. ochraceus*).



**Fig. 61.** Fragmento de fusión que contiene la secuencia inicial (primeros 210 nucleótidos) de la 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. nidulans* y el resto de la de *A. ochraceus*, junto con los oligonucleótidos empleados para ello.

El fragmento de fusión que contenía el gen híbrido se clonó en el p1660' y se utilizó para transformar la cepa KO. Los transformantes resultantes fueron comprobados con las pruebas habituales y, para determinar si el gen híbrido conseguía mejorar la eficiencia en la 11 $\alpha$ -hidroxilación, se realizó una fermentación con la cepa transformante (ANAO4) y se cultivó en presencia de AD y de progesterona, conjuntamente. En la **Fig. 62** se muestra, en la parte inferior, los cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC de la fermentación de la cepa ANAO4 realizada a 37°C (izquierda) y a 32°C (derecha). En ninguno de los casos se produjo modificación de la AD ni de la progesterona.



**Fig. 62.** Análisis por HPLC de la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en la cepa KO del CYP68AQ1, patentada, del CYP68L8 y de la proteína de fusión ANAO, procedentes de *A. ochraceus*. En la primera fila se muestran los cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC de la cepa AOp2 (conteniendo el

*CYP68AQ1*) cuando se cultivaba en presencia de AD y progesterona a 37°C (izquierda) y a 32°C (derecha). En la fila central se recogen los cromatogramas correspondientes a la fermentación de la cepa A03 (conteniendo el *CYP68L8*) también realizadas a 37 (izquierda) y 32°C (derecha). En último lugar, la fila inferior se corresponde con los cromatogramas de la cepa ANA04, que contiene el gen híbrido del *CYP68L1* y *CYP68L8* cuando se cultiva con AD y progesterona a 37 (izquierda) y 32°C (derecha).

En la **Fig. 62** se aprecia que, de todos los cromatogramas mostrados, únicamente se registra la formación de los 11 $\alpha$ -hidroxi-derivados de AD y de progesterona cuando se incubaban cepas que contenían el gen que codificaba el *CYP68L8* a 32°C. Esto quiere decir que nuestro intento de lograr mayor eficiencia de transformación con la proteína de fusión que contiene el principio de la secuencia del *CYP68L1* (de *A. nidulans*, organismo receptor) produce la pérdida de la actividad de la proteína resultante ya que no aparece ninguna actividad de hidroxilación detectable en el cromatograma. Asimismo, de esta figura también podemos deducir que, tal y como esperábamos, la esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus* patentada (el *CYP68AQ1*) no se corresponde realmente con esa actividad o, que si realiza la hidroxilación, lo hace tan pobremente que no somos capaces de detectarla.

En definitiva, podemos confirmar la identificación del *CYP68L8* como el gen que codifica la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. ochraceus*, ya que al introducir este gen en la cepa KO hemos sido capaces de detectar la actividad esperada, si bien es cierto que la escasa actividad generada podría sugerir que en este proceso está implicado algún otro gen. Esto explicaría la elevada actividad de la cepa silvestre de *A. ochraceus* en comparación con nuestra cepa recombinante (A03). No hay que olvidar que esta escasa actividad probablemente se deba también a que el citocromo no está actuando a su temperatura óptima, puesto que, como ya se ha visto, a 37°C ni siquiera presenta actividad mientras que a 32°C lo hace de manera discreta. En cualquier caso, la identificación del gen que codifica esta enzima posee un gran interés farmacéutico ya que permite la creación de microorganismos recombinantes que integren la actividad de hidroxilación en la posición 11 y en configuración  $\alpha$ . No obstante, para caracterizar mejor esta enzima debería obtenerse una cepa KO de *A. ochraceus* con el objetivo de conocer si la 11 $\alpha$ -hidroxilación se debe únicamente al *CYP68L8* o si existen otros citocromos implicados. Por el momento, la falta de plásmidos y de cepas mutantes de *A. ochraceus* dificulta este proceso. Una alternativa que permitiría obtener mejores rendimientos pudiera ser la sobreexpresión del gen *CYP68L8* en la cepa silvestre.

Por otra parte, para completar el estudio de las  $11\alpha$ -hidroxilasas presentes en las dos especies de estudio del género *Aspergillus*, se realizó una fermentación empleando AD como sustrato y monitorizando su transformación en  $11\alpha$ OHAD por todas las cepas que presentan esta actividad (las cepas silvestres de *A. nidulans* y *A. ochraceus*, la cepa KO, la cepa P400, la cepa GPD4 y la cepa AO3, que contiene el *CYP68L8* de *A. ochraceus*). En la Fig. 63 se muestra, a la izquierda, una gráfica en la que se recoge la evolución en la producción de  $11\alpha$ OHAD, durante 72 h, expresado como el porcentaje del área de  $11\alpha$ OHAD formado respecto al total del área de todos los picos que se aprecian en el cromatograma. Por el contrario, a la derecha se recoge el gráfico del consumo de AD durante 72 h, expresado como el porcentaje del área de AD respecto al porcentaje de las áreas del resto de los picos.

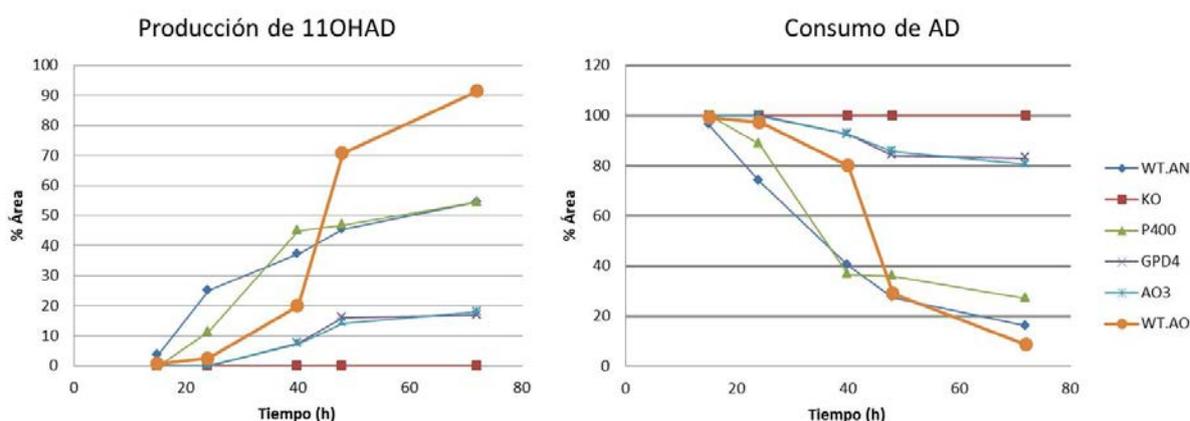


Fig. 63. Representación gráfica en la que se comparan la producción de  $11\alpha$ OHAD y el consumo de AD entre las distintas cepas estudiadas en este trabajo pertenecientes al género *Aspergillus*.

En los gráficos se aprecia cómo, claramente, *A. ochraceus* (naranja) es el mayor productor de  $11\alpha$ OHAD de todas las cepas estudiadas. A él le siguen la cepa WT de *A. nidulans* (azul oscuro) y, prácticamente al mismo nivel, la cepa revertida P400 (verde). Con una producción mucho más baja se sitúan tanto la cepa revertida con el *CYP68L1* bajo el promotor de la GPD (GPD4, morado) y la cepa con el *CYP68L8* de *A. ochraceus* (AO3, azul claro). La ausencia de producción de  $11\alpha$ OHAD se observa en la cepa KO (rojo).

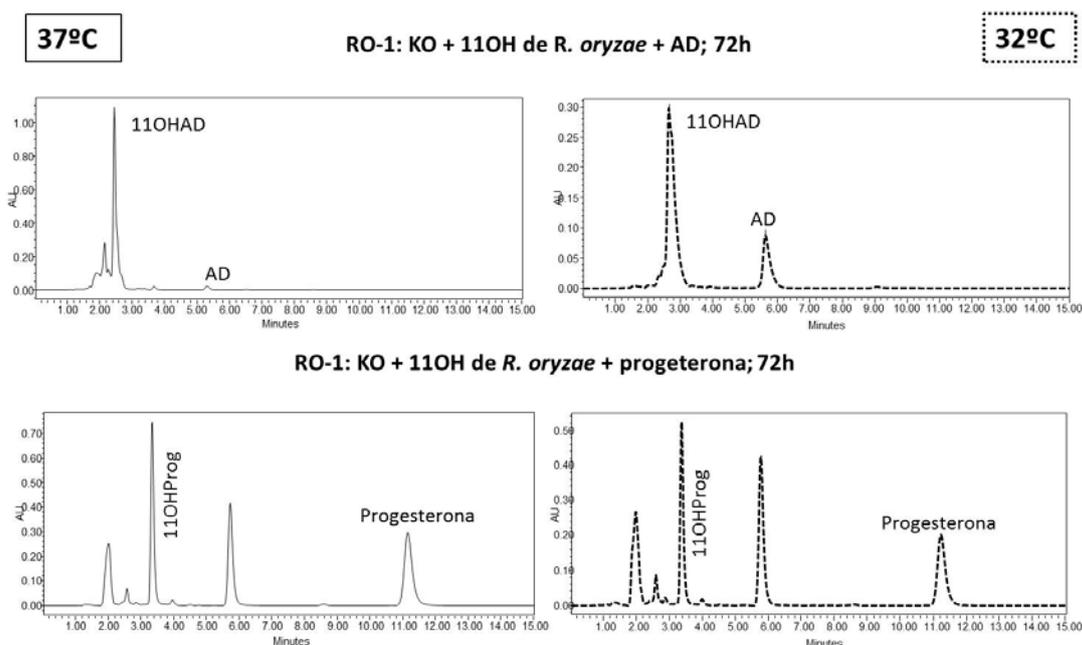
#### 4.2 Esteroides 11-hidroxilasa de *Rhizopus oryzae*: CYP509C12

Los primeros pasos realizados en el campo de la biotransformación de esteroides fueron posibles gracias al descubrimiento de la  $11\alpha$ -hidroxilación a cargo de especies del género *Rhizopus spp.* (Gabinskaia et al., 1971). En la actualidad, el citocromo responsable de esta actividad está perfectamente identificado y ha sido clonado a partir de la especie *R. oryzae*. A este citocromo se le denomina CYP509C12 (Petrič et al., 2010).

Con el fin de comparar la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa de ese citocromo, se introdujo su gen en nuestra cepa KO de *A. nidulans*. Como casos precedentes, tenemos que tener en cuenta que, al igual que *A. ochraceus*, se trata de un hongo que crece entre 27-30°C, por lo que podría ser que el CYP509C12 no funcionase con todo su potencial cuando se cultiva a 37°C. Por esta razón, las fermentaciones para el estudio de su actividad se llevaron a cabo a 37°C y a 32°C. Asimismo, no hay que olvidar que ya se ha realizado una comparación con las cepas silvestres tanto de *A. nidulans*, *A. ochraceus* y *R. oryzae* (Fig. 42), donde se ha visto que la mayor actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa recaía sobre *A. ochraceus*.

Para realizar la construcción que contiene el gen *CYP509C12*, se procedió a la amplificación de su secuencia a partir del plásmido FUN cedido por el Prof. Dr. José Luis García (CIB-CSIC, Madrid, España) y se siguió la estrategia de clonación utilizada para otros genes (ver apartado 4.1.3. de Materiales y Métodos). Utilizamos el plásmido p1660' (conteniendo la proteína inducible de - 400 pb del CYP68L1) ya que, tal y como se ha visto en el apartado 3.1.3. de Resultados, es el mejor para producir una buena expresión de las proteínas con actividad 11-hidroxilasa.

Con esa construcción, se transformó la cepa KO sobre el marcador truncado *pyroA4*, presente en la cepa KO, que complementaba la secuencia truncada del *pyroA* del plásmido p1660'. Los transformantes resultantes fueron seleccionados y analizados por PCR y mediante secuenciación. Tras estas comprobaciones, se realizó una fermentación para determinar la actividad enzimática de la cepa transformante RO1. La fermentación se llevó a cabo en presencia de AD, por un lado, y de progesterona, por otro, como esteroides para ser modificados y se realizó a 37°C y a 32°C. En la Fig. 64 se muestran los cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC de las muestras de la fermentación realizada en presencia de AD (arriba) y de progesterona (abajo), tanto a 37°C (izquierda) como a 32°C (derecha).



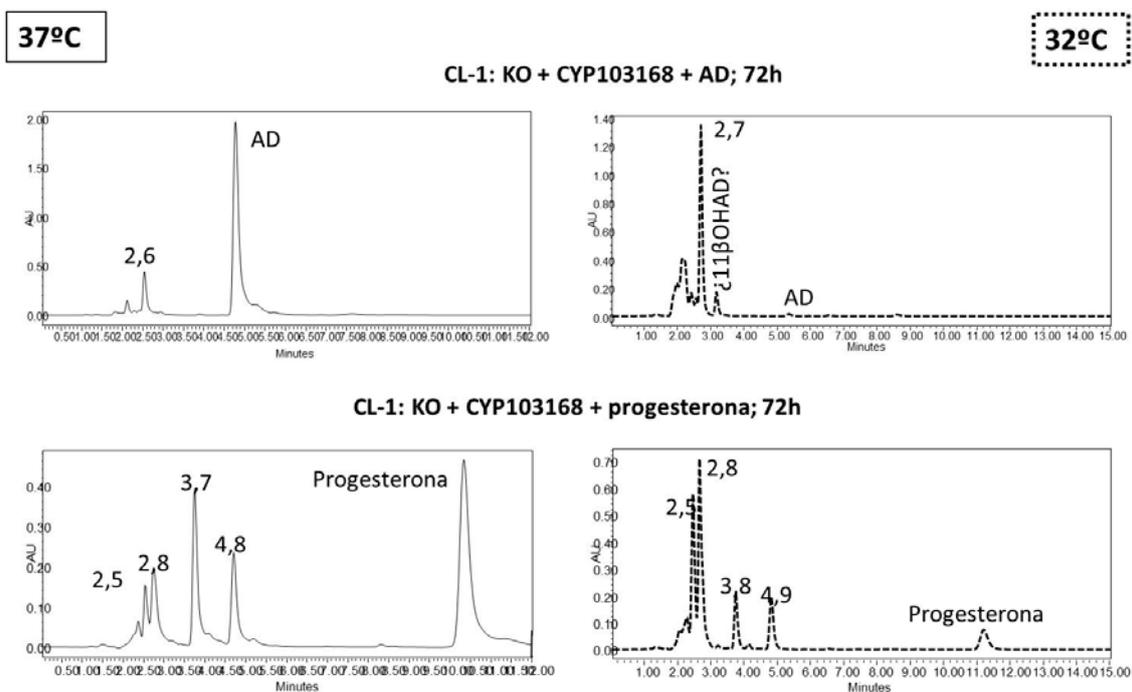
**Fig. 64.** Cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC de las muestras de las fermentaciones de la cepa RO1, conteniendo el *CYP509C12* en la cepa KO, en presencia de AD y progesterona y a una temperatura de 37° (izquierda) y 32°C (derecha).

Al introducir únicamente el gen responsable de la  $11\alpha$ -hidroxilación en *R. oryzae*, (el gen *CYP509C12*), observamos que el doble pico que aparecía en la fermentación con AD con la cepa silvestre de esta especie (**Fig. 40**), desaparecía, aunque seguían apareciendo otros picos minoritarios con TR próximos. Es conveniente resaltar que el rendimiento de esta proteína en la cepa KO sobre AD, es mucho mejor que la obtenida con el propio citocromo *CYP68L1* de *A. nidulans*. Estos datos se analizaron con mayor profundidad en el apartado 4.4 (ver más adelante). Llama también la atención que la producción de  $11\alpha$ OHAD que se observa a 37°C es prácticamente la misma que a 32°C, a pesar de que se trate de una proteína procedente de una especie que crece a 27°C. No obstante, aunque a 37°C se consume casi todo el sustrato (AD), es cierto que la proporción de  $11\alpha$ OHAD formada es algo mayor cuando la fermentación tiene lugar a 32°C, ya que la cantidad de otros compuestos formados es menor. Respecto a la actividad del *CYP509C12* sobre la progesterona, la figura muestra que se forman un mayor número de intermediarios que cuando se empleaba la cepa silvestre de *R. oryzae*, lo cual sugiere la posible intervención de enzimas presentes en la cepa KO de *A. nidulans* que, al formarse  $11\alpha$ -hidroxi-progesterona, son capaces de actuar. Además, no se observan diferencias significativas entre los rendimientos obtenidos a 37°C y a 32°C.

### 4.3 Esteroide 11-hidroxilasa de *Cochliobolus lunatus*: CYP103168

El estudio de la actividad de la cepa silvestre de *C. lunatus* (ver apartado 1.4. de Resultados), nos permitió comprobar que esa especie realizaba diversas modificaciones sobre los sustratos de partida (AD, progesterona y testosterona). Por comparación con las otras tres especies, observábamos que aparecían derivados con tiempos de retención próximos a los 11 $\alpha$ -hidroxi-derivados pero que no llegaban a ser coincidentes (**Fig. 41**). Sin embargo, en el caso de la AD, del que disponíamos el derivado 11 $\beta$ -hidroxi-AD (Sigma), el tiempo de retención era de 3,2 minutos, bastante distante de su análogo en posición alfa (2,6 minutos), lo que nos hizo pensar en la posibilidad que los derivados que observábamos en los cromatogramas pudieran ser 14 $\alpha$ -hidroxi-derivados (otra de las actividades que, según la bibliografía, posee *C. lunatus*) (Huang *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1993).

Puesto que se ha identificado la enzima responsable de la actividad 11 $\beta$ -hidroxilasa (Ogawa, *et al.*, 2015) que ha sido denominada CYP103168, el gen que codifica este citocromo se introdujo en la cepa KO con el objetivo de comprobar su actividad sobre determinados sustratos esteroideos (AD y progesterona). Para realizar la construcción, se amplificó la secuencia codificante del CYP103168 a partir del plásmido FAN, cedido por el Prof. Dr. José Luis García (CIB-CSIC, Madrid, España). La secuencia amplificada fue introducida en el vector de expresión p1660' entre *Nco*I y *Eco*RI, siguiendo la estrategia de clonación descrita en el apartado 4.1.3. de Materiales y Métodos. Un clon sin mutaciones fue seleccionado para llevar a cabo la transformación en la cepa KO de *A. nidulans*. Los transformantes resultantes fueron seleccionados por crecimiento en medio específico y, posteriormente, verificados por amplificación y secuenciación de su DNA. Su actividad enzimática fue investigada mediante una fermentación realizada en presencia de AD y progesterona, por separado. No obstante, al igual que ocurre con las cepas transformadas conteniendo el CYP68L8 de *A. ochraceus*, y el CYP509C12 de *R. oryzae*, se hicieron fermentaciones tanto a 37°C como a 32°C, puesto que *C. lunatus* también crece en condiciones normales entre 27-30°C. En la **Fig. 65** se muestran los cromatogramas obtenidos a partir del análisis por HPLC de la fermentación realizada en presencia de AD (arriba) y progesterona (abajo), tanto a 37°C (izquierda) como a 32°C (derecha).



**Fig. 65.** Cromatogramas procedentes del análisis por HPLC de las fermentaciones realizadas con la cepa CL1, que contiene el gen *CYP103168* en la cepa KO, en presencia de AD y de progesterona y a una temperatura de 37° y 32°C.

En primer lugar, cabe mencionar que el *CYP103168*, al igual que ocurría con el *CYP68L8* de *A. ochraceus*, funcionaba mejor a 32°C que a 37°C, ya que la cantidad de derivados formados y de sustrato consumido es mucho mayor cuando la fermentación se realizaba a 32°C. Ello indica que la actividad de la enzima es sensible a la temperatura. Por otra parte, nos llamó la atención que al introducir el gen *CYP103168* se formaban los mismos derivados que cuando se había realizado la fermentación con la cepa silvestre (**Fig. 41**). Cuando se añadía AD, el derivado que se acumulaba en mayor proporción (TR 2,7 min) no correspondía al patrón 11β-hidroxi-AD (Sigma) (TR de 3,2 min). Para tratar de explicar estos resultados, planteamos tres hipótesis: i) que la actividad atribuida al *CYP103168* no sea la de 11β-hidroxilasa, ii) que la AD no sea un sustrato de esta enzima (*CYP103168*) o iii) que la cantidad producida de 11β-hidroxi-AD sea tan reducida que la confundamos entre alguno de los derivados minoritarios que se forman y que se aprecian en el cromatograma (**Fig. 65**).

En presencia de progesterona, también observamos que los picos que se formaban eran los mismos que en la cepa silvestre. En este caso, no se dispone de un patrón de 11β-hidroxi-progesterona, por lo que no podemos saber si realmente se está formando o no y en qué proporción. Sin embargo, cuando añadíamos progesterona como sustrato, el número de derivados que se formaban tras 2 o 3 días de fermentación era muy elevado, lo cual no indica que el *CYP103168* lleve a cabo todas

esas biotransformaciones sobre la progesterona. En este caso, lo que parece que ocurre es que a partir de la progesterona se formaban dos derivados, con TR 4,9 y 3,8 min que, a medida que trascurría el tiempo, iban reduciéndose en favor de los picos detectados a 2,8 y 2,5 min. Es posible que, al igual que ocurría con *Aspergillus spp.*, se traten de compuestos generados a partir de la progesterona con un grupo hidroxilo, (TR 4,9 y 3,8 min) y que a partir de esos compuestos el CYP103168 o alguna proteína presente en la cepa receptora de *A. nidulans*, introduzca un segundo grupo hidroxilo dando lugar a los dos compuestos cuyo TR era de 2,8 y 2,5 min, respectivamente.

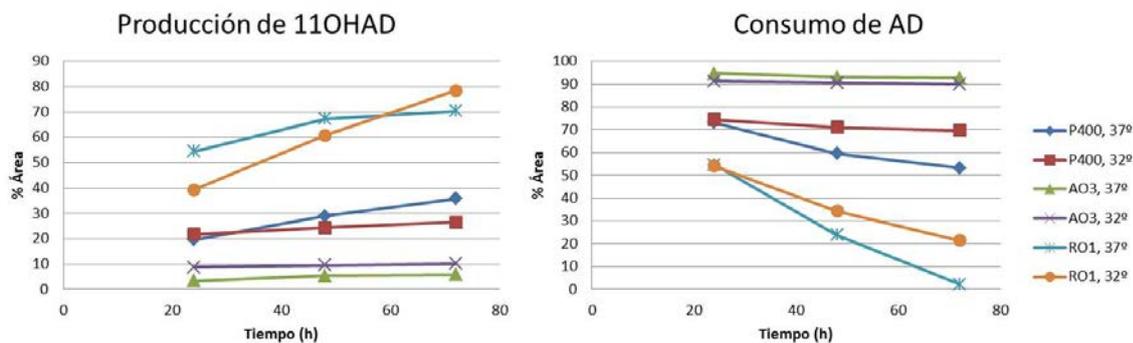
#### 4.4 Comparación de los resultados obtenidos tras expresar los cuatro citocromos en la cepa KO

Durante el desarrollo de este trabajo se han estudiado la expresión de cuatro citocromos con actividad esteroide 11-hidroxilasa en la cepa KO de *A. nidulans* (carente de esta actividad). Se trata de:

- CYP68L1, de *A. nidulans* y con actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa, cepa P400.
- CYP68L8, de *A. ochraceus* y con actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa, cepa A03.
- CYP509C12, de *R. oryzae* y con actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa, cepa R01.
- CYP103168, de *C. lunatus* y con actividad 11 $\beta$ -hidroxilasa, cepa CL1

Sin embargo, dado que con la cepa CL1 no obtenemos compuestos que seamos capaces de identificar y, por tanto, de comparar, eliminamos esta cepa del estudio comparativo. Para comparar la actividad de estas tres cepas, se realizaron dos fermentaciones: una de ellas a 37°C y otra a 32°C, debido a las dificultades observadas para desempeñar su actividad en las cepas con proteínas recombinantes procedentes de especies que crecían a 27°C, especialmente para en el caso del CYP68L8 de *A. ochraceus*.

En todos los casos, se tomaron muestras para conocer la evolución en el peso del micelio (para evitar diferencias debido a una variación en la masa biotransformante), apreciándose que no existían diferencias significativas. A partir de los cromatogramas obtenidos, se realizó un gráfico (**Fig. 65**) en el que se muestra la producción de 11 $\alpha$ OHAD reflejado como el porcentaje del área de este sustrato en comparación con el área del resto de compuestos apreciables en el cromatograma. De la misma forma, también se muestra la evolución en el consumo de AD.



**Fig. 66.** Comparación de la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa sobre la AD de los transformantes de la cepa KO. Gráfico de producción de 11 $\alpha$ OHAD, expresado como el porcentaje del área de 11 $\alpha$ OHAD respecto al resto de áreas de los picos formados, por parte de las tres cepas transformantes a partir de los citocromos con actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en la cepa KO tanto a 37° como a 32° (izquierda). Gráfico de consumo de AD en las mismas condiciones (derecha).

Observando la **Fig. 66** llama la atención que la cepa en la que existe una mayor producción de 11 $\alpha$ OHAD es la cepa RO1, tanto en la fermentación a 32°C como a 37°C, ya que cabría esperar que la reversión de la actividad con el CYP68L1 del propio *A. nidulans* fuera más eficiente. La menor actividad de la cepa revertida, P400, con respecto a RO1, podría explicarse teniendo en cuenta los rendimientos de sus respectivas cepas silvestres (de *A. nidulans* y *R. oryzae*, **Fig. 42**). Además, hay que considerar que el citocromo responsable para la 11 $\alpha$ -hidroxilación en *R. oryzae* está extensamente caracterizado puesto que es uno de los empleados hoy en día en la industria, de forma que sus rendimientos presentan un menor potencial de mejora, al contrario de lo que ocurre con el CYP68L1 de *A. nidulans*.

La actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa de la cepa AO3, aunque reducida, permite la identificación del gen que codifica esa actividad en *A. ochraceus*. Esta escasa actividad puede explicarse por la falta de optimización respecto a su rendimiento y condiciones de fermentación así como por el efecto de la temperatura sobre el funcionamiento de la enzima. En el apdo. 4.1 hemos observado que la cepa AO3 no era capaz de actuar a 37°C y que lo hacía moderadamente a 32°C, poniendo en relieve que las diferencias de temperatura entre el crecimiento de la cepa receptora (*A. nidulans*, 37°C) y el de la cepa donadora (*A. ochraceus*, 27°C) tienen un efecto claro sobre el funcionamiento del CYP68L8.

## 5 Expresión en *A. nidulans* de otras enzimas esteroideas de interés comercial

A pesar de que la mayor parte de nuestros esfuerzos durante el desarrollo de este trabajo se han centrado en la identificación y caracterización de diferentes esteroide 11-hidroxilasas pertenecientes a especies fúngicas, la obtención comercial de esteroides es mucho más amplia y diversa y comprende un gran número de reacciones, tal y como se puede ver en la Fig. 9. Por ello, en este trabajo también se ha abordado el estudio de la expresión de los genes que codifican otras enzimas implicadas en la transformación de esteroides en diferentes microorganismos y que podrían emplearse para la obtención de otros esteroides con interés farmacéutico y comercial.

### 5.1 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa

Una de las enzimas de interés analizada ha sido la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa que se encarga de la transformación de AD en testosterona, permitiendo la obtención de esta hormona sexual. Esta enzima, además de otras muchas funciones, es capaz también de realizar la reacción inversa. En este trabajo, hemos estudiado la proteína procedente de dos hongos ya empleados anteriormente: la descrita en *A. nidulans* y la procedente de *C. lunatus*.

#### 5.1.1 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*

Para el estudio de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa procedente de *A. nidulans*, se procedió a la comparación de la secuencia del gen que codifica en *A. niger* esta enzima mediante la herramienta web NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Esta búsqueda nos permitió encontrar un gen candidato (AN6450) que guardaba el 52% de identidad con la de *A. niger*. Para su amplificación, se diseñaron oligonucleótidos específicos con cortes para *Nco*I y *Eco*RI (Tabla 8) y, posteriormente, se procedió a su clonación en el vector p1660 (ver apdo. 4.1.3. de Materiales y Métodos).

Después de secuenciar el plásmido resultante, se procedió a la transformación de la cepa control y de la cepa KO de *A. nidulans*. Las cepas transformantes fueron seleccionadas mediante crecimiento en medios específicos y se comprobaron mediante PCR y por secuenciación. Su expresión se verificó a nivel transcripcional a través de RT-PCR (ver apdo. 4.1.3. de Materiales y Métodos). Tras estos análisis nos quedamos con el transformante 17AN-2, derivado de la cepa control, y el transformante KO.17AN-2, que procedía de la cepa KO.

El estudio de la actividad enzimática del transformante 17AN-2 (incluido en la cepa control, que conservaba la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa intacta) en presencia de AD y testosterona mostró una transformación mayoritaria de esas moléculas en sus respectivos 11 $\alpha$ -hidroxi-derivados, tal y como se aprecia en la Fig. 67. No obstante, también se obtuvo una pequeña biotransformación en 11 $\alpha$ -hidroxi-testosterona, cuando se añadía AD (negro) como sustrato y, sobre todo, la formación de 11 $\alpha$ OHAD, a partir de testosterona (rojo) como precursor. Por lo tanto, podría decirse que la introducción de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa en la cepa control no permite determinar con exactitud la actividad de la enzima, debido a la formación de 11 $\alpha$ -hidroxi-derivados.

- En cepa control  $\rightarrow$  17AN-2 + AD, 72 h

17AN-2 + testosterona, 72 h

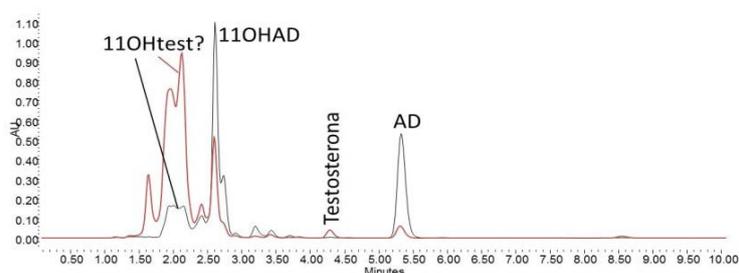


Fig. 67. Cromatograma correspondiente al análisis mediante HPLC de las muestras obtenidas de la fermentación realizada con la cepa transformante 17AN-2 en presencia de AD (negro) y de testosterona (rojo), tras 72 horas de incubación.

Por el contrario, el estudio de la actividad del gen introducido en la cepa KO posibilita, de manera mucho más clara, la determinación de la actividad de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa puesto que la actividad esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa no interfiere con los sustratos ni con los productos de la reacción. En la Fig. 68 se aprecia una transformación de testosterona en AD muy discreta mientras que no se observa transformación desde AD en testosterona en la cepa KO.17AN-2.

- En cepa KO  $\rightarrow$  KO.17AN-2+ AD, 72 h

KO.17AN-2+ testosterona, 72 h

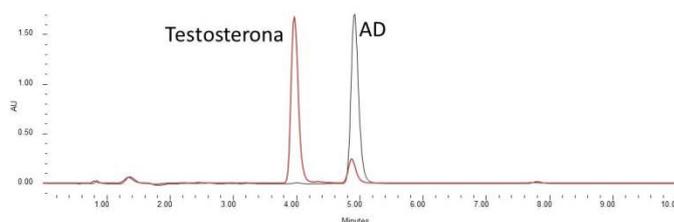


Fig. 68. Estudio de la actividad enzimática de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de *A. nidulans* en la cepa KO (KO.17AN-2) en presencia de AD (negro) y testosterona (rojo), después de 72 horas de incubación.

Esta escasa actividad biotransformante de AD en testosterona, nos hace plantearnos si realmente nuestro gen de elección en *A. nidulans*, AN6450, es el principal responsable de esta actividad ya que, pese a que la secuencia está identificada como tal en la base de datos, no existen estudios que lo confirmen.

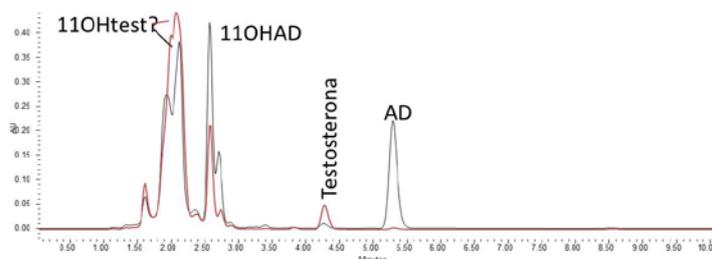
#### 5.1.2 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de *Cochliobolus lunatus*

En el caso de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa procedente de *C. lunatus*, el gen responsable se obtuvo a partir de una construcción cedida por el Prof. Dr. Julián Perera (Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, España).

Al igual que en el caso anterior, se procedió a la clonación de esta enzima en la cepa control y en la cepa KO de *A. nidulans*. Esta clonación se llevó a cabo utilizando el plásmido p1660 que posibilita la transformación dirigida en el marcador libre de *pyroA4*, siguiendo la estrategia habitual (ver apdo. 4.1.3 de Materiales y Métodos). Un clon sin mutaciones se seleccionó para ser empleado posteriormente en la transformación dirigida de la cepa control y de la cepa KO. Después de realizar las comprobaciones pertinentes (medio específico, PCR, secuenciación y RT-PCR), se estudió su actividad enzimática mediante fermentaciones realizadas en presencia de AD y de testosterona. Para estos experimentos, empleamos el transformante 17CL-1, (derivado de la cepa control) y el KO.17CL-1 (derivado de la cepa KO).

En la **Fig. 69** se muestran los cromatogramas obtenidos tras el análisis de las muestras obtenidas tras 72 horas de cultivo de la cepa 17CL-1 cultivada en presencia de AD (negro) y de testosterona (rojo). Partiendo de AD, observamos que se forma una importante cantidad de 11 $\alpha$ OHAD, y también una cantidad prácticamente equivalente de 11 $\alpha$ -hidroxi-testosterona. A pesar de ello, la transformación a los respectivos 11 $\alpha$ -hidroxi-derivados sigue entorpeciendo la detección de la actividad de la enzima objeto de estudio.

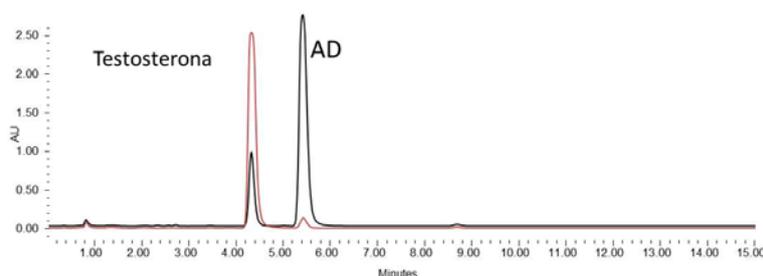
- En cepa control → **17CL-1 + AD, 72 h**  
**17CL-1 + testosterona, 72 h**



**Fig. 69.** Cromatograma procedente del análisis de las muestras obtenidas cuando la cepa 17CL-1 se cultivó en presencia de AD (negro) o de testosterona (rojo) (72 horas de crecimiento).

Por el contrario, respecto al análisis de la actividad enzimática de la cepa KO.17CL-1, resulta mucho más clarificador ya que en los respectivos cromatogramas solo aparecían la AD y la testosterona; de forma que la biotransformación es mucho más obvia. En este caso, en la **Fig. 70** se aprecia que partiendo de AD obteníamos una cantidad reseñable de testosterona, mientras que cuando era la testosterona la que actuaba como precursora, apenas se observaba AD resultante.

- En cepa KO → **KO.17CL-1+ AD, 72 h**  
**KO.17CL-1 + testosterona, 72 h**

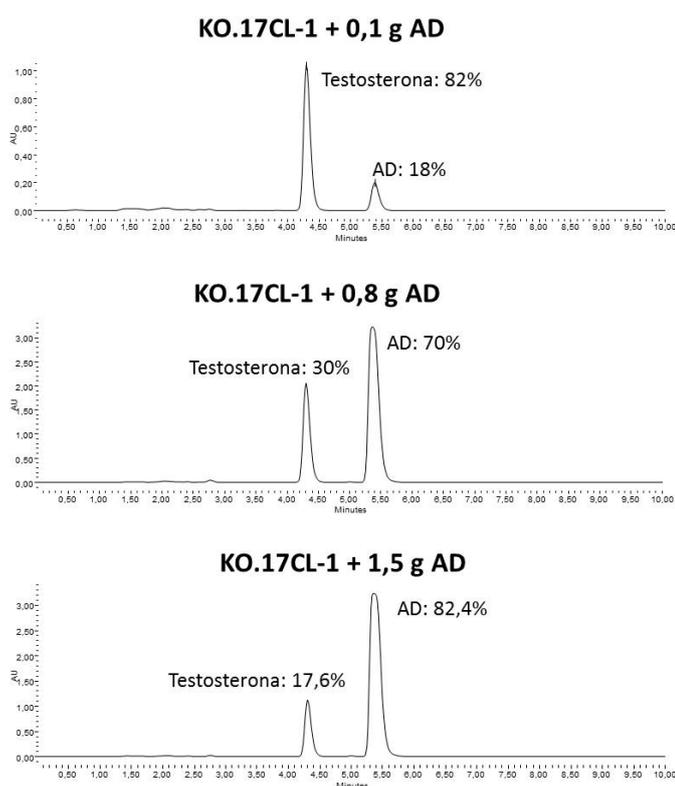


**Fig. 70.** Estudio de la actividad enzimática detectada en la cepa KO.17CL-1 mediante fermentaciones realizadas en presencia de AD (negro) y de testosterona (rojo) a las 72 horas de crecimiento.

La detección de esta actividad (bioconversión de AD en testosterona) se antoja interesante para la industria farmacéutica ya que la AD puede ser fácilmente biotransformada a partir de precursores baratos como los fitoesteroides, permitiendo obtener un esteroide de interés comercial (la testosterona) de forma sencilla, rápida y rentable. Por ello, intentamos optimizar la fermentación empleando un medio más enriquecido al que añadimos glucosa al 2%, como fuente de carbono, y *Corn Steep Liquor* al 3%, como fuente de nitrógeno. A esta fermentación le añadimos AD como esteroide a transformar usando las concentraciones de 1 g/L, 8 g/L y 15 g/L (volumen final de 100 ml). En la **Fig. 71** se recogen los cromatogramas obtenidos del análisis de la fermentación mediante HPLC tras 72 horas de incubación. En ella observamos que

cuando la cantidad de AD añadida inicialmente era baja (100 mg), la bioconversión era muy elevada (más del 80% de AD se transformaba en testosterona). Sin embargo, cuando las cantidades fueron mayores (800 mg y 1,5 g) esta bioconversión era mucho menor. Este efecto probablemente se deba a un efecto tóxico de la propia AD sobre el crecimiento o el metabolismo del hongo, lo que limitaría su capacidad de bioconversión.

Los buenos resultados de esta fermentación utilizando un medio enriquecido abren la puerta a la posibilidad de realizar una patente para salvaguardar el interés que esta cepa pudiera tener a nivel industrial.



**Fig. 71.** Cromatogramas obtenidos a partir del análisis por HPLC de las muestras de la fermentación realizada con la cepa KO.17CL-1 cultivada en presencia de AD, a distintas concentraciones, después de 72 horas de crecimiento y utilizando un medio enriquecido (glucosa 2%, *Corn Steep Liquor* 3%).

## 5.2 $3\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa

El estudio de otras enzimas con posible interés farmacéutico prosiguió con la de la enzima  $3\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa, responsable de la deshidrogenación de los carbonos 1 y 2 del núcleo CPHF presente en la AD. El resultado de esta reacción es la formación de androsta-1,4-diene-3,17-diona (en adelante, ADD). Esta enzima también cataliza la reacción inversa. Su estudio se llevó a cabo en *A. nidulans* a partir de los genes que la codifican en *Rhodococcus ruber* Chol-4 (gen denominado *kstD2*)

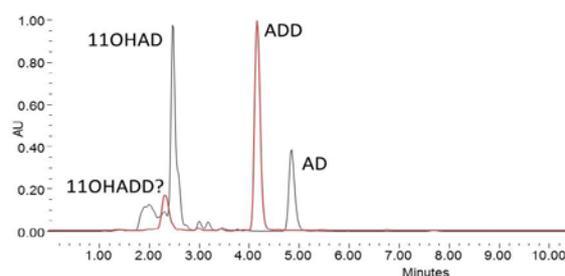
(Fernández de Las Heras *et al.*, 2009; Fernández de las Heras *et al.*, 2012) y en *Pseudomonas putida* DOC21, (codificada por el gen denominado *kstH*) (Merino *et al.*, 2013; Barrientos *et al.*, 2015). El interés de esta enzima radica en que la obtención de ADD posibilita la obtención de otros esteroides de interés comercial tales como prednisona y prednisolona, que son excelentes antiinflamatorios.

#### 5.2.1 3 $\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa de *R. ruber* Chol-4

El estudio de la proteína codificada en el gen *kstD2* procedente de *Rhodococcus ruber* Chol-4 se llevó a cabo mediante su introducción en las cepas control (*yA2*, *pyroA4*, *pantoB100*) y en la KO (*nkuA* $\Delta$ , *pyroA4*) de *A. nidulans*. La secuencia del gen fue amplificada a partir de un plásmido conteniendo el gen de interés, facilitado por Prof. Dr. José Luis García (CIB-CSIC, Madrid, España), partiendo de oligonucleótidos específicos (**Tabla 8**). El inserto amplificado fue digerido y ligado en el vector destino (p1660) y, posteriormente, usado para transformar *E. coli*. Tras su secuenciación, un clon sin mutaciones fue escogido para realizar la transformación fúngica tanto en la cepa control como en la cepa KO.

Como es habitual, las cepas transformantes fueron analizadas mediante crecimiento en medio específico (MM con ácido pantoténico para las resultantes de la transformación en la cepa control, y MM sin suplementar para los transformantes de la cepa KO). Asimismo, se realizó una PCR para aislar un fragmento del gen codificante de la proteína y el promotor y secuenciarlos a modo de comprobación. Su expresión a nivel transcripcional fue verificada mediante RT-PCR. Después de estas comprobaciones, se tomó el transformante Rhod-5, procedente de la cepa control, y el transformante KO.Rhod-2, derivado de la cepa KO, para proceder al estudio de su actividad enzimática mediante una fermentación. La fermentación fue realizada en presencia de AD y ADD. En la **Fig. 72** se muestran los cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC después de 72 horas de crecimiento de la cepa Rhod-5 cultivada en presencia de AD (negro) y de ADD (rojo). En ellos se aprecia la biotransformación del sustrato inicial en su correspondiente 11 $\alpha$ -hidroxi-derivado, tal y como cabía esperar ya que la actividad de 11 $\alpha$ -hidroxilasa propia de *A. nidulans* es mucho más elevada.

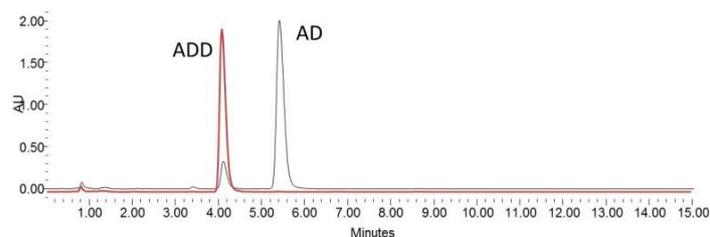
- En cepa control → Rhod-5 + AD, 72 h  
Rhod-5 + ADD, 72 h



**Fig. 72.** Cromatograma resultante del análisis por HPLC de la fermentación de la cepa Rhod-5 en presencia de AD como sustrato inicial (negro) y ADD (rojo), después de 72 h de crecimiento.

Por el contrario, en la **Fig. 73** se recoge el análisis de la fermentación realizada con la cepa KO.Rhod-2 tras 72 horas de crecimiento con AD (negro) y ADD (rojo). En esta cepa, al estar suprimida la actividad  $11\alpha$ -hidroxilasa, se observa una discreta biotransformación de AD en ADD, pero no de la reacción contraria (de ADD en AD).

- En cepa KO → KO.Rhod-2 + AD, 72 h  
KO.Rhod-2 + ADD, 72 h



**Fig. 73.** Cromatograma procedente del análisis por HPLC de la fermentación de la cepa KO.Rhod-2 cultivada en presencia de AD como sustrato (negro) y ADD (rojo), tras 72 h de crecimiento.

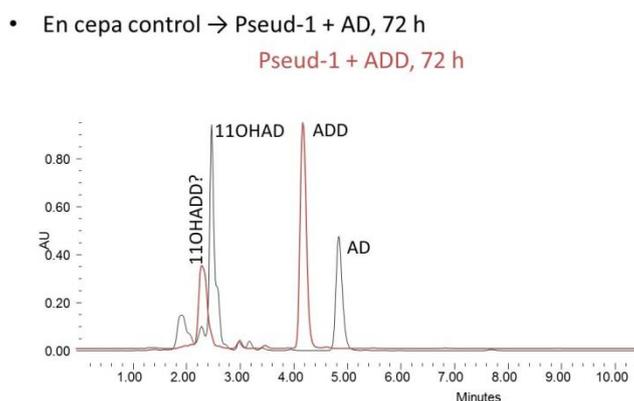
El análisis por HPLC de la fermentación realizada con la cepa KO.Rhod-2 en presencia de AD (**Fig. 73**, negro) muestra su bioconversión en ADD, constatando que, aunque de forma limitada, la enzima está funcionando *in vivo*. Es posible que el funcionamiento de la enzima pudiera mejorarse llevando a cabo optimizaciones a nivel genético, mejorando su expresión para *A. nidulans*, o bien usando un medio enriquecido para realizar las fermentaciones.

### 5.2.2 $3\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa de *P. putida* DOC21

De la misma manera, la  $3\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* DOC21 (codificada en esta cepa por el gen *kstH*) también se introdujo en la cepa control y en la cepa KO de *A. nidulans*.

Esta construcción se realizó siguiendo los mismos pasos indicados anteriormente aunque, en esta ocasión, se escogieron los cortes *Hind*III y *Eco*RI (**Tabla 8**) para clonar el DNA codificante en el vector p1660. El gen *kstH* fue obtenido de nuestro propio grupo de investigación. Una vez hecha la construcción, y tras haber sido secuenciada para descartar posibles mutaciones, se procedió a la transformación fúngica en la cepa control y de la cepa KO. Los transformantes obtenidos fueron sometidos a las correspondientes comprobaciones rutinarias que nos permitieron asegurar que contenían el inserto *kstH* de *P. putida* DOC21, de manera que tomamos el transformante Pseud-1, procedente de la transformación de la cepa control, y el KO.Pseud-2, de la cepa KO.

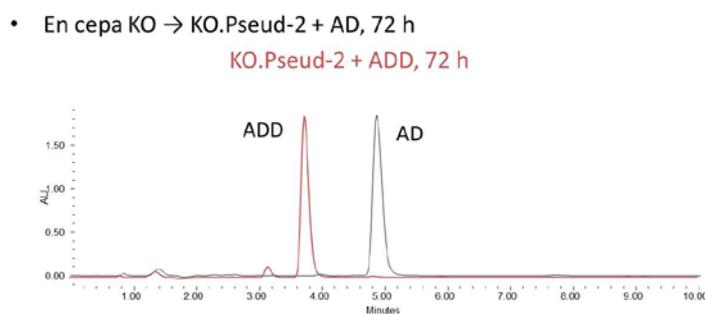
El estudio de su actividad enzimática se llevó a cabo mediante una fermentación que analizamos por HPLC. En la **Fig. 74** se muestran los cromatogramas obtenidos del análisis de la cepa Pseud-1 en presencia de AD (negro) y ADD (rojo), después de 72 horas de crecimiento. En la imagen se aprecia que, tal y como ocurría con los transformantes de la cepa Rhod-5, la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. nidulans* era mayor que la actividad que habíamos intentado expresar mediante la enzima 3 $\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa, por lo que tanto AD como ADD, se biotransformaban en sus 11-hidroxi-derivados.



**Fig. 74.** Cromatograma procedente del análisis por HPLC de las muestras procedentes de la fermentación de la cepa Pseud-1 en presencia de AD (negro) y ADD (rojo), después de 72 h de crecimiento.

Por otra parte, el análisis por HPLC de la fermentación de la cepa KO.Pseud-2, es decir, en la cepa sin actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa, se recoge en la **Fig. 75**, donde aparecen los cromatogramas obtenidos tras el análisis de esta cepa en presencia de AD (negro) y ADD (rojo) después de un crecimiento de 72 horas. En este caso, la formación de 11 $\alpha$ OHAD y 11 $\alpha$ OHADD desaparece, de manera que la potencial bioconversión de AD en ADD y viceversa se podría apreciar de forma más clara. Sin embargo, esta cepa no

fue capaz de transformar ni la AD en ADD ni al contrario en proporción que podamos observar por el análisis por HPLC.



**Fig. 75.** Cromatograma resultante del análisis de la fermentación de la cepa KO.Pseud-2 en presencia de AD como sustrato inicial (negro) y ADD (rojo), después de 72 h de crecimiento.

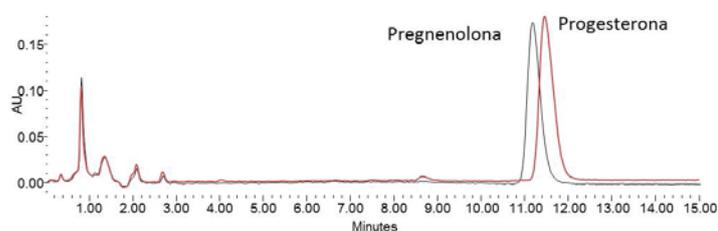
### 5.3 $3\beta$ -hidroxiesteroide- $\Delta 5$ -deshidrogenasa de *A. nidulans*

Finalmente, la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide- $\Delta 5$ -deshidrogenasa está implicada en la transformación de colesterol en AD, concretamente, en el paso intermedio que conduce a la formación de progesterona a partir de pregnenolona (**Fig. 43**). Esta enzima presenta la capacidad de oxidar el grupo hidroxilo de C3 a un grupo ceto y de modificar el doble enlace existente entre C5-C6, pasándolo al C4-C5. Esta enzima es capaz también de realizar la reacción inversa. En mamíferos, esta enzima ejerce su actividad después del CYP11A1, una vez que ya se ha eliminado la cadena C22 del colesterol. El estudio sobre esta enzima se va a centrar en torno a los posibles genes que codifican la función  $3\beta$ -hidroxiesteroide- $\Delta 5$ -deshidrogenasa en *A. nidulans* según la base de datos del NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1990). En ella hemos encontrado dos posibles genes que codifican esta actividad: el gen AN0765, que guarda un 26% de identidad con la enzima humana, y el gen AN7575, con un 28% de identidad.

Para la clonación del gen AN0765, se diseñaron oligonucleótidos específicos (**Tabla 8**) tras comprobar qué cortes de restricción estaban incluidos en el propio gen. La estrategia de clonación seguida está descrita en el apartado 4.1.3. de Materiales y Métodos. Una vez que obtuvimos esa construcción, se procedió a su transformación en la cepa KO de *A. nidulans* ya que será en esta cepa donde mejor se pueda ver la actividad de la  $3\beta$ -hidroxi- $\Delta 5$ -esteroide-deshidrogenasa sin que interfiera la actividad esteroide  $11\alpha$ -hidroxilasa. De esta transformación, obtuvimos cepas que, tras ser seleccionados y comprobados en un medio selectivo, fueron verificados mediante PCR y por secuenciación. Los transformantes obtenidos fueron denominados KO.AN0765-3, 4 y 5.

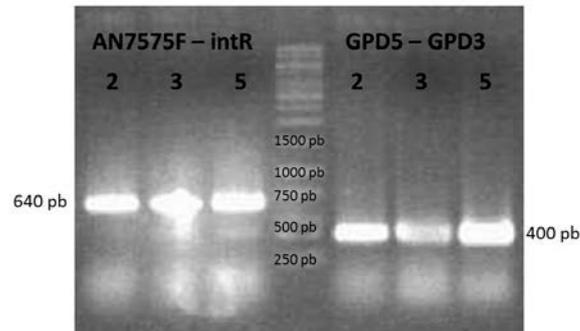
A continuación, se realizó un estudio sobre su expresión a nivel transcripcional, mediante RT-PCR, tal y como se recoge en el apartado 4.1.3. de Materiales y Métodos, observándose la correcta expresión del gen. La actividad *in vivo* fue analizada mediante una fermentación empleando como sustratos la pregnenolona y la progesterona. En la **Fig. 76** se muestran los cromatogramas obtenidos a partir del análisis por HPLC de las muestras de la fermentación realizada con la cepa KO.AN0765-3 tras 72 horas de cultivo. En ella, se aprecia que no existe actividad biotransformadora en la cepa KO.AN0765 ni cuando se parte de pregnenolona ni cuando el sustrato era la progesterona.

- En cepa KO → KO.AN0765-3 + pregnenolona  
KO.AN0765-3 + progesterona



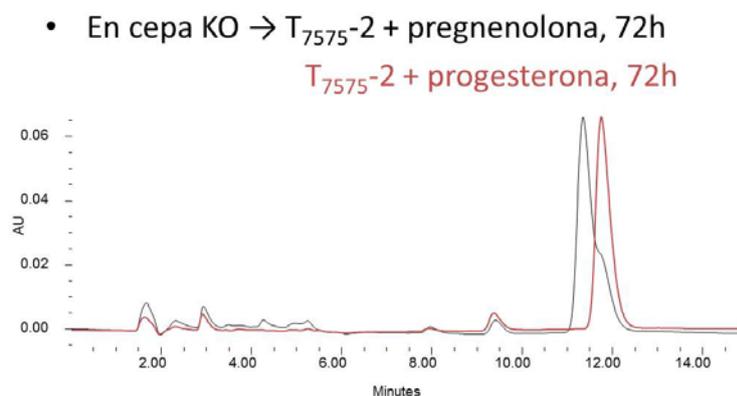
**Fig. 76.** Cromatograma resultante del análisis de las muestras de la fermentación realizada con la cepa KO.AN0765-3 cultivada en presencia de pregnenolona (negro) y progesterona (rojo) después de 72 horas de crecimiento.

Para el estudio de la actividad del gen AN7575, con un 28% de identidad con el gen responsable de la actividad 3 $\beta$ -hidroxi- $\Delta$ 5-esteroide-deshidrogenasa en humanos, se procedió de forma semejante al caso descrito anteriormente. Una vez habíamos transformado la cepa KO con la construcción conteniendo el gen AN7575, se procedió a su verificación por crecimiento en medios selectivos, por PCR y por secuenciación. Seleccionamos los transformantes KO.AN7575-2, 3 y 5 y su análisis de la expresión a nivel transcripcional (**Fig. 77**) se realizó amplificando un fragmento del cDNA de cada uno de los transformante (apdos. 2.6.1 y 2.7.1) correspondiente a los primeros 640 nucleótidos del gen AN7575, amplificado con los oligonucleótidos AN7575F y AN7575intR. Como control positivo, se realizó una PCR con los oligonucleótidos GPD5 y GPD3 que amplifican los primeros 400 nucleótidos del gen codificante para la enzima constitutiva gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GPD).



**Fig. 77.** Análisis de la expresión transcripcional del gen AN7575 en los transformantes KO.AN7575-2, 3 y 5, mediante una RT-PCR y cuyos productos de reacción fueron analizados en un gel de agarosa.

Tras comprobar que se producía expresión del RNA en los tres transformantes, se procedió a realizar el estudio de su actividad *in vivo* mediante fermentaciones en las que se empleaban como sustratos la pregnenolona y la progesterona. En la **Fig. 78**, podemos apreciar los resultados obtenidos en presencia de pregnenolona y progesterona a las 72 horas de crecimiento. Es importante recordar que la pregnenolona hay que detectarla a 210 nm (en lugar de 240 nm como el resto de esteroides) por lo que los cromatogramas expuestos a continuación se corresponden a esta longitud de onda (al igual que el cromatograma de la **Fig. 76**). En la imagen observamos que tanto pregnenolona como progesterona salen muy próximas y que cuando añadimos pregnenolona se forma un codo más adelante que pudiera corresponderse con la progesterona, aunque lo hace en una cantidad muy reducida. Por ello, de tratarse de progesterona, sería una actividad muy discreta.



**Fig. 78.** Cromatograma obtenido del análisis mediante HPLC de las muestras correspondientes a la fermentación realizada con la cepa T7575-2 cultivada en presencia de pregnenolona (negro) y progesterona (rojo) tras 72 horas de crecimiento.

Podemos plantear diferentes explicaciones para justificar la ausencia de actividad  $3\beta$ -hidroxiesteroide- $\Delta$ 5-deshidrogenasa. En primer lugar, podríamos sugerir que las identificaciones de la base de datos no eran correctas ya que éstas se basan

en predicciones y aproximaciones bioinformáticas sin haber sido comprobadas *in vivo* o *in vitro*. Por otro lado, pudiera ser que uno o los dos genes probados sí codifican la actividad pero que por ser muy pobre, no fuésemos capaces de detectarla. Además, cabe mencionar que en bacterias como *Mycobacterium smegmatis* la actividad de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide- $\Delta$ 5-deshidrogenasa se ejerce sobre el colesterol en lugar de sobre la pregnenolona (Uhía *et al.*, 2011), como sucede en humanos, por lo que, aunque esta enzima podría estar actuando, es posible que no fuésemos capaces de identificar su actividad. Para comprobarlo, se hizo una fermentación con cada una de las dos cepas escogidas (KO.AN0765-3 y KO.AN7575-2) en presencia de colesterol si bien es cierto que, en un análisis por HPLC, no fuimos capaces de detectar ninguna modificación significativa. Por tanto, por el momento desconocemos si los resultados descritos se deben a la ausencia de actividad también sobre el colesterol o por una incapacidad de nuestro método analítico de detectar el hipotético derivado del colesterol con un grupo ceto en posición C3 y la existencia de un el doble enlace entre los carbonos C4 y C5.

# CONCLUSIONES

---

---



## Conclusiones

1. El estudio de la actividad *in vivo* de las cepas silvestres de *Aspergillus nidulans*, *A. ochraceus*, *Rhizopus oryzae* y *Cochliobolus lunatus* ha demostrado que poseen una actividad esteroide 11-hidroxilasa capaz de actuar sobre AD, progesterona y testosterona y que, de todas ellas, la especie con mayor actividad es *Aspergillus ochraceus*.
2. La expresión de los citocromos humanos CYP11A1 y CYP17A1 y de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2, procedentes de *Mycobacterium smegmatis*, en *Aspergillus nidulans* no conduce a la biotransformación del colesterol o los fitoesteroles.
3. La técnica de la hibridación supresivo-substractiva ha posibilitado la identificación del único gen responsable de la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en *A. nidulans* que se codifica en un citocromo denominado CYP68L1.
4. Gracias a la identificación del CYP68L1 y a la secuenciación del genoma de *A. ochraceus*, se ha identificado el citocromo CYP68L8 como responsable de la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en esta especie. Esta actividad se ha demostrado mediante la expresión del gen que codifica al CYP68L8 en una cepa de *A. nidulans* carente de actividad 11-hidroxilasa (cepa KO).
5. El estudio del CYP68AQ1, procedente de *A. ochraceus*, y patentado como 11 $\alpha$ -hidroxilasa, ha revelado que la expresión del gen que codifica a ese citocromo en la cepa KO de *A. nidulans* no es capaz de restaurar ninguna actividad esteroide 11 $\alpha$ -hidroxilasa.
6. Se ha llevado a cabo el estudio de otros citocromos con actividad esteroide 11-hidroxilasa en la cepa KO de *A. nidulans* comprobando que es el CYP509C12, procedente de *Rhizopus oryzae*, el citocromo con una actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa más alta.
7. La expresión de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa procedente de *Cochliobolus lunatus* en la cepa KO de *A. nidulans* ha puesto de manifiesto la capacidad de esta enzima para convertir AD en testosterona.
8. La expresión de la 3 $\beta$ -cetoesteroide- $\Delta$ 1,2-deshidrogenasa procedente de *Rhodococcus ruber* en la cepa KO de *A. nidulans* confiere a esta cepa de la capacidad para transformar AD en ADD.



# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---



## Referencias bibliográficas

- Agematu, H., Matsumoto, N., Fujii, Y., Kabumoto, H., Doi, S., Machida, K., Ishikawa, J., and Arisawa, A. (2006). Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes P450 using the *Escherichia coli* expression system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 307–311.
- Agha, A., Liew, A., Finucane, F., Baker, L., O’Kelly, P., Tormey, W., and Thompson, C.J. (2004). Conventional glucocorticoid replacement overtreats adult hypopituitary patients with partial ACTH deficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 60, 688–693.
- Akihisa, T., Kokke, W. and Tamura T. (1991). Naturally occurring sterols and related compounds from plants. In *Physiology and Biochemistry of Sterols*, (Champaign, IL, USA: American Oil Chemists Society), pp. 172–228.
- Al-Awadi, S., Afzal, M., and Oommen, S. (2001). Studies on *Bacillus stearothermophilus*. Part 1. Transformation of progesterone to a new metabolite 9,10-seco-4-pregnene-3,9,20-trione. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78, 493–498.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- American Chemical Society, and Royal Society of Chemistry (1999). *Alexander Fleming Discovery and Development of Penicillin - Landmark - American Chemical Society* (London, UK).
- Arthan, D., Svasti, J., Kittakoop, P., Pittayakhachonwut, D., Tanticharoen, M., and Thebtaranonth, Y. (2002). Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. *Phytochemistry* 59, 459–463.
- Auchus, R.J., Lee, T.C., and Miller, W.L. (1998). Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J. Biol. Chem.* 273, 3158–3165.
- Bajguz, A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 45, 95–107.
- Balandrin, M.F. (1996). Commercial utilization of plant-derived saponins: an overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications. *Adv. Exp. Med. Biol.* 404, 1–14.
- Barnes, H.J., Arlotto, M.P., and Waterman, M.R. (1991). Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5597–5601.
- Barrientos, Á., Merino, E., Casabon, I., Rodríguez, J., Crowe, A.M., Holert, J., Philipp, B., Eltis, L.D., Olivera, E.R., and Luengo, J.M. (2015). Functional analyses of three acyl-CoA synthetases involved in bile acid degradation in *Pseudomonas putida* DOC21. *Environ. Microbiol.* 17, 47–63.
- de Bekker, C., Wiebenga, A., Aguilar, G., and Wösten, H.A.B. (2009). An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger*. *J. Microbiol. Methods* 76, 305–306.

- Bensasson, C.S., Hanson, J.R., and Le Huerou, Y. (1999). The microbiological hydroxylation of 3 alpha,5-cycloandrostanes by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 52, 1279–1282.
- Bhatti, H.N., and Khera, R.A. (2012). Biological transformations of steroidal compounds: a review. *Steroids* 77, 1267–1290.
- Bird, C.W., Lynch, J.M., Pirt, F.J., and Reid, W.W. (1971). Steroids and squalene in *Methylococcus capsulatus* grown on methane. *Nature* 230, 473–474.
- Björkhem, I., and Eggertsen, G. (2001). Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 97–103.
- Black, S.M., Harikrishna, J.A., Szklarz, G.D., and Miller, W.L. (1994). The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450<sub>sc</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7247–7251.
- Bloch, K. (1965). The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150, 19–28.
- Bloch, K.E. (1983). Sterol structure and membrane function. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 14, 47–92.
- Blumenthal, P.D., and Edelman, A. (2008). Hormonal contraception. *Obstet. Gynecol.* 112, 670–684.
- Bolten, S.L., Clayton, R.A., Easton, A.M., Engel, L.C., Messing, D.M., Ng, J.S., Reitz, B., Walker, M.C., and Wang, P.T. (2007). *Aspergillus ochraceus* 11 alpha hydroxylase and oxidoreductase.
- Boussel, P., Bonnemain, H., and Bové, F.J. (1983). History of pharmacy and pharmaceutical industry (Asklepios Press).
- Brakhage, A.A. (1997). Molecular regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus (Emericella) nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 148, 1–10.
- Bureik, M., Schiffler, B., Hiraoka, Y., Vogel, F., and Bernhardt, R. (2002). Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, etp1. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 2311–2321.
- Callewaert, F., Boonen, S., and Vanderschueren, D. (2010). Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21, 89–95.
- Callow, R.K. (1936). The absorption spectra of oestrone and related compounds in alkaline solution. *Biochem. J.* 30, 906–908.
- Capek, A., Hanc, O., and Tadra, M. (1963). Microbial transformations of steroids. XXI. Microbial preparation of 1,4-androstadiene derivatives. *Folia Microbiol. (Praha)* 8, 120–124.
- Capyk, J.K., Kalscheuer, R., Stewart, G.R., Liu, J., Kwon, H., Zhao, R., Okamoto, S., Jacobs, W.R., Eltis, L.D., and Mohn, W.W. (2009). Mycobacterial cytochrome P450 125 (cyp125) catalyzes the terminal hydroxylation of c27 steroids. *J. Biol. Chem.* 284, 35534–35542.

- Carballeira, J.D., Quezada, M.A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M.J., Alcantara, A.R., and Sinisterra, J.V. (2009). Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnol. Adv.* 27, 686–714.
- Celentano, D.D., Klassen, A.C., Weisman, C.S., and Rosenshein, N.B. (1987). The role of contraceptive use in cervical cancer: the Maryland Cervical Cancer Case-Control Study. *Am. J. Epidemiol.* 126, 592–604.
- Chung, S.-K., Ryoo, C.H., Yang, H.W., Shim, J.-Y., Kang, M.G., Lee, K.W., and Kang, H.I. (1998). Synthesis and bioactivities of steroid derivatives as antifungal agents. *Tetrahedron* 54, 15899–15914.
- Clouse, S.D., and Sasse, J.M. (1998). Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 427–451.
- Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., and Rosenthal, O. (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147, 400–402.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881–10890.
- Croft, S.L., Barrett, M.P., and Urbina, J.A. (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 21, 508–512.
- da Cunha, K.C., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Gené, J., Cano, J., Madrid, H., Hoog, S. de, Crous, P.W., and Guarro, J. (2013). In vitro antifungal susceptibility and molecular identity of 99 clinical isolates of the opportunistic fungal genus *Curvularia*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 168–174.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.F., and Siebert, P.D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303, 349–380.
- Dixon, H., Ginger, C.D., and Williamson, J. (1972). Trypanosome sterols and their metabolic origins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 41, 1–18.
- Donova, M.V., and Egorova, O.V. (2012). Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1423–1447.
- Driscoll, M.D., McLean, K.J., Levy, C., Mast, N., Pikuleva, I.A., Lafite, P., Rigby, S.E.J., Leys, D., and Munro, A.W. (2010). Structural and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CYP142: evidence for multiple cholesterol 27-hydroxylase activities in a human pathogen. *J. Biol. Chem.* 285, 38270–38282.
- Dumas, B., Cauet, G., Lacour, T., Degryse, E., Laruelle, L., Ledoux, C., Spagnoli, R., and Achstetter, T. (1996). 11 beta-hydroxylase activity in recombinant yeast mitochondria. In vivo conversion of 11-deoxycortisol to hydrocortisone. *Eur. J. Biochem.* 238, 495–504.
- Dumbacher, J.P., Wako, A., Derrickson, S.R., Samuelson, A., Spande, T.F., and Daly, J.W. (2004). Melyrid beetles (Choresine): a putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and toxic passerine birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15857–15860.

- Dumbacher, J.P., Deiner, K., Thompson, L., and Fleischer, R.C. (2008). Phylogeny of the avian genus *Pitohui* and the evolution of toxicity in birds. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**, 774–781.
- Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E., and Pompon, D. (1998). Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat. Biotechnol.* **16**, 186–189.
- Escobar, J.C., Patel, S.S., Beshay, V.E., Suzuki, T., and Carr, B.R. (2011). The human placenta expresses CYP17 and generates androgens de novo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1385–1392.
- Eser, D., Schüle, C., Baghai, T.C., Romeo, E., Uzunov, D.P., and Rupprecht, R. (2006). Neuroactive steroids and affective disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **84**, 656–666.
- Fernandes, P., and Cabral, J.M.S. (2007). Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresour. Technol.* **98**, 2335–2350.
- Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H., and Cabral, J.M. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 688–705.
- Fernández de Las Heras, L., García Fernández, E., María Navarro Llorens, J., Perera, J., and Drzyzga, O. (2009). Morphological, physiological, and molecular characterization of a newly isolated steroid-degrading actinomycete, identified as *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *Curr. Microbiol.* **59**, 548–553.
- Fernández de las Heras, L., van der Geize, R., Drzyzga, O., Perera, J., and María Navarro Llorens, J. (2012). Molecular characterization of three 3-ketosteroid- $\Delta(1)$ -dehydrogenase isoenzymes of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **132**, 271–281.
- Fernández-Cañón, J.M., and Peñalva, M.A. (1995). Fungal metabolic model for human type I hereditary tyrosinaemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9132–9136.
- Ferrer-Sevillano, F., and Fernández-Cañón, J.M. (2007). Novel phacB-encoded cytochrome P450 monooxygenase from *Aspergillus nidulans* with 3-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase and 3,4-dihydroxyphenylacetate 6-hydroxylase activities. *Eukaryot. Cell* **6**, 514–520.
- Fisher, C.W., Caudle, D.L., Martin-Wixtrom, C., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H., Waterman, M.R., and Estabrook, R.W. (1992). High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **6**, 759–764.
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226–236.
- Flück, C.E., Miller, W.L., and Auchus, R.J. (2003). The 17, 20-lyase activity of cytochrome P450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 3762–3766.

- Fragkaki, A.G., Angelis, Y.S., Koupparis, M., Tsantili-Kakoulidou, A., Kokotos, G., and Georgakopoulos, C. (2009). Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids* 74, 172–197.
- Franca, R., De Iudicibus, S., and Decorti G. (2011). Pharmacogenetics of Glucocorticoid Response. In *Glucocorticoids: Effects, Action Mechanisms, and Therapeutic Uses*, (Nova Science Publishers), pp. 1–33.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., and Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88, 587–605.
- Frank, D.J., Madrona, Y., and Ortiz de Montellano, P.R. (2014). Cholesterol ester oxidation by mycobacterial cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 289, 30417–30425.
- Frye, L.L., and Leonard, D.A. (1999). Lanosterol analogs: dual-action inhibitors of cholesterol biosynthesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34, 123–140.
- Fuh, M.-R., Huang, S.-Y., and Lin, T.-Y. (2004). Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion trap-mass spectrometer. *Talanta* 64, 408–414.
- Gabinskaia, K.N., Shpingis, A.A., and Ryzhkova, V.M. (1971). Effect of some cultivation conditions on the ability of mucor fungi *Tieghemella hyalospora* and *Rhizopus nigricans* to effect 11 alpha-hydroxylation of steroid molecules. *Mikrobiologiya* 40, 448–454.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., Baştürkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., et al. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438, 1105–1115.
- Garfinkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493–509.
- van der Geize, R., Hessels, G.I., van Gerwen, R., van der Meijden, P., and Dijkhuizen, L. (2001). Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Delta1-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 197–202.
- van der Geize, R., Hessels, G.I., van Gerwen, R., van der Meijden, P., and Dijkhuizen, L. (2002). Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9alpha-hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Mol. Microbiol.* 45, 1007–1018.
- van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M.H., Hara, H., Anderton, M.C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J.E., Mohn, W.W., et al. (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1947–1952.
- Ghosh, D., and Samanta, T.B. (1981). 11 alpha-Hydroxylation of progesterone by cell free preparation of *Aspergillus ochraceus* TS. *J. Steroid Biochem.* 14, 1063–1067.

- Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M., and Pangborn, W. (2009). Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457, 219–223.
- Ginter, E., and Simko, V. (2013). Update on medical management of dyslipidemia and atherosclerosis. *Bratisl. Lek. Listy* 114, 262–268.
- Griffin, D. H. (1994). *Fungal Physiology* (New York: Wiley-Liss).
- Grossman Barr, N. (2010). Managing adverse effects of hormonal contraceptives. *Am. Fam. Physician* 82, 1499–1506.
- Gryganskyi, A.P., Lee, S.C., Litvintseva, A.P., Smith, M.E., Bonito, G., Porter, T.M., Anishchenko, I.M., Heitman, J., and Vilgalys, R. (2010). Structure, function, and phylogeny of the mating locus in the *Rhizopus oryzae* complex. *PLoS One* 5, e15273.
- Halkerston, I.D., Eichhorn, J., and Hechter, O. (1961). A requirement for reduced triphosphopyridine nucleotide for cholesterol side-chain cleavage by mitochondrial fractions of bovine adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 236, 374–380.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., and Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 330–344.
- Hannich, J.T., Umebayashi, K., and Riezman, H. (2011). Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Hanson, J.R. (2005). Steroids: reactions and partial synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 22, 104–110.
- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 779–804.
- Hanukoglu, I., and Rapoport, R. (1995). Routes and regulation of NADPH production in steroidogenic mitochondria. *Endocr. Res.* 21, 231–241.
- Hanukoglu, I., Privalle, C.T., and Jefcoate, C.R. (1981). Mechanisms of ionic activation of adrenal mitochondrial cytochromes P-450<sub>scc</sub> and P-450<sub>11β</sub>. *J. Biol. Chem.* 256, 4329–4335.
- Hayami, M., Okabe, A., Sasai, K., Hayashi, H., and Kanemasa, Y. (1979). Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms. *J. Bacteriol.* 140, 859–863.
- Hogg, J.A. (1992). Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. *Steroids* 57, 593–616.
- Hu, S., Genain, G., and Azerad, R. (1995). Microbial transformation of steroids: contribution to 14 alpha-hydroxylations. *Steroids* 60, 337–352.
- Huang, S.H., Xu, S.W., and Fa, Y.H. (1989). 11 beta-hydroxylation of 16 alpha-methyl-Reichstein's compound S 21-acetate by *Curvularia lunata*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 29, 68–71.

- Hull, C.M., Warrilow, A.G.S., Rolley, N.J., Price, C.L., Donnison, I.S., Kelly, D.E., and Kelly, S.L. (2017). Co-production of 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and ethanol using recombinant yeast expressing fungal steroid hydroxylases. *Biotechnol. Biofuels* 10, 226.
- Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A., and Haskins, C.P. (1950). Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms. *Proc. Am. Philos. Soc.* 94, 152–170.
- Ichii, S., Kobayashi, S., and Matsuba, M. (1965). Effect of acth *in vivo* on the cholesterol side-chain cleaving enzyme and on steroid hormone precursor cholesterol in rat adrenal gland. *Steroids* 10, 663–676.
- Ingle, J.N., Kalari, K.R., Buzdar, A.U., Robson, M.E., Goetz, M.P., Desta, Z., Barman, P., Dudenkov, T.T., Northfelt, D.W., Perez, E.A., et al. (2015). Estrogens and their precursors in postmenopausal women with early breast cancer receiving anastrozole. *Steroids* 99, 32–38.
- Kang, Y., and Bashirullah, A. (2014). A steroid-controlled global switch in sensitivity to apoptosis during *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 386, 34–41.
- Khallil, A.M., and Mostafa, M.E. (1996). Microbiological transformation of progesterone by some zoosporic fungi. *J. Basic Microbiol.* 36, 255–259.
- Kitamura, H., Takahashi, A., Hotta, H., Kato, R., Kunishima, Y., Takei, F., Horita, H., Masumori, N., and Sapporo Medical University Urologic Oncology Consortium (2015). Palonosetron with aprepitant plus dexamethasone to prevent chemotherapy-induced nausea and vomiting during gemcitabine/cisplatin in urothelial cancer patients. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* 22, 911–914.
- Kołek, T., and Swizdor, A. (1998). Biotransformation XLV. Transformations of 4-ene-3-oxo steroids in *Fusarium culmorum* culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67, 63–69.
- Lee, C.Y., and Liu, W.H. (1992). Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using immobilized growing cells of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 adsorbed on solid carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 598–603.
- Lerner, T.L. (1994). Health care reform: impact on R&D and innovation in the biotechnology industry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 729, 128–131.
- Li, T., and Chiang, J.Y.L. (2012). Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases. *J. Lipids* 2012, 754067.
- Li, J.J., Johnson, D.S., Sliskovic, D.R., and Roth, B.D. (2004). *Contemporary Drug Synthesis* (John Wiley & Sons).
- Malaviya, A., and Gomes, J. (2008). Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresour. Technol.* 99, 6725–6737.
- Malerba, F., and Orsenigo, L. (2002). Innovation and market structure in the dynamics of the pharmaceutical industry and biotechnology: towards a history-friendly model. *Ind. Corp. Change* 11, 667–703.

- Mast, N., Annalora, A.J., Lodowski, D.T., Palczewski, K., Stout, C.D., and Pikuleva, I.A. (2011). Structural basis for three-step sequential catalysis by the cholesterol side chain cleavage enzyme CYP11A1. *J. Biol. Chem.* 286, 5607–5613.
- McLean, K.J., Lafite, P., Levy, C., Cheesman, M.R., Mast, N., Pikuleva, I.A., Leys, D., and Munro, A.W. (2009). The Structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: molecular basis for cholesterol binding in a P450 needed for host infection. *J. Biol. Chem.* 284, 35524–35533.
- McLean, K.J., Belcher, J., Driscoll, M.D., Fernandez, C.C., Le Van, D., Bui, S., Golovanova, M., and Munro, A.W. (2010). The *Mycobacterium tuberculosis* cytochromes P450: physiology, biochemistry & molecular intervention. *Future Med. Chem.* 2, 1339–1353.
- Merino, E., Barrientos, A., Rodríguez, J., Naharro, G., Luengo, J.M., and Olivera, E.R. (2013). Isolation of cholesterol- and deoxycholate-degrading bacteria from soil samples: evidence of a common pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 891–904.
- Merino García, E. (2015). Estudio de la ruta catabólica responsable de la degradación aeróbica del desoxicolato sódico y de otros compuestos esteroideos en *Pseudomonas putida* DOC21. Universidad de León
- Miller, E.M., and Nickoloff, J.A. (1995). *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 47, 105–113.
- Mingot, J.M., Peñalva, M.A., and Fernández-Cañón, J.M. (1999). Disruption of *phacA*, an *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction. *J. Biol. Chem.* 274, 14545–14550.
- Morris, N.R., Lai, M.H., and Oakley, C.E. (1979). Identification of a gene for alpha-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 16, 437–442.
- Munro, A.W., Girvan, H.M., Mason, A.E., Dunford, A.J., and McLean, K.J. (2013). What makes a P450 tick? *Trends Biochem. Sci.* 38, 140–150.
- Myers, J.B., and Meacham, R.B. (2003). Androgen replacement therapy in the aging male. *Rev. Urol.* 5, 216–226.
- Nakajin, S., Shively, J.E., Yuan, P.M., and Hall, P.F. (1981). Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 alpha-hydroxylase and c17,20-lyase) associated with one protein. *Biochemistry (Mosc.)* 20, 4037–4042.
- Naumann, J.M., Messinger, J., and Bureik, M. (2010). Human 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1)-dependent biotransformation with recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biotechnol.* 150, 161–170.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A., and Oakley, B.R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557–1566.
- Nebert, D.W. (1979). Multiple forms of inducible drug-metabolizing enzymes: a reasonable mechanism by which any organism can cope with adversity. *Mol. Cell. Biochem.* 27, 27–46.

- Nebert, D.W. (1990). Drug metabolism. Growth signal pathways. *Nature* 347, 709–710.
- Nelson, D.R. (2009). The cytochrome P450 homepage. *Hum. Genomics* 4, 59–65.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. (Freeman W. H.).
- Neuwirth, I. (1950). The production of acids from glucose by oral microorganisms: citric acid. *J. Dent. Res.* 29, 589–592.
- Ogawa, J., Kimura, T., Yoda, N., Yamamoto, Y., and Sakamoto, T. (2015). Novel steroid 11 $\beta$ -hydroxylase and method for producing 11 $\beta$ -hydroxysteroid using the same.
- Omura, T., and Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, 1375–1376.
- Orlov, S.N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S.V., Tremblay, J., and Hamet, P. (1999). Inversion of the intracellular Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J. Biol. Chem.* 274, 16545–16552.
- Ortega de los Ríos, L., Luengo, J.M., and Fernández-Cañón, J.M. (2017). Steroid 11-Alpha-Hydroxylation by the Fungi *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus ochraceus*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1645, 271–287.
- Parikh, A., Gillam, E.M., and Guengerich, F.P. (1997). Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450. *Nat. Biotechnol.* 15, 784–788.
- Paterson, G. K., H. Northen, D. B. Cone, C. Willers, S. E. Peters, y D. J. Maskell. (2009). Deletion of *TolA* in *Salmonella* Typhimurium Generates an Attenuated Strain with Vaccine Potential. *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 1): 220-28.
- Pérez, C., Falero, A., Hung, B.R., Tirado, S., and Balcinde, Y. (2005). Bioconversion of phytosterols to androstanes by mycobacteria growing on sugar cane mud. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 83–86.
- Petrič, S., Hakki, T., Bernhardt, R., Zigon, D., and Crešnar, B. (2010). Discovery of a steroid 11 $\alpha$ -hydroxylase from *Rhizopus oryzae* and its biotechnological application. *J. Biotechnol.* 150, 428–437.
- Pikuleva, I.A. (2006). Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 112, 761–773.
- Pikuleva, I.A., and Waterman, M.R. (2013). Cytochromes P450: roles in diseases. *J. Biol. Chem.* 288, 17091–17098.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D., and Bufton, A.W.J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141–238.
- Prescott, S.C., Dunn, C.G., and Reed, G. (1982). *Prescott & Dunn's industrial microbiology* (AVI Pub. Co.).
- Ramirez-Ortega, M., Maldonado-Lagunas, V., Melendez-Zajgla, J., Carrillo-Hernandez, J.F., Pastelín-Hernandez, G., Picazo-Picazo, O., and Ceballos-Reyes, G. (2006).

- Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by *in vitro* stimulation with digitalis. *Eur. J. Pharmacol.* 534, 71–76.
- Reddy, D.S. (2003). Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit. Rev. Neurobiol.* 15, 197–234.
- Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 353, 1711–1723.
- Rizner, T., Moeller, G., Thole, H.H., Zakelj-Mavric, M., and Adamski, J. (1999). A novel 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the fungus *Cochliobolus lunatus*: new insights into the evolution of steroid-hormone signalling. *Biochem. J.* 337 ( Pt 3), 425–431.
- Russell, D.W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 137–174.
- Ryan, K.J. (1959). Biological aromatization of steroids. *J. Biol. Chem.* 234, 268–272.
- Ryan, K.J., and Engel, L.L. (1957). Hydroxylation of steroids at carbon 21. *J. Biol. Chem.* 225, 103–114.
- Sakaki, T., Yamamoto, K., and Ikushiro, S. (2013). Possibility of application of cytochrome P450 to bioremediation of dioxins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 60, 65–70.
- Samson, M., Porter, N., Orekoya, O., Hebert, J.R., Adams, S.A., Bennett, C.L., and Steck, S.E. (2016). Progesterin and breast cancer risk: a systematic review. *Breast Cancer Res. Treat.* 155, 3–12.
- Schiffer, L., Anderko, S., Hobler, A., Hannemann, F., Kagawa, N., and Bernhardt, R. (2015). A recombinant CYP11B1 dependent *Escherichia coli* biocatalyst for selective cortisol production and optimization towards a preparative scale. *Microb. Cell Factories* 14, 25.
- Seifert, K.A. (2008). Compendium of Soil Fungi - by K.H. Domsch, W. Gams & T.-H. Anderson,. *Eur. J. Soil Sci.* 59, 1007–1007.
- Sheir-Neiss, G., Lai, M.H., and Morris, N.R. (1978). Identification of a gene for beta-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 15, 639–647.
- Shet, M.S., Fisher, C.W., and Estabrook, R.W. (1997). The function of recombinant cytochrome P450s in intact *Escherichia coli* cells: the 17  $\alpha$ -hydroxylation of progesterone and pregnenolone by P450c17. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 218–225.
- Shkumatov, V.M., Radyuk, V.G., Falertov, Y.V., Vinogradova, A.A., Luzikov, V.N., and Novikova, L.A. (2006). Expression of cytochrome P450<sub>scc</sub> in *Escherichia coli* cells: intracellular location and interaction with bacterial redox proteins. *Biochem. Biokhimiia* 71, 884–892.
- Shu, P., and Johnson, M.J. (1947). Effect of the Composition of the Sporulation Medium on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* in Submerged Culture. *J. Bacteriol.* 54, 161–167.

- Shuster, L.T., Rhodes, D.J., Gostout, B.S., Grossardt, B.R., and Rocca, W.A. (2010). Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas* 65, 161–166.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Sih, C.J., Tai, H.H., Tsong, Y.Y., Lee, S.S., and Coombe, R.G. (1968). Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIV. Pathway of cholesterol side-chain degradation. *Biochemistry (Mosc.)* 7, 808–818.
- Simpson, E.R., and Boyd, G.S. (1966). The cholesterol side-chain cleavage system of the adrenal cortex: a mixed-function oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 10–17.
- Sivin, I., Campodonico, I., Kiriwat, O., Holma, P., Diaz, S., Wan, L., Biswas, A., Viegas, O., el din Abdalla, K., Anant, M.P., et al. (1998). The performance of levonorgestrel rod and Norplant contraceptive implants: a 5 year randomized study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 13, 3371–3378.
- Smith, M., Zahnley, J., D, and Goff, D. (1993). Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* species in Tween 80 medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1425–1429.
- Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T., and Jacobs, W.R. (1990). Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4, 1911–1919.
- Soliman, A., De Sanctis, V., and Yassin, M. (2013). Vitamin d status in thalassemia major: an update. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 5, e2013057.
- Sorensen, P.W., Pinillos, M., and Scott, A.P. (2005). Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140, 164–175.
- Suzuki, K., Sanga, K., Chikaoka, Y., and Itagaki, E. (1993). Purification and properties of cytochrome P-450 (P-450<sub>1un</sub>) catalyzing steroid 11 beta-hydroxylation in *Curvularia lunata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1203, 215–223.
- Szcebara, Florence Ménard, Cathy Chandelier, Coralie Villeret, Amélie Masurel, Stéphane Bourot, Catherine Duport, Sophie Blanchard, et al. (2003). Total Biosynthesis of Hydrocortisone from a Simple Carbon Source in Yeast. *Nature Biotechnology* 21 (2): 143–49.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A., Oakley, B.R., and Oakley, B. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* 1, 3111–3120.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A., and Davies, R.W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26, 205–221.

- Trussell, P.C. (1950). The influence of zinc, iron, copper, and manganese on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *J. Bacteriol.* *59*, 217–227.
- Uhía, I., Galán, B., Morales, V., and García, J.L. (2011). Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. *Environ. Microbiol.* *13*, 943–959.
- Urlacher, V.B., and Eiben, S. (2006). Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* *24*, 324–330.
- Urlacher, V.B., and Girhard, M. (2012). Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* *30*, 26–36.
- Urlacher, V.B., Lutz-Wahl, S., and Schmid, R.D. (2004). Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *64*, 317–325.
- Vázquez-Mourelle, R., Carracedo-Martínez, E., Ces Gens, E., Cadórniga Valiño, L., Álvaro Esteban, P., and Pose Reino, J.M. (2015). Control measures for anabolic androgenic steroid medicines. *Gac. Sanit.* *29*, 304–307.
- Vincze, T., Posfai, J., and Roberts, R.J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3688–3691.
- Vinogradova, A.A., Luzikov, V.N., and Novikova, L.A. (2007). Comparative study of topogenesis of cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11A1) and its hybrids with adrenodoxin expressed in *Escherichia coli* cells. *Biochem. Biokhimiia* *72*, 208–214.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., and Higton, G. (2013). *Industrial Microbiology: An Introduction* (Wiley).
- Wang, F.-Q., Li, B., Wang, W., Zhang, C.-G., and Wei, D.-Z. (2007). Biotransformation of diosgenin to nuatigenin-type steroid by a newly isolated strain, *Streptomyces virginiae* IBL-14. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *77*, 771–777.
- Wang, DZ Wei, and K Yao (2011). *From Soybean Phytosterols to Steroid Hormones*. (InTech - Open Access Publisher).
- Ward, O.P., Qin, W.M., Dhanjoon, J., Ye, J., and Singh, A. (2006). Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.* *58*, 1–75.
- Watanabe, K., and Hamamura, N. (2003). Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Curr. Opin. Biotechnol.* *14*, 289–295.
- Wollam, J., and Antebi, A. (2011). Sterol regulation of metabolism, homeostasis, and development. *Annu. Rev. Biochem.* *80*, 885–916.
- Wortman, J.R., Gilsenan, J.M., Joardar, V., Deegan, J., Clutterbuck, J., Andersen, M.R., Archer, D., Bencina, M., Braus, G., Coutinho, P., et al. (2009). The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal Genet. Biol.* *46 Suppl 1*, S2-13.
- Wozniak, K., Kolacinska, A., Blasinska-Morawiec, M., Morawiec-Bajda, A., Morawiec, Z., Zadrozny, M., and Blasiak, J. (2007). The DNA-damaging potential of tamoxifen in breast cancer and normal cells. *Arch. Toxicol.* *81*, 519–527.

Xu, D., and Lin, S.-X. (2016). Mimicking postmenopausal steroid metabolism in breast cancer cell culture: Differences in response to DHEA or other steroids as hormone sources. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **161**, 92–100.

Yelton, M.M., Hamer, J.E., and Timberlake, W.E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1470–1474.

Yoshimitsu, H., Nishida, M., and Nohara, T. (2000). Cholestane glycosides from *Solanum abutiloides*. III. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **48**, 556–558.

Zhao, J., Shan, T., Mou, Y., and Zhou, L. (2011). Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini Rev. Med. Chem.* **11**, 159–168.

Zhou, W., Cross, G.A.M., and Nes, W.D. (2007). Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*. *J. Lipid Res.* **48**, 665–673.

Zohri, A.A. (2000). Progesterone transformation as a biochemical aid in classification of the genus *Emericella*. *Folia Microbiol. (Praha)* **45**, 391–396.

(1989). IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. *Eur. J. Biochem.* **186**, 429–458.