



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

---

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Biología Molecular  
Área de Bioquímica y Biología Molecular

**Estudio genético, bioquímico y  
biotecnológico de la ruta de degradación de  
compuestos esteroídicos en la cepa  
*Pseudomonas putida* DOC21**

**Álvaro Barrientos Castañeda  
León, 2017**





universidad  
de león

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Dr. José María Luengo Rodríguez como Director y el Dr. Elías Rodríguez Olivera como codirector de la Tesis Doctoral titulada “ **Estudio genético, bioquímico y biotecnológico de la ruta de degradación de compuestos esteroídicos en la cepa *Pseudomonas putida* DOC21**” realizada por **D. Álvaro Barrientos Castañeda** en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a    de julio de 2017.

Fdo.: José María Luengo Rodríguez

Fdo.: Elías Rodríguez Olivera







universidad  
de león

## ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El órgano responsable del programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología en su reunión celebrada el día      de julio de 2017 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “ **Estudio genético, bioquímico y biotecnológico de la ruta de degradación de compuestos esteroídicos en la cepa *Pseudomonas putida* DOC21**”, dirigida por los doctores José María Luengo Rodríguez y el Elías Rodríguez Olivera, y elaborada por D. Álvaro Barrientos Castañeda, y cuyo título en inglés es el siguiente “**Genetic, biochemical and biotechnologic study of the catabolic pathway of steroidic compounds in *Pseudomonas putida* DOC21 strain**”.

Lo que firmo, en León a      de julio de 2017.

El Secretario,

Vº Bº

El Director del Departamento/  
Presidente de la Comisión Académica,









# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Esteroides. definición y breve reseña histórica .....</b>	<b>18</b>
1.1.1 funciones de los esteroides en mamíferos .....	19
1.1.1.1 Función estructural .....	20
1.1.1.2 Función hormonal .....	21
1.1.1.2.1 Mineralocorticoides .....	22
1.1.1.2.2 Glucocorticoides .....	22
1.1.1.2.3 Hormonas sexuales .....	23
1.1.1.3 Mediadores de la absorción lipídica.....	23
1.1.1.4 Función vitamínica .....	24
1.1.2 Biosíntesis de los esteroides en mamíferos.....	25
1.1.3 Esteroides con funciones especiales en otros grupos animales.....	27
1.1.4 Esteroides en vegetales y hongos.....	29
1.1.4.1 Fitosteroles.....	29
1.1.4.2 Metabolitos secundarios vegetales.....	30
1.1.4.2.1 Brasinosteroides .....	30
1.1.4.2.2 Glicósidos esteroideos .....	32
1.1.1.2.3 Alcaloides esteroídicos .....	37
1.1.5 Esteroides en organismos unicelulares .....	38
<b>1.2 Los ácidos biliares.....</b>	<b>39</b>
1.2.1 Síntesis .....	39
1.2.2 Funciones.....	43
<b>1.3 Los esteroides como compuestos contaminantes .....</b>	<b>45</b>
<b>1.4 Degradación bacteriana de esteroides.....</b>	<b>50</b>
1.4.1 Degradación bacteriana de ácidos biliares.....	53
1.1.4.1 Metabolismo anaerobio .....	53
1.1.4.2 Metabolismo aerobio .....	54
<b>1.5 Etapas metabólicas responsables de la degradación de ácidos biliares .....</b>	<b>55</b>
1.5.1 Oxidación del anillo A .....	56

1.5.2	Eliminación de la cadena lateral unida a C17 .....	58
1.5.3	Apertura de la estructura anular .....	61
1.5.4	Mecanismos moleculares alternativos .....	64
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>Microorganismos utilizados .....</b>	<b>72</b>
3.1.1	ESPECIES BACTERIANAS PERTENECIENTES AL GÉNERO .....	72
3.1.1.1	<i>Pseudomonas putida</i> DOC21 .....	72
3.1.1.1.1	Características morfológicas.....	72
3.1.1.1.2	Características fisiológicas.....	73
3.1.1.1.3	Condiciones de crecimiento .....	74
3.1.1.1.4	Asimilación de fuentes de carbono de naturaleza no esteroídica.....	75
3.1.1.2	<i>Pseudomonas putida</i> U .....	76
3.1.1.3	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 .....	77
3.1.1.4	<i>Pseudomonas putida</i> F1 .....	77
3.1.2	ESTIRPES BACTERIANAS PERTENECIENTES A LA ESPECIE.....	78
3.1.2.1	<i>Escherichia coli</i> DH10B .....	78
3.1.2.2	<i>Escherichia coli</i> HB101.....	79
<b>3.2</b>	<b>VECTORES utilizados.....</b>	<b>79</b>
3.2.1	pUC18 y pUC19 .....	79
3.2.2	pGS9 .....	80
3.2.3	pRK600 .....	80
3.2.4	pGEM <sup>®</sup> -T EASY .....	80
3.2.5	pTZ57R/T .....	81
3.2.6	pJQ200 (KS/SK).....	82
3.2.7	pBBR mcs-3.....	82
<b>3.3</b>	<b>reactivos químicos .....</b>	<b>83</b>
<b>3.4</b>	<b>Medios de cultivo.....</b>	<b>85</b>
3.4.1	Medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972). .....	85
3.4.2	Medios King (King <i>et al.</i> , 1954).....	85
3.4.3	Medio Trypticasein Soy Broth (TSB).....	86
3.4.4	Medio Trypticasein Soy Agar (TSA) (Sambrook, <i>et al.</i> , 1989). .....	87
3.4.5	Medio $\Phi$ . .....	87
3.4.6	Medio mínimo (MM) de.....	88

3.4.7 Medio mínimo Chol1.....	88
3.4.8 Preparación de compuestos esteroideos para ser utilizados en cultivos o como fuente de carbono.....	89
<b>3.5 ADITIVOS SUPLEMENTADOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO.....</b>	<b>90</b>
<b>3.6 MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.....</b>	<b>92</b>
<b>3.7 MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS Y/O TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ADN.....</b>	<b>93</b>
3.7.1 Determinación de la concentración y pureza del ADN.....	93
3.7.2 Digestión y modificación del ADN.....	94
3.7.2.1 Protocolo general para la digestión del ADN con enzimas de restricción.....	94
3.7.2.2 Protocolo general de reacción de las enzimas de modificación del ADN usadas con mayor frecuencia.....	95
3.7.2.2.1 Desforforilación del ADN.....	95
3.7.2.2.2 Ligación de fragmentos de ADN.....	95
3.7.3 Análisis de las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.....	96
3.7.3.1 Preparación de las muestras.....	97
3.7.3.2. Preparación de los geles.....	97
3.7.3.3. Desarrollo de la electroforesis.....	97
3.7.4. Aislamiento de ADN genómico de.....	98
3.7.5. Aislamiento de ADN plasmídico de.....	100
3.7.6. Recuperación del ADN desde los geles de agarosa.....	101
<b>3.8 TRANSFORMACIÓN DE.....</b>	<b>102</b>
<b>3.8.1. Obtención de células competentes de.....</b>	<b>102</b>
3.8.2 Procedimiento de transformación por choque térmico.....	103
<b>3.9 Técnica de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....</b>	<b>104</b>
<b>3.10 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE ADN.....</b>	<b>106</b>
<b>3.11 OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE.....</b>	<b>107</b>
3.11.1 Mutagénesis con el transposón Tn5 (Norrander <i>et al.</i> , 1983).....	107
3.11.1.1. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el ADN genómico.....	110
3.11.1.2. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el ADN genómico mediante la estrategia de “recombinación en el brazo del Tn5”.....	112
3.11.1.3 Secuenciación de las zonas adyacentes a un fragmento de secuencia conocida.....	117
3.11.2 Obtención de mutantes mediante delección.....	119
3.11.3 Expresión de genes en <i>trans</i> .....	122



<b>3.12 ANÁLISIS DE LOS CALDOS DE CULTIVO MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.</b>	<b>123</b>
.....	
3.12.1 Cromatografía en capa fina.....	123
3.12.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). .....	123
3.12.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). .....	124
<b>3.13 ENSAYOS ENZIMÁTICOS CON DIFERENTES EXTRACTOS CELULARES. ....</b>	<b>125</b>
3.13.1 Preparación de los extractos celulares .....	126
3.13.2 Ensayos enzimáticos de esterificación con CoA.....	128
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>132</b>
4.1.1 Caracterización metabólica.....	133
4.1.2 Caracterización genómica .....	136
<b>4.2.....</b>	<b>141</b>
4.2.1 Clasificación de los distintos tipos de mutante.....	142
4.2.1.1 Mutantes de la ruta alta.....	143
4.2.1.2 Mutantes de la ruta baja .....	143
4.2.1.3 Mutantes del metabolismo central.....	144
4.2.2 Etapas iniciales en la degradación de ácidos biliares en.....	145
4.2.2.1 Transformaciones en posición 3 del anillo A. Participación de una 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. ....	146
4.2.2.2 Mecanismo de eliminación de la cadena lateral .....	149
4.2.2.2.1 Obtención y caracterización de los mutantes de delección en los genes <i>std1</i> , <i>std2</i> y <i>std3</i> .....	151
4.2.2.2.2 Aislamiento e identificación de los intermediarios metabólicos acumulados por los mutantes <i>P. putida</i> $\Delta$ <i>stdA1</i> y <i>P. putida</i> $\Delta$ <i>stdA2</i> . ....	154
4.2.2.2.3 Ensayos de complementación génica y metabólica de los mutantes de delección.....	157
4.2.2.2.4 Ensayos enzimáticos con las enzimas StdA1 y StdA2 .....	159
4.2.2.2.5 Funcionalización de la cadena alifática de los esteroides. Catabolismo de esteroides .....	172
4.2.3 Transformaciones enzimáticas en el anillo A.....	178
4.2.3.1 Deshidrogenación dentro del anillo A.....	178
4.2.3.2 Hidroxilación en posición 9 del anillo B.....	194
4.2.4 StdA3. Función metabólica de la tercera coA ligasa implicada en el catabolismo de compuestos esteroideos .....	198
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>212</b>







## **1. INTRODUCCIÓN**

# Introducción

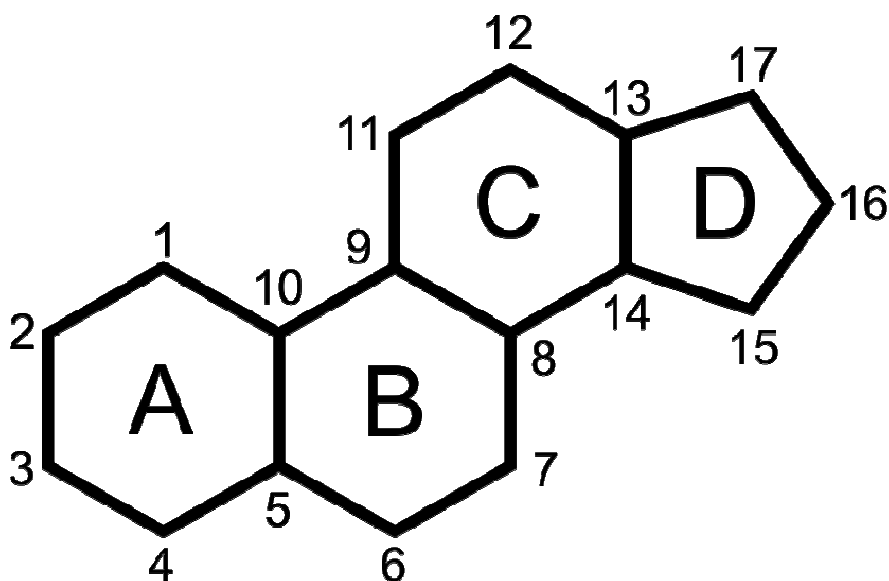
---

## 1.1 ESTEROIDES. DEFINICIÓN Y BREVE RESEÑA HISTÓRICA

Se define como esteroide aquella molécula derivada del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno, también denominado esterano o gonano. Esta molécula presenta 17 átomos de carbono dispuestos en una estructura tetraanular consistente en tres ciclohexanos unidos en un núcleo de fenantreno con un ciclopentano adherido (Fig. 1).

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

Todas estas moléculas tienen en común la estructura hidrocarbonada de cuatro anillos fusionados, nombrados con las letras A, B, C y D (Fig. 1). A partir de esta estructura común, el resto de moléculas esteroídicas se generan por adición de grupos funcionales, principalmente hidroxilos, alquilos y metilos a diferentes átomos de la estructura y la aparición de alguna insaturación, especialmente en los anillos A y B. Esta posibilidad de presentar sustituyentes, heteroátomos, ciclos adicionales o insaturaciones entre diferentes átomos de carbono del esqueleto, permite una enorme plasticidad para este tipo de compuestos, de manera que en la naturaleza se cuentan por cientos el número de moléculas clasificadas como esteroides (IUPAC-IUB, 1989).



**Figura 1.** Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno

### 1.1.1 FUNCIONES DE LOS ESTEROIDES EN MAMÍFEROS

Los esteroides constituyen uno de los grupos de compuestos químicos de mayor relevancia biológica y más ampliamente distribuidos dentro de los diferentes reinos de seres vivos.

Las moléculas de naturaleza esteroídica cumplen diversas funciones en la célula eucariota animal. Es en este tipo de célula donde los esteroides se encuentran más abundantemente representados y en el que juegan un papel fisiológico más importante.

El ser humano es la especie donde más se han estudiado las funciones de este grupo de moléculas y, consecuentemente, es en el que se han realizado mayor número de publicaciones respecto de la estructura y los procesos en los que se encuentran implicados los distintos tipos de esteroides que se hallan dentro del organismo.

# Introducción

---

Así pues, los esteroides en los seres humanos cumplen distintas funciones:

## 1.1.1.1 Función estructural

Actúan como componentes integrantes de la bicapa lipídica, aportando rigidez a la estructura de la membrana celular.

La molécula esteroídica que desempeña esta función en las células animales es el colesterol (Fig. 2). Este compuesto, de naturaleza altamente hidrofóbica, se intercala en el seno de la fracción lipídica de los fosfolípidos que integran la bicapa lipídica celular, dotándola de mayor estabilidad y aportando una rigidez que permite el desarrollo de los múltiples procesos en los que están implicadas las estructuras membranosas (Bloch, 1965; Bloch, 1983).

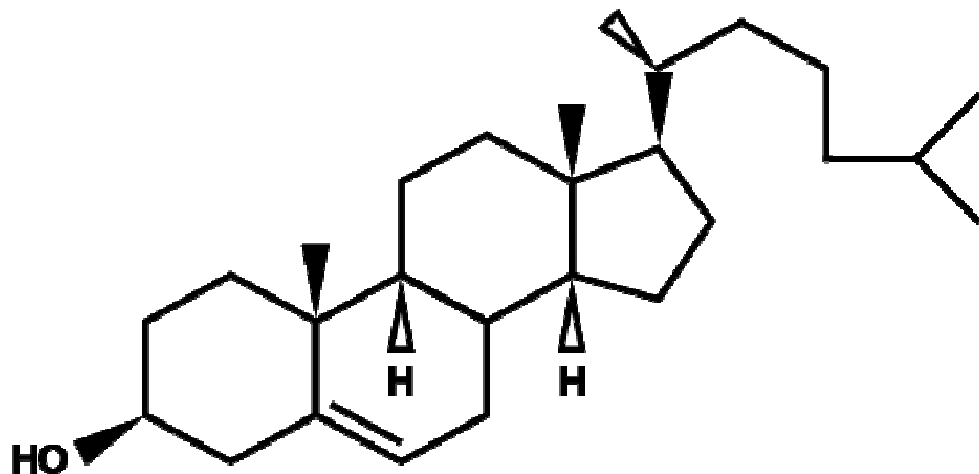


Figura 2. Estructura de la molécula de colesterol.

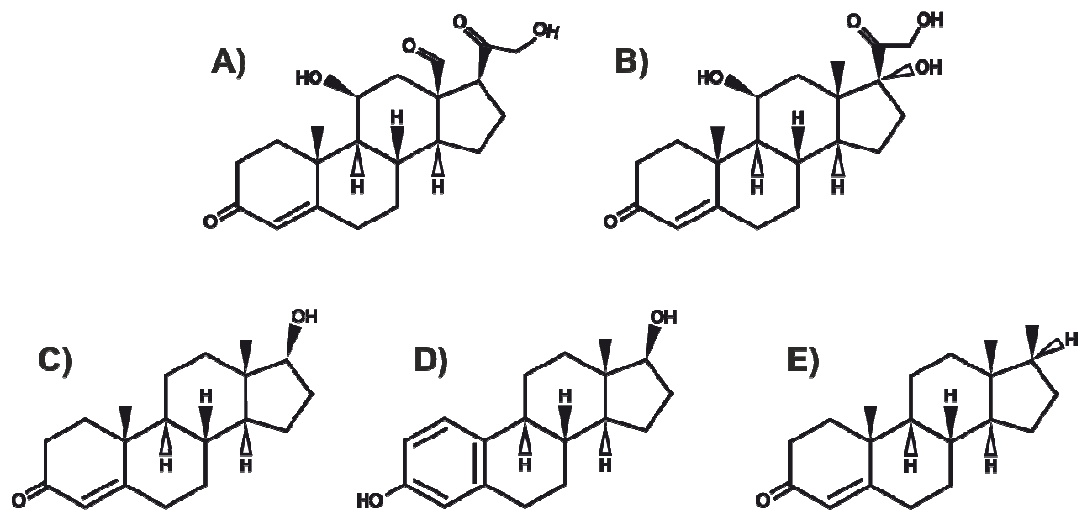


# Introducción

## 1.1.1.2 Función hormonal

Existen diferentes categorías de moléculas esteroideas que cumplen una función hormonal, jugando un papel fundamental en la regulación de procesos tan diversos y complejos como el equilibrio osmótico o el desarrollo de los caracteres sexuales.

Dentro de los grupos de esteroides con función hormonal, existen diferentes clases; entre estas se encuentran: a) los corticosteroides (que se subdividen en mineralocorticoides, como la aldosterona y glucocorticoides como la corticosterona) y b) las hormonas sexuales (que se subdividen en andrógenos, como la testosterona; estrógenos, como el estradiol y progestágenos, como la progesterona).



**Figura 3.** Estructura de las principales moléculas esteroídicas con función hormonal.

A) Aldosterona; B) cortisol; C) testosterona; D) estradiol y E) progesterona.

# Introducción

---

## 1.1.1.2.1 Mineralocorticoides

Cumplen una importante función en los procesos de equilibrio electrolítico al favorecer la recaptación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y la eliminación de iones  $\text{K}^+$  a nivel de los túbulos renales, con la consecuente reabsorción de agua. De este modo se modula la proporción de cationes en la luz del sistema excretor y se controla el volumen y composición de la orina. Importantes afecciones metabólicas como la enfermedad de Addison y la enfermedad de Cushing tienen su origen en una síntesis anormal de estas moléculas (Prieto, 1992).

Un ejemplo de mineralocorticoide es la aldosterona (Fig. 3).

## 1.1.1.2.2 Glucocorticoides

Este grupo de compuestos actúan como moduladores en la regulación del metabolismo.

Su principal papel fisiológico en mamíferos es la regulación de la biosíntesis y del catabolismo de carbohidratos, estimulando la gluconeogénesis y disminuyendo la utilización de glucosa. Además, estimulan la degradación de proteínas (salvo en hepatocitos) y lípidos, actuando como promotores de la movilización de ácidos grasos hacia el tejido muscular. Este grupo de compuestos interviene además en los procesos inmunes e inflamatorios, constituyendo de este modo uno de los más importantes reguladores metabólicos (Prieto, 1992).

Un ejemplo de glucocorticoide es el cortisol (Fig. 3).

# Introducción

---

## 1.1.1.2.3 Hormonas sexuales

Se dividen en tres grupos principales. El primero incluye a los denominados esteroides androgénicos, cuya principal función es la de estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos y la síntesis de tejido muscular. El segundo agrupa a las hormonas estrogénicas, que estimulan el desarrollo de los caracteres sexuales femeninos y regulan, junto con los integrantes del tercer grupo, los progestágenos, el ciclo menstrual y el desarrollo del embarazo.

Ejemplos de cada uno de los grupos de hormonas sexuales son la testosterona, el estradiol y la progesterona, respectivamente (Fig. 3).

## 1.1.1.3 Mediadores de la absorción lipídica

Algunos de los compuestos esteroídicos actúan en el tracto intestinal facilitando la absorción de las grasas de la dieta, como es el caso de los ácidos biliares. Estas moléculas se acumulan en la bilis y se vierten al intestino, donde actúan como detergentes lipídicos en el intestino delgado, permitiendo la emulsión de los lípidos y su absorción por parte de los enterocitos.

Ejemplo de ácido biliar es el ácido cólico (Fig. 4).

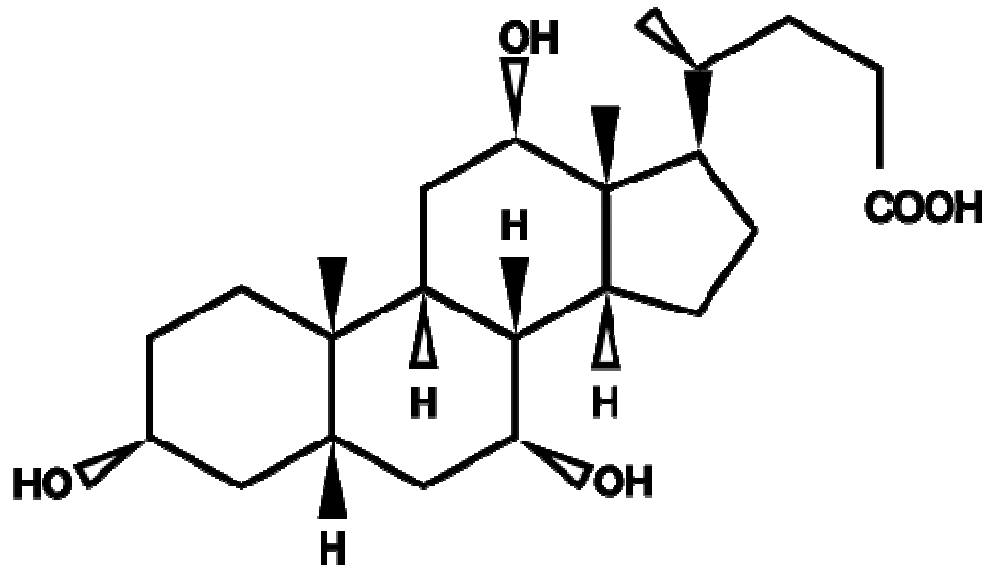
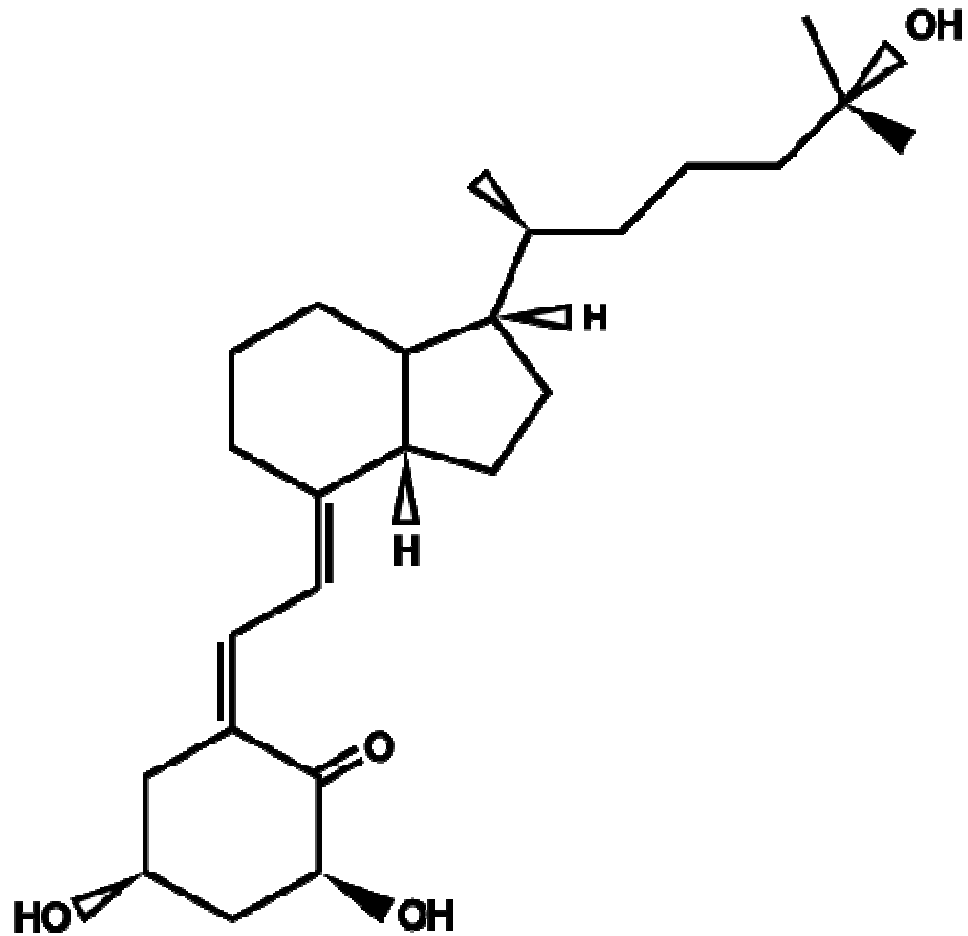


Figura 4. Estructura del ácido cólico.

#### 1.1.1.4 Función vitamínica

La vitamina D es un derivado esteroídico con función muy particular. La forma activa de la vitamina D<sub>3</sub>, el calcitriol (Fig. 5), estimula la recaptación de Ca<sup>2+</sup> en el riñón e inhibe la formación de osteoclastos. De esta manera, actúa junto a la paratohormona favoreciendo la mineralización ósea y regulando el normal crecimiento de los huesos (Arilla, 1992).



**Figura 5.** Estructura del colecalcitriol, forma activa de la vitamina D.

### 1.1.2 BIOSÍNTESIS DE LOS ESTEROIDES EN MAMÍFEROS

Toda la familia de lípidos conocida como esteroides tiene un precursor biosintético común en el colesterol, que puede tener su origen en la dieta o sintetizarse endógenamente a partir del acetato mediante la ruta del geranil-fosfato. Partiendo del colesterol se sintetizan el resto de moléculas esteroídicas (Fig. 6).

Las hormonas se sintetizan a partir de la pregnenolona, la primera molécula con actividad hormonal que se genera a partir de colesterol. Tomando como

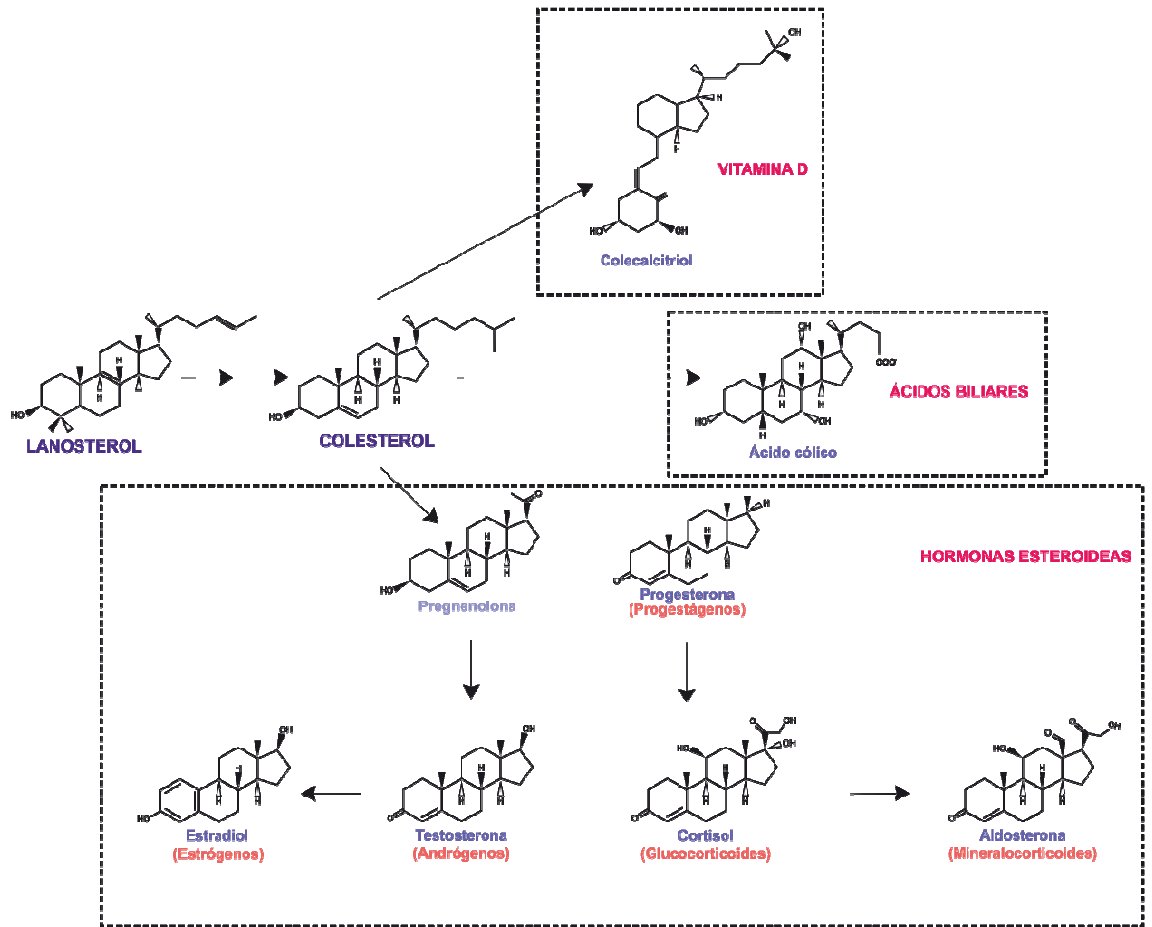
## Introducción

---

molécula de partida la pregnenolona, se originan el resto de hormonas pertenecientes a la familia de los esteroides:

- Corticosteroides
  - Glucocorticoides: Cortisol y corticosterona
  - Mineralocorticoides: Aldosterona
- Hormonas sexuales
  - Andrógenos: Testosterona y su forma activa, dihidrotestosterona
  - Estrógenos:  $\beta$ -estradiol y estrona
  - Progestágenos: Progesterona
- La vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol se genera por acción de la luz solar sobre el  $\Delta^{5,7}$ -colesterol. Un proceso equivalente ocurre con el ergosterol, procedente de fuentes fúngicas, para generar vitamina D<sub>2</sub>. Posteriormente, ambas prohormonas sufren una serie de hidroxilaciones enzimáticas en el hígado para convertirse en su forma activa, la 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> o calcitriol, molécula con actividad hormonal implicada en el transporte de Ca<sup>2+</sup> a través de las membranas celulares.
- Los ácidos biliares, que son el principal destino metabólico en mamíferos del colesterol, se generan a partir de modificaciones enzimáticas sucesivas del esqueleto hidrocarbonado del mismo que implican la intervención de varios citocromos (Fig. 13)

# Introducción



**Figura 6.** Esquema simplificado de las rutas biosintéticas de esteroides con diferentes funciones en mamíferos

## 1.1.3 ESTEROIDES CON FUNCIONES ESPECIALES EN OTROS GRUPOS ANIMALES

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, los esteroides distan enormemente de ser un grupo de moléculas exclusivas de los mamíferos. Están presentes en todos los reinos de los seres vivos cumpliendo diversas funciones fisiológicas en cada caso.

Dentro del grupo de los insectos, los esteroides desempeñan un papel fundamental. Además de la presencia de colesterol en la membrana celular

## Introducción

---

característica de todas las células animales, este grupo sintetiza un tipo de moléculas con función hormonal denominadas ecdisteroides. Estos compuestos poseen una gran relevancia biológica en artópodos, ya que actúan como hormonas de la muda y activan la transcripción de genes en especies como *Drosophila melanogaster* (Kang & Bashirullah, 2014). Asimismo, estas moléculas pueden ser sintetizadas por algunas especies de plantas y hongos (fitoecdisteroides o micoecdisteroides, respectivamente) (Dinan, 2001). En plantas no está esclarecido el papel de los fitoecdisteroides, aunque se apunta su función como moléculas de defensa frente a insectos depredadores al actuar como disruptores endocrinos.

Algunas especies de insectos son también las responsables de la síntesis de ciertas batracotoxinas presentes en ciertos anfibios y aves. Las batracotoxinas, uno de los venenos más potentes conocidos, tienen naturaleza esteroídica y están presentes en ranas de los géneros *Phyllobates* y *Dendrobates* y en ciertos representantes de los géneros de aves *Pitohui*, *Ifrita*, *Colluricincla* que las almacenan, pero se cree que no las sintetizan, sino que las obtienen a través de la dieta, ingiriendo escarabajos incluidos en el género *Choresinae* (Dumbacher *et al.*, 2004; Dumbacher *et al.*, 2008).

Otra función de las moléculas con estructura esteroídica que entronca con su capacidad señalizadora resulta patente en el uso por parte de algunas especies de peces teleósteos de esteroides como feromonas. Así, las hembras de carpa dorada (*Carassius auratus*) liberan al medio androstendiona y otras feromonas sexuales como 17 $\beta$ -estradiol; 17,20 $\beta$ -dihidroxipregn-4-en-3-ona (17,20 $\beta$ P) y 17,20 $\beta$ -dihidroxipregn-4-en-3-ona 20-sulfato como método para atraer a los machos y garantizar la viabilidad del ciclo sexual (Sorensen *et al.*, 2005). También la lamprea de mar (*Petromyzon marinus*) sintetiza una serie de alcoholes y ácidos biliares como quimioatrayentes, tanto con fines sexuales como territoriales, siendo los principales el petromizonol-sulfato y el ácido alocólico, con sus respectivos 3-ceto derivados (Venkatachalam, 2005).



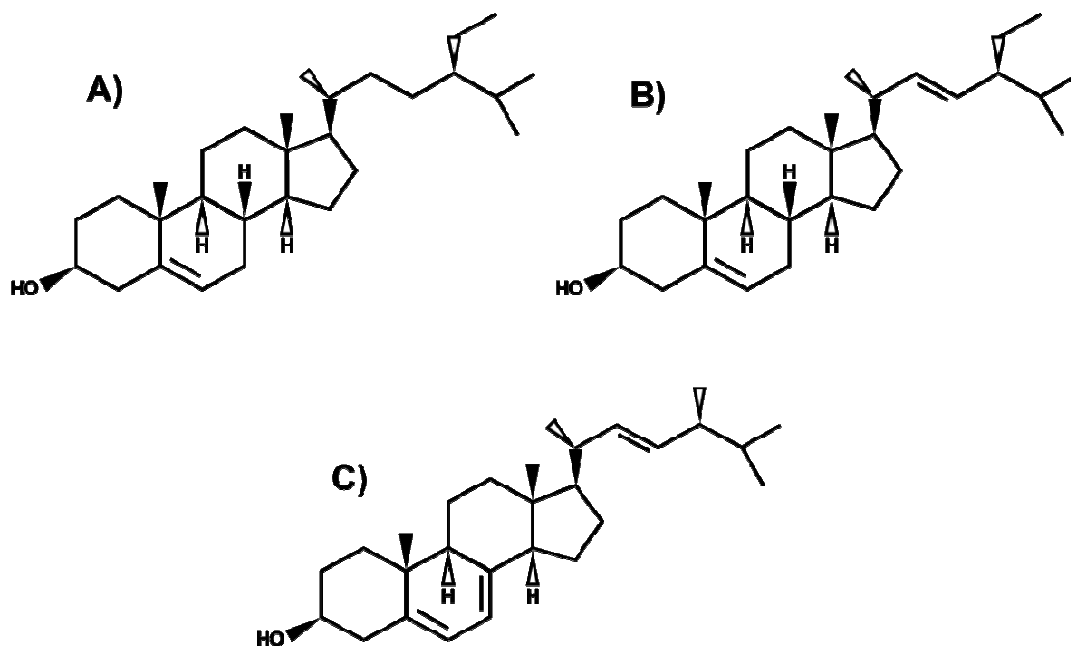
# Introducción

## 1.1.4 ESTEROIDES EN VEGETALES Y HONGOS

La presencia de esteroides en la naturaleza no se limita al reino *Animalia*. Existen multitud de compuestos con naturaleza esteroídica de elevada relevancia fisiológica entre el resto de reinos vivos. De este modo, los esteroides pueden desempeñar funciones estructurales, hormonales, defensivas, etc.

### 1.1.4.1 Fitosteroles

Los fitosteroles, una de las clases de esteroides producidos por plantas, constituyen uno de los grupos más numerosos y abundantes en la naturaleza y lo componen una mezcla de diferentes moléculas, entre las que mayoritariamente se encuentran el estigmasterol, el ergosterol y el  $\beta$ -sitosterol (Fig. 7).



**Figura 7.** Estructura de los principales fitosteroles. A)  $\beta$ -sitosterol; B) estigmasterol y C) ergosterol.

# Introducción

---

Estos tres compuestos cumplen funciones similares al colesterol en las membranas celulares de los miembros del reino *Plantae* (Grosjean *et al.*, 2015; Hartmann, 1998), siendo el ergosterol el principal esteroide de la membrana celular en los miembros del reino *Fungi* (Douglas & Konopka, 2014). Debido a su enorme abundancia, constituyen la principal fuente para la síntesis química o la hemisíntesis biológica de compuestos esteroídicos con interés farmacéutico.

Existe una gran cantidad de metabolitos secundarios sintetizados por numerosas especies vegetales y por diversas especies animales cuya estructura tiene origen esteroídico. Algunos de los más representativos son los brasinoesteroides, los alcaloides esteroideos o los glicósidos esteroideos.

## 1.1.4.2 Metabolitos secundarios vegetales

### 1.1.4.2.1 Brasinosteroides

Los brasinoesteroides constituyen una familia de especial relevancia, ya que juegan un papel importante en la elongación y división celular. Estos compuestos, considerados hormonas vegetales, desempeñan además una importante función en procesos tales como:

- Desarrollo y diferenciación de tejidos vasculares y reproductivos;
- Mecanismos responsables de polarización de la membrana y de bombeo de protones;
- Modulación de la respuestas frente a factores de estrés bióticos y abióticos;

## Introducción

---

- Floración, senescencia y fotomorfogénesis (Bajguz, 2007; Clouse & Sasse, 1998).

Esta clase de compuestos no fue descubierta hasta 1970, en que la brasinolida fue aislada de polen de colza (*Brassica napus*) (Mitchell *et al.*, 1970). Su actividad como promotor del crecimiento y división celular hizo que recibiesen la denominación de sexto grupo de hormonas vegetales. Sin embargo, esta consideración no fue aceptada de manera general hasta el descubrimiento de mutantes afectados en la síntesis de brasinoesteroides de *Arabidopsis* cuyo fenotipo enano revertía a normal tras tratamiento con alguna de estas moléculas (Kauschmann *et al.*, 1996).

Actualmente, se cifra en más de 40 el número de moléculas diferentes pertenecientes a este grupo. Desde un punto de vista biosintético todas proceden del campesterol y se originan por modificación bien del núcleo central o bien de la cadena lateral. Es por este motivo por el que no poseen una estructura química común, aunque el tipo más numeroso es el que posee dos grupos hidroxilo vecinales unidos a los carbonos 3 y 4 del anillo A (Fig. 8).

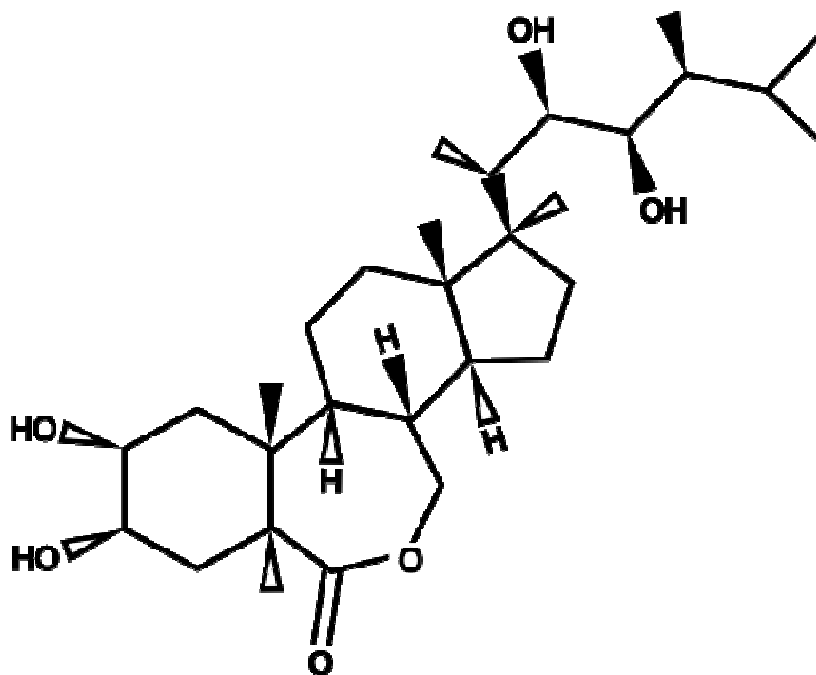


Figura 8. Estructura de la brasinolida.

### 1.1.4.2.2 Glicósidos esteroideos

Otro de los grupos de esteroides vegetales son los glicósidos esteroideos, denominados de este modo porque su aglicona o genina tiene naturaleza esteroídica.

Dentro de este grupo de compuestos destacan dos clases principales (saponinas y glicósidos cardiotónicos), que se diferencian según su función biológica:

#### 1.1.4.2.2.1 Saponinas

Los compuestos de este grupo constituyen el tipo de moléculas más numeroso dentro de los esteroides. Todas ellas poseen una elevada capacidad detergente, propiedad responsable de su denominación. Son sintetizados por una gran cantidad de plantas terrestres de climas templados, como el ajo,

## Introducción

---

espárrago, berenjena, pimientos, avena, tomate, además de plantas desérticas como las adscritas a los géneros *Yucca* y *Quillaja* (Mahato *et al.*, 1982). También se encuentran presentes en algunos grupos animales, pero de manera mucho más infrecuente. Son sintetizadas por la mayoría de equinodermos y de manera menos común en cnidarios y poríferos (Kicha *et al.*, 2001). Algunas especies de peces las utilizan como repelentes de tiburones (Williams & Gong, 2007).

Las saponinas poseen una fracción glucídica, que habitualmente contiene glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, ramnosa o metilpentosa, unida mediante un enlace glucosídico a la aglicona (sapogenina), que puede tener naturaleza de esteroide o de triterpenoide. La cadena oligosacáridica está normalmente unida al carbono en posición 3 (monodesmosídico), pero algunas saponinas presentan un resto glicídico adicional en posición 6, 7, 15, 16, 24, 26 ó 28 (bidesmosídico) (Francis *et al.*, 2002; Williams & Gong, 2007).

Dentro de este grupo se encuentran algunos ginsenósidos, procedentes de la raíz del *Panax ginseng* (Attele *et al.*, 1999), o la dioscina (Fig. 9), presente en el varios tubérculos de diferentes especies de ñame (plantas pertenecientes al género *Dioscorea*). La aglicona de la dioscina, la diosgenina, es, junto con los fitosteroles, la molécula de partida en la mayoría de procesos industriales de obtención de esteroides de interés farmacéutico por su similitud con las hormonas esteroideas (Balandrin, 1996; Oncina *et al.*, 2000).

## Introducción

---

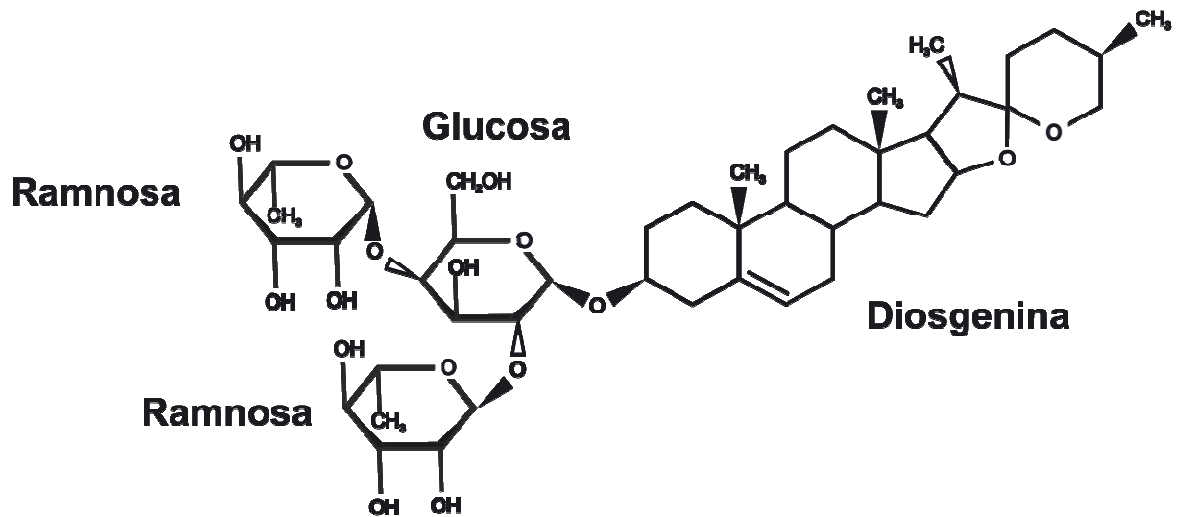


Figura 9. Estructura de la dioscina.

La función de estos compuestos en plantas no resulta del todo conocida, pero están documentado que poseen propiedades antimicrobianas, insecticidas e inhibidoras del crecimiento fúngico (Francis et al., 2002).

Alguno de los efectos de estas moléculas en los sistemas animales incluyen:

- Alteración de las propiedades de las membranas, como permeabilización de las mismas;
- Actividad citostática frente a células tumorales;
- Alteración de la homeostasis del colesterol;
- Alteración en la asimilación de nutrientes a través de la membrana intestinal en mamíferos;
- Actividad antifúngica y antiprotozoaria;
- Disrupción de ciclos sexuales y alteraciones hormonales.

# Introducción

## 1.1.4.2.2.2 Glicósidos cardiotónicos

Estos compuestos son así denominados por su efecto sobre la contracción cardíaca. Están constituidas por entre uno y cuatro residuos glicídicos unidos a la molécula de esteroide mediante un enlace a través del hidroxilo presente en posición 3 (Fig.1). La molécula de esteroide presenta un hidroxilo adicional en posición 14 y un anillo lactónico en posición 17 (Heasley, 2012).

Cuando el anillo lactónico es pentagonal (una  $\gamma$ -butirolactona insaturada) se trata de un cardenólido, como la digoxina (Fig. 10), la rostafuroxina o la oubaína.

Cuando el anillo es de tipo hexagonal (una  $\alpha$ -pirona) se trata de los denominados bufadienólidos, como la marinobufagenina (Fig. 11), telocinobufagina, la procilaridina A o la 19-norbufalina.

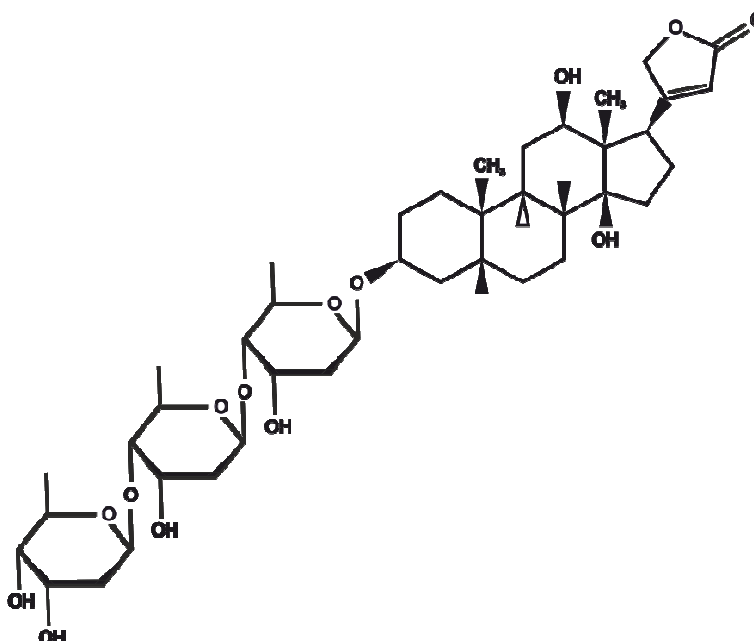


Figura 10. Estructura de la digoxina.

## Introducción

---

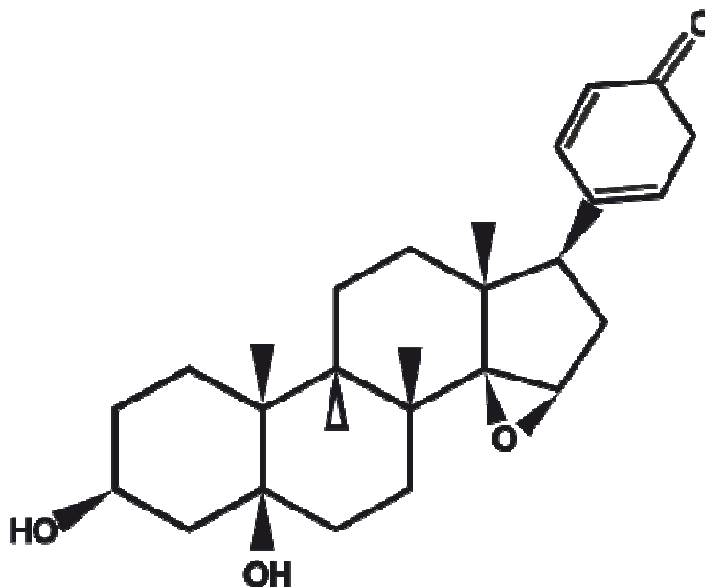


Figura 11. Estructura de la marinobufagenina

Los glicósidos cardiotónicos sintetizados por algunas especies vegetales constituyen también el principio activo de la secreción de alguna especie de sapos y se ha demostrado que pueden ser sintetizadas endógenamente por algunos mamíferos. Se ha detectado síntesis *de novo* de ouabaína e hidroxioouabaína por células bovinas adrenocorticales (Perrin *et al.*, 1997), y de digoxina y de marinobufagenina a partir de colesterol en cultivos celulares de la línea de ratón Y-1 (Dmitrieva *et al.*, 2000; Qazzaz *et al.*, 2004).

Estos glicósidos cardiotónicos presentan interesantes implicaciones en diversos procesos fisiológicos (Bagrov *et al.*, 2009; Schoner & Scheiner-Bobis, 2007), siendo el principal su efecto inotrópico positivo, ya que inhiben la subunidad  $\alpha$  catalítica de la ATPasa integrante de la bomba de sodio/potasio. De este modo, la salida de  $\text{Na}^+$  de las células cardíacas se ve reducida y con ello la fuerza motriz de salida de cationes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que aumentan su concentración intracelular, lo que incrementa la fuerza de las contracciones cardíacas.



## Introducción

---

No obstante, la regulación de la actividad cardíaca por parte de estos compuestos se explica a través de otros mecanismos, como la teoría del signalosoma, que explica la capacidad de alterar la expresión de algunos genes (Bagrov *et al.*, 2009). Esta capacidad implica la activación de cascadas de señalización intracelulares, estimulando de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero, la vía del fosfatidil-inositol 3'-quinasa o la protein-quinasa B además de la vía de transducción Ras-Raf-MEK-ERK (Fontana *et al.*, 2013; Wasserstrom & Aistrup, 2005). Además, ha sido demostrado el efecto estimulante de la proliferación y diferenciación celular y su actividad antitumoral por parte de alguno de estos esteroides (Orlov *et al.*, 1999; Ramirez-Ortega *et al.*, 2006).

### 1.1.1.2.3 Alcaloides esteroídicos

Otro grupo de metabolitos secundarios vegetales está constituido por los alcaloides esteroídicos. No poseen una estructura química común, ya que algunos podrían considerarse glicósidos, pero tienen en común la presencia de un núcleo esteroideo y un heterociclo nitrogenado. Estas sustancias poseen características tanto de esteroides (dan ensayos positivos con el reactivo de Liebermann-Burchard) como de alcaloides (dan positivo en el ensayo de Dragendorff) (Evans, 2009).

Pertenecen a este grupo la solanina (Fig. 12), la chaconina o la tomatina, sintetizados por plantas del género *Solanum* (Heftmann, 1983). Otros géneros de plantas que producen este tipo de compuestos son *Veratrum* y *Fritillaria* (Cong *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007).

## Introducción

---

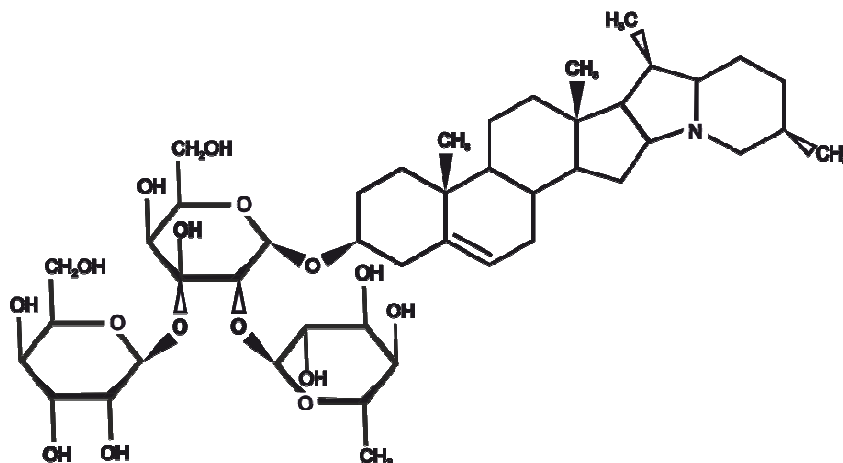


Figura 12. Estructura de la solanina.

### 1.1.5 ESTEROIDES EN ORGANISMOS UNICELULARES

Algunos protistas, cual es el caso de las especies pertenecientes al género *Trypanosoma*, sintetizan esteroides. Se han realizado estudios en *Trypanosoma brucei*, agente causal de la enfermedad del sueño, que demuestran que esta cepa es capaz de sintetizar más de 10 clases de esteroides que se integran en la membrana celular de sus formas procíclicas desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de su ciclo vital (Dixon *et al.*, 1972; Zhou *et al.*, 2007). La importancia de los esteroides en este género es tal, que la ruta biosintética de esteroides es considerada una diana terapéutica para el tratamiento de afecciones como la enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es *T. cruzi* (Croft *et al.*, 2005).

Por último, se han descrito varias cepas bacterianas capaces de sintetizar esteroides. Habitualmente, los procariotas sintetizan terpenos pentacíclicos del tipo de los hopanoides como elemento estructural en sus membranas (Ourisson & Nakatani, 1994), cumpliendo la función que colesterol, estigmasterol o ergosterol y fitosteroides desarrollan en células de animales, hongos y plantas respectivamente (Ourisson *et al.*, 1987; Rohmer *et al.*, 1984). Así, a pesar de que se ha demostrado que especies como *Nannocystis*

## Introducción

---

*excedens* y *Polyangium sp.* tienen capacidad de producir esteroides (Kohl *et al.*, 1983), los tritepenos tetracíclicos resultan extremadamente raros en procariotas. De hecho, su presencia solamente ha sido únicamente descrita en algunas especies pertenecientes al género *Staphylococcus* (Hayami *et al.*, 1979), *Methylococcus capsulatus* (Bird *et al.*, 1971), *Gemmata obscuriglobus* (Pearson *et al.*, 2003) y en un número escaso de especies adicionales, la mayoría incluidas dentro del Orden de las mixococales (como varias especies adcritas al género *Cystobacter*, *Corallococcus coralloides*, *Angiococcus disciformis*, *Melittangium lichenicola* y *Archangium sp.* y *Stigmatella aurantiaca*). Estas especies son capaces de sintetizar varios esteroides, entre los que se encuentran el lanosterol y el cicloartenol (Bode *et al.*, 2003).

### 1.2 LOS ÁCIDOS BILIARES

#### 1.2.1 SÍNTESIS

Los ácidos biliares, sus glico y tauroconjugados y sus sales son constituyentes fundamentales de la bilis de los mamíferos cuya función fundamental es la de emulsionar los lípidos de la dieta para facilitar su absorción y digestión.

La síntesis de los ácidos biliares es la principal vía catabólica del colesterol en los mamíferos (Russell, 2003). Este proceso puede producirse mediante dos rutas enzimáticas diferentes denominadas respectivamente ruta clásica o neutra y ruta alternativa o ácida. Ambas vías implican el acortamiento de la cadena lateral y la hidroxilación de ciertas posiciones del anillo esteroídico y se distinguen por la naturaleza alcohólica o ácida de los intermediarios metabólicos (Fig. 13).

## Introducción

---

Además, en la ruta clásica, la modificación del núcleo de esterol precede a la escisión oxidativa de la cadena lateral, mientras que por el contrario, en la ruta alternativa, la oxidación de la cadena lateral se produce con anterioridad a la modificación del anillo esteroideo (Chiang, 2004).

La ruta clásica requiere una cascada de 14 reacciones catalizadas por diferentes enzimas y citocromos localizados en el citosol, retículo endoplásmico, mitocondrias y peroxisomas de los hepatocitos (Chiang, 2004). La síntesis de ácidos cólico y quenodesoxicólico, denominados ácidos biliares primarios por ser los más abundantes, solo difieren en la hidroxilación en el carbono 12 del núcleo esteroídico. Así, las moléculas intermediarias que sufren la actividad de la esterol 12 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP8B1) se convertirán en ácido cólico, mientras que las que escapan a la acción de la enzima, se transformarán en ácido quenodesoxicólico. Como se expuso anteriormente, la escisión de la cadena lateral, que sucede a la modificación del núcleo es catalizada por el citocromo con actividad esterol 27-hidroxilasa mitocondrial (CYP27A1), que oxida el carbono 27 de 5 $\beta$ -colestán-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol y 5 $\beta$ -colestán-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol hasta un grupo carboxilo. Los productos obtenidos de esta reacción, ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -colestánico y ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colestánico, son condensados con CoA por la ácido biliar CoA-sintetasa (BACS) o la acil-CoA sintetasa y transportados a los peroxisomas donde sufren un ciclo de  $\beta$ -oxidación, con objeto de acortar la cadena lateral, liberándose una molécula de propionil-CoA y formándose quenodesoxicolil-CoA o colil-CoA, respectivamente.

En humanos, los ácidos biliares se dividen según su composición en primarios y secundarios:

- Los ácidos biliares primarios son el cólico (ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -colánico) y el quenodesoxicólico (ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colánico),

## Introducción

---

presentes mayoritariamente en sus formas glico y tauroconjugadas. La síntesis de estas moléculas desde el colesterol es catalizada por enzimas hepáticas (Fig. 13).

- Los ácidos biliares desoxicólico y litocólico, comúnmente denominados ácidos biliares secundarios, son generados por deshidroxilación en posición C7 de los ácidos cólico y quenodesoxicólico respectivamente. Esta reacción es llevada a cabo por bacterias entéricas (Ridlon *et al.*, 2006).

# Introducción

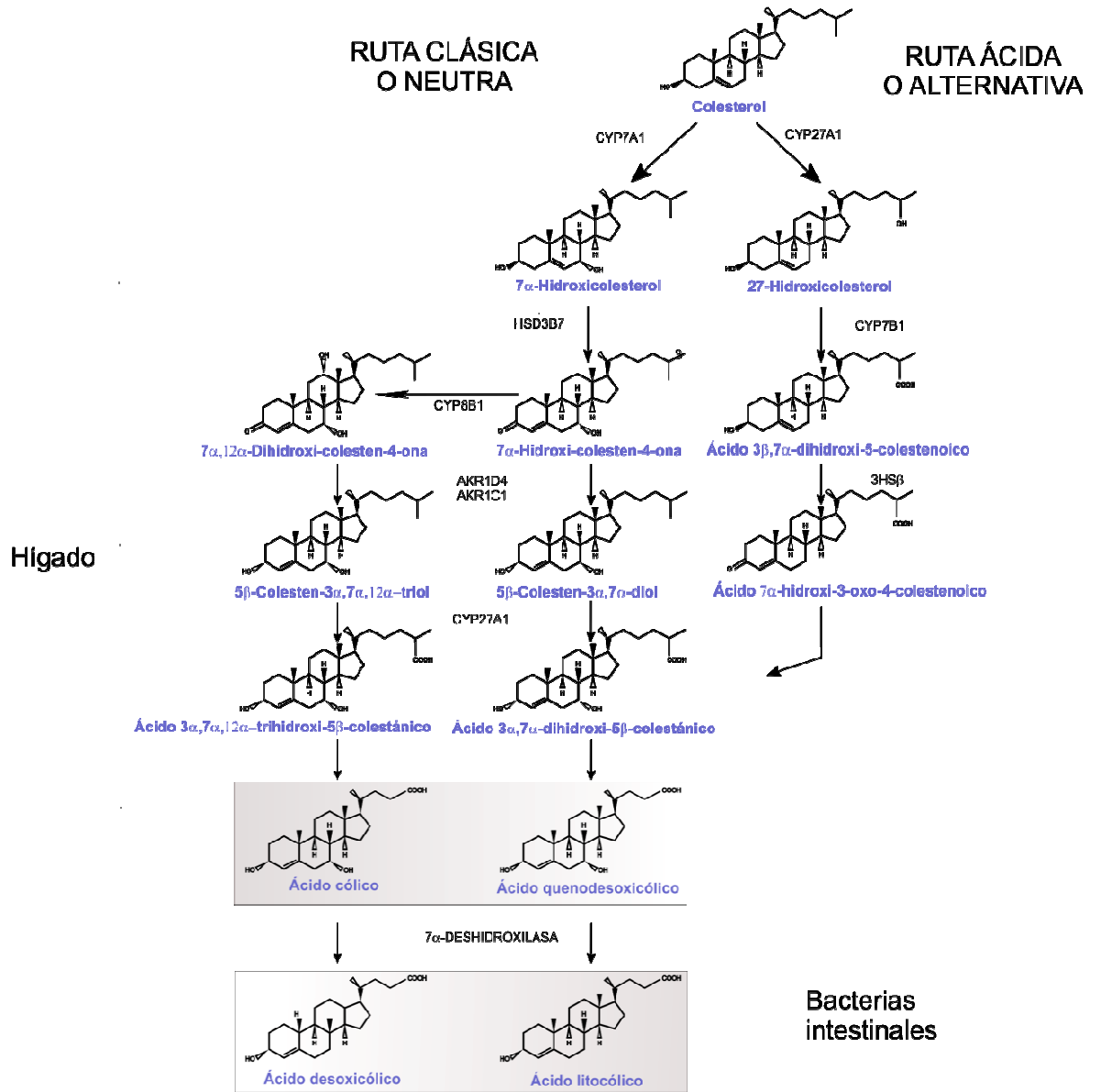


Figura 13. Esquema de la ruta biosintética de ácidos biliares en mamíferos

## Introducción

---

Los ácidos biliares suponen un reservorio de unos 3 gramos que transitan por el aparato digestivo y se reabsorben cíclicamente entre 4 y 12 veces al día. Este mecanismo, denominado circulación enterohepática consiste en un sistema de reciclaje de las sales biliares a lo largo del sistema digestivo y que permite la reabsorción de la mayor parte de las mismas, de manera que únicamente se requiere la síntesis para la reposición de la cantidad que se excreta en heces y en orina (Macdonald *et al.*, 1983). De este modo, se estima que la cantidad de esteroides que un individuo sano adulto excreta en forma de ácidos biliares oscila entre 0,2 y 0,6 g al día (Chiang, 2009).

### 1.2.2 FUNCIONES

Los ácidos biliares son importantes agentes fisiológicos ya que forman sales que actúan como detergentes en el intestino delgado emulsionando las grasas, lo que facilita la acción de las lipasas pancreáticas sobre las mismas y la absorción intestinal de nutrientes. Esta característica los convierte en los más importantes reguladores de la homeostasis lipídica, ya que eliminan el exceso de colesterol y previenen la acumulación de triglicéridos, evitando de este modo lesiones hepáticas (Wollam & Antebi, 2011).

Además de su importancia como mediadores de la absorción lipídica, los ácidos biliares desempeñan otra serie de funciones fisiológicas esenciales. Un interesante papel jugado por estas moléculas consiste en su capacidad de regular su propio proceso de biosíntesis. Trabajos recientes han demostrado la importancia de los ácidos biliares como moléculas señalizadoras con actividad endocrina (Hylemon *et al.*, 2009).

Se han descrito tres mecanismos principales de señalización en los que están implicados:

## Introducción

---

- Activando rutas mediadas por quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) (Gupta *et al.*, 2001; Qiao *et al.*, 2003).
- Actuando como ligandos del receptor acoplado a proteína G (GPCR) TGR5 (Kawamata *et al.*, 2003; Maruyama *et al.*, 2002).
- Activando receptores nucleares de hormonas como el receptor  $\alpha$  del farnesoide X (FXR $\alpha$ ; NR1H4) (Makishima *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

El papel desempeñado por los ácidos biliares como moléculas señalizadoras resulta de gran interés, puesto que permite que los propios ácidos biliares regulen su propia biosíntesis a través de la cascada de señalización que inicia la activación del receptor nuclear FXR. Dicho receptor responde a cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico y litocólico, y cuando se encuentra ocupado por ligando, inhibe la actividad transcripcional del receptor de oxisterol (LXR $\alpha$ ), un regulador positivo de la transcripción del citocromo P450 7A1 (CYP7A1) (H. Wang *et al.*, 1999). Este citocromo actúa como una enzima que posee actividad 7 $\alpha$ -hidroxilásica del colesterol, y supone la enzima que cataliza la reacción limitante en la ruta de degradación del colesterol y síntesis de ácidos biliares (Chiang, 2009). Esta inhibición se produce a través la inducción mediada FRX/BAR del gen *shp-1* (*small heterodimer partner*), que codifica un receptor nuclear carente de dominio de unión al ADN, y que se une a otros receptores nucleares reprimiendo sus actividades transcripcionales, de manera que, entre otros, inhibe la transcripción de *cyp7a1* interactuando con LHR-1 (*liver homolog receptor 1*), un receptor nuclear que se une al elemento de respuesta del promotor del gen *cyp7a1* activando su transcripción (Goodwin *et al.*, 2000).

Además de a través de la vía FRX, la biosíntesis de ácidos biliares también está regulada por la ruta quinasa c-Jun N-terminal. Los ácidos



## Introducción

---

biliares interaccionan de manera dependiente del tiempo y concentración con JNK-1. Esta quinasa fosforila a su vez el factor de transcripción c-Jun. Éste se une al promotor del gen *shp-1* o interacciona directamente con el receptor nuclear LHR-1, obteniendo un efecto idéntico al producido a través de la vía del FRX (Gupta *et al.*, 2001).

Los ácidos biliares son reconocidos por el receptor de membrana asociado a proteína G (GPCR) BG37. Este mecanismo permite una respuesta más rápida que las vías de señalización anteriores, las cuales implican la participación de receptores nucleares, lo que significa una respuesta lenta. La activación de este receptor induce una inmediata elevación de los niveles intracelulares de AMP cíclico independiente de los mecanismos de modificación transcripcional mediados por las cascadas de quinasas activadas por mitógenos (Maruyama *et al.*, 2002).

### 1.3 LOS ESTEROIDES COMO COMPUESTOS CONTAMINANTES

Los esteroides, como se ha expuesto anteriormente, son compuestos ampliamente distribuidos en todos los seres vivos, por ello su presencia en el medio ambiente sucede de manera natural.

Los estrógenos, como moléculas sintetizadas por las hembras de los mamíferos de manera continua a lo largo del ciclo reproductivo, son vertidos de manera continua y en grandes cantidades al entorno (Ying *et al.*, 2002). Los humanos y el ganado constituyen una fuente notable de estrógenos esteroídicos. Las personas excretan grandes cantidades de estrona, estradiol y estriol diariamente en sus formas conjugadas con glucuronato y sulfato principalmente a través de la orina.

## Introducción

---

Los principales estrógenos excretados por los animales son los mismos que en humanos, con la salvedad de que el estradiol, que en humanos se encuentra únicamente como epímero  $\alpha$ , en las especies animales puede presentar un segundo epímero con el hidroxilo en posición 17 en configuración  $\beta$  (Lange *et al.*, 2002). La cantidad diaria de estrógenos liberados por cada animal dependen de la especie, sexo, edad, ciclo circadiano y estado reproductivo del mismo. La vía de excreción preferente es la fecal en rumiantes (entre el 50 y 70% del total en ganado vacuno y hasta el 96% en ovino) mientras que los cerdos excretan en torno al 95% en orina y los pollos utilizan la vía urinaria para excretar el 70% de los estrógenos liberados al medio (Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010; Poole *et al.*, 1999).

Además de las hormonas esteroideas, la lanolina, componente importante de la lana del ganado ovino, lleva asociada importantes cantidades de esteroides, lo que constituye otra fuente de compuestos de esta naturaleza provenientes de explotaciones animales y plantas textiles (Poole *et al.*, 1999).

Otra fuente adicional de esteroides presentes en el medio ambiente son los esteroides sintéticos utilizados en terapias contraceptivas o de sustitución hormonal. La cantidad de los mismos que se libera anualmente al entorno se estima en unos 720 kilogramos (Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010).

Además, numerosas actividades humanas como los vertidos de plantas farmacéuticas o los depósitos de estiércol provocados por la industria ganadera incrementan las posibilidades de presencia de compuestos esteroídicos en el entorno.

## Introducción

---

Las moléculas de naturaleza esteroídica presentan una elevada recalcitrancia, esto es, dificultad para la biodegradación (debido, entre otros muchos factores, a su baja solubilidad en medios acuosos y su bajo número de grupos funcionales). Esta característica, unida a su capacidad para actuar y alterar la vida animal y vegetal de distintos medios, permiten considerar a los esteroides como unos importantes contaminantes ambientales (Shore *et al.*, 1993; Shore & Shemesh, 2003).

Como hemos visto, la presencia de esteroides en el medio ambiente es frecuente y al ser múltiples sus fuentes, su estructura química también presenta una elevada variabilidad. Además, dado que existen diversos microorganismos capaces de metabolizarlos, las moléculas pueden sufrir modificaciones que las convierten en estructuras diferentes, muchas de ellas hormonalmente activas. De este modo, los fitosteroles, abundantes en los vertidos de industrias papeleras, son susceptibles de transformación microbiana en AD y progesterona (Jenkins *et al.*, 2003). Se ha descrito la actividad de estos compuestos como disruptor endocrino en peces (grupo de seres vivos en el que más profusamente se ha estudiado la influencia de los esteroides). Así, por ejemplo, se ha documentado que los compuestos estrogénicos causan feminización e inducción de la síntesis de vitelogenina de machos, aparición de características intersexuales en algunos individuos y desarrollo anormal de las características secundarias habituales. Asimismo, el estradiol presenta efecto genotóxico en lubina (*Dicentrarchus labrax* L) (Teles *et al.*, 2004), y el etinilestradiol inhibe el crecimiento testicular en machos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Jobling *et al.*, 1996). Además de las alteraciones concernientes a las características sexuales de los individuos, los estrógenos tienen influencia en el sistema inmune de numerosas especies de peces (Milla *et al.*, 2011).

## Introducción

---

También se han descrito efectos de los compuestos estrogénicos y otras moléculas que mimetizan su acción en anfibios, reptiles, aves, mamíferos e insectos (Campbell *et al.*, 2006). Se conoce con detalle el efecto inductor de producción de vitelogenina por parte del dietilbestrol y del 17 $\beta$ -estradiol en machos de tortuga pintada (*Trachemys scripta*) y de rana africana (*Xenopus laevis*) (Kloas *et al.*, 1999; Palmer & Palmer, 1995).

Igualmente, está documentada con detalle la influencia de las hormonas sexuales, especialmente de la estrona y del 17 $\beta$ -estradiol, en diferentes aspectos fisiológicos vegetales. De este modo, se ha observado el incremento en la producción de fitoestrógenos por parte de alfalfa (*Medicago sativa*) regada con agua residual contaminada con estrógenos de origen animal (Shore *et al.*, 1995). Adicionalmente, se han descrito efectos estimulantes de las hormonas sexuales animales en la floración, germinación y polinización del trigo (Janeczko & Filek, 2002) y de *Arabidopsis thaliana* (Janeczko, 2012).

Otros estudios han demostrado que algunas hormonas sexuales de mamíferos (como la progesterona, la androsterona y el  $\beta$ -estradiol) estimulan el crecimiento vegetativo y la capacidad antioxidante en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) (Erdal & Dumlupinar, 2010) y favorecen el crecimiento de semillas de maíz (*Zea mays* L.) sometidas a estrés salino mediante la estimulación de la actividad antioxidante y las reacciones de síntesis (Erdal, 2012). También ha sido descrita la acción del colato como agente causante del aumento de síntesis de fitoalexinas en plantas de arroz, lo que le confiere un incremento de resistencia frente a posibles patógenos (Shimizu *et al.*, 2008).

Todos estos efectos demuestran que la influencia biológica de las moléculas de naturaleza esteroideas no se limita al reino animal, sino que también se puede percibir en especies vegetales. Por todo ello, la

## Introducción

---

comprensión de los mecanismos moleculares responsables del catabolismo de moléculas esteroídicas presenta mucho interés. El esclarecimiento de todos los pasos implicados en la ruta metabólica que permite la degradación de este grupo de moléculas posibilitaría la aplicación de estrategias como la utilización de bacterias en la biorremediación de diferentes hábitats (suelos, lagos, ríos, depósitos de agua, etc.) de manera que se aliviasen los posibles efectos adversos que la presencia de estos compuestos causa en los diferentes ecosistemas que integran el medio ambiente.

Desde otro punto de vista, la identificación de todos los genes y enzimas de la ruta permitiría:

- La posibilidad de obtener mutantes que acumulen algún compuesto de particular interés industrial;
- La clonación de genes que codifiquen alguna actividad particular resultante en alguna molécula modificada;
- La aplicación de estrategias de cometabolismo microbiano para complementar y/o potenciar las capacidades metabólicas de aquellos microorganismos capaces de degradar parcialmente ciertos esteroides.

Estas aplicaciones han sido ampliamente aplicadas en las últimas décadas, debido a que la utilización de microorganismos presenta una serie de ventajas frente a la síntesis de esteroides de interés farmacéutico mediante procesos químicos.

El empleo de procesos químicos en la síntesis de compuestos esteroides implica, generalmente, la necesidad de múltiples etapas y el uso de intermediarios con alguno de sus grupos funcionales protegidos, lo que limita el rendimiento final de la reacción y encarece el coste económico del

## Introducción

---

proceso. Asimismo, la estructura de algunas moléculas de naturaleza esteroidea las hace especialmente sensibles al ataque por parte de alguno de los reactivos utilizados y, además, algunos de los mismos (como la piridina, el trióxido de azufre o el dióxido de selenio) presentan una elevada toxicidad tanto para los operarios como para el medio ambiente.

Por estos motivos, las fermentaciones microbianas, al realizarse en condiciones suaves de presión y temperatura, suponen una alternativa o un complemento de alto interés para la industria química (Fernandes *et al.*, 2003). Por todo lo expuesto anteriormente, resulta evidente que la caracterización de los genes y enzimas responsables de los procesos biológicos implicados en la modificación de los esteroides por parte de los diferentes microorganismos constituirá una herramienta de elevada utilidad en la manufactura de esteroides de uso farmacéutico en el próximo futuro.

### 1.4 DEGRADACIÓN BACTERIANA DE ESTEROIDES

La degradación bacteriana de esteroides ha sido estudiada desde principios del siglo XX. Existen trabajos que caracterizan la utilización de colesterol por especies de *Proactinomyces* - actualmente clasificadas dentro de los géneros *Rhodococcus* o *Nocardia* - (Turfitt, 1944) y otras de los géneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium* o *Nocardia* (Schatz *et al.*, 1949).

Los estudios referentes a la degradación microbiana de esteroides han sido llevados a cabo tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis (Ismail & Chiang, 2011). Existen cepas bacterianas capaces de asimilar parcialmente esteroides en condiciones de anaerobiosis estricta, otras que llevan a cabo la mineralización de los mismos en aerobiosis y un

## Introducción

grupo más reducido que posee la capacidad de degradarlos en ambas condiciones (anaerobiosis facultativa).

**Tabla I.** Algunas de las cepas capaces de la degradación de esteroides.

<b>ESPECIE</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>AEROBIOS</b>	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	(Weber <i>et al.</i> , 2005)
<i>Acinetobacter</i> sp.	(Pauwels <i>et al.</i> , 2008)
<i>Alcaligenes</i> sp.	(Payne & Talalay, 1985)
<i>Aminobacter aminovorans</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus</i> sp.	(Jiang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Nitrosomonas europaea</i>	(Shi <i>et al.</i> , 2004)
<i>Novosphingobium tardaugens</i>	(Fujii <i>et al.</i> , 2003)
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	(Pauwels <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Pauwels <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pseudomonas putida</i> DOC21	(Merino <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ralstonia pickettii</i>	(Pauwels <i>et al.</i> , 2008)
<i>Sphingobacterium</i> sp.	(Haiyan <i>et al.</i> , 2007)
<i>Vibrio</i> sp.	(Sang <i>et al.</i> , 2012)
<b>ANAEROBIOS</b>	
<i>Bacteroides</i> sp.	(Kornman & Loesche, 1982)
<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	(Fahrbach <i>et al.</i> , 2006)
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	(Freier <i>et al.</i> , 1994)
<b>ANAEROBIOS FACULTATIVOS</b>	
<i>Agromyces</i> sp.	(Ke <i>et al.</i> , 2007)
<i>Acinetobacter</i> sp.	(Ke <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Chol1	(Philipp <i>et al.</i> , 2006)
<i>Sphingomonas</i> sp.	(Ke <i>et al.</i> , 2007)
<i>Steroidobacter denitrificans</i>	(M Fahrbach <i>et al.</i> , 2008)
<i>Sterolibacterium denitrificans</i>	(Tarlera & Denner, 2003)

Como puede apreciarse en la Tabla I, numerosos microorganismos son capaces de modificar de algún modo una molécula de naturaleza esteroídica dada. Sin embargo, no todos ellos poseen la maquinaria enzimática necesaria para degradar por completo esteroides (Donova & Egorova, 2012; Mahato & Majumdar, 1993; Szentirmai, 1990; Yu *et al.*, 2013).

Las principales transformaciones microbianas utilizadas en procesos industriales han sido:

- La introducción de grupos hidroxilo en diferentes puntos de la molécula;
- La deshidrogenación del anillo A en posición  $\Delta^1$ ;
- La eliminación de la cadena lateral unida al C<sub>17</sub> de esteroides y ácidos biliares.

Uno de los focos de interés de la industria química y farmacéutica en cuanto a la aplicación de transformaciones microbiológicas para la obtención de esteroides de interés, ha sido la búsqueda de inhibidores de la degradación del núcleo esteroídico o la obtención de cepas que carezcan de la capacidad de atacarlo.

En la década de los 60, el organismo paradigmático en los estudios de degradación de colesterol fue *Nocardia restricta*, actualmente catalogado como *Rhodococcus equi* (Sih *et al.*, 1968). Esta cepa, al igual que las cepas incluidas en el género *Mycobacterium*, pertenece a la clase de las actinobacterias. En este grupo, la degradación de colesterol presenta un especial interés, debido a la implicación de esta ruta metabólica en el establecimiento y en el desarrollo de la tuberculosis, la lepra y de todos aquellos procesos patológicos que causan estas bacterias (Mattos *et al.*, 2014; Ouellet *et al.*, 2011; Pandey & Sassetti, 2008; van der Geize *et al.*, 2007).



### 1.4.1 DEGRADACIÓN BATERIANA DE ÁCIDOS BILIARES

En el caso particular de los ácidos biliares, los estudios acerca de su degradación microbiana comenzaron a abordarse a mediados del siglo XX. Dichos trabajos fueron llevados a cabo tanto en especies G+, cual es el caso de *Nocardia* (Halperin *et al.*, 1954) como G-, cual es el caso de *Clostridium perfringens* (Macdonald *et al.*, 1983).

#### 1.1.4.1 Metabolismo anaerobio

Existen multitud de artículos científicos en los que se describen cepas bacterianas con capacidad de modificar ácidos biliares en condiciones anóxicas. De hecho, son bacterias intestinales, la mayoría anaerobias estrictas o facultativas, las responsables de un proceso biológico de gran importancia fisiológica en mamíferos, como resulta la síntesis de ácidos biliares secundarios (desoxicólico y litocólico). Estas dos moléculas se sintetizan a partir de la deshidroxilación de los primarios (cólico y quenodesoxicólico, respectivamente), que es llevada a cabo principalmente por cepas adscritas a los géneros *Eubacterium* y *Clostridium* (Mallonee *et al.*, 1990; Wells & Hylemon, 2000).

No existe registro de ninguna cepa capaz de catabolizar íntegramente ácidos biliares en condiciones de anaerobiosis. Existen cepas capaces de degradarlos parcialmente, como es el caso de la cepa *Pseudomonas Chol1*, con la facultad de eliminar la cadena lateral de los mismos, pero obteniendo ADD como metabolito final, o la cepa *Sterolibacterium denitrificans*, que además de emplear colesterol, es capaz de utilizar testosterona como única fuente de carbono y energía (Chiang *et al.*, 2007).

## Introducción

---

No obstante, los mecanismos moleculares y enzimáticos implicados en la completa mineralización de estos compuestos permanecen hasta la fecha sin ser descritos detalladamente.

### 1.1.4.2 Metabolismo aerobio

La literatura acerca de la degradación aeróbica de ácidos biliares es mucho más extensa. Un gran número de estudios se ha desarrollado tomando como modelo la especie *Comamonas testosteroni* (Horinouchi *et al.*, 2012). Esta cepa (una bacteria G- incluida dentro del grupo de las  $\beta$ -Proteobacterias) guarda una relación filogenética más o menos próxima con la cepa utilizada en el presente estudio, *Pseudomonas putida* DOC21, y es capaz de mineralizar ácidos biliares, AD, ADD y testosterona.

También se han llevado a cabo estudios sobre degradación bacteriana de ácidos biliares en bacterias G +, especialmente en organismos pertenecientes al grupo *Actinobacteria*. Dentro de este filo existen representantes de los géneros *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia* o *Streptomyces* capaces de degradar completamente alguno de estos compuestos. No obstante los géneros bacterianos modelo para la degradación de ácidos biliares por parte de Gram + son *Rhodococcus* o *Mycobacterium* (Mohn *et al.*, 2012; Swain *et al.*, 2012; van der Geize *et al.*, 2007).

Los estudios realizados en la cepa *R. jostii* RHA1 han permitido la caracterización de un cluster genético implicado en el catabolismo de colato mediante estudios transcriptómicos. Dicho *cluster* se encuentra presente en múltiples representantes del grupo *Actinobacteria*, especialmente el género *Rhodococcus*, pero su presencia no es tan generalizada como la de los genes que codifican la maquinaria enzimática responsable de la degradación

## Introducción

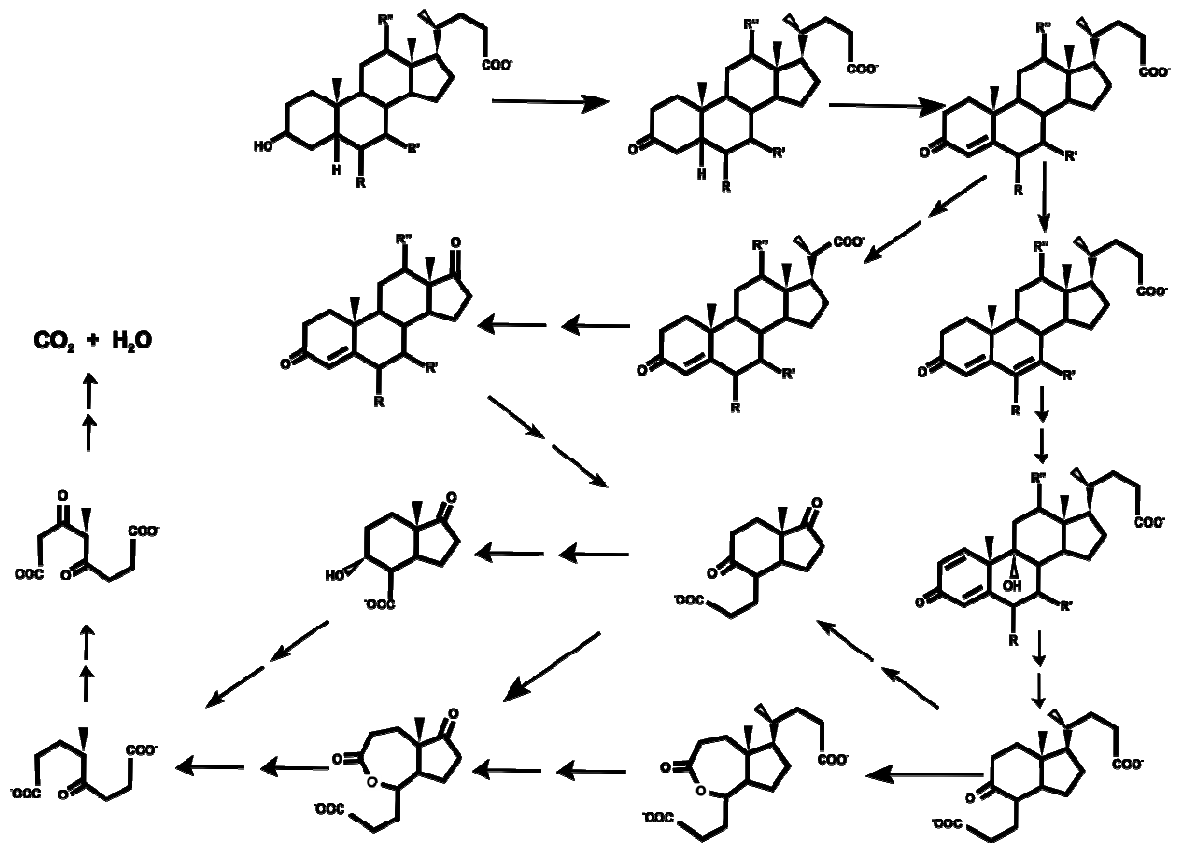
---

de colesterol. Así, mientras *R. jostii* RHA1, *R. equi* 103S, *R. ruber*. Chol-4 o *R. erythropolis* SQ1, que albergan este cluster, muestran capacidad de utilizar el colato como única fuente de carbono, otras actinobacterias relacionadas, como *Gordonia* sp. KTR9, *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 o *M. bovis* BCG, que carecen de este cluster, no presentan la misma capacidad catabólica. Este hecho explica que la capacidad de degradar ácidos biliares no sea tan frecuente en estos géneros como la de asimilar colesterol, ampliamente extendida dentro de este grupo de microorganismos.

Asimismo, existen casos de cepas, como *Thermonospora curvata*, que presentan en su genoma un cluster ortólogo al presente en el género *Rhodococcus*, pero cuya capacidad para crecer en esteroides no ha sido estudiada (Mohn *et al.*, 2012).

### 1.5 ETAPAS METABÓLICAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS BILIARES

La ruta empleada para la degradación de esteroides empleada por *Arthrobacter simplex*, *R. equi* o algunas especies pertenecientes los géneros *Streptomyces* o *Pseudomonas* (ahora catalogadas taxonómicamente como *Comamonas*) fue denominada "ruta de los 9,10-seco-intermediarios" por Hayakawa (Hayakawa, 1982), quien propuso un esquema degradativo para estos compuestos basándose en las estructuras de los intermediarios metabólicos identificados en los caldos de cultivo de diferentes cepas bacterianas (Fig. 14).



**Figura 14.** Esquema de la ruta propuesta por Hayakawa para la degradación de ácido cólico (1982).

Los procesos metabólicos clave para la degradación de la molécula de ácido biliar (Philipp, 2011) son los siguientes:

- Oxidación del anillo A;
- Eliminación de la cadena lateral;
- Apertura del núcleo esteroídico.

## 1.5.1 OXIDACIÓN DEL ANILLO A

La oxidación del hidroxilo situado en posición 3 hasta un grupo carbonilo constituye la reacción inicial en la oxidación del anillo A y, por lo tanto, el primer paso en la degradación de ácidos biliares. Esta reacción está

## Introducción

---

catalizada por una enzima con actividad  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Todas estas enzimas utilizan  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como cofactor y pertenecen a la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDRs) (Hoffmann & Maser, 2007). La  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ha sido descrita con detalle en varias cepas del género *Comamonas* (Oppermann & Maser, 1996) y en *Clostridium scindens*, donde está codificada por los genes *hsdA* y *ybaiA* respectivamente (Ridlon & Hylemon, 2012).

Una vez que el grupo hidroxilo en posición 3 del anillo A se ha oxidado a un grupo ceto, se requiere la desaturación de las posiciones 1,2 y 4,5 dentro del anillo. Estas dos actividades están catalizadas por la  $\Delta^1$ -cetoesteroide deshidrogenasa y la  $\Delta^4$ -cetoesteroide deshidrogenasa, dos enzimas que pertenecen al grupo de las flavoproteínas y que utilizan FAD como grupo prostético.

La actividad  $\Delta^1$ -cetoesteroide deshidrogenasa está codificada en *C. testosteroni* por el gen *tesH* (Horinouchi *et al.*, 2010), mientras que presenta diferentes isoformas en *R. erythropolis* SQ1 y *R. ruber* Chol4: KSTD1, KSTD2 y KSTD3 (Fernández de las Heras *et al.*, 2012; Knol *et al.*, 2008). El resultado de este paso catalítico es la eliminación trans-axial de los átomos de hidrógeno C-1( $\alpha$ ) y C-2( $\beta$ ) y el establecimiento de un doble enlace entre los mismos átomos de carbono del núcleo esteroídico. Esta enzima ha sido profusamente estudiada en diferentes géneros como *Nocardia* (Itagaki *et al.*, 1990), *Mycobacterium* (Wovcha *et al.*, 1979) o *Arthrobacter* (Choi *et al.*, 1995).

La otra actividad que completa el proceso de oxidación del anillo, mediante la  $\Delta^4$ -cetoesteroide deshidrogenasa, ha sido estudiada con menor detalle. Cataliza el proceso equivalente a la anterior entre los átomos de carbono 4 y 5 eliminando los protones C-4( $\beta$ ) y C-5( $\alpha$ ).

La primera enzima que realiza esta función (perteneciente al género *Nocardia*) no fue purificada y cristalizada hasta 1990 (Hatta *et al.*, 1991) y el primer gen que codificaba una enzima con esta actividad hasta 1996 en la especie *C. testosteroni* (Florin *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha identificado el gen homólogo, *kst4D* en *Rhodococcus* (Knol *et al.*, 2008) y en una cepa adicional de *C. testosteroni*, donde recibe el nombre de *tesI* (Horinouchi *et al.*, 2010), pero el número de especies en los que se ha encontrado homología con este gen es mucho más reducido que en el caso de la  $\Delta^1$ . Tal es así, que el grupo de Maser trató de detectar homólogos de ambos genes en distintas especies bacterianas. Como resultado se obtuvo la identificación del gen homólogo al *tesH* en más de 100 especies bacterianas, mientras que solo 24 especies mostraban algún gen con homología respecto al *tesI*. (Kisiela *et al.*, 2012).

Adicionalmente, estudios bioinformáticos permitieron concluir que la distribución de estos genes es mucho más habitual en actinobacterias que en proteobacterias. En contra de lo que podría intuirse, la similitud de la secuencia aminoacídica de ambas flavoproteínas no es demasiado elevada salvo en la región N-terminal, que contiene el dominio de unión al FAD (Kisiela *et al.*, 2012).

### 1.5.2 ELIMINACIÓN DE LA CADENA LATERAL UNIDA A C17

La eliminación de la cadena lateral es un requisito imprescindible para continuar con la mineralización de todos los esteroides con un resto acilo unido a la posición 17. Los ácidos biliares, que exhiben una cadena de cinco átomos de carbono, requieren la mineralización de la misma para continuar con la degradación del núcleo. No obstante, los mecanismos moleculares responsables de este proceso no han sido esclarecidos hasta la fecha.

## Introducción

---

Se han identificado varias de las funciones implicadas en la eliminación de esta cadena lateral en diversos géneros bacterianos. Basándose en las actividades descritas y en el análisis de los intermediarios acumulados en los caldos de cultivo, se asumió que el procedimiento se asemejaba a una  $\beta$ -oxidación (Hayakawa, 1982).

La activación con coenzima A es una característica propia de los procesos  $\beta$ -oxidativos. En el caso de los ácidos biliares, la esterificación del grupo carboxilo con CoA es uno de los pasos que llevan a cabo las bacterias anaeróbicas intestinales durante el proceso de 7 $\alpha$ -deshidroxilación, que convierte los ácidos biliares primarios en secundarios.

Estudios con la cepa *Pseudomonas* NCIB 10590 sugerían la degradación de la cadena lateral a través del mecanismo similar a una  $\beta$ -oxidación (Tennessee *et al.*, 1979). No obstante, los primeros estudios genéticos y bioquímicos del proceso se desarrollaron en *Pseudomonas* Chol1, una cepa con capacidad para utilizar ácidos biliares como única fuente de carbono (Birkenmaier *et al.*, 2007).

El análisis de extractos celulares de esta de esta cepa cuando se cultivaba en medio químicamente definido suplementado únicamente con colato, permitió la detección de la presencia de ésteres de CoA de colato, cetocolato y  $\Delta^{1,4}$ -cetocolato. Asimismo, un mutante de esta misma cepa, el R1, había perdido la capacidad de crecer en colato y acumulaba 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-3-oxopregna-1,4-dien-20-carboxilato (DHOPDC) y su éster de CoA en los extractos celulares, hecho que concuerda con el acortamiento en dos átomos de carbono de la cadena lateral que se produce en el primer ciclo de una  $\beta$ -oxidación al liberarse una molécula de acetil-CoA. El gen interrumpido en el mutante R1, *acad*, resultó presentar una elevada homología de secuencia con otros genes que codifican acil-CoA deshidrogenasas en *C.*

## Introducción

---

*testosteroni* KF-1, *R. jostii* RHA1 o *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, una cepa cuya capacidad para degradar esteroides no había sido descrita con anterioridad (Birkenmaier *et al.*, 2007). La presencia de DHOPDC también se detectó en caldos de cultivo de un cultivo de un mutante insercional de la cepa *C. testosteroni* TA441 (otro organismo modelo) cuando fue cultivado en un medio con colato como única fuente de carbono. Cuando se analizó el gen interrumpido, se comparó la secuencia aminoacídica de la proteína que codificaba con la proteína Acad de *Pseudomonas sp.* Chol1 y se observó una similitud de secuencia del 70% (Horinouchi *et al.*, 2010).

En el momento de comenzar los experimentos de esta tesis doctoral, la hipótesis más aceptada era aquella que postulaba que la eliminación del residuo hidrocarbonado unido a la posición C-17 transcurría mediante un mecanismo de la  $\beta$ -oxidación.

Los trabajos experimentales presentados en este trabajo demuestran que en varias cepas (*P. putida* DOC21 o *Pseudomonas* Chol1) el proceso bioquímico para la eliminación de la cadena lateral difiere del modelo propuesto hasta ahora, tal y como se explicará en el capítulo de resultados y discusión.

No existe certidumbre sobre el orden de los procesos de oxidación del anillo A y la eliminación de la cadena lateral. *R. jostii* RHA1 es capaz de iniciar la oxidación del anillo A e incluso proseguir con la degradación del núcleo central de la molécula esteroídica mientras la cadena lateral no ha sido completamente degradada, como atestigua la presencia en los caldos de cultivo de esta cepa cuando crece con colato de 3,7(*R*),12(*S*)-trihidroxi-9-oxo-9,10-seco-23,24-bisnorcola-1,3,5(10)-trien-22-ato (THSBNC) y de 1 $\beta$ (2'-propanoato)-3 $\alpha$ -H-4 $\alpha$ (3''(*R*)-hidroxi-3''-propanoato)-7 $\alpha$  $\beta$ -metilhexahidro-5-indanona (HHIDP) (Swain *et al.*, 2012).



Ambas moléculas conservan un resto de propanoato unido a la posición 17, pero los anillos A y B están ya parcialmente degradados.

*P. Chol1* y *P. putida* DOC21 no proceden del mismo modo. En estas cepas, los ácidos biliares sufren la oxidación completa del anillo A y pierden la cadena lateral en posición 17, que es sustituida por un grupo carbonilo. De esta manera, se converge en androst-1,4-dien-3,17-diona (ADD) o un derivado hidroxilado, molécula que supone un intermediario común en el proceso de catabolización de los compuestos esteroideos (Merino *et al.*, 2013; Philipp *et al.*, 2006).

### 1.5.3 APERTURA DE LA ESTRUCTURA ANULAR

La ADD (o el correspondiente derivado hidroxilado) es el último intermediario que conserva la estructura característica de los esteroides en el proceso degradativo de los mismos. En ese punto se produce la hidroxilación en posición 9 del esqueleto hidrocarbonado. Este paso catalítico es llevado a cabo por una enzima con actividad 3 $\alpha$ -cetoesteroide-9-hidroxilásica.

En *M. tuberculosis* y *R. rhodochrous* esta transformación está catalizada por KshAB, una oxigenasa de tipo Rieske que posee dos componentes (Capyk *et al.*, 2009; Petrusma *et al.*, 2009). Uno de ellos, la subunidad KshB es el componente reductasa y actúa como un monómero que contiene un cluster [2Fe-2S] tipo vegetal y un centro de unión a FAD. KshA, la oxigenasa, funciona como un homotrímero que alberga un cluster sulfoférrico [2Fe-2S] tipo Rieske y está coordinado en torno a un centro mononuclear de hierro ferroso.

## Introducción

---

Tanto la AD como la ADD pueden ser sustratos potenciales de la oxigenasa, ya que el complejo KshAB presenta una afinidad similar por la ADD y por la AD. No obstante no se detecta actividad catalítica en moléculas con un resto hidroxilo en posición 3 (Petrusma *et al.*, 2009).

En G- no ha sido purificada hasta la fecha ninguna enzima con esta actividad. En *C. testosteroni* TA441 ha sido identificado un marco de lectura abierto (ORF) que potencialmente codifica el componente reductasa de la actividad 9-hidroxilasa, ya que la proteína hipotética presenta un porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos del 90% con proteínas incluidas en la familia de las flavodoxin reductasas tipo 1. Otra evidencia que soporta esta hipótesis es el hecho de que un mutante de disrupción de este gen acumula ADD cuando se cultiva en presencia de testosterona. No obstante, ningún gen mostró homología significativa con el componente oxigenasa en esta cepa así como tampoco ha sido encontrada en ninguna otra bacteria G- (Horinouchi *et al.*, 2012).

Una vez que el carbono en posición 9 sufre la hidroxilación, se cree que la apertura del anillo B se produce de manera espontánea tras la aromatización del anillo A, de modo que el reordenamiento retroaldólico del intermediario con estructura 1,4-dien-3-ona evoluciona espontáneamente a otro con estructura 3-hidroxi-9,10-seco-1,3,5(10)-androstatrieno (Park *et al.*, 1986).

En el caso del ácido cólico, el intermediario identificado en los caldos es la 3,7,12-trihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)trien-9,17-diona (THSATD) (Philipp *et al.*, 2006).

El paso posterior implica la hidroxilación en posición 4 del intermediario generado. Esta transformación rinde como resultado la aparición de un derivado dihidroxilado en el resto correspondiente al anillo A que en el caso del colato es la 3,4-dihidroxi-9,10-seco-1,3,5(10)-androstatrien-9,17-diona.

## Introducción

---

Esta reacción está catalizada por monooxigenasas. En *M. tuberculosis* y en *C. testosteroni* TA441 son monooxigenasas de dos componentes las que llevan a cabo esta reacción. Ambas enzimas son dependientes de FAD y están codificadas por los genes *hsaAB* y *tesA1A2* respectivamente (Dresen *et al.*, 2010; Horinouchi *et al.*, 2004a).

Estos intermediarios metabólicos que presentan en su estructura dos grupos hidroxilo vecinales son el sustrato de dioxigenasas extradiólicas que abren el anillo A en posición meta. HsaC, una extradiol dioxigenasa que contiene un átomo de hierro en su centro catalítico, es la enzima que cataliza esta reacción en *M. tuberculosis*, mientras que *tesB* es el gen que codifica esta misma actividad en *C. testosteroni* TA441. El producto de esta reacción en el caso del colato es ácido 4,5-9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico (Horinouchi *et al.*, 2005).

Posteriormente, se produce la escisión de la molécula resultante por acción de una hidrolasa, que separa el intermediario en un derivado con estructura de indanodiona (corresponde a los anillo C y D y el resto alifático dicarboxílico lineal 2-hidroxihexa-2,4-dienoato generado tras la apertura de los anillos A y B). Son los genes *tesD* en *C. testosteroni* TA441 y *hsaC* en *M. tuberculosis* los que codifican estas funciones en estas dos cepas representativas de bacterias degradadoras de esteroides (Yam *et al.*, 2009).

A partir de este punto, la ruta catabólica resulta casi por completo desconocida. En *C. testosteroni* TA441 se conoce la implicación de los genes *tesE*, *tesF* y *tesG* en la degradación del metabolito con estructura lineal. La proteína TesE tiene actividad hidratasa y cataliza la conversión del 2-hidroxihexa-2,4-dienoato en 4-hidroxi-2-oxohexanoato, compuesto cuya mineralización posterior se postula a través de su conversión enzimática en propionil-CoA y piruvato, que entran en las rutas del metabolismo general. Con respecto a la degradación del intermediario metabólico con estructura

## Introducción

---

de indanodiona, se ignoran casi por completo las reacciones requeridas para su catabolismo (Horinouchi *et al.*, 2004b).

### 1.5.4 MECANISMOS MOLECULARES ALTERNATIVOS

En fechas recientes se ha demostrado que la vía de los 9,10-secoesteroides, que hasta hace poco se consideraba común para todos los microorganismos capaces de realizar el catabolismo aeróbico de compuestos esteroideos, no es la exclusiva para la degradación de ácidos biliares.

Se ha demostrado que la especie *Dietzia* sp. Chol2 utiliza una ruta alternativa, caracterizada por la presencia de intermediarios que presentan una insaturación en el anillo B en posición 6,7 y la pérdida del grupo hidroxilo en posición 7 del núcleo esteroideo del ácido cólico. Esta vía degradativa provoca la acumulación transitoria de intermediarios con estructura 3-ceto- $\Delta^{4,6}$ -dien-7-desoxi. Algunos de estos compuestos, como los ácidos 3,12-dioxo-4,6-coldienoico y 12-hidroxi-3-cetocol-4,6-dienoico, aparecen también en los caldos de cultivo de dos  $\alpha$ -proteobacterias aisladas por el mismo grupo, *Sphingomonas* sp. Chol10 y *Novosphingobium* sp. Chol11 (Holert *et al.*, 2014).

Compuestos con estructuras similares ya habían sido descritos en la degradación de colato por *Arthrobacter simplex* (Mukherjee *et al.*, 1993). En esta ruta metabólica intervienen algunas de las reacciones enzimáticas comunes a la ruta de los 9,10-secoesteroides, como la oxidación del hidroxilo en posición 3, que evoluciona a un grupo carbonilo, así como la deshidrogenación del anillo A con la aparición de una insaturación en posición 4. El proceso de degradación de estos intermediarios permanece prácticamente desconocido.

## Introducción

---

La ruta metabólica alternativa de los 3-ceto- $\Delta^{4,6}$ -dien-7-desoxiesteroideos no es la única conocida. La bacteria *Steroidobacter denitrificans* DSMZ18526, una  $\gamma$ -proteobacteria anaerobia facultativa, utiliza la vía de los 9,10-secoesteroideos para degradar testosterona en condiciones de aerobiosis. Sin embargo, cuando crece en ausencia de oxígeno, esta bacteria utiliza una ruta metabólica no descrita antes y que implica la degradación del núcleo esteroídico a través de una oxidación del átomo de carbono en posición 1 que conducirá posteriormente a la apertura del anillo A, dando lugar a intermediarios metabólicos como el ácido 17-hidroxi-1-ceto-2,3-androstan-3-oico (Wang *et al.*, 2013).

Estas pruebas son claros indicios de que las estrategias metabólicas microbianas enfocadas a la degradación de ácidos biliares es más heterogénea de lo que se creía a la hora de abordar el metabolismo de estos compuestos.

Algunos de los genes y enzimas de la ruta catabólica han sido estudiados con detalle en multitud de microorganismos. Sirvan como ejemplos la 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la 3-cetoesteroide  $\Delta^1$ -deshidrogenasa de *Comamonas testosteroni* (antes *Pseudomonas testosteroni*) (Plesiat *et al.*, 1991) y *Rhodococcus ruber* (Fernández de las Heras *et al.*, 2012) o la 3-cetoesteroide 9 $\alpha$ -hidroxilasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Capyk *et al.*, 2011) o *Rhodococcus erythropolis* (van der Geize *et al.*, 2002).

No obstante, las investigaciones acerca de las distintas actividades catalíticas que se requieren para la asimilación completa de esteroideos son más bien escasas. Por este motivo con este trabajo nos hemos propuesto integrar el conocimiento sobre la mayor parte posible de genes y enzimas participantes en el catabolismo de moléculas esteroideas en la cepa *Pseudomonas putida* DOC21.



## **2. OBJETIVOS**

## Objetivos

---



## Objetivos

---

El propósito de esta Tesis Doctoral es la caracterización genética y bioquímica de las rutas responsables de la degradación aeróbica de ácidos biliares y de otros esteroides en la cepa *Pseudomonas putida* DOC21. Para la consecución de este propósito, se formularon los siguientes objetivos:

- 1.-** Caracterización del metabolismo esteroideo de *P. putida* DOC21.
  
- 2.-** Análisis *in silico* de los genes y proteínas implicados en la degradación de compuestos esteroideos en nuestra cepa objeto de estudio, con especial foco en las etapas iniciales del proceso catabólico.
  
- 3.-** Aislamiento de mutantes de *P. putida* DOC21 afectados en el catabolismo de esteroides, incapaces de degradar el desoxicolato sódico, pero que, por el contrario, creciesen eficientemente en medios de composición definida que contengan otras fuentes de carbono.
  
- 4.-** Delección génica de genes con posible implicación en el proceso catabólico e identificación de los compuestos acumulados por cada uno de los mutantes resultantes cuando se cultiven en presencia de distintos compuestos esteroideos.
  
- 5.-** Estudio genético y bioquímico de las proteínas codificadas por los distintos marcos abiertos de lectura afectados en cada mutante aislado y análisis comparativo de la secuencia polipeptídica con aquellas almacenadas en las bases de datos pertenecientes a otros microorganismos.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Para desarrollar este trabajo se emplearon cepas bacterianas procedentes de diferentes colecciones o aisladas por nuestro grupo de investigación.

#### 3.1.1 ESPECIES BACTERIANAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *Pseudomonas*

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* son bacterias G- que se encuadran dentro del grupo de las  $\gamma$ -proteobacterias (Garrity, 2005). La mayoría, son organismos saprófitos y se caracterizan por presentar una enorme versatilidad fisiológica. Son bacilos rectos o ligeramente curvados de metabolismo aeróbico obligado. Como formas libres están presentes en numerosos ecosistemas terrestres, aéreos o acuáticos, aunque también pueden encontrarse asociados a organismos hospedadores (plantas y animales). Suelen desempeñar un papel muy importante en biodegradación y participan muy activamente en los ciclos del carbono y del nitrógeno (Palleroni, 1993). En función de los estudios de hibridación ARNr/ADN, las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* se distribuyen en cinco grupos (Palleroni *et al.*,1972). Siguiendo esta clasificación, *Pseudomonas putida* DOC21, cepa objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, está incluida en el grupo I de ARNr.

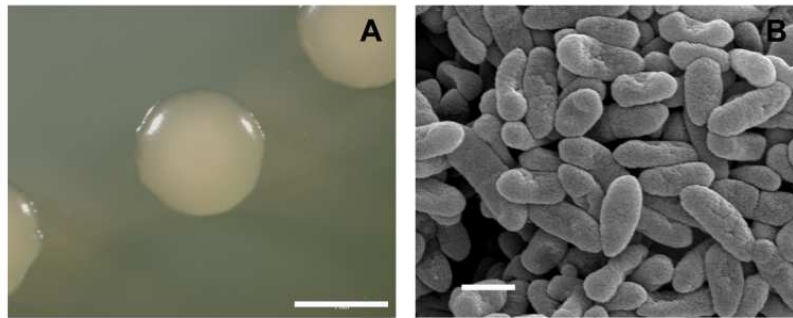
##### 3.1.1.1 *Pseudomonas putida* DOC21

###### 3.1.1.1.1 Características morfológicas

## Materiales y Métodos

---

- Presenta colonias lisas, circulares, convexas, translúcidas y con una pigmentación blanquecina en medio LB y TSA (Fig. 15).
- Bacilos rectos Gram negativos con un tamaño 1.6-2.4  $\mu\text{m}$  de largo x 0.4-0.7  $\mu\text{m}$  de ancho, de aspecto irregular y superficie rugosa cubierta por ranuras similares a cicatrices (Fig. 15).
- Posee flagelos polares.



**Figura 15.** Colonias (A) y células (B) de *P. putida* DOC21.

### 3.1.1.1.2 Características fisiológicas

- Metabolismo aeróbico estricto (metabolismo oxidativo no fermentativo).
- No formador de esporas.
- Productor catalasa y oxidasa.
- Carente de actividad arginina dihidrolasa.
- Es indol negativa, ureasa negativa y  $\beta$ -galactosidasa negativa.
- No desnitrificante (no reduce nitratos a nitritos).
- No hidroliza la gelatina ni la escualina.
- No produce pirocianina ni otros pigmentos en el medio King A. En el medio King B, muestra trazas de fluoresceína tras 100 horas de incubación, lo que indica que la captura de hierro III en el medio es llevada a cabo por mecanismos diferentes a los mediados por fluoresceína.
- Resistente a ampicilina con un rango de tolerancia de hasta 200  $\mu\text{g/ml}$ .

## Materiales y Métodos

---

### 3.1.1.1.3 Condiciones de crecimiento

- Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C. Como organismo psicrotolerante, es capaz de crecer lentamente a temperaturas bajas (4°C) pero no a aquellas iguales o superiores a 40°C.

- Es capaz de crecer en un rango de valores de pH comprendido entre 5 y 11. No es capaz de crecer cuando los valores de pH equivalen o son inferiores a 4.

- Tolera concentraciones de cloruro sódico del 6% (p/v), viéndose reducido su crecimiento cuando esas concentraciones son superiores al 8%. Por encima de esa concentración salina, se inhibe completamente su crecimiento.

## Materiales y Métodos

### 3.1.1.1.4 Asimilación de fuentes de carbono de naturaleza no esteroídica

Fuente de carbono	<i>P. putida</i> DOC21	Fuente de carbono	<i>P. putida</i> DOC21
Acetato	++	3-Hidroxicinamato	+
Propionato	++	4-Hidroxicinamato	+
Octanoato	+++	Fenoxiacetato	-
Nonanoato	+++	Ciclohexilacetato	-
Decanoato	+++	Adipato	-
Succinato	++	Pimelato	-
Fumarato	++	Suberato	-
Malato	+++	Lactosa	-
Citrato	+++	Sacarosa	-
Gluconato	-	Maltosa	-
Fenilacetato	+++	D-Glucosa	+
3-Hidroxifenilacetato	-	D-Fructosa	+
4-Hidroxifenilacetato	+++	D-Sorbitol	-
Benzoato	-	D-Xilosa	+
2-Hidroxibenzoato	-	D-Glucuronato	+
3-Hidroxibenzoato	-	D-Sorbosa	-
4-Hidroxibenzoato	+++	D-Manitol	-
3-Fenilpropionato	+++	L-Arabinosa	-
3-Hidroxifenilpropionato	+++	L-Fucosa	-
4-Hidroxifenilpropionato	-	Glicerol	+++
L-Isoleucina	++	L-Histidina	++
L-Fenilalanina	+	Histamina	-
L-Tirosina	+++	Feniletilamina	-
L-Valina	+	Tiramina	+++
L-Metionina	-		

Tabla II. Crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* DOC21 en medio mínimo (MM) suplementado con ácidos grasos, intermediarios del metabolismo central u otros compuestos como única fuente de carbono a una concentración de 4 mM. El símbolo (+++) indica crecimiento óptimo; (++) crecimiento moderado; (+) crecimiento escaso y (-) crecimiento nulo.

## Materiales y Métodos

### 3.1.1.1.1 Asimilación de fuentes de carbono de naturaleza esteroídica

Fuente de carbono	<i>P. putida</i> DOC21
Colesterol	-
$\beta$ -Sitosterol	-
Estigmasterol	-
Ergosterol	-
Desoxicolato	+++
Colato	++
Quenodesoxicolato	+++
Litocolato	+++
Ursodesoxicolato	+++
Deshidrocolanato	+
5- $\beta$ - Colanato	-
Progesterona	-
Prednisona	-
5-Pregnen-3 $\beta$ -ol-20-ona	-
17- $\alpha$ -Metiltestosterona	-
1-Deshidro-17 $\alpha$ -metiltestosterona	-
Testosterona	+++
$\beta$ -Estradiol	-
<i>trans</i> - Deshidroandrosterona	-
Estrona	-
Dihidrotestosterona	+++
<i>trans</i> - Androsterona	-
4-Androsten-3,17-diona	+++

Tabla III. Crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* DOC21 en MM suplementado con diferentes compuestos esteroideos como única fuente de carbono a una concentración de 4 mM. El símbolo (+++) indica un buen crecimiento; (++) crecimiento moderado; (+) crecimiento escaso y (-) ausencia de crecimiento.

### 3.1.1.2 *Pseudomonas putida* U

Esta cepa pertenece a nuestra colección, y fue aislada originalmente por el Prof. R. A. Cooper (*Department of Biochemistry, University of Leicester, Leicester, U.K.*) a partir de lodos urbanos (Dagley & Gibson, 1964).



## Materiales y Métodos

---

El contenido de G + C del cromosoma de esta bacteria es del 60-62%. Se caracteriza por su capacidad para utilizar los ácidos fenilacético (AFA), 3-hidroxifenilacético (3-OHAFA) y 4-hidroxifenilacético (4-OHAFA) como única fuente de carbono.

### 3.1.1.3 *Pseudomonas putida* KT2440

Cepa derivada por mutación espontánea de la cepa *Pseudomonas putida* mt-2, un aislado medioambiental caracterizado por su capacidad para utilizar *m*-tolueno como única fuente de carbono (Bayley *et al.*, 1977).

El contenido de G+C en el cromosoma de esta bacteria es del 61,6%, valor similar al estimado para otras especies dentro de este mismo género. Es una cepa biológicamente segura con una gran aplicación en biotransformación, en biorremediación y en agricultura. *P. putida* KT2440 posee una elevada homología en su secuencia genómica con *P. putida* U, así como una alta similitud metabólica. Como rasgo distintivo frente a esta última, cabe reseñar que esta bacteria es incapaz de metabolizar 3-OH-AFA ó 4-OH-AFA, pero sí puede crecer en medios de composición definida que contienen AFA como única fuente de carbono (Luengo *et al.*, 2001).

### 3.1.1.4 *Pseudomonas putida* F1

Cepa aislada de un arroyo contaminado en Urbana (Illinois, EE.UU.) y caracterizada por ser capaz de crecer en presencia de hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno y etilbenceno como única fuente de carbono (Wackett & Gibson, 1988), por lo que presenta una alta utilidad en el campo de la biorremediación.

El contenido de G+C en el cromosoma de esta bacteria es del 61,9%, valor similar al estimado para otras especies dentro de este mismo género. Posee una elevada homología en su secuencia genómica con *P. putida*

## Materiales y Métodos

---

KT2440, aunque no tiene la capacidad de crecer en medios de composición definida cuya única fuente de carbono sea el AFA o algún derivado hidroxilado del mismo.

### 3.1.2 ESTIRPES BACTERIANAS PERTENECIENTES A LA ESPECIE *Escherichia coli*

#### 3.1.2.1 *Escherichia coli* DH10B

Cepa empleada en los experimentos rutinarios de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (superior a  $1 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN). Posee una deleción en el gen *lacZ*, por lo que al carecer de actividad  $\beta$ -galactosidasa hace que sea una cepa idónea para la selección de plásmidos de selección blanco/azul por  $\alpha$ -complementación (por ejemplo los de la serie pBlueScript) (Grant *et al.*, 1990).

Esta cepa también fue transformada con el vector suicida pGS9, que presenta el transposón Tn5, para ser utilizada como donadora en los experimentos de mutagénesis mediada por este transposón.

Genotipo de *E.coli* DH10B: F<sup>-</sup>, *mcrA*,  $\Delta(mrr\text{-}hsd\text{ RMS-}mcrBC)$ ,  $\Delta\text{Ø80d}lacZ1M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*,  $\Delta(ara, leu)7697$ , *galU galK*,  $\lambda^-$ , *rpsL*, *nupG*.

## Materiales y Métodos

---

### 3.1.2.2 *Escherichia coli* HB101

Esta cepa se utilizó como hospedadora del vector pRK600, el cual facilita la movilización de aquellos plásmidos que carezcan de los genes *mob*. Debido a esta característica, fue empleada como cepa auxiliar en experimentos de conjugación triparental (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969).

Genotipo *E. coli* HB101 : F,  $\Delta(gpt-proA)62$  *leuB6*, *supE44*, *ara-14*, *galK2*, *lacY1*,  $\Delta(mcrCmrr)$ , *rpsL20(Smr)*, *xyt-5mtl-1*, *recA13*.

## 3.2 VECTORES UTILIZADOS

### 3.2.1 PUC18 Y PUC19

Son vectores plasmídicos de clonación que se mantienen en el hospedador en alto número de copias y su tamaño es de 2,8 kb. Contienen el replicón pMB1 y el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli*. Como marcador genético de selección poseen un gen de resistencia a ampicilina. Los números 18 y 19 hacen referencia a la orientación de las dianas de restricción zona de clonación múltiple (MCS o *polylinker*) con respecto al extremo 5' del gen *lacZ*. La clonación de cualquier fragmento de ADN en este plásmido hará que el gen de la  $\beta$ -galactosidasa no se exprese, lo que permite una fácil y rápida identificación de aquellas colonias que posean el vector con el inserto mediante selección blanco/azul al ser cultivadas en los medios apropiados (Norrander *et al.*, 1983).

### 3.2.2 PGS9

Plásmido suicida en *Pseudomonas putida* que actúa como donador del transposón Tn5. Este plásmido tiene un tamaño de 30,2 kb y contiene el replicón P15A y el sistema de conjugación bacteriana N-*tra*. Posee como marcadores genéticos un gen de resistencia a cloranfenicol y otro de resistencia a kanamicina (codificado dentro del transposón Tn5), lo que permite una rápida selección de las cepas que lo han incorporado (Selvaraj & Iyer, 1983).

### 3.2.3 PRK600

Plásmido auxiliar utilizado en algunos sistemas de conjugación para movilizar plásmidos *mob*<sup>+</sup> defectivos en la función *tra* (por ejemplo, el plásmido pJQ200SK). Presenta el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E.coli* (Herrero *et al.*, 1990). Es el plásmido que alberga la cepa auxiliar en los mating triparentales.

### 3.2.4 pGEM<sup>®</sup>-T EASY

Plásmido comercial distribuido la compañía Promega (EE.UU.) como vector linearizado. Se mantiene en el hospedador en alto número de copias. Su tamaño es de 3015 pb y se utiliza rutinariamente para la clonación directa de los productos de amplificación obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los amplicones resultantes usando Taq polimerasa, poseen en sus extremos 3' un resto libre de adenina, mientras que el pGEM<sup>®</sup>-T Easy es un plásmido abierto que presenta restos de timina en sus extremos 3', lo que permite su ligación de extremos cohesivos. Este

## Materiales y Métodos

---

plásmido presenta el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli* y posee los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa flanqueando el sitio de clonación múltiple, que se encuentra situado dentro de la región que codifica el péptido LacZ $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa. La clonación de cualquier fragmento de ADN dentro de este MCS hará que el la  $\beta$ -galactosidasa se exprese truncada lo que permite la identificación de las colonias que posean el vector con el inserto mediante simple selección blanco/azul al ser cultivada en medios suplementados con X-gal. También porta una copia del gen de una  $\beta$ -lactamasa, lo que confiere a la cepa portadora resistencia a ampicilina.

### 3.2.5 pTZ57R/T

Plásmido comercial distribuido por Thermo Fisher Scientific (EE.UU.), de características similares al pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Se mantiene en el hospedador en alto número de copias. Su tamaño es de 2886 pb y se utiliza rutinariamente para la clonación directa de los productos que han sido amplificados mediante PCR con *Taq* u otras ADN polimerasas que añadan una adenina adicional a los extremos de los productos de PCR permitiendo de este modo la clonación TA. Posee el promotor T7 de la ARN polimerasa, bajo el cual se expresa el gen clonado, y se encuentra situado dentro de la región que codifica el péptido LacZ $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa, lo que permite selección blanco/azul de los clones que han incorporado el fragmento. También porta el gen de una  $\beta$ -lactamasa, lo que aporta a la cepa portadora resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

## Materiales y Métodos

---

### 3.2.6 PJQ200 (KS/SK)

Plásmido que se mantiene en alto número de copias con un tamaño de 5370 pb. Posee el origen de replicación p15A compatible con los sistemas de *E. coli*, pero que no es reconocido por gran parte de las bacterias G- entre las que se incluye el género *Pseudomonas*, donde actúa como un plásmido integrativo. Presenta como marcadores de selección un gen de resistencia a gentamicina y el sistema *lacZ* $\alpha$  que permite la selección blanco/azul de los fragmentos clonados. Además, este plásmido es movilizable e incorpora el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es inducido por sacarosa y cuya expresión resulta letal en bacterias G-. Las siglas KS/SK indican la orientación del MCS derivado del plásmidos pBluescript II. Este plásmido se utiliza para obtener mutantes de delección de algún gen en *P. putida* DOC21 mediante un proceso de doble recombinación en dos pasos, seleccionando en cada uno de ellas los clones resistentes a gentamicina y los recombinantes que han perdido el gen letal de la sacarasa (Quandt & Hynes, 1993).

### 3.2.7 PBBR MCS-3

Plásmido de bajo número de copias que posee un tamaño de 5,2 kb y amplio rango de hospedador. Presenta el origen de replicación *oriBBR1* que le confiere capacidad de replicarse autónomamente en multitud de cepas bacterianas, incluidas *E. coli*, *P. fluorescens* y *P. putida*. Este plásmido es movilizable y compatible con plásmidos pertenecientes a los grupos IncP, IncQ e IncW, así como con aquellos que poseen los orígenes de replicación ColE1 y p15a. Presenta como marcador genético un gen de resistencia a tetraciclina y permite la selección directa por sistema blanco/azul de los recombinantes en *E. coli* mediante interrupción del péptido LacZ $\alpha$  (Kovach *et al.*, 1995).

## Materiales y Métodos

---

El plásmido pBBR1MCS-3 deriva del plásmido pBBR1MCS, el cual se obtuvo por modificación del plásmido pBBR1, al que se incorporó el sitio múltiple de clonación de pBluescript® IKS. De este modo, la nueva construcción contenía un MCS con 16 sitios únicos de restricción, el gen *lacZ* $\alpha$  interrumpido y mantenía el marcador de selección original (un gen de resistencia a cloranfenicol). Debido a que este marcador de selección limitaba el uso en muchos microorganismos Gram negativos, se generaron cuatro plásmidos derivados del pBBR1MCS con resistencias a cuatro antibióticos diferentes (tetraciclina, gentamicina, ampicilina y kanamicina).

El pBBR1MCS-3, plásmido con resistencia a tetraciclina, al que nos referiremos en adelante como pMC, se utiliza habitualmente para la expresión heteróloga de genes en *trans* en *P. putida* DOC21.

### 3.3 REACTIVOS QUÍMICOS

Todos los productos químicos utilizados han sido distribuidos por alguna de las siguientes casas comerciales: Alfa Aesar (EE.UU.); Bachem AG. (Suiza); Bio-Rad (EE.UU.); Carlo Erba (Italia); Conda-Pronadisa (España); Difco (EE.UU.); Merck (Alemania); Panreac (España); Probus (España); Promega Co. (EE.UU.); Roche (Alemania); Sigma-Aldrich Co. (EE.UU.); y Thermo Fisher Scientific (EE.UU.).

Los diferentes compuestos esteroideos empleados en los experimentos, como los ácidos desoxicólico, cólico, quenodesoxicólico, litocólico, ursodesoxicólico, 5- $\beta$ -colánico, testosterona, progesterona,  $\beta$ -estradiol, 5-pregnen-3 $\beta$ -ol-20-ona, prednisona, estrona, androstanolona, *trans*-androsterona, *trans*-deshidroandrosterona, estigmasterol, deshidrocolánico, 1-deshidro-17 $\alpha$ -metiltestosterona, 17- $\alpha$ -metiltestosterona, 4-androsten-

## Materiales y Métodos

---

3,17-diona (AD), ergosterol,  $\beta$ -sitosterol o colesterol fueron adquiridos a la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (EE.UU.).

Los reactivos utilizados en los experimentos de Biología Molecular procedían de diferentes casas comerciales, entre las que caben citarse: Promega Co. (EE.UU), Roche (Alemania) y Takara (Japón). La procedencia de ciertas enzimas fue: ADN polimerasa termoestable de *Thermus thermophilus*, *Taq* polimerasa, de Biotools (España); *Pfu* ADN polimerasa, de *Pyrococcus furiosus* de Promega (EE.UU.); ADN ligasa del fago T4 de Takara (Japón); fosfatasa alcalina de gamba USB<sup>®</sup>Affymetrix (EE.UU.) y fosfatasa alcalina de intestino de ternera de Roche (Alemania). El marcador de peso molecular, *1kb DNA ladder plus*<sup>®</sup> se adquirió en la casa comercial Invitrogen Corporation (EE.UU.).

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación génica mediante técnicas de PCR fueron sintetizados por las casas comerciales Biomers (Alemania) o Roche (Alemania).

Los diferentes reactivos utilizados en los procesos de manipulación de ácidos nucleicos como la extracción de ADN plasmídico y cromosómico, la limpieza de las reacciones enzimáticas o de los productos obtenidos mediante PCR o la recuperación de fragmentos de ADN procedentes de muestras electroforéticas de geles de agarosa, fueron adquiridos a las casas comerciales Promega (USA) y Quiagen (Alemania).



## Materiales y Métodos

---

### 3.4 MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.4.1 MEDIO LURIA-BERTANI (LB) (Miller, 1972).

Se ajusta el pH a 7,5 previamente a la esterilización en autoclave. Para preparar medio LB sólido se añadió agar al 2% (p/v).

Medio Luria Bertani (LB)	
Bacto-triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

#### 3.4.2 MEDIOS KING (King *et al.*, 1954).

Estos medios de cultivo se utilizan para discriminar entre cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* en función de su capacidad para producir diferentes pigmentos. El medio King A o Agar *Pseudomonas* P estimula la producción de piocianina e inhibe la síntesis de pioverdina (fluoresceína), mientras que el King B o Agar *Pseudomonas* F actúa de manera inversa, estimulando la producción de pioverdina y reprimiendo la de piocianina.

Estos medios se preparan agua destilada ajustando el pH a 7. Ambos medios requieren la adición de 10 ml de glicerol previa a la esterilización en autoclave.

## Materiales y Métodos

King A	
Digerido pancreático de gelatina	20 g/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L
MgCl <sub>2</sub>	1,4 g/L
Agar	14 g/L

King B	
Peptona de carne	20 g/L
MgSO <sub>4</sub>	1,5 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g/L
Agar	14 g/L

### 3.4.3 MEDIO TRIPTICASEIN SOY BROTH (TSB)

Se ajusta el pH a 7 previamente a la esterilización en autoclave.

Medio Trypticasein Soy Broth (TSB)	
Digerido pancreático de caseína	17 g/L
Digerido papaínico de soja	3 g/L
NaCl	5 g/L
Fosfato dipotásico	2,5 g/L
Glucosa·H <sub>2</sub> O	2,5 g/L

## Materiales y Métodos

---

### 3.4.4 MEDIO TRIPTICASEIN SOY AGAR (TSA) (Sambrook, *et al*, 1989).

Se ajusta el pH a 7 previamente a la esterilización en autoclave.

Medio Trypticasein Soy Agar (TSA)	
Digerido pancreático de caseína	15 g/L
Digerido papaínico de soja	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L

### 3.4.5 MEDIO $\Phi$ .

Se ajusta el pH a 7,6 previamente a la esterilización en autoclave

Medio $\Phi$	
Bacto-triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
KCl	7,5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	4 g/L

## Materiales y Métodos

3.4.6 MEDIO MÍNIMO (MM) DE *Pseudomonas* (Martínez-Blanco *et al.*, 1990).

Se ajusta el pH a 7 previamente a la esterilización en autoclave. Para la preparación de medio sólido se añadió agar purificado al 2% (p/v). A este medio se le añadieron las fuentes de carbono precisadas en función del experimento que se fuese a realizar.

Medio mínimo (MM)	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	13,6 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 mg/L

3.4.7 MEDIO MÍNIMO CHOL1 (Philipp *et al.*, 2006)

Medio mínimo Chol1	
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (o $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	7,9(6,1) g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,1 g/L
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,1 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,37 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0015 g/L

## Materiales y Métodos

---

El medio Chol1 se suplementa con una mezcla de elementos traza (Bauchop & Elsdén, 1960):

SL10	
FeCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	1500 mg/L
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg/L
MnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	100 mg/L
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	190 mg/L
CuCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	2 mg/L
NiCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	24 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	36 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg/L
HCl 25 %	10 mL/L

A este medio suplementado con microelementos se le añadieron las fuentes de carbono precisadas en función del experimento que se fuese a realizar.

### 3.4.8 PREPARACIÓN DE COMPUESTOS ESTEROIDEOS PARA SER UTILIZADOS EN CULTIVOS O COMO FUENTE DE CARBONO.

El colesterol y algunos compuestos esteroideos como la testosterona, el  $\beta$ -estradiol o la estrona, presentan una solubilidad en agua casi nula y relativamente alta en solventes orgánicos. Esta cualidad impide que se repartan homogéneamente en el medio cuando se preparan en solución acuosa, generando turbidez, lo que impide la medición espectrofotométrica de los cultivos en medio líquido. Para solventar el problema, se utiliza un

## Materiales y Métodos

---

protocolo (Klein *et al.*, 1995), basado en la formación de complejos entre las moléculas de compuesto esteroideo y las de metil- $\beta$ -ciclodextrina (BCD). Este protocolo consiste en disolver 100 mg del compuesto esteroideo por cada 500  $\mu$ L de isopropanol-cloroformo (2:1 v/v). Esta solución se añade alícuotas de 200-300 $\mu$ L a otra preparada anteriormente consistente en 1g BCD disuelta en 11 ml de tampón salino fosfato (PSB) pH7. Esta adición se realiza en agitación y manteniendo la solución a una temperatura de 80°C. La solución final preparada siguiendo este protocolo varía según la masa molecular del compuesto esteroídico, por lo que el volumen a añadir posteriormente al medio de cultivo que ha de ser considerado. Las ciclodextrinas (Trappsol Randomly Methylated BCD Cyclodextrin) fueron adquiridas a la casa comercial Technologies Development Inc. (EE.UU.)

PSB (Tampón Fosfato salino) pH7 (200mL)	
NaHPO <sub>4</sub> 0.2M	39 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.2M	61 ml

Se ajusta con agua destilada hasta un volumen final de 200 ml.

### 3.5 ADITIVOS SUPLEMENTADOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO

Para la realización de algunos experimentos se requirió la adición de determinados antibióticos, aminoácidos y vitaminas a los medios de cultivo. En esos casos, se siguieron las recomendaciones de Sambrook y sus colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989).

## Materiales y Métodos

---

	Ampicilina (Ap)	Cloranfenicol (Cm)	Estreptomina (Str)	Gentamicina (Gtm)	Kanamicina (Km)	Rifampicina (Rf)	Tetraciclina (Tc)
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	200	90	10	30	12,5*	5**	25

\*En medio sólido la concentración utilizada fue 25 $\mu\text{g/mL}$

\*\* En medio sólido la concentración utilizada fue 20 $\mu\text{g/mL}$

Todos los antibióticos utilizados fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (EE.UU.).

Para la expresión de los sistemas basados en promotores del tipo *lac*, que reconocen la lactosa como inductor, se utilizó un análogo no metabolizable del inductor natural, el isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), adquirido a la casa comercial Bachem AG. (Suiza). La concentración final de IPTG en el medio de cultivo fue de 70  $\mu\text{M}$ .

Cuando se utilizaron vectores en los que la presencia del péptido  $\alpha$  de la proteína LacZ permitía una selección blanco/azul, se añadió a los medios de cultivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal), obtenido de la casa comercial Thermo Fisher Scientific (USA). La concentración final en el medio de cultivo fue de 34  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.6 MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Las cepas bacterianas se conservaron en placas de Petri selladas con Parafilm™ a 4°C durante dos semanas como máximo, o bien en una disolución agua/glicerol (50% v/v) a -80°C.

Para el cultivo de bacterias en medio sólido se utilizó medio LB o TSA para la propagación de cepas de *E. coli* (incapaces de crecer en MM) o medio mínimo suplementado con una fuente de carbono con una concentración de agar del 2% (p/v) para el crecimiento de los diferentes géneros de *Pseudomonas*. La misma estrategia se utilizó al llevar a cabo el cultivo en medio líquido de las diferentes cepas.

El mantenimiento de las cepas se realizó resemebrando periódicamente las mismas en placas de Petri Así, las cepas de *E. coli* se conservaron en placas con medio LB sólido. Sin embargo, las cepas de *P. putida* DOC21 y sus diferentes mutantes se conservaron en placas con MM suplementado con 4-OHAFAs como única fuente de carbono. De este modo, se facilitaba el crecimiento posterior en otros medios mínimos.

Para la realización de cultivos en medio líquido y la elaboración de curvas de crecimiento, se partió de placas de medio sólido crecidas en las condiciones anteriormente descritas, a partir de las cuales se procedió a inocular con los distintos microorganismos los diferentes medios líquidos. Las bacterias, que habían crecido durante 24 horas a 30°C, se resuspendieron en agua destilada estéril, ajustando la absorbancia a un valor absoluto de 1 (0,1 en una dilución 1/10), medido en un espectrofotómetro Beckman DU 640 a una longitud de onda de 540 nm. A cada matraz de vidrio, que contenía el medio deseado (1/5 del volumen del matraz), se le añadió el volumen necesario de esta suspensión bacteriana



## Materiales y Métodos

---

para que la densidad óptica (a 540 nm) inicial del cultivo fuese 0,05. Los matraces se incubaron en un agitador orbital *Innova* 4330 (New Brunswick Scientific) a 250 rpm y 30°C durante el tiempo requerido para cada experimento. La determinación de la cinética del crecimiento bacteriano se llevó a cabo midiendo la absorbancia de la suspensión de células a 540 nm periódicamente.

### 3.7 MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS Y/O TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ADN.

Todas las etapas del procesamiento de muestras que contenían ADN se llevaron a cabo utilizando materiales y reactivos estériles, evitándose de este modo la degradación y/o la contaminación de las muestras.

#### 3.7.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN.

Para llevar a cabo la medida de la concentración y la pureza de las muestras de ADN se utilizaron dos métodos:

El primer método consistía en la dilución de la muestra con agua estéril o con tampón TE (ver composición más abajo) entre 100 y 1000 veces, y la posterior medida de la absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 nm (se utilizó un espectrofotómetro Beckman, modelo DU 640). La concentración de la muestra fue calculada considerando que a una longitud de onda de 260 nm, una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 µg/ml. Una relación entre los valores de las

## Materiales y Métodos

---

absorbancias, medidas a 260 y a 280 nm, próxima a 2 indica un nivel óptimo de pureza de las muestras (Sambrook et al., 1989).

**Tampón TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM.

El segundo método consistía en la medida directa de la concentración de 1µL de muestra en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

### 3.7.2 DIGESTIÓN Y MODIFICACIÓN DEL ADN.

3.7.2.1 Protocolo general para la digestión del ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones de los fragmentos de ADN con enzimas de restricción se llevaron a cabo utilizando las soluciones amortiguadoras y siguiendo las condiciones recomendadas por las diferentes casas comerciales para cada enzima en particular.

Mezcla de reacción:

- 1/10 del volumen total de reacción de tampón de digestión (10x).
- X µg de ADN en H<sub>2</sub>O milliQ.
- 1-3 unidades de la endonucleasa de restricción/µg de ADN.
- H<sub>2</sub>O milliQ estéril hasta completar el volumen de digestión.

La mezcla de reacción se incubó a la temperatura adecuada durante 2-3 horas.

## Materiales y Métodos

---

### 3.7.2.2 Protocolo general de reacción de las enzimas de modificación del ADN usadas con mayor frecuencia

#### 3.7.2.2.1 Desforforilación del ADN

**1.-** El ADN (0,5 µg) se disolvió en 45 µL de H<sub>2</sub>O milliQ con 1/10 del volumen total de tampón de fosfatasa (10x), se calentó a 65°C durante 10 minutos para asegurar la completa disolución y la relajación del ADN y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

**2.-** Se añadieron 5 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) o de fosfatasa alcalina de gamba (SAP) y la mezcla de reacción se incubó durante 60-90 minutos a 37°C.

**3.-** La enzima se inactivó a 65°C durante 15 minutos y se eliminó la fracción proteica del ADN mediante fenolización, se precipitó a -20°C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M, pH 6,5, y con 2,5 volúmenes de etanol frío.

#### 2.7.2.2.2 Ligación de fragmentos de ADN.

**1.-** Se midieron las concentraciones (ng/µL) del ADN vector y del ADN utilizado como inserto, mediante un espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000.

**2.-** Se mezclaron cantidades del ADN vector y del ADN utilizado como inserto atendiendo a la siguiente ecuación:

$$(\text{longitud del inserto/longitud del vector}) \times \text{ng vector} \times 3 = \text{ng inserto}$$

## Materiales y Métodos

---

3.- Se añadió el agua milliQ estéril necesaria hasta alcanzar un volumen final de reacción de 10  $\mu$ L, y la mezcla se calentó a 65°C durante 15 segundos con el fin de relajar todos los fragmentos de ADN.

4.- Se añadieron 2  $\mu$ L de tampón de ligasa (10x), 1 unidad de DNA ligasa del fago T4 y agua milliQ hasta completar un volumen de 20  $\mu$ L.

5.- La mezcla de reacción se incubó a 16°C durante 12 horas (en los casos en los que se requería, la incubación se llevó a cabo a 4°C durante 12 horas). La reacción de ligación se transfirió a la cepa de *E. coli* adecuada siguiendo un protocolo estándar de transformación.

### 3.7.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

El análisis de las muestras de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración del gel se estableció en función del tamaño del fragmento de ADN que se pretendía analizar. Generalmente, se utilizaron geles al 0,8 % que nos permitían ver fácilmente fragmentos de entre 600 pb y 3000 pb. Cuando se trabajó con fragmentos más grandes (más de 10 kb) la concentración de agarosa podía llegar a ser del 0,6%. Para fragmentos inferiores a los 600 pb el porcentaje utilizado fue del 2%.

## Materiales y Métodos

---

### 3.7.3.1 Preparación de las muestras.

Las muestras se mezclaron con aproximadamente una quinta parte del volumen de tampón de carga (ver formulación más abajo) antes de proceder a depositarlo en el gel. Como marcador de tamaño se utilizó el 1 kb DNA ladder plus<sup>®</sup> (Invitrogen) a razón de unos 0,7 µg por carril.

**Tampón de carga:** azul de bromofenol al 0,25%, azul de xileno al 0,25% y sacarosa al 40%.

### 3.7.3.2. Preparación de los geles.

La preparación de los geles se llevó a cabo disolviendo, mediante calentamiento, la agarosa en TAE (ver composición abajo) y añadiendo aproximadamente 0,5 µg/mL de bromuro de etidio para visualizar las bandas de ADN mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

**TAE 50 x:** Tris base 242 g; ácido acético glacial 57,1 mL; EDTA 0,5 M pH 8 100 ml; agua destilada hasta 1L

**Bromuro de etidio:** Solución 10 mg/mL en H<sub>2</sub>O milliQ; se conserva protegido de la luz a 4°C.

### 3.7.3.3. Desarrollo de la electroforesis.

La electroforesis se realizó en buffer TAE, utilizando una fuente de alimentación BIO RAD PowerPac Basic<sup>™</sup> y aplicando una diferencia de potencial de 100V durante el tiempo adecuado para obtener una correcta resolución de las bandas de ADN.

### 3.7.4. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE *Pseudomonas putida*.

Para el aislamiento de ADN genómico en esta cepa, el protocolo que se siguió fue el siguiente:

1.- Se inocularon 50 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina con la cepa *Pseudomonas putida* DOC21. Este cultivo se incubó toda la noche a 30°C.

2.- Las células se recogieron por centrifugación a 4000g durante 10 minutos a 4°C y el precipitado bacteriano se resuspendió en 20 mL de solución GTE. A continuación, se añadieron 20 mg de lisozima y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

<b>Disolución GTE:</b> Tris-HCl 25 mM pH 8; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM
---

3.- Se añadieron 2 mL de SDS 10% para que la solución final fuera del 1%. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

4.- Transcurrido este tiempo, se añadieron 300 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C.

5.- A continuación, se añadieron 550 µL de NaCl 4 M de modo que la concentración final fuese 0,1 M.

6.- El ADN se extrajo con un volumen de fenol neutro dos veces. A continuación, con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (ver

## Materiales y Métodos

---

composición más abajo), otras dos veces; y, por último, con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico, conservando la fase acuosa en todos los casos.

**Fenol neutro:** antes de utilizar el fenol para extraer los ácidos nucleicos, debe ser equilibrado a pH 7,8, para lo cual, se siguió el siguiente protocolo:

1. Fundir el fenol a 68°C y añadir hidroxiquinoleína a una concentración final de 0,1%.
2. Añadir 1 volumen de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 8 y mezclar durante 15 minutos. Dejar reposar y cuando las dos fases se hayan separado, eliminar la mayor cantidad posible de tampón.
3. Añadir 1 volumen de tampón Tris HCl 0,1 M, pH 8 y proceder como en el paso anterior.
4. Añadir 1/10 de volumen de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8 conteniendo 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol y conservar a 4°C.

**Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico:** Mezcla de fenol (equilibrado con tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 8) cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1.

**Cloroformo: alcohol isoamílico (CIA):** Mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1.

**7.-** Se añadieron lentamente 2,5 volúmenes de etanol frío (100%; -20°C) procurando en todo momento que no se mezclaran el etanol y la fase acuosa. Las dos fases se mezclaron suavemente, hasta que se apreció la aparición de un ovillo de ADN. Este ovillo se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur previamente cerrada en su extremo más fino.

## Materiales y Métodos

---

**8.-** El ADN se lavó con etanol al 70% y frío (-20°C) para eliminar el exceso de sales y posteriormente se dejó secar al aire.

**9.-** Una vez evaporada la solución etanólica, el ADN fue resuspendido en 5 ml de tampón TE.

<b>TE:</b> Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8.
---

Cuando se emplearon *kits* comerciales (Quiagen) para el aislamiento de ADN genómico, se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante.

### 3.7.5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*.

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando *kits* comerciales (Promega o Quiagen) que permiten la purificación de ADN plasmídico de forma sencilla y rápida, tanto a pequeña como a gran escala. Para ello, con la ayuda de un palillo estéril, se inoculó con una única colonia 10 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado. Los tubos se incubaron a 37°C con agitación (250 rpm) durante un mínimo de 8 horas. Las células fueron recogidas por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. Después, se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante en función del *kit* utilizado. El fundamento del proceso se resume a continuación:

**1.-** Recolección de las células y resuspensión de las mismas en un tampón que contiene RNAsa.

**2.-** Lisis alcalina de las células en presencia de SDS.



## Materiales y Métodos

---

**3.-** Neutralización del lisado con acetato potásico pH 6-6.5 de elevada concentración (4-6 M).

**4.-** Eliminación de los restos celulares, ADN genómico y proteínas, por centrifugación.

**5.-** Retención específica del ADN, mediante interacciones de tipo hidrofóbico, sobre una resina contenida en el interior de una columna. La elevada fuerza iónica de la solución favorece el establecimiento de estas interacciones hidrofóbicas.

**6.-** Lavado del sistema resina-ADN plasmídico con una solución etanólica.

**7.-** Secado de la columna por centrifugación.

**8.-** Elución del ADN mediante la adición de agua milliQ o un tampón de baja fuerza iónica (TE) sobre la resina.

### 3.7.6. RECUPERACIÓN DEL ADN DESDE LOS GELES DE AGAROSA.

Al igual que sucedía para la extracción de plásmidos, la recuperación del ADN desde geles de agarosa se realizó por medio de *kits* comerciales (Quiagen). La mayoría de ellos están basados en la purificación del ADN por interacción hidrofóbica con una resina específica que se suministra, bien en suspensión, o bien empaquetada en minicolumnas. En un paso previo a la purificación, la agarosa que contenía el ADN se disolvía por calentamiento moderado (50-65°C) en presencia de una solución salina concentrada (p.e. KI 6M). A continuación, el ADN era retenido sobre la resina. El sistema

## Materiales y Métodos

---

resina-ADN era lavado con una solución etanólica para, posteriormente, ser eluido mediante la adición de agua milliQ.

### 3.8 TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli*.

Para que las bacterias admitan ADN exógeno (proceso de transformación) han de estar en un estado de receptividad denominado competencia.

#### 3.8.1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* POR EL MÉTODO DEL CLORURO DE RUBIDIO.

Este método ha sido el empleado para obtener células competentes de la cepa *E. coli* DH10B. Siguiendo ese protocolo se consigue una elevada eficiencia de transformación (hasta  $10^8$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN). El procedimiento citado consiste en:

**1.-** La cepa de *E. coli* DH10B se cultivó en medio LB sólido durante 12-14 horas.

**2.-** Se preparó un preinóculo en 100 mL de medio  $\Phi$  líquido sembrado con una colonia aislada. Se incubó a 37°C en agitación (250 rpm) hasta que el cultivo alcanzó un crecimiento adecuado para proceder al inóculo de dos matraces de 2,5 L con 500 mL de medio  $\Phi$  cada uno. Estos matraces se incubaron a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,4-0,5 a 600 nm medida en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU640. Una vez alcanzada esa absorbancia el cultivo se enfrió durante 30 minutos en hielo.

## Materiales y Métodos

---

**3.-** Las células se recogieron sometiéndolas a centrifugación durante 5 minutos a 5000g a 4°C.

**4.-** El sedimento celular resultante se resuspendió en solución Tfb1 (1/3 del volumen inicial) y las bacterias se mantuvieron durante 30 minutos en hielo.

**Disolución Tfb1:** RbCl 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; acetato potásico 30 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; glicerol al 15% (v/v). Ajustar el pH a 5,8 acético acético 0,2 M. Esterilizar por filtración.

**5.-** La suspensión anterior en Tfb1 se centrifugó 5 minutos a 5.000 x g a 4°C. El sedimento bacteriano se resuspendió en solución Tfb2 (1/12,5 del volumen inicial) y se mantuvo en hielo durante 15 minutos.

**Solución Tfb2:** MOPS 10 mM pH 7; RbCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; glicerol al 15% (v/v). Ajustar el pH a 6,8 con NaOH y esterilizar por filtración.

**6.-** Las células competentes resultantes pueden ser usadas inmediatamente o bien conservarse (convenientemente repartidas en alícuotas de 200 µL preparadas para su uso en el protocolo de transformación por choque térmico) a -80°C, previa congelación en nitrógeno líquido o en un baño de hielo seco/etanol.

### 3.8.2 PROCEDIMIENTO DE TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* se ha seguido el método del choque térmico descrito por Hanahan (Hanahan, 1983):

## Materiales y Métodos

---

**1.-** El ADN (en un volumen no superior a 10  $\mu\text{L}$ ) se añadió a 200  $\mu\text{L}$  de una suspensión de células competentes y la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos.

**2.-** A continuación, las células se sometieron a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a una temperatura de 37°C durante 2 minutos, ó a 42°C durante 45 segundos, dependiendo de la cepa de *E. coli* que se esté utilizando como hospedador del ADN exógeno. Posteriormente, se enfriaron en hielo durante 2 minutos y luego se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de medio LB.

**3.-** Las células se incubaron durante 1 hora a 37°C, con el fin de reconstituir las membranas.

**4.-** Por último, se sembraron alícuotas de 200-250  $\mu\text{L}$  en placas de LB-agar que contenían el antibiótico usado para la selección. Las placas se mantuvieron a 37°C durante 12 horas o durante el tiempo necesario para observar la aparición de colonias, las cuales, bajo la presión selectiva del correspondiente antibiótico, expresan el marcador de selección existente en el plásmido que han incorporado. La eficacia de transformación obtenida por este método fue del orden de  $10^6$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico.

### 3.9 TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa descrita por K. Mullis (Mullis *et al.*, 1992) permite amplificar un fragmento de ADN a partir de dos oligonucleótidos (3' y 5') que hibridan en los extremos del fragmento que se pretende amplificar y que actúan como cebadores. La reacción está catalizada por una ADN polimerasa termoestable.

## Materiales y Métodos

---

Para la reacción de PCR se usaron dos ADN polimerasas termoestables:

**Taq polimerasa** procedente de *Thermus aquaticus* (Biotools). Es una polimerasa termoestable, de alta procesividad, pero que carece de actividad correctora de copia. Los productos de PCR generados al amplificar utilizando esta enzima, pueden ser directamente clonados en los plásmidos comerciales pGEM<sup>®</sup>-T Easy y pTZ57R/T.

**Pfu polimerasa** procedente de *Pyrococcus furiosus* (Promega). Esta enzima posee actividad correctora de copia (*proofreading*), pero no deja restos de adenina en los fragmentos amplificados por PCR, lo que imposibilita la clonación de los fragmentos obtenidos en los plásmidos pGEM<sup>®</sup>-T Easy y pTZ57R/T. Además, esta enzima no tiene una procesividad tan elevada como la Taq polimerasa.

A continuación se indica la mezcla de la reacción de PCR empleada, para un volumen final de 50  $\mu$ L.

Mezcla de reacción	Concentración final
5 $\mu$ L de tampón (10X) de la polimerasa	1X
2 $\mu$ L de Cl <sub>2</sub> Mg (50mM)	2mM
4 $\mu$ L de mezcla de desoxinucleótidos (2,5mM)	0,4mM
5 $\mu$ L del oligonucleótido 5' (2 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ M
5 $\mu$ L del oligonucleótido 3' (2 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ M
5 $\mu$ L de ADN molde (25ng/ $\mu$ L)	2,5ng/ $\mu$ L
1 unidad de ADN polimerasa	

## Materiales y Métodos

---

Rutinariamente, la PCR se realizó durante 35 ciclos en los que la temperatura de desnaturalización del ADN (95°C) se mantuvo durante 30 segundos. El anillamiento de los oligonucleótidos se realizó a una temperatura que dependía de la naturaleza de los propios cebadores, es decir, de la T<sub>m</sub> específica (utilizando siempre la menor T<sub>m</sub> de los pares de oligonucleótidos) y la extensión se realizó a 72°C, temperatura óptima de la polimerasa (a 68°C en el caso de la *Pfu*). El tiempo de extensión se determinó en cada caso, considerando que la polimerasa sintetizaba una molécula de 1 kb de longitud en un minuto. Así mismo, en el protocolo seguido se agregó una etapa inicial de desnaturalización a 95°C y una etapa final de extensión a 72°C. En algunas ocasiones fue necesario modificar las condiciones de PCR en función de la longitud del fragmento a amplificar, de la temperatura de anillamiento de los cebadores, de la presencia de estructuras secundarias, etc.

Los termocicladores utilizados fueron el modelo Gene Amp PCR Sistema 2400 suministrado por la casa comercial Perkin Elmer (EE.UU.); el modelo 2720 de Applied Biosystems (USA); y el modelo MJ Mini<sup>TM</sup> Gradient de Bio-Rad (USA).

### 3.10 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE ADN.

La secuenciación de ADN fue llevada a cabo por la empresa Secugen, S.L. (Sequencing and Molecular Diagnostic, Madrid, España). Las secuencias obtenidas experimentalmente fueron comparadas frente a otras depositadas en las bases de datos públicas de GenBank (National Center for Biotechnology Information) (Benson *et al.*, 2000), EMBL/EBI Nucleotide Sequence Database (Stoesser *et al.*, 2001) y DNA Data Bank of Japan (Tateno *et al.*, 1998), utilizando los programas BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTN (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) y Fasta3 (Pearson, 1990; Pearson & Lipman, 1988). Los alineamientos múltiples se realizaron

## Materiales y Métodos

---

con los programas ALING (Wilbur & Lipman, 1983) y ClustalX o ClustalW (Thompson *et al.*, 2002).

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas fueron analizadas empleando las herramientas disponibles en el servidor de Biología Molecular del Swiss Institute of Bioinformatics (EXPASy) (Hochstrasser *et al.*, 1995).

Los esquemas comparativos de las diferentes organizaciones génicas (*clusters*) se realizan mediante la utilización del programa informático *Redasoft Visual Cloning* 2000. El cálculo de la masa molecular de las distintas proteínas se dedujo a partir de las secuencias de aminoácidos utilizando el servidor SMS (Sequence Manipulation Suite).

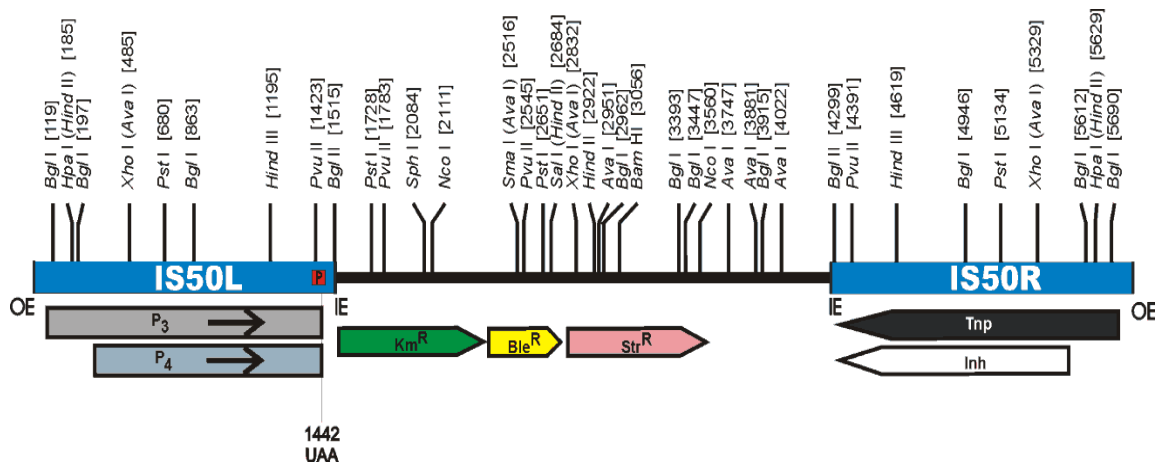
### 3.11 OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *P. putida* DOC21.

#### 3.11.1 MUTAGÉNESIS CON EL TRANSPOSÓN Tn5 (Norlander *et al.*, 1983).

Las cepas bacterianas utilizadas en este proceso fueron *E. coli* DH10B (portadora del plásmido pGS9) como cepa donadora del transposón Tn5 (Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>), *P. putida* DOC21 como cepa receptora (Ap<sup>R</sup>) y la *E. coli* HB101 como cepa ayudante (Cm<sup>R</sup>) (portadora del plásmido pRK600, el cual contiene los genes necesarios para la transferencia de ADN desde la cepa donadora a la receptora) (Fig. 16).

Este método ofrece ventajas tales como:

- (i) el Tn5 se integra sólo una vez (y al azar) en el genoma de la bacteria receptora provocando mutaciones únicas y puntuales.
- (ii) causa una mutación estable.
- (iii) el punto de inserción puede ser identificado fácilmente.



**Figura 16.** Mapa genético y de restricción del transposón Tn5. Se observan las secuencias de inserción *IS50L* e *IS50R* flanqueando la zona central, en la que se encuentran los marcadores genéticos de este transposón (un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a bleomicina y un gen de resistencia a estreptomycina). También se observan los genes codificados en las secuencias *IS50* (transposasa, *tnp*; inhibidor de la transposasa, *inh*;  $p_3$  y  $p_4$ ).

El procedimiento que se siguió es el que se indica a continuación:

**1.-** Se resembraron en medio sólido LB suplementado con Km y Cm la cepa *E. coli* DH10B (pGS9) y en medio sólido LB suplementado con Cm la cepa *E. coli* HB101 (pRK600), y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La cepa *P. putida* DOC21 se resembró en medio mínimo sólido suplementado con 4-OHAFA como fuente de carbono y se incubó a 30°C durante 24 horas.

**2.-** Se inocularon 10 mL de medio líquido LB suplementado con Km y Cm con *E. coli* DH10B (pGS9) y otros 10ml de medio líquido LB suplementado con Cm con *E. coli* HB101 (pRK600), incubándose ambas cepas a 37°C durante 5 horas. Del mismo modo, se inocularon 10 mL de medio líquido LB, suplementado con Ap con *P. putida* DOC21, incubándose a 30°C durante 5



## Materiales y Métodos

---

horas. Previsiblemente, la densidad óptica final de estas cepas bacterianas a 540 nm, al cabo de 5 horas, ha de estar en torno a 2-2,5.

**3.-** Se centrifugó una alícuota con el mismo número de células de cada una de las cepas (proporción final de cada una de las bacterias 1:1:1), en un tubo Eppendorf estéril, a 12.000g durante 1 minuto, y se desechó el sobrenadante. Las bacterias se lavaron 3 veces con 1 mL de agua milliQ estéril, y se volvieron a centrifugar (12.000g, 1 minuto). El sobrenadante se desechó de nuevo y la mezcla de células se resuspendió en 50 µL de medio líquido LB.

**4.-** En una placa de medio LB sólido se dispuso un filtro bacteriológico de nitrocelulosa (Millipore) estéril de un tamaño de poro de 0,22 µm sobre el que se depositó la mezcla de bacterias resuspendida (*E. coli* DH10B pGS9, *E.coli* HB101 pRK600 y *P. putida* DOC21). La placa se incubó durante 12 horas a 30°C.

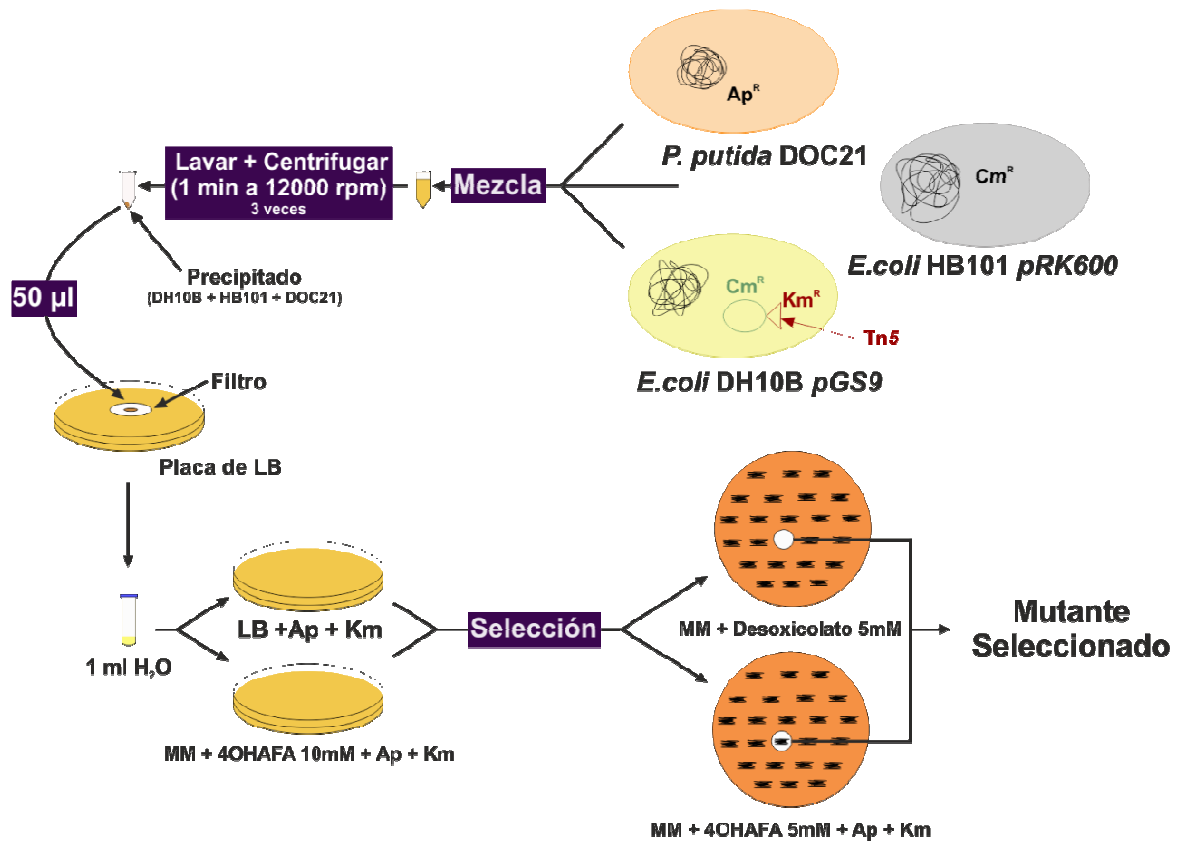
**5.-** Una vez que las células habían crecido sobre el filtro, éste se retiró de la placa y se introdujo en un tubo estéril que contenía 1 mL de agua milliQ, sin antibióticos, y se resuspendieron las bacterias.

**6.-** A partir de esta suspensión bacteriana se inocularon placas de LB y MM 4-OHAFa suplementados con Ap y Km (a las concentraciones anteriormente indicadas) a razón de 300 µl por placa. En estas placas no podían crecer las cepas parentales, ya que no tenían resistencia a alguno de los dos antibióticos; sin embargo, sí lo hacían los mutantes de *P. putida* DOC21 ya que, además de la resistencia a ampicilina que presentan *per se*, poseían la resistencia a kanamicina adquirida a través del transposón Tn5.

**7.-** Los transconjugantes que aparecieron en estas placas tras 48 horas de incubación a 30°C, fueron seleccionados por crecimiento en medios

## Materiales y Métodos

mínimos de composición definida (MM) con la fuente de carbono requerida para cada experimento y suplementado con Ap y Km. (Fig. 17).



**Figura 17.** Esquema del proceso de mutación mediante conjugación e inserción del transposón Tn5 en *P. putida* DOC21. En este ejemplo se seleccionaría un mutante en el que el Tn5 se ha insertado en un gen implicado en el catabolismo de desoxicolato sódico.

### 3.11.1.1. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el ADN genómico.

Una vez obtenidos los diferentes mutantes por inserción del transposón Tn5, era necesario conocer qué gen había sido interrumpido. El

## Materiales y Métodos

---

procedimiento tradicional seguido con los diferentes mutantes fue el siguiente:

**1.-** Se obtuvo ADN genómico del mutante objeto de estudio.

**2.-** Este ADN se digirió con una endonucleasa de restricción que tuviera una frecuencia de corte no muy elevada en el genoma de *P. putida* DOC21 y que no cortara dentro de la resistencia de Km en el transposón, ya que esta resistencia será utilizada como marcador de selección. Algunas de las enzimas que cumplían ambos requisitos eran *Bam*HI y *Sal*I, aunque también se hicieron combinaciones utilizando estas enzimas junto con *Eco*RI, *Sac*I o *Xba*I.

**3.-** Una vez digerido el ADN, se procedió a limpiar la digestión y posteriormente se ligó en el plásmido pUC18 previamente digerido con la enzima seleccionada y desfosforilado para evitar religaciones.

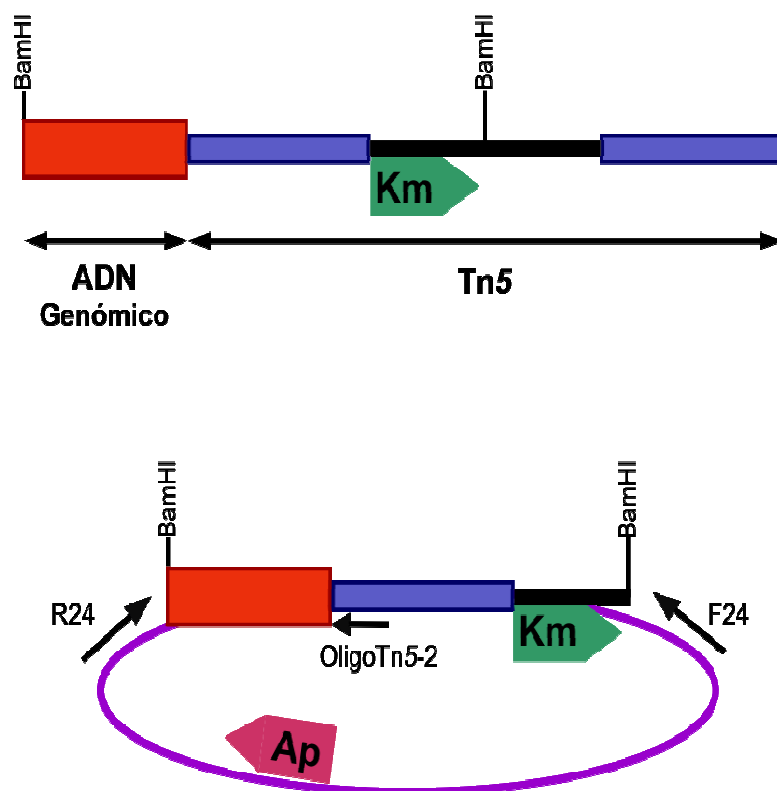
**4.-** La reacción de ligación se incubó a 16°C durante 12 horas y, posteriormente, se utilizó para transformar la cepa *E. coli* DH10B.

**5.-** La selección de los transformantes se llevó a cabo en medio LB suplementado con los antibióticos Ap y Km. De este modo, sólo serían capaces de crecer aquellas cepas que hubieran incorporado el plásmido pUC18 que llevase el fragmento de ADN directamente unido al transposón, pues serían los únicos que poseerían la resistencia a Km (Tn5) y Ap (pUC18).

**6.-** Una vez seleccionados estos transformantes, se obtuvo el ADN plasmídico de cada uno de ellos y se secuenció el inserto que había sido clonado en el *polylinker* del vector pUC18. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos universales directo (F24 5'-CGCCAGG GTTTTCCCAGTCACGAC-3') y reverso (R24 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAG GA-3') (del vector pUC18) y un

## Materiales y Métodos

oligonucleótido específico que anilla en el extremo del brazo del transposón Tn5 (Tn5-2 5'-CCGCCGAAGAGAA CAGGC-3') (Fig. 18). El análisis de la secuencia obtenida nos permitió identificar en qué gen se había introducido el transposón Tn5.



**Figura 18.** Procedimiento esquemático para la identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el ADN genómico de *P. putida* DOC21.

3.11.1.2. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el ADN genómico mediante la estrategia de "recombinación en el brazo del Tn5".

A partir del momento en que se desarrolló en nuestro laboratorio la estrategia de "recombinación en el brazo del Tn5", ésta se convirtió en la técnica seguida para analizar de forma específica qué gen estaba

## Materiales y Métodos

---

interrumpido en los mutantes. A partir de la información obtenida, se abordó la secuenciación de las zonas adyacentes al punto de inserción del Tn5 con el objeto de caracterizar los genes que codificaban todas las actividades implicadas en el catabolismo del desoxicólico.

Mediante esta estrategia se ha identificado el punto de inserción del transposón Tn5 en los mutantes obtenidos en este trabajo. La principal ventaja de la utilización de esta estrategia frente a la utilización del método tradicional, es que nos puede proporcionar información de la secuencia localizada a ambos lados del transposón Tn5. Además, esta técnica permite la obtención de clones conteniendo fragmentos de ADN genómico de mayor tamaño.

En términos generales, esta técnica se basa en la recombinación homóloga de un vector de clonación sobre una de las secuencias repetidas invertidas (Fig. 16) (secuencias *IS50*, "brazos" del transposón) presentes en ambos extremos del Tn5 (Reznikoff, 1993). Teniendo en cuenta que ambas secuencias son idénticas (salvo en un nucleótido), un plásmido suicida que contenga una secuencia homóloga a la de estas secuencias, tendría las mismas posibilidades de insertarse, mediante un fenómeno de recombinación homóloga, sobre cualquiera de los dos extremos del transposón. Esto implicaría que, estadísticamente, la mitad de las colonias que se obtuvieran habrían recombinado sobre la secuencia *IS50R* y la otra mitad de las colonias lo harían sobre la secuencia *IS50L*. Utilizando un proceso de restricción con endonucleasas específicas (ver más adelante) se podrá obtener, a partir del cromosoma de cada uno de los posibles mutantes, las secuencias adyacentes al punto de inserción del transposón Tn5, tanto las que se encuentran corriente arriba como aquellas que se encuentren en dirección 3' respecto a dicho punto de inserción.

## Materiales y Métodos

---

Para llevar a cabo esta técnica en los distintos mutantes se diseñó un plásmido en el que, utilizando el esqueleto del vector pJQ200KS (portador de un gen de resistencia a gentamicina), se clonó, utilizando las dianas de restricción *Apa*I/*Sa*I, un fragmento de 1113 pb correspondiente a un trozo de una de las secuencias de inserción ("brazos") del transposón Tn5. Este plásmido, denominado pJQ-Tn5, poseía, flanqueando al brazo del Tn5 las siguientes dianas de restricción (que no estaban presentes en el interior del brazo ni del plásmido): *Bam*HI, *Xba*I, *Sma*I y *Sa*I. El proceso seguido, se detalla a continuación.

**1.-** La construcción, que contenía el fragmento del brazo del transposón se transfirió por conjugación triparental a los diferentes mutantes de *P. putida* DOC21. Para ello se utilizó como cepa donadora una *E. coli* DH10B, previamente transformada con la construcción pJQ-Tn5. Como cepa auxiliar se utilizó la cepa *E. coli* HB101 conteniendo el plásmido pRK600 que facilita la movilización de aquellos plásmidos que contengan los genes *mob*. Para llevar a cabo esta conjugación triparental se mezclaron distintas cantidades de cada una de estas tres cepas (receptora, auxiliar y donadora en proporción 1:1:1) en un tubo Eppendorf estéril. Se centrifugó la mezcla de bacterias (12000g, 1 minuto) y se desechó el sobrenadante. Las células así precipitadas se lavaron dos veces con 1 ml de agua milliQ estéril, volviéndose a centrifugar (12000g, 1 minuto). Se desechó de nuevo el sobrenadante y la mezcla de células se resuspendió en 50 µL de medio LB estéril.

**2.-** En una placa de medio LB sólido se dispuso un filtro bacteriológico estéril de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore) sobre el que se depositó la mezcla de bacterias. La placa se incubó durante 12 horas a 30°C.

**3.-** Tras este tiempo de incubación, se procedió a la selección, utilizando los marcadores de resistencia a antibióticos del plásmido, de aquellos transconjugantes de *P. putida* DOC21 que hubieran integrado en el

## Materiales y Métodos

---

cromosoma la construcción pJQ-Tn5 (ya que este plásmido carece de origen de replicación autónomo en *Pseudomonas*). Para ello se resuspendió el filtro bacteriológico en 1 mL de agua milliQ estéril y, posteriormente, se inocularon placas de LB suplementadas con Gtm, Ap y Km.

**4.-** Hay que tener en cuenta que en esta conjugación triparental se pueden producir dos fenómenos de recombinación diferentes debido a que los brazos del Tn5 son secuencias repetidas e invertidas. Por lo tanto, la construcción pJQ-Tn5 podrá recombinar en cualquiera de los dos brazos del transposón (Fig. 19), y este hecho es el que nos va a permitir conocer las secuencias genéticas adyacentes al punto de inserción del Tn5.

**5.-** Una vez que se obtuvieron los transconjugantes de *P. putida* DOC21, se extrajo ADN genómico de varios de ellos sin olvidar el hecho de que estamos trabajando con dos poblaciones distintas de transconjugantes (según en qué brazo del transposón haya recombinado el plásmido). Dicho ADN se digirió a totalidad con endonucleasas de restricción del *polylinker* del plásmido que no cortaran en el interior del brazo del transposón, como es el caso de *Bam*HI, *Xba*I, *Sma*I y *Sa*I.

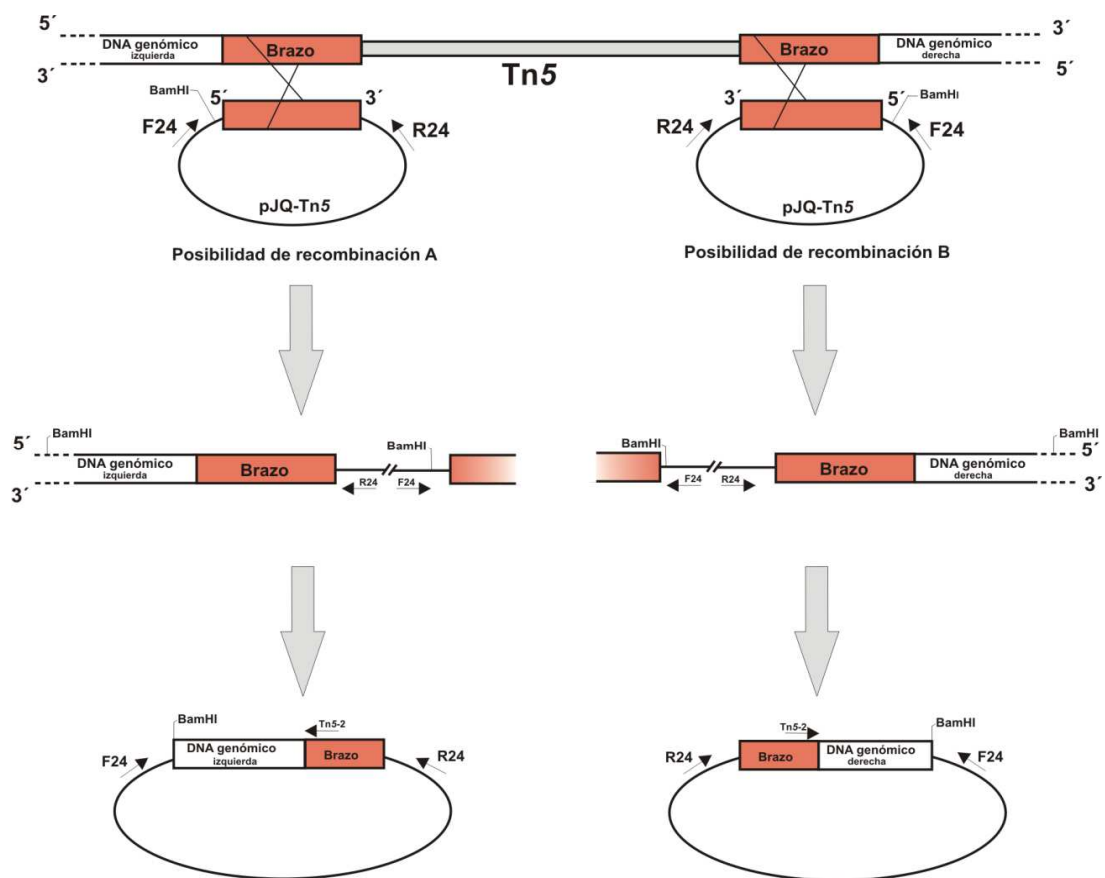
**6.-** Posteriormente, se limpió la reacción de restricción y se realizó una religación del ADN obtenido.

**7.-** La reacción de ligación se incubó a 16°C durante 12 horas y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La selección de estos transformantes de *E. coli* DH10B se realizó en medio LB suplementado con Gtm, de tal forma que sólo crecieran aquellas colonias que hubieran incorporado el plásmido pJQ200KS con el inserto (brazo del Tn5 + ADN genómico).

**8.-** Se obtuvo ADN plasmídico de las dos poblaciones de transformantes y se secuenció el inserto de dichas construcciones utilizando para ello los

## Materiales y Métodos

oligonucleótidos universales del plásmido F24 y R24, y el Tn5-2, cuyas secuencias se indicaron previamente en esta memoria. El inserto resultante consta de la secuencia del brazo del Tn5 más una secuencia de mayor o menor tamaño correspondiente al ADN genómico de *P. putida* DOC21 que codifica funciones del catabolismo de desoxicolato sódico. La nueva secuencia corresponde al lado izquierdo o derecho del punto de inserción del transposón Tn5, dependiendo del brazo en el que se hubiera llevado a cabo la recombinación.



**Figura 19.** Representación esquemática del proceso de aislamiento y secuenciación de la zona adyacente al punto de inserción del transposón Tn5 mediante la estrategia de "recombinación en el brazo del Tn5". En el esquema aparecen reflejadas las dos posibilidades de recombinación de la construcción pJQ-Tn5 en los brazos del transposón Tn5 que se ha insertado previamente en el genoma de *P. putida* DOC21. En el ejemplo esquematizado aquí se ha utilizado el corte *Bam*HI.



## Materiales y Métodos

---

### 2.11.1.3 Secuenciación de las zonas adyacentes a un fragmento de secuencia conocida.

Una vez que se identificó el punto de inserción del Tn5 y se obtuvo información sobre la secuencia del fragmento próximo al transposón (del gen que estaba interrumpido), se pueden conocer las secuencias adyacentes a dicho fragmento. De forma rutinaria se siguieron dos procedimientos:

**1.-** Se amplificó mediante PCR el fragmento conocido del gen y, posteriormente, el producto de amplificación se clonó directamente en el pGEM<sup>®</sup>-T Easy o en el pTZ57R/T. Mediante la digestión de esta construcción con las endonucleasas adecuadas, el fragmento se clonó en pJQ200KS y se transformó con esta construcción una alícuota de células competentes de *E. coli* DH10B.

**2.-** La construcción obtenida se transfirió por conjugación triparental de tal forma que el plásmido se insertaba en el genoma mediante recombinación homóloga a través del fragmento clonado. Esto permitió la obtención de transconjugantes en los que, adyacentes a una zona conocida de secuencia, se localizan dianas de corte de enzimas de restricción.

**3.-** Se extrajo ADN genómico de alguno de los clones transconjugantes. Dicho ADN se digirió a totalidad con enzimas de restricción con sitio de corte dentro del *polylinker* del plásmido, teniendo en cuenta que no cortaran en el interior de la secuencia conocida.

**4.-** Posteriormente, se limpió la reacción de digestión y se realizó una religación de la misma.

## Materiales y Métodos

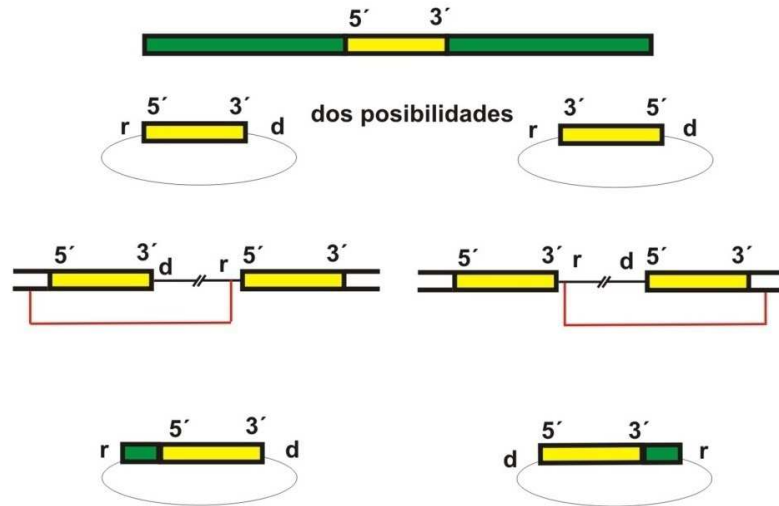
---

**5.-** La reacción resultante del punto anterior se incubó a 16°C durante 12 horas y, posteriormente, se empleó para transformar una alícuota de células competentes de la cepa *E. coli* DH10B.

**6.-** La selección de los transformantes se realizó en medio LB suplementado con Gtm, de tal forma que solo crecieran aquellas colonias que hubieran incorporado el plásmido con el inserto.

**7.-** Se obtuvo ADN plasmídico de los transformantes y se secuenció el inserto de dichas construcciones con los cebadores universales F24 y R24. El inserto resultante constaría de la secuencia ya conocida más una secuencia de mayor o menor tamaño desconocida. La nueva secuencia correspondería al lado izquierdo o derecho del fragmento conocido, dependiendo de cómo se hubiese orientado el inserto de partida en la construcción inicial (Fig. 20).

Rutinariamente se siguió este protocolo para secuenciar la zona adyacente a un fragmento conocido de secuencia. Pero en otras ocasiones, se diseñaron oligonucleótidos específicos sobre el fragmento de ADN de secuencia conocida, y se utilizaron para hacer amplificaciones mediante PCR frente a un oligonucleótido específico del brazo del Tn5. Estas reacciones de PCR se limpiaron siguiendo los protocolos anteriormente descritos o utilizando *kits* comerciales específicos para ello, y, posteriormente, se secuenciaron. En ocasiones, si el experimento lo requería se ligaron en el pGEM<sup>®</sup>-T Easy o el pTZ57R/T y se clonaron en otro plásmido.



**Figura 20.** Representación esquemática del proceso de secuenciación de la zona adyacente a un fragmento conocido. En amarillo aparece el fragmento conocido y en verde la zona adyacente desconocida. d, representa el sitio del oligonucleótido universal F24 y r, el sitio del oligonucleótido universal R24. De este modo se podrá llegar a conocer la secuencia adyacente, tanto a la derecha como a la izquierda, según fuese la orientación inicial del fragmento dentro del plásmido.

### 3.11.2 OBTENCIÓN DE MUTANTES MEDIANTE DELECIÓN.

Para analizar la función de un gen concreto se utilizó el sistema de delección o eliminación total o parcial del mismo. En primer lugar, se tienen que clonar en el plásmido pJQ200KS los fragmentos adyacentes a la zona del gen que se desea eliminar (en el mismo sentido que poseen en el genoma). El procedimiento seguido fue:

**1.-** Los fragmentos adyacentes al gen que se quería delecionar se obtuvieron mediante digestiones con endonucleasas de restricción, o bien se amplificaron mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos; se clonaron en el plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy o en el plásmido pTZ57R/T y, desde aquí, mediante digestión con alguna de las enzimas que cortan en el *polylinker*, se liberaron los fragmentos y se clonaron en el pJQ200KS. Generalmente, todas estas construcciones se clonaron utilizando el corte de

## Materiales y Métodos

---

restricción *NotI* que está presente en el *polylinker* del pGEM<sup>®</sup>-T Easy y que se localiza a ambos lados del inserto clonado, o utilizando los cortes de restricción *ApaI-XbaI* que están en el *polylinker* del pTZ57R/T, localizados uno a cada lado del inserto clonado.

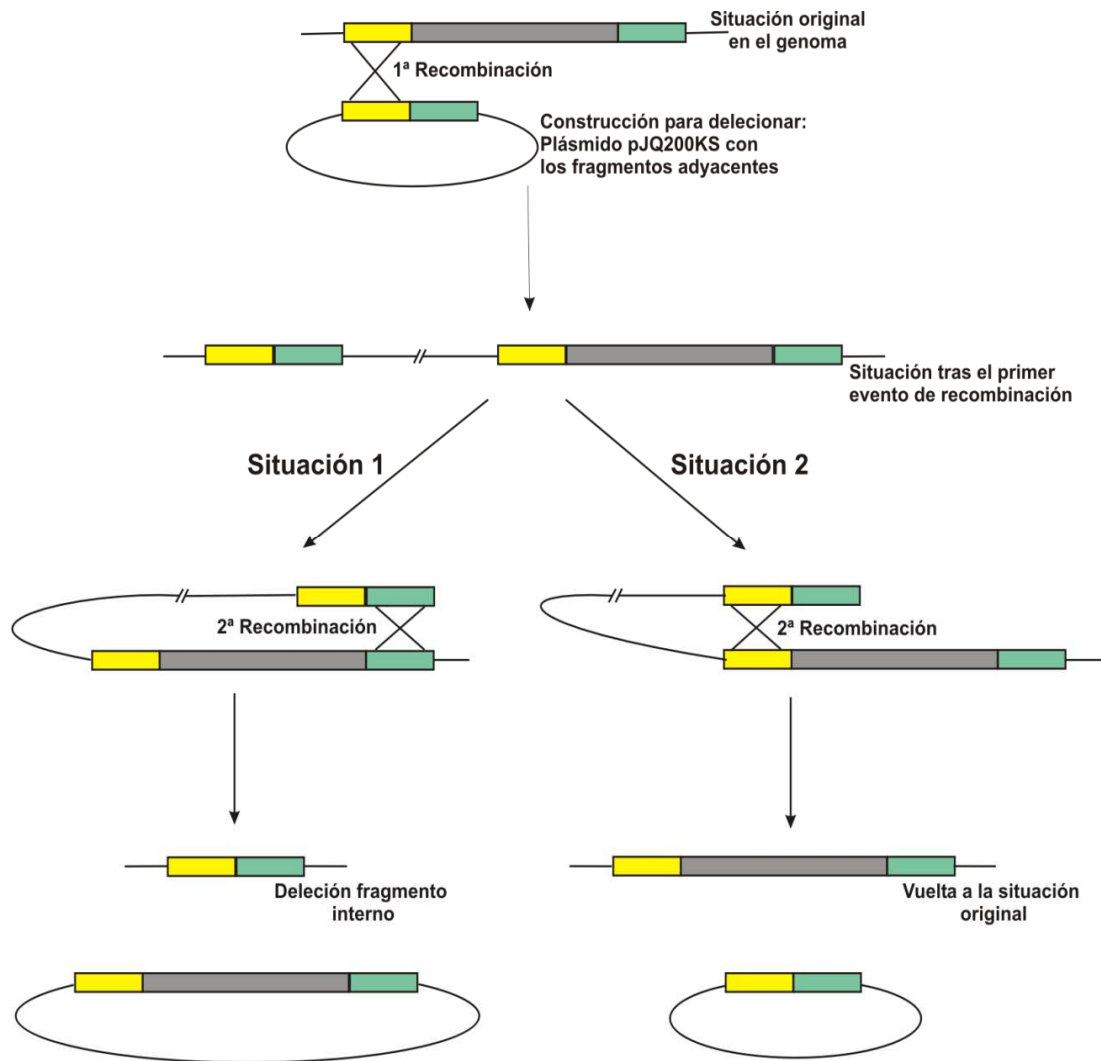
**2.-** Una vez obtenida la construcción en pJQ200KS, se procedió a transferirla a *P. putida* DOC21 por conjugación triparental, siguiendo el protocolo descrito para la obtención de mutantes mediante inserción del transposón Tn5.

**3.-** La selección de transformantes se llevó a cabo en medio LB suplementado con los antibióticos Ap y Gtm. La única posibilidad para que los transconjugantes sobrevivieran en presencia de la gentamicina era que se llevara a cabo una recombinación homóloga a través de una de las dos regiones de ADN clonadas en el pJQ200KS, puesto que este vector no es replicativo en *P. putida* DOC21.

**4.-** Con ayuda de un palillo estéril se seleccionó una colonia aislada de los diferentes transconjugantes obtenidos tras la primera recombinación; se resuspendió en 1 mL de agua milliQ estéril, sembrándose en alícuotas de 200 µL en placas de Petri con LB suplementado con Ap y sacarosa al 10%. Este vector posee el gen *sacB*, que codifica una proteína que hidroliza la sacarosa presente en el medio, dando lugar a levanos (polímeros de fructosa), los cuales se acumulan en el espacio periplásmico de las bacterias y causan su muerte por estrés osmótico. Para evitar el efecto provocado por la acción de la sacarasa, en presencia de sacarosa se fuerza una segunda recombinación que puede producirse de dos maneras diferentes (Fig. 21) dando como resultado, bien la restauración del gen completo, es decir, la vuelta a la situación original, o bien causando la delección de parte del mismo (25% de los casos).

## Materiales y Métodos

**5.-** Para analizar si los transconjugantes tenían o no el gen deleciónado, se realizaron amplificaciones de PCR sobre el ADN genómico de los mismos utilizando oligonucleótidos específicos correspondientes a las regiones exteriores a las de los fragmentos amplificados para recombinar las construcciones en el vector pJQ200KS.



**Figura 21.** Evento de mutación de un gen mediante deleción de un fragmento interno del mismo. La primera recombinación aparece en la parte superior de la figura, y la segunda se indica en la parte inferior. Pueden darse dos situaciones: Situación 1, la segunda recombinación ocurre por el fragmento distinto al implicado en la primera recombinación dando lugar a la deleción de la región de ADN entre ambos fragmentos y a la liberación del plásmido, que arrastra la región del genoma deleciónada y que se pierde por dilución. Situación 2, la segunda recombinación ocurre por

## Materiales y Métodos

---

el mismo fragmento implicado en la primera. En este caso se recupera la situación original y el plásmido, que se libera tal y como se insertó, se pierde por dilución.

### 3.11.3 EXPRESIÓN DE GENES EN *TRANS*.

Con el objetivo de determinar si los mutantes obtenidos por integración del transposón Tn5 o delección recuperaban su función original al restaurar el gen afectado, se expresó el mismo en *trans* mediante la clonación en el plásmido pBBR1MCS-3 (pMC). El proceso seguido se describe a continuación:

**1.-** En primer lugar, se amplifica por PCR el gen que va a ser expresado en *trans* con la ayuda de cebadores degenerados con diana de corte para enzimas de restricción que permitan la clonación orientada del mismo. Se liga el producto de amplificación en un plásmido comercial (pGEM-Teasy o pTZ57R/T), y se clona (en el sentido adecuado para que tenga lugar su expresión) en el plásmido pBBR1MCS-3.

**2.-** Se transforma la cepa *E. coli* DH10B con esta construcción.

**3.-** El plásmido pBBR1MCS-3 que contiene el gen de interés, se transfiere mediante conjugación triparental a los mutantes de *Pseudomonas putida* DOC21, siguiendo el mismo proceso anteriormente descrito.

**4.-** La selección de transconjugantes que incorporaron el plásmido se realizó en medio LB sólido suplementado con Ap (marcador de resistencia de la cepa receptora) y Tc (marcador de resistencia del plásmido pBBR1MCS-3).

### 3.12 ANÁLISIS DE LOS CALDOS DE CULTIVO MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

Los intermediarios metabólicos acumulados en los medios de cultivo de las diferentes cepas y mutantes presentados en esta tesis doctoral fueron analizados mediante diferentes técnicas cromatográficas: cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

#### 3.12.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Para la cromatografía en capa fina de metabolitos intermediarios, las distintas cepas fueron cultivadas en medio químicamente definido (Martínez-Blanco *et al.*, 1990) suplementado con succinato a una concentración 10mM como fuente de carbono y litocolato o testosterona a una concentración 5mM como precursor de intermediarios esteroídicos. Se depositaron 10 $\mu$ L de muestras tomadas a distintos tiempos de cultivo en la base de la placa de cromatografía de aluminio cubierta de sílica (Merck, Alemania). La fase móvil se compuso de una de benceno:acetona en proporción 5:3 (v/v). La cromatografía se dejó transcurrir hasta que el frente alcanzase el límite superior de la placa y los puntos se revelaron tratando la placa con una solución de ácido sulfúrico al 30% y calentándola durante 10 minutos a 100°C.

#### 3.12.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Cuando los metabolitos se analizaron mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, el sistema se compuso de dos bombas de alta presión (Shimadzu LC-10ATvp), un autoinyector (Gilson

## Materiales y Métodos

---

234), una columna C18 de fase reversa (Grom-Sil 120 ODS, 5  $\mu$ m, 150 $\times$ 4.6 mm; Grom) y un detector de diodo UV-VIS (Shimadzu SPD-M 10) con un rango de barrido de 190 a 500 nm. Como fase móvil se empleó un tampón K/Na-fosfato (10 mM, pH 7.1; eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) a un caudal de 1 mL/min.

El análisis de los intermediarios metabólicos se realizó mediante un método isocrático (30% de eluyente B). El colato eluyó entre 5 y 5,8 min y se cuantificó comparando su absorbancia a 210 nm con patrones externos de concentración conocida (1, 5, y 10 mM).

Para el análisis de los productos resultantes de los ensayos enzimáticos se empleó un método de gradiente consistente en 2 min al 20% de eluyente B, elevando a un 90% de eluyente B en 9 min, retornando a 20% de eluyente B en 1 min, seguido de un período de 4 min de equilibrado.

### 3.12.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS).

Cuando los metabolitos acumulados por los diferentes mutantes en los caldos de cultivo se analizaron mediante esta técnica se siguió el protocolo descrito por Casabon (Casabon *et al.*, 2013) como se detalla a continuación:

- Los mutantes fueron cultivados en 100 ml de medio M9 suplementado con elementos traza, vitamina B1 y colato o desoxicolato 1mM preparado con DMSO. Se cultivaron a 30°C y 200 rpm durante 300 horas.

- A intervalos de tiempo regulares, se tomaron muestras (300  $\mu$ L) de los caldos de cultivo y se modificaron con 5 $\alpha$ -colestano 10 mM y se adificaron con ácido acético glacial utilizando una proporción de 30:1 v/v. Los



## Materiales y Métodos

---

metabolitos fueron extraídos con un volumen equivalente de acetato de etilo. La fracción orgánica se secó en atmósfera de nitrógeno y se disolvió en 50  $\mu$ L de piridina.

- Los extractos fueron derivatizados a temperatura ambiente con 50 mL de *bis* (trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSA)/ trimetilclorosilano (TMCS) y analizados en un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS) modelo Agilent 6890 serie GC equipado con una columna capilar HP-5ms 30 m  $\times$  250  $\mu$ m (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) y un detector de masas selectivo HP 5973. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: la temperatura del inyector se fijó en 280°C, la temperatura de la línea de transferencia fue de 290°C y la velocidad de flujo fue 1 mL/min con helio. El programa de temperatura del horno fue de 104°C durante 2 min, se incrementó hasta 290°C a una velocidad de 15°C por min y se mantuvo a 290°C durante 15 min. Las condiciones establecidas para el espectrómetro de masas para la emisión de electrones de barrido fueron 40-800 m/z, a 1,97 exploraciones por segundo. La abundancia relativa y las concentraciones absolutas se calcularon sobre la base total de la señal de corriente de iones, con muestras normalizadas según la norma interna.

### 3.13 ENSAYOS ENZIMÁTICOS DE ESTERIFICACIÓN CON DIFERENTES PROTEÍNAS.

Para la realización de los ensayos enzimáticos descritos en este trabajo se siguieron dos protocolos diferentes en función de la actividad testada. Este protocolo incluye un paso de obtención de extracto crudo celular o de purificación de la proteína y un ensayo enzimático cuyas condiciones variaron en función de la enzima ensayada.

### 3.13.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES

Los cultivos de las cepas de *P. putida* que expresaban los genes *stdA1* y *stdA2* se llevaron a cabo en MM Chol1 suplementado con la fuente de carbono requerida y se recogieron en fase exponencial ( $A_{540nm}=1$ ) por centrifugación a 9000g durante 10 min a 4°C. El precipitado celular se lavó dos veces con tampón Na-K 50 mM, pH 7 centrifugando en las mismas condiciones anteriormente indicadas. Se resuspendió el precipitado final en un pequeño volumen del tampón enzimático y se lisaron las células mediante tres pasos por una prensa francesa refrigerada (Aminco) a 138 MPa. El homogenizado celular se centrifugó a 18000g durante 30 min a 4°C para separar los restos celulares y, en caso necesario, se eliminaron las moléculas con masas moleculares <5 KDa, por desalado con una columna Sephadex G-25 PD-10 (Pharmacia Biotech, Sweden). La concentración proteica se determinó mediante un ensayo por el método BCA (Pierce, USA) empleando albúmina sérica bovina como estándar. Estos extractos se utilizaron de inmediato o se almacenaron a -20°C.

### 3.13.2 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA STDA3

Para los ensayos de reacción con la enzima StdA3 se requirió la purificación de esta proteína. Para ello, un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) que portaba una copia del gen pET-30a-*stdA3* se cultivó en medio LB a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó  $A_{540nm}=0,5$  se añadió IPTG a una concentración 0,5 mM. La temperatura entonces se bajó a 16°C y se incubó durante otras 20 h, momento en que se recogieron las células por centrifugación a 5000g durante 10 min a 4°C. El precipitado celular correspondiente a 1,5 L de

## Materiales y Métodos

---

cultivo se resuspendió en 20 mL de tampón de lisis cuya fórmula se indica a continuación:

Compuesto	Concentración final
Tampón Tris-HCl pH 8	20 mM
Glicerol	10%
NaCl	150 mM
PMSF	0,1 mM
EDTA	1 mM
Lisozima	0,1 mg/mL
DNasaI	25 µg/mL

La lisis de las células se produjo mediante la aplicación de cinco pulsos de 30 s ajustando la intensidad a 5,0 en un molino de bolas modelo MP Biomedicals FastPrep-24 con una incubación de 5 min en hielo entre pulsos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15000g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se suplementó con imidazol 10 mM y se pasó por una columna de Ni-Sefarosa 6 Fast Flow (GE Healthcare), La proteína retenida se eluyó con una solución fría de tampón sodio-fosfato 25 mM (pH 8), NaCl 50 mM e imidazol 500mM. La solución se dializó a 4°C durante 12 horas con 2 L de tampón HEPES 25 mM (pH 7,5), KCl 50 mM y la proteína se concentró por ultrafiltración hasta una concentración final de 15 mg/mL. Esta solución se utilizó de inmediato o se congeló en nitrógeno líquido para su uso posterior.

## Materiales y Métodos

---

### 3.13.3 ENSAYOS ENZIMÁTICOS DE ESTERIFICACIÓN CON CoA

El tampón de reacción utilizado para los ensayos de las enzimas StdA1 y StdA2 se preparó según la siguiente fórmula:

Compuesto	Concentración final
Tampón MOPS pH 7,8	50 mM
Coenzima A	1 mM
ATP	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
NAD <sup>+</sup> , K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	1 mM
Extracto celular	0,6-0,8 mg/mL

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 30°C y se iniciaron mediante la adición del sustrato. La concentración del mismo varió dependiendo del experimento, utilizándose 1 mM en el caso del ácido cólico y entre 100 y 200 µM en el caso del 3-cetocolato y el DHOPDC.

## Materiales y Métodos

---

El tampón de reacción utilizado para los ensayos de la enzima StdA3 se preparó según la siguiente fórmula:

Compuesto	Concentración final
Tampón HEPES pH 7,3	100 mM
Coenzima A	1 mM
ATP	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NADH	0,1 mM
PEP	2 mM
Piruvato quinasa	5 U
Adenilato quinasa	5 U
Lactato deshidrogenasa	20 U
Sustrato (HIP, 3'OH-HIP...)	500 μM

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 25°C y se iniciaron mediante la adición la enzima purificada a una concentración 5 nM.





## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 4.1 *Pseudomonas putida* DOC21. DESCRIPCIÓN GENERAL

#### 4.1.1 CARACTERIZACIÓN METABÓLICA

La cepa utilizada para el desarrollo de la mayor parte de los estudios presentados en este trabajo, *Pseudomonas putida* DOC21, como se indicó en la tabla III de la sección de Materiales y Métodos, es capaz de metabolizar un espectro más o menos amplio de moléculas con estructura esteroídica. No obstante, el listado detallado de compuestos que esta cepa es incapaz de degradar indica ciertas características y requisitos que ha de poseer la molécula esteroídica en cuestión para poder ser asimilada por *Pseudomonas putida* DOC21.

Entre estas características estructurales se encuentran:

- i) la presencia de un grupo hidroxilo con configuración  $\alpha$  o
- ii) un grupo carbonilo en posición 3.

Por el contrario, todas aquellas moléculas que presentaban un grupo hidroxilo con configuración  $\beta$  en esa posición, no fueron utilizadas como única fuente de carbono en esta bacteria (Fig. 22).

El potencial de la cepa *P. putida* DOC21 para el degradar algunos de estos compuestos esteroideos (desoxicolato, colato, litocolato, testosterona y 4-androsten-3,17-diona) se determinó mediante ensayos de crecimiento. Para ello, se cultivó esta cepa en MM suplementado con dichas fuentes de carbono, a la concentración que se requería en cada caso, y se determinó el crecimiento midiendo la evolución de la absorbancia a una longitud de onda de 540nm ( $A_{540nm}$ ) a lo largo del tiempo. Este mismo protocolo se empleó en cada uno de los experimentos en los que se estudiaba el crecimiento de esta bacteria o alguno de sus respectivos mutantes presentados en esta Tesis Doctoral.

## Resultados y discusión

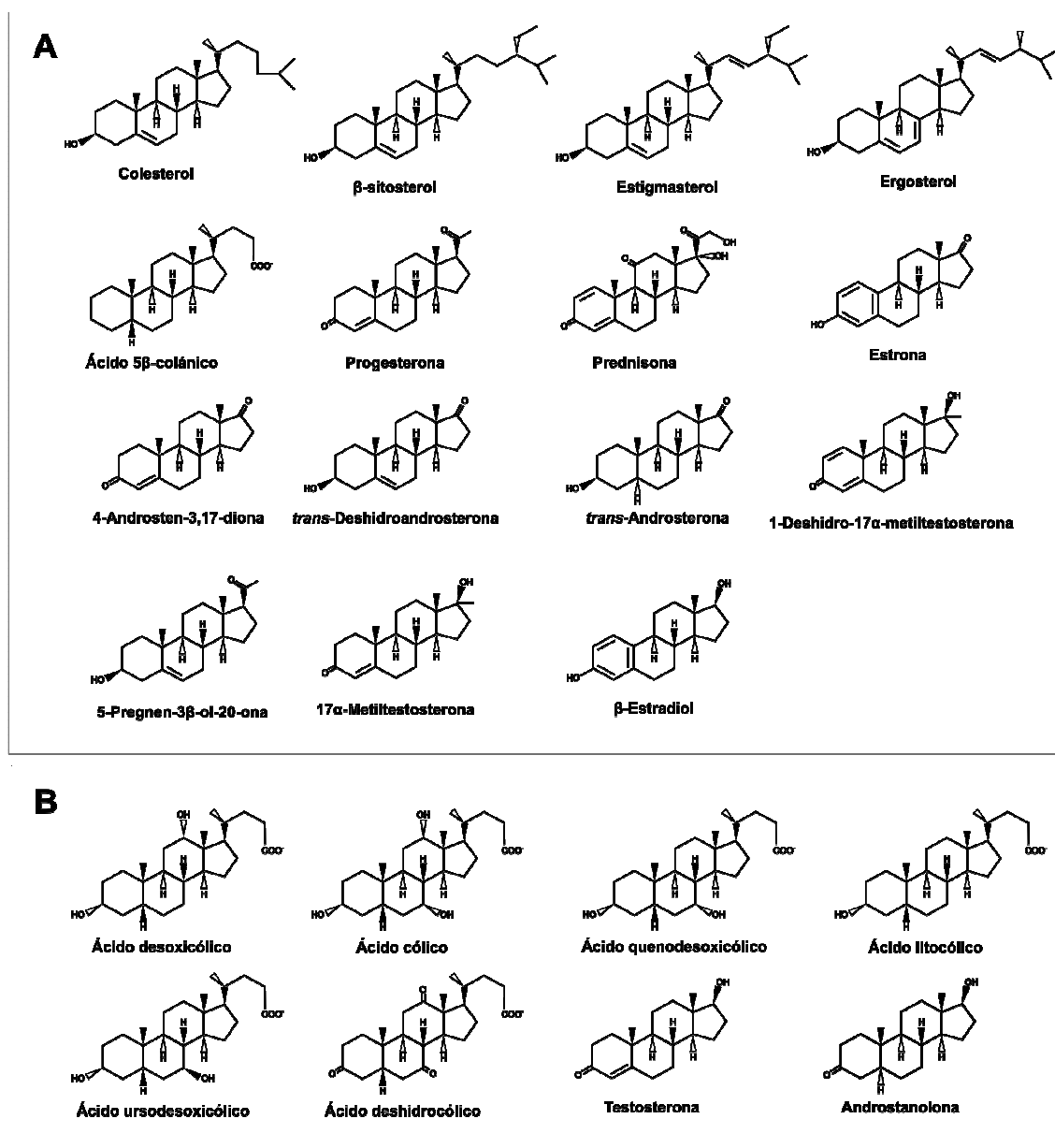


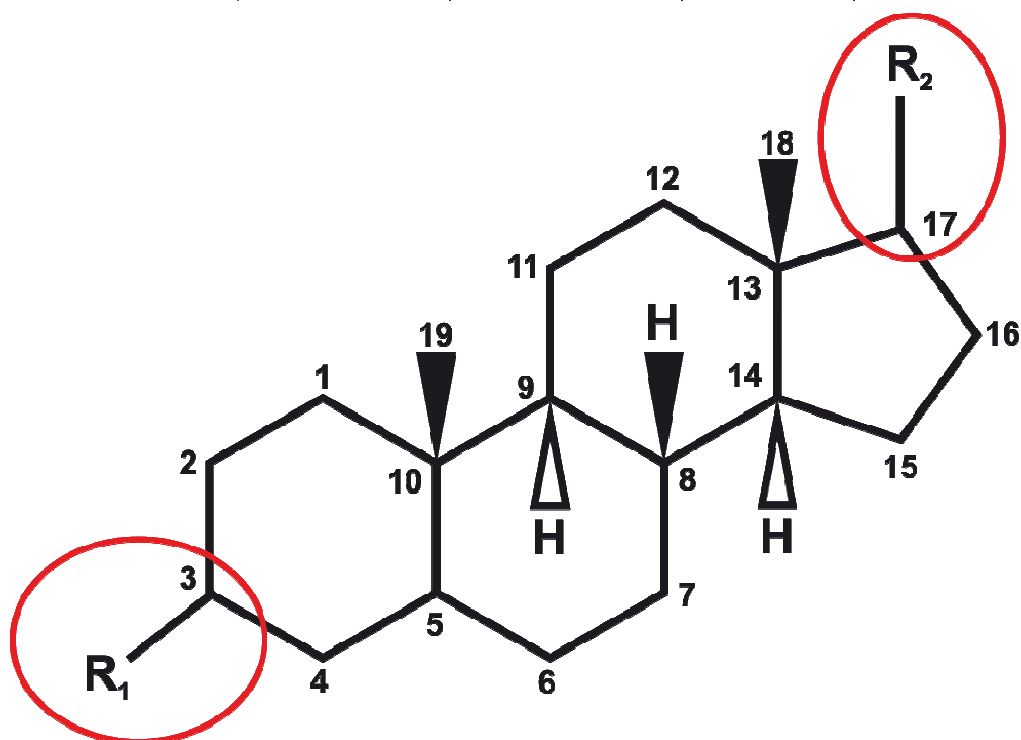
Figura 22. Diferentes fuentes de carbono de naturaleza esteroídica. Aquellos compuestos metabolizables por la cepa DOC21 se incluyen en el cuadro B, mientras que los no metabolizables se incluyen en el cuadro A.

Siguiendo el procedimiento indicado, se comprobó que la cepa *P. putida* DOC21 degradaba eficazmente sales biliares tales como desoxicolato, colato, deshidrocolato, ursodesoxicolato, quenodesoxicolato, deshidrocolato y litocolato, pero que no poseía la capacidad de metabolizar *trans*-androsterona o *trans*-deshidroandrosterona, compuestos que poseen un grupo hidroxilo con configuración  $\beta$ . Por el contrario, otras moléculas con elevada similitud estructural como la testosterona, la androstanolona y la 4-

## Resultados y discusión

androstén-3,17-diona (AD), en los que en posición 3 de la estructura se encuentra adherido un grupo funcional carbonilo, sí que son asimilados por la cepa DOC21.

Tipo de sustituyente	Ejemplo	Capacidad de catabolismo
Hidroxilo con configuración $\alpha$ en $R_1$	Androsterona	Metabolizable
Hidroxilo con configuración $\beta$ en $R_1$	Estradiol	No metabolizable
Carbonilo en $R_1$	Progesterona	Metabolizable
$R_2$ funcionalizada	Ácido cólico	Metabolizable
$R_2$ no funcionalizada	Colesterol	No metabolizable



**Figura 23.** Esquema que señala los puntos clave para la metabolización de esteroides por parte de la cepa DOC21.

Además, *P. putida* DOC21 también parece necesitar ciertos requerimientos estructurales para que se produzca la degradación de la cadena lateral unida al carbono en posición 17 presente en algunos esteroides. Así pues, esta bacteria es incapaz de metabolizar aquellos compuestos en los cuales el carbono terminal de la cadena alifática no haya

## Resultados y discusión

---

sido previamente oxidado a un grupo carboxilo. De este modo, ni el colesterol ni otros compuestos de estructura análoga, generados por el acortamiento de su cadena alifática (como la 5-pregnen-3 $\beta$ -ol-20-ona), pueden ser asimilados por esta cepa. Por esta misma razón, tampoco utiliza progesterona, que presenta una cadena lateral de dos átomos de carbono; pero sí testosterona, molécula en la que la cadena lateral ha sido sustituida por un grupo hidroxilo (Fig. 23).

Todos estos resultados sugieren que *P. putida* DOC21 carece de los genes que codifican las enzimas requeridas para la transformación del colesterol en compuestos con cadena lateral funcionalizada (como es el caso de los ácidos biliares) y que puedan, de este modo, ser metabolizados. Esta actividad enzimática suele estar catalizada por las colesterol oxidasas presentes en los microorganismos con capacidad de metabolizar este esteroide (Doukyu, 2009).

Sin embargo, esos genes sí existen en *Rhodococcus jostii* RHA1 y en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, microorganismos tomados en esta Tesis Doctoral como modelo de referencia. Puede afirmarse, por lo tanto, que *P. putida* DOC21 carece de las enzimas necesarias para llevar a cabo la asimilación de esteroides.

### 4.1.2 CARACTERIZACIÓN GENÓMICA

Como complemento al estudio fisiológico de la cepa, se procedió al estudio de la secuencia genómica de la misma con el fin de recabar información acerca de los genes implicados en el catabolismo de compuestos esteroideos. Esta caracterización genética conducirá a la localización de las secuencias y *clusters* relacionados con la degradación de esteroides. Asimismo, el conocimiento de los genes implicados, así como el de la región en que se encuentran integrados, posibilitará el uso de técnicas

## Resultados y discusión

---

de manipulación genética tales como la delección. Dicha técnica permite la obtención de mutantes *knock-out* que facilitarán el análisis de la función desempeñada por las proteínas codificadas por los genes catabólicos que componen la ruta degradativa.

Para llevar a cabo el estudio del genoma de la cepa *P. putida* DOC21 se emplearon tecnologías de secuenciación masiva. En primer lugar se utilizó la técnica de pirosecuenciación 454 (Margulies *et al.*, 2005), lo que permitió la obtención de varios millones de lecturas del genoma que, tras el solapamiento de secuencias idénticas, se transformaron en un total de 3.348 fragmentos independientes. Dichos fragmentos se fueron ensamblando manualmente en función del análisis de todas y cada una de las secuencias codificadas en los extremos de los fragmentos de DNA obtenidos inicialmente. Mediante la identificación de las posibles secuencias contiguas, el diseño de oligonucleótidos específicos a los posibles fragmentos a ensamblar, la amplificación mediante PCR entre los distintos fragmentos y finalmente realizando la secuenciación de los productos de PCR con el fin de determinar las secuencias adyacentes, se llevó a cabo el empalme de las secuencias contiguas. Empleando esta estrategia se ensamblaron un total de 316 *scaffolds* no solapantes entre sí, con un tamaño que va desde las 14 kb hasta las 426 kb, así como 502 *contigs* con un tamaño medio de 422 pb. Estos 502 *contigs* suponen 296 kb, es decir, aproximadamente un 5% del genoma sobre un estimado de 6.5 Mb totales como tamaño del cromosoma. Sin embargo, aún está pendiente el total ensamblado de los *scaffolds* y de los *contigs* en el orden adecuado para representar al genoma de *P. putida* DOC21. Más aún, dentro de los *scaffolds* aún hay secuencias con indeterminaciones o con cambios de marco de lectura que han de ser corregidas.

La falta de secuencia solapante o la aparición de indeterminaciones y errores puntuales en la secuencia obtenida pueden ser producto tanto de las limitaciones intrínsecas a la tecnología 454 como de las características

## Resultados y discusión

---

propias del DNA genómico objeto de estudio. Así pues, existen zonas de alta complejidad que aparecen a lo largo del cromosoma. Estas regiones muestran un elevado porcentaje de pares G+C superior al que presenta por término medio el genoma de *P. putida* DOC21, lo que favorece la aparición de estructuras secundarias muy estables, dificultando consiguientemente la resolución de las mismas empleando la técnica de secuenciación 454.

Además, *P. putida* DOC21, al ser un aislado medioambiental, presenta en su genoma un gran número de bacteriófagos anidados, elementos transponibles y zonas duplicadas originadas por posibles eventos de recombinación debido a la transferencia horizontal desde diversos microorganismos donadores. Todos estos fenómenos dan lugar a zonas de indeterminación que separan *contigs* y/o *scaffolds* impidiendo no sólo la continuidad de la secuencia, sino también la organización topográfica y de orientación entre los elementos de secuencia discretos.

Para tratar de mejorar los datos obtenidos aplicando la tecnología de secuenciación 454, se procedió a secuenciar el genoma de la cepa *P. putida* DOC21 en un secuenciador masivo HiSeq 2000 de *Illumina* que emplea tecnología de secuenciación Solexa (Bentley *et al.*, 2008).

La integración de los datos obtenidos mediante ambas técnicas unida la corrección realizada tras la amplificación por PCR y posterior secuenciación de los amplicones generados entre los extremos, ha permitido la confección un genoma borrador (*draft genome*) formado por 91 *scaffolds* (DC0001 a DC0091) que cubren una secuencia total de 6.484.031 pb.

La información sobre la estructura genética y la secuencia nucleotídica obtenida de este modo permitió la identificación de algunos genes adyacentes a los afectados por mutación insercional del trasposón Tn5. La determinación de las secuencias adyacentes a un gen que se ha visto afectado por la introducción del transposón facilitará el análisis de posibles

## Resultados y discusión

---

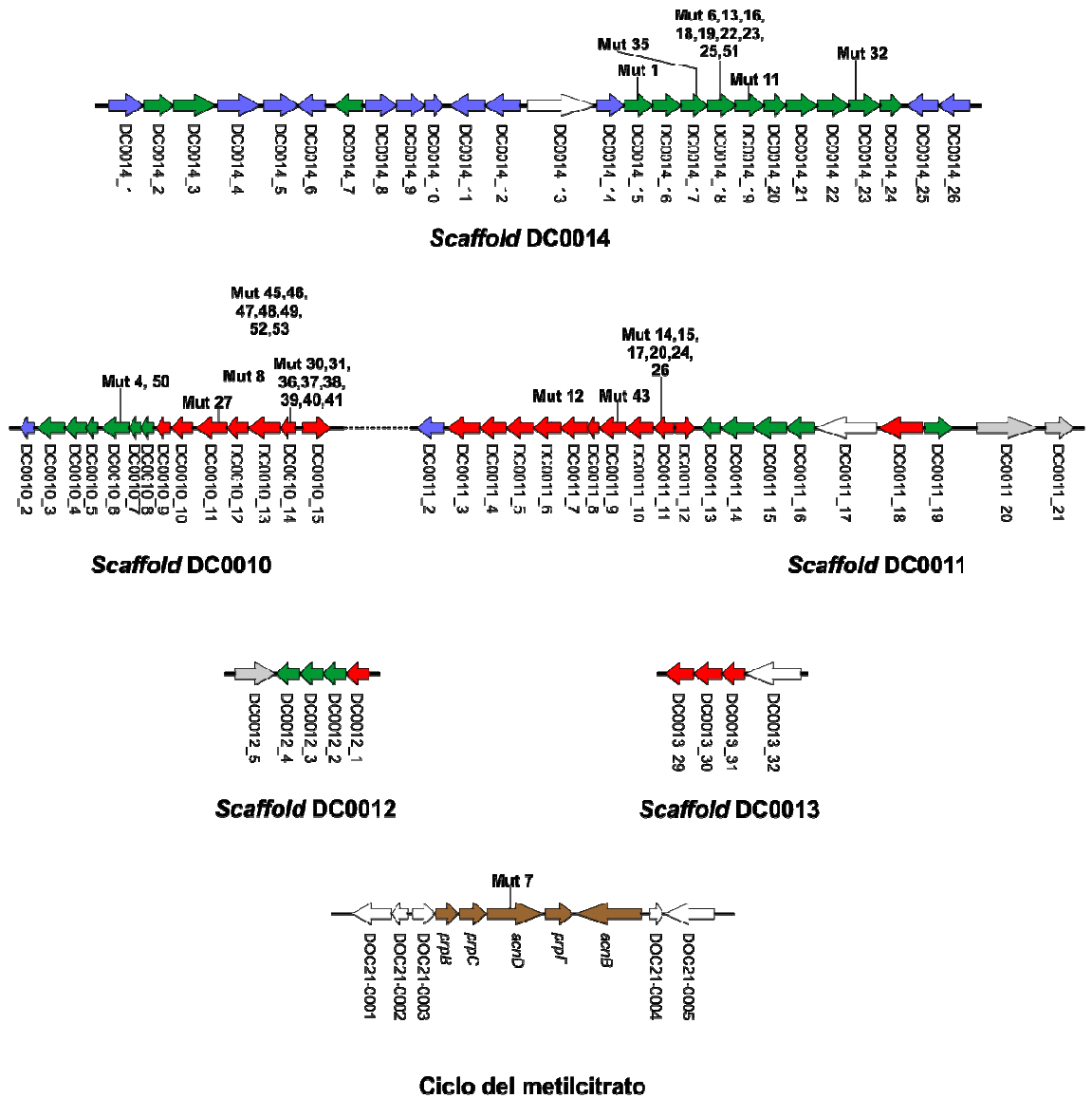
efectos polares causados por interrupción de algún operón del que dicho gen forme parte.

Asimismo, tal y como se expresó anteriormente, la disposición de un borrador más o menos preciso de la secuencia genómica de la cepa DOC21 posibilitó la utilización de otro tipo de estrategias, como la delección génica, técnica que facilitó el estudio genético y bioquímico detallado de la ruta catabólica responsable de la degradación de esteroides en dicho microorganismo. El empleo de esta estrategia permitió la eliminación dirigida de determinados fragmentos genómicos, de modo que se obtuvieron cepas *knock-out* en los que la única diferencia entre la cepa silvestre y la cepa mutante era la ausencia del fragmento delecionado.

Esta serie de experimentos permitió la identificación de varios contigs o agrupaciones génicas que contenían la mayor parte de los genes implicados en los mecanismos de degradación de esteroides en la cepa *P. putida* DOC21. De este modo, se realizaron comparaciones de identificación de secuencia con genes catabólicos de otras especies depositados en bases de datos de secuencias nucleotídicas. Siguiendo esta estrategia, se obtuvo un mapa genético preliminar que incluía varios de los genes que codificaban actividades enzimáticas que podrían participar en el catabolismo de esteroides (Fig. 24).

Dicho mapa genético incluía un gran número de genes que codificaban proteínas cuya secuencia de aminoácidos presentaba elevada similitud con algunas enzimas bien caracterizadas en otros microorganismos, que podrían ser responsables de estos procesos catabólicos. Tal es el caso del gen que codifica la 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, una de las actividades más profusamente estudiadas en diferentes especies tanto procariontas como eucariotas (Hoffmann & Maser, 2007; Oppermann & Maser, 1996).

## Resultados y discusión



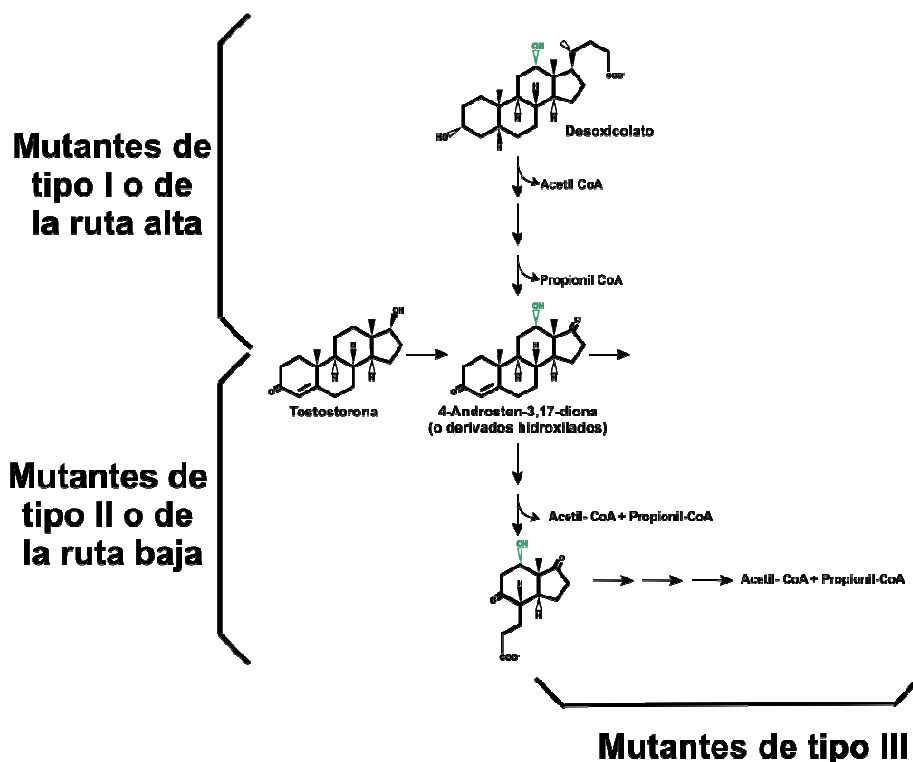
**Figura 24.** Organización de los fragmentos genéticos que codifican proteínas implicadas en el catabolismo de esteroides. En rojo aparecen coloreados los genes de la ruta alta; en verde los de la ruta baja; en marrón los genes del metabolismo central y en azul los presuntamente implicados sin caracterización concreta.



### 4.2 ESTUDIOS DE METABOLISMO ESTEROÍDICO EN *Pseudomonas putida* DOC21

Para la caracterización de los diferentes genes y enzimas que integran la ruta catabólica responsable de la asimilación de esteroides en *P. putida* DOC21, se siguieron las estrategias mutagénicas, antes mencionadas, de interrupción génica por inserción de un transposón y de delección génica dirigida. Para llevar a cabo esta segunda estrategia se contó con la ayuda del pJQ200SK, un plásmido no replicativo en bacterias G-. Combinando la información proporcionada por cada una de las técnicas de estudio, se trataron de identificar las distintas actividades enzimáticas y así como sus respectivos genes codificantes.

Con el fin de caracterizar las diferentes etapas parciales requeridas para el catabolismo esteroideo (eliminación de la cadena lateral, transformación del anillo A, apertura del núcleo común esteroídico...), se analizó el comportamiento fenotípico de cada uno de los mutantes obtenidos. Esto es, una vez obtenido un fragmento genético afectado (bien por delección, bien por interrupción por el Tn5), se procedió a agrupar las cepas mutantes resultantes en función del tipo de moléculas que pudiesen metabolizar. La capacidad de asimilar unas u otras ha permitido la clasificación de las cepas en tres grupos diferenciados que compartían una serie de características metabólicas comunes (Fig. 25).



**Figura 25.** Clasificación de los tipos de mutantes según el punto de la ruta en que se encontrasen afectados.

### 4.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE MUTANTE

Antes de definir las diferentes etapas responsables de la degradación de moléculas esteroídicas, es conveniente indicar que los microorganismos suelen llevar a cabo las transformaciones necesarias hasta la obtención de un intermediario común, punto a partir del cual, unifican los mecanismos moleculares de transformación hasta la mineralización completa de los mismos (Merino *et al.*, 2013).

En el caso de *P. putida* DOC21, y con objeto de facilitar el estudio de la ruta degradativa, los mutantes afectados en el metabolismo de esteroides que se obtuvieron mediante una técnica de mutación mediada por el transposón Tn5 se caracterizaron según las moléculas esteroídicas que eran capaces de asimilar.

## Resultados y discusión

---

Esta caracterización catabólica permitió agrupar a los mutantes en función de si la etapa que se encontrase afectada se encontraba antes o después de la síntesis del intermediario central, la 4-AD (Merino *et al.*, 2013). La clasificación que se estableció para las cepas mutantes se indica a continuación:

### 4.2.1.1 Mutantes de la ruta alta

En primer lugar, se comprobó que parte de las cepas obtenidas por inserción del transposón *Tn5* resultaban incapaces de crecer con ácidos biliares como única fuente de carbono, pero no obstante, su capacidad para utilizar testosterona o androst-4-en-3,17-diona (AD) no se veía afectada. En este grupo se incluirían aquellos mutantes previsiblemente afectados en algún paso enzimático implicado en el proceso de eliminación de la cadena lateral en C17 y que conduciría a la obtención de un intermediario catabólico común. A estas cepas se las catalogó como mutantes del tipo I o de la ruta alta.

### 4.2.1.2 Mutantes de la ruta baja

El segundo grupo de mutantes incluía aquellas cepas que resultaban incapaces de metabolizar tanto ácidos biliares como AD o testosterona cuando se utilizaban estos compuestos como fuentes de carbono. Dichos mutantes presentaban pues un bloqueo metabólico en algún punto situado aguas abajo de la aparición del intermediario central; es decir, en etapas que impedían el procesamiento de la estructura común tetraanular propia de los esteroides. Como curiosidad, cabe destacar el hecho de que alguno de estos mutantes acumulase un intermediario con capacidad de absorber radiación visible, lo que confería a los caldos de cultivo un aspecto

## Resultados y discusión

---

coloreado. Este grupo de mutantes se incluyó en denominado grupo II o también denominado grupo de mutantes afectados en la ruta baja.

### 4.2.1.3 Mutantes del metabolismo central

El tercer grupo de mutantes presentaba un comportamiento catabólico idéntico a los del grupo II, con la salvedad de que al analizar la secuencia interrumpida por el transposón, esta correspondía a un gen sin homología con ninguno conocido en rutas degradativas de esteroides. Las cepas pertenecientes a dicha categoría fueron denominadas mutantes del metabolismo central. En la mayor parte de los casos, el gen afectado codificaba alguna de las actividades enzimáticas implicadas en la asimilación de las moléculas resultantes del proceso degradativo de los esteroides. Estas enzimas se encuentran normalmente integradas en algún ciclo o ruta metabólica general (como es el caso de aquellos afectados en el ciclo del metilcitrato; Merino, 2016).

### 4.2.2 ETAPAS INICIALES EN LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS BILIARES EN *P. putida* DOC21

Anteriormente se expuso que los microorganismos suelen canalizar la degradación de distintos esteroides a través de la síntesis de un intermediario común desde el que unifican la ruta catabólica (Merino *et al.*, 2013). Este tipo de comportamiento fisiológico permite maximizar la flexibilidad metabólica de los microorganismos, ya que al ser comunes gran parte de las etapas, solamente es necesario presentar adicionalmente la maquinaria enzimática para llevar a cabo estas transformaciones.

En el caso de los ácidos biliares (a partir de ahora AB), estas transformaciones periféricas de la molécula incluyen la eliminación de la cadena lateral unida en C17, así como una serie de modificaciones dentro de la estructura tetraanular hasta la obtención de un compuesto que posee dos dobles enlaces entre los carbonos C1-C2 y C4-C5 (dentro del anillo A) y un grupo carbonilo unido en posición 3.

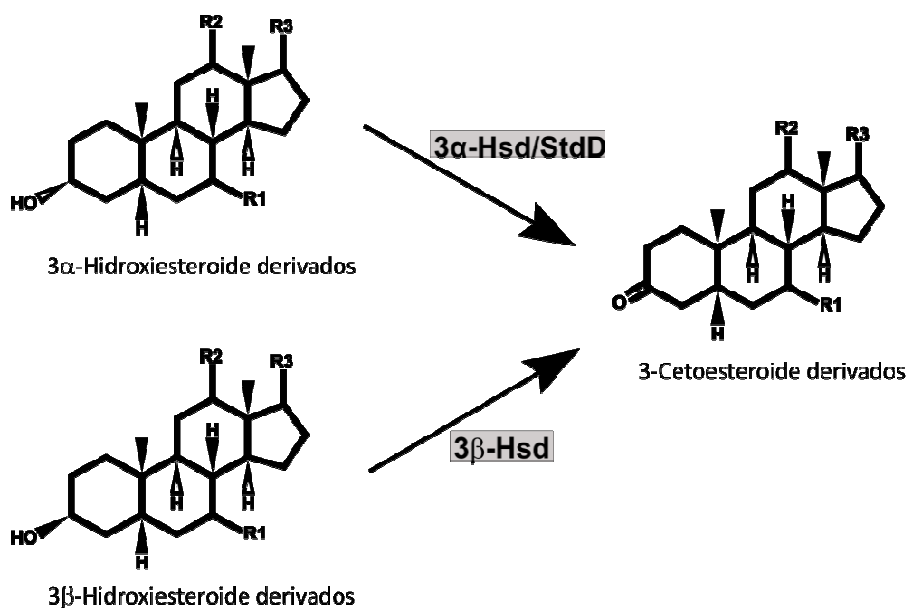
En el caso del colesterol, una molécula estructuralmente relacionada con los ácidos biliares, se considera que la oxidación del hidroxilo en posición 3 es la etapa previa requerida para que tengan lugar las transformaciones. Esta oxidación está mediada bien por una colesterol oxidasa (Brzostek *et al.*, 2007; Fernández De Las Heras *et al.*, 2014; MacLachlan *et al.*, 2000; Sojo *et al.*, 1997) o bien por una 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Uhía *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2007). Ambas enzimas catalizan idéntica reacción, pero difieren en sus respectivos mecanismos moleculares. Así, las colesterol oxidasas son capaces de oxidar el radical hidroxilo utilizando oxígeno molecular como cosustrato, mientras que las 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas, como el resto de enzimas de su clase, requieren la participación de un cofactor, normalmente NAD, que actúe como aceptor de electrones en la oxidación del radical molecular.

### 4.2.2.1 Transformaciones en posición 3 del anillo A. Participación de una 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Con objeto de determinar la intervención de una actividad 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa en el catabolismo de los ácidos biliares, se procedió a analizar el genoma secuenciado de la cepa con el fin de buscar algún gen potencialmente codificante de dicha actividad. Esta búsqueda permitió identificar un marco de lectura abierto cuya secuencia polipeptídica codificada mostraba elevada identidad de secuencia con 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas caracterizadas en otros microorganismos. Esta homología resultó particularmente elevada en el caso de varias cepas de *C. testosteroni* (Möbus & Maser, 1998), lo que suponía un importante indicio de la más que probable intervención de esta enzima en el metabolismo de los AB.

Como ya se indicó en la sección de Introducción (1.5.1), las 3-hidroxiesteroide deshidrogenasas catalizan la oxidación del radical hidroxilo localizado en posición 3 de las moléculas esteroídicas generando un grupo carbonilo.

Dado que existen moléculas esteroideas en las cuales el sustituyente hidroxilo presenta configuración  $\alpha$  y otras en las que lo hace en configuración  $\beta$ , existen hidroxilasas estereoespecíficas que permiten atacar cada uno de estos dos tipos de sustituyente (Fig. 26).



**Figura 26.** Esquema de las reacciones catalizadas por las 3 $\alpha$ - y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas.

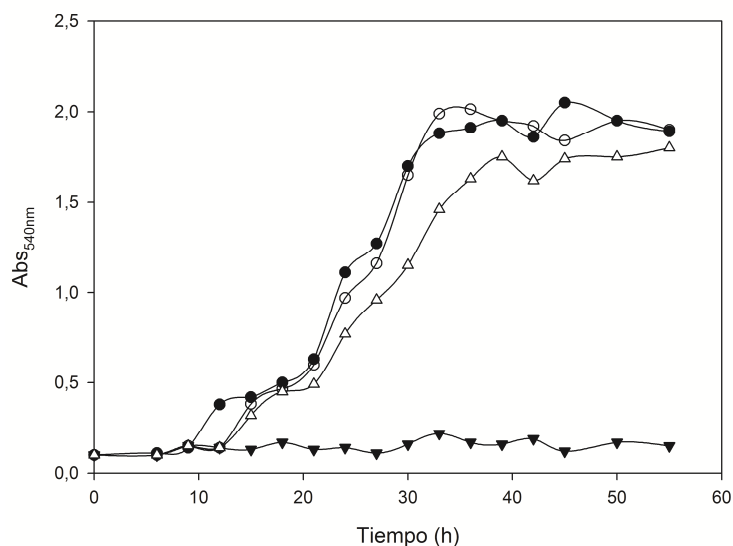
Para analizar la función de esta proteína, se procedió a deletar el gen correspondiente y la cepa obtenida, *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdD*, se cultivó en medios que contenían diferentes esteroides como fuente de carbono.

Estos experimentos evidenciaron que el mutante era incapaz de crecer a expensas de ácidos biliares. Sin embargo, no se veía afectado su crecimiento cuando se cultivaba en medio con testosterona o 4-AD (Fig. 27).

Los ácidos biliares, a diferencia de la testosterona o de la 4-AD, poseen en posición 3 ese hidroxilo que requiere su oxidación hasta un grupo ceto para proseguir la cascada enzimática que permite su catabolismo. Por consiguiente, una cepa defectiva en dicha actividad sería incapaz de metabolizar aquellos compuestos con un grupo hidroxilo en configuración  $\alpha$  (como sucede con todos los ácidos biliares y sus respectivas sales), pero en cambio no tendrían dificultad en catabolizar esteroides en los que tal sustituyente hubiese sido previamente oxidado (como es el caso de la testosterona).

## Resultados y discusión

Por consiguiente, el comportamiento observado en el mutante *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdD* sugiere que el gen que había sido deletado codificaba una enzima con actividad 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.



**Figura 27.** Curvas de crecimiento (medidas como Abs<sub>540nm</sub>) de las cepas *Pseudomonas putida* DOC21 wt (○), *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdD* pMC*stdD* (●), *P. putida*  $\Delta$ *stdD* (▼) cultivadas en MM suplementado con colato 5mM y *P. putida*  $\Delta$ *stdD* (Δ) cultivada en MM suplementado con testosterona 5mM.

Con el fin de establecer la naturaleza de los intermediarios catabólicos acumulados por dicho mutante, los caldos de cultivo se analizaron mediante HPLC. En todos estos experimentos se empleó el medio mínimo Chol1 (Introducción 1.3.4.7) suplementado con ácido cólico y citrato a una concentración 2mM y 10mM, respectivamente.

Estos análisis revelaron que el ácido cólico presente en el medio, aún cuando la cepa crecía a expensas del citrato añadido adicionalmente, permanecía inalterado durante el tiempo que se prolongó el experimento.

El hecho de que no se detectase ningún intermediario metabólico en el medio de cultivo de este mutante, unido a la falta de crecimiento observada cuando cualquier ácido biliar era empleado como sustrato, demostraba además la incapacidad de esta cepa para eliminar la cadena lateral.



## Resultados y discusión

---

Estos resultados sugieren que la oxidación del grupo hidroxilo en posición 3 hasta un grupo ceto (reacción llevada a cabo por la 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa) es el paso inicial en la degradación de AB. Por lo tanto, habremos de admitir que, en condiciones fisiológicas, la enzima responsable de la activación del carboxilo terminal de la cadena lateral solo reconocería como sustrato catalítico la molécula esteroidea en la cual el anillo A presentase un resto carbonílico en posición 3. Esto es, sin este grupo ceto, no se produciría la activación del carboxilo terminal de la cadena lateral adherida a C17 y, por consiguiente, no se iniciaría la degradación de la misma y, por ello, se bloquearía la subsecuente metabolización del ácido biliar.

### 4.2.2.2 Mecanismo de eliminación de la cadena lateral

En una primera etapa, nuestros esfuerzos se centraron en el esclarecimiento de las etapas conducentes a la eliminación de la cadena lateral de cinco átomos de carbono adherida en posición 17 a la estructura tetraanular característica del núcleo de los ácidos biliares (Fig. 4). Para ello recurrimos al análisis de los datos genómicos que nos habían permitido localizar los diferentes *clusters* en que se agrupaban los genes catabólicos responsables de la degradación de esteroides.

Tomando en consideración las referencias bibliográficas, que postulaban un proceso similar a una  $\beta$ -oxidación como el mecanismo más probable de degradación de este resto hidrocarbonado (Szentirmai, 1990), se buscó entre los mutantes de inserción algún gen que codificase enzimas estructuralmente relacionadas con CoA ligasas.

## Resultados y discusión

---

Se comprobó que en uno de los mutantes, el transposón Tn5 se había insertado en el gen *stdA1*, cuya proteína presentaba una elevada identidad de secuencia elevada con acil-CoA ligasas microbianas (Holert *et al.*, 2013b; Mohn *et al.*, 2012). Este mutante se comportaba como los mutantes de la ruta alta, puesto que resultaba incapaz de crecer cuando cualquier sal biliar se utilizó como fuente de carbono, pero mantenía su capacidad de catabolizar 4-AD o testosterona de modo similar a como lo hacía la cepa silvestre. Ambos hechos sugerían que el gen afectado codificaba una enzima con actividad ácido biliar CoA sintetásica responsable de la esterificación del resto carboxílico terminal de la cadena lateral. Con el fin de corroborar esta hipótesis, se procedió al análisis de las regiones génicas próximas a este gen en busca de otros ORFs que codificaran enzimas que pudieran participar en el proceso de eliminación de la cadena lateral. Este análisis condujo a la identificación de dos genes adicionales, denominados *stdA2* y *stdA3*, cuyas proteínas codificadas poseían características típicas de enzimas con actividad CoA ligasa.

Estudios previos realizados tanto en microorganismos G+ como G- (Casabon *et al.*, 2013; Horinouchi *et al.*, 2006; Miclo & Germain, 1990) habían descrito la intervención de una segunda acil-CoA ligasa implicada en la ruta baja. Esta enzima actuaría esterificando una de las moléculas resultantes de la escisión de la estructura tetraanular tras la apertura en meta del anillo B por acción de una dioxigenasa. Sin embargo, hasta ese momento, todas las evidencias experimentales y la bibliografía existente sugerían la existencia de una sola acil-CoA ligasa implicada en la degradación de la cadena lateral alifática unida a C17.

El hecho de que no existiera hasta la fecha ningún microorganismo en el que se hubiese descrito íntegramente el desarrollo de la ruta catabólica, nos animó a profundizar en el estudio de los pasos implicados en el procesamiento, acortamiento y metabolización de la cadena lateral.

## Resultados y discusión

Por esta razón, y con el objetivo de caracterizar la función concreta de las tres acil-CoA ligasas identificadas, se procedió a la delección de los genes que las codificaban.

### 4.2.2.2.1 Obtención y caracterización de los mutantes de delección en los genes *std1*, *std2* y *std3*.

Para tratar de esclarecer la participación o no de estos genes en el catabolismo de compuestos esteroidicos en la cepa *P.putida* DOC21, se empleó la estrategia de delección específica y dirigida en cada uno de los tres casos.

```
StdA2 -----MNLPSSSLPPSRVVPREQTQAILDRRSAASALIKPSDLYTLADRLEQQAE
StdA1 MSIEQWRSAWTQLIGEGAPFEVITPADGGPRQFRH-----APATL----QAVIDAGR
StdA3 -----MMNPIQNCAAPLPA-----APTSI----ARLLF----
          : * :           :           * : :           :

StdA2 RFGERPLLIYGE-----QSLSYAEVDARANQMAHTFYAKGLRAGDVCAMV
StdA1 VHGEREFLVWQDQRLSFAGYF-----DLVDR--LAGQMIARFGLQPGERVAIA
StdA3 -----ASAARFAGYTAIEEDGQCLDYADLPEQALTVTRGLMALGIQAGDRVGLW
          : :           : : * : : * : . :

StdA2 MENRPAFFCTWFGLVKLVVVAFINTQVNGKALLHALQTTAAKALVVGEECLSNVLATEG
StdA1 MRNQPAWLIAFAAIQRCGAVCVPLNSWGLRDELLHGLED SGAGLLLCDEARLNLLRDDL
StdA3 APNGRQWILAALGIHCAGAVLVPINTRMKGAEAADILARSGCRALFVQRRFLDVEDYPALL
          * : : . : * . * : : : . * : . . * . . * .

StdA2 LP----PLSYWLVGDAENPWTADLPGFIDRQ--FAARLDSAPRTAFPRDIRAGVEAQTP
StdA1 ARQ-----RTTIAVG-----LGSVGLPDYCFRYEDLLAAEPLS--APQ--VQVGRDSPA
StdA3 EPCRPASLEHQIVFDAEQVADARDLGYAQF---LTGALTIEKLTAEERRA--LSIGPEAMC
          : . . . * : * : : : : : : : :

StdA2 LLIFTSGTTGLPKAARYSHMRWSSGDVM-----EVTLAATCDDVFYCC
StdA1 MILYTSGTTSRAGVLSHRVAVCQALTALEFQGAFCALSSPQRIGKVIASGFAPTSMLMAV
StdA3 DLLFTSGTTGKPKGVMSAHGQNLRAFSEY-----VRVIGLVPGDYRILVN
          : : * * * * . * . . : * : : : : . : .

StdA2 PLYHGAAATSVTSTALRAGASIVVRRRFSVSEFWRDVSRHQITVFQYIGEICRYLLNRPV
StdA1 PLFHVSLHAQFLSALRGGRRLLVLMYKWDVEQALDLIRDERCTQFNGAPVMMQQLLASPR
StdA3 PFFHAFGYKAGWLTCLIAGATILPHAVFDADVVFQRIARERISVLPGAPTLYLSLLAHP
          * : * . : : * . * : : : : : : : : : * * *

StdA2 QPGEQAHSRLC-MLGAGLTPESQWRWI-ERFGPIQVFEGWGATEANSALINV-----DN
StdA1 FGSADTASLFLGLGGGASSAGLLGWMVERKPDVIGGSGYGLTESNGIGAAIG-GDPFVH
StdA3 LADTDLSSLRIAVTGSASIPPSLIERMRNELGFSVVTAYGLTECGGLATLCDPGDSAEV
          . : * * * . . . : : . : * * * . .

StdA2 YPGSCGRVPDWARDNLRLIRFDVENDCHPRDANGFYQECQVGEVGEAMGFIVNHPDIGGG
StdA1 KPASCGWPLP IVDL-----RIGDDPRQ-----PVADGDSGL---IWLRSPTLMSG
StdA3 IAGTSGRPLAGTEV-----SIRDPQNL-----ALAQGETGE---ICLRGFHVMHG
          . : . * . : : . : * : * : : . : *
```

## Resultados y discusión

```

StdA2      RFEGYTSAEATESKIRRNVLREGDAWSSGDLRLQDADGYCYFVDRIGDTFRWKSENVST
StdA1      YWNQP---QAS-----AETL-QDGLWNTGDLGYLDDEGFLCINGRVKELINRGGEKISA
StdA3      YFENP---EAT-----REAI DAEGWLHTGDVGRLDGQGNLVI TDRLKDMYIVGGFNCYP
           ::      **:          :.* **: *:* :.*: : .:

StdA2      QEVADALGDLTGLELINIYGVQVPGHEGRAGMAAVLMOAGQSFDPQALFALAEARLPRYA
StdA1      AEIEACISDMPGVDEAAVFAVPDPL-LGEAVAL--VIQGDQLPTEQAVQVFLAERLAGYK
StdA3      AEIEAALIAHPAIAQVAVIGIPDAR-MGEVGCACVVLREGRQLAEGELIAWSRERMANYK
           *: .: .: : .: *.. ::: .: : . **: *

StdA2      APLFVR-VSAAADLTSTFKLRKVDLQRQGYCPQACADPLYIRDEQSSSYQPYSPELLERL
StdA1      VPAHVYRVSEPLPRNATGKVLKAQLKQRLTL-----
StdA3      VPRQVR-LFPALPLNASSKVAKNELRALVACD-----
           .* * : .: : * : * :*:

StdA2      ELAPFVVASHD
StdA1      -----
StdA3      -----

```

**Figura 28.** Alineamiento de las tres acil-CoA ligasas presentes en el genoma de la cepa DOC21 con implicación en el catabolismo de esteroides.

Los mutantes en los que se había provocado la delección de un fragmento interno de cada uno de estos tres genes se obtuvieron mediante una estrategia de doble recombinación asistida por el plásmido (no replicativo en *Pseudomonas*) pJQ200SK, tal y como se detalló en la sección Materiales y Métodos.

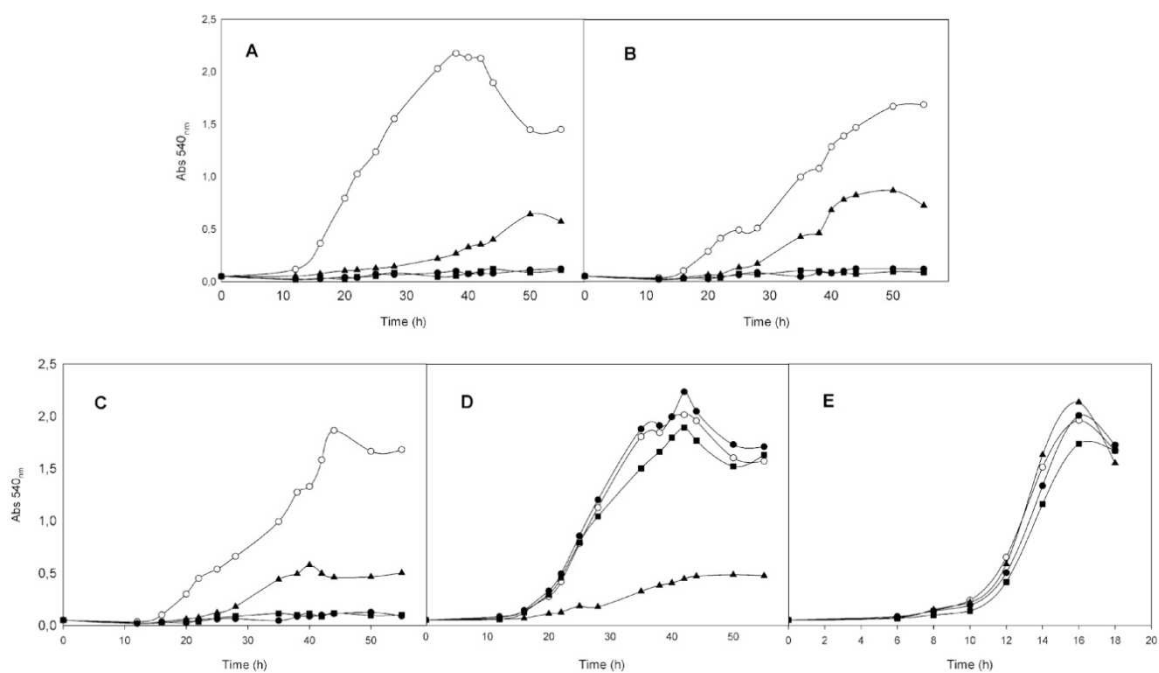
Una vez que se comprobó la eliminación efectiva del fragmento génico, se procedió al análisis del crecimiento de cada una de las cepas mutantes resultantes, estudiando su capacidad de asimilar diferentes esteroides. De este modo, se observó que dos de los tres mutantes exhibían el mismo comportamiento, siendo incapaces de crecer a expensas de ácidos biliares pero manteniendo la capacidad para utilizar testosterona o 4-AD como fuentes de carbono. Este comportamiento metabólico coincide con el de los mutantes de la ruta alta, esto es, el de aquellos mutantes afectados en algún paso catalítico periférico previo a la síntesis del intermediario metabólico común (Fig. 25).

Por otro lado, el tercer mutante de delección presentaba un comportamiento diferente del de los dos anteriores. Este mutante resultaba incapaz de metabolizar testosterona o 4-AD, y crecía escasamente en los

## Resultados y discusión

medios en los que se empleaba un ácido biliar como sustrato metabólico (Fig. 29).

De hecho, cuando se cultivó este mutante en medio que contenía ácidos biliares como único sustrato, la  $A_{540nm}$  suponía aproximadamente la tercera parte de la absorbancia alcanzada por la cepa silvestre (Fig. 29). Este comportamiento sugería que el mutante defectivo en la actividad enzimática codificada por el gen delecionado estaba afectado en la degradación de una parte de la estructura del ácido biliar. Por esta razón, esta cepa crecía a expensas de la otra fracción que sí que era degradada, gracias a que aún conservaba el resto de maquinaria enzimática necesaria para su procesamiento (Fig. 29).



**Figura 29.** Curvas de crecimiento (medidas como  $Abs_{540nm}$ ) de las cepas *Pseudomonas putida* DOC21 wt (○), *P. putida* DOC21  $\Delta stdA1$  (●), *P. putida*  $\Delta stdA2$  (■) y *P. putida*  $\Delta stdA3$  (▲) cultivadas en MM suplementado con colato 5mM (A); Desoxicolato 5 mM (B); Quenodesoxicolato 5 mM (C); Testosterona 5 mM (D) y Succinato 20mM (E)

Los datos recabados hasta este momento crecimiento nos permitieron proponer que las enzimas codificadas por los dos primeros genes,

## Resultados y discusión

---

denominados *stdA1* y *stdA2*, formaban un heterodímero. Según esta hipótesis actuarían conjuntamente para catalizar la esterificación del grupo carboxilo presente en el extremo de la cadena lateral de los ácidos biliares. Mientras, la tercera actividad enzimática, denominada StdA3, sería la responsable de la activación del intermediario metabólico resultante tras la escisión de la molécula esteroídica como consecuencia de la ruptura del núcleo central de la misma (Casabon et al., 2013).

Para tratar de confirmar o rechazar dicha hipótesis, se procedió al análisis e identificación de los intermediarios metabólicos presentes en los diferentes medios de cultivo.

#### 4.2.2.2.2 Aislamiento e identificación de los intermediarios metabólicos acumulados por los mutantes *P. putida* $\Delta$ *stdA1* y *P. putida* $\Delta$ *stdA2*.

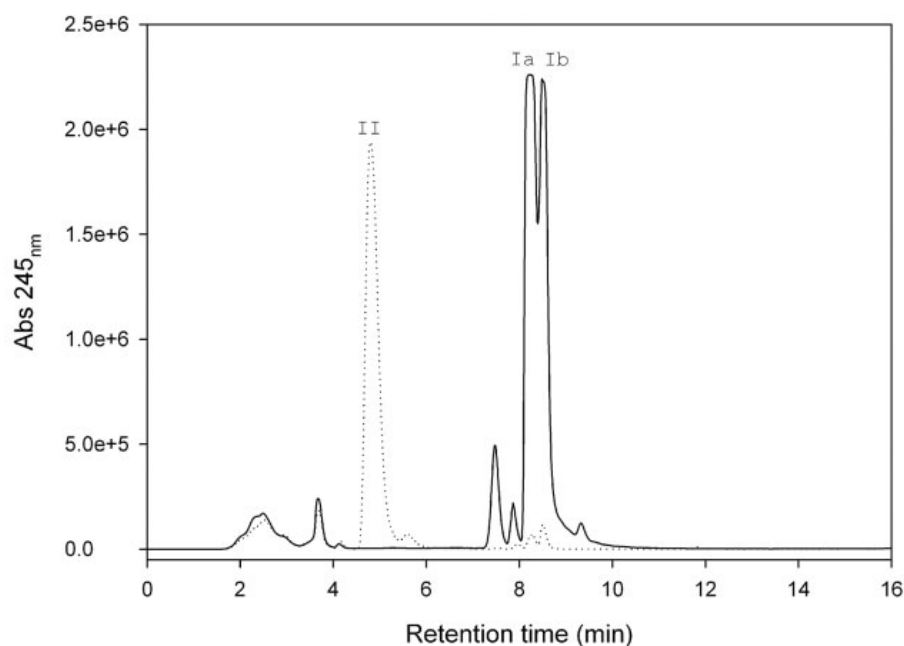
Con el objeto de profundizar en la caracterización de estos mutantes y de establecer los puntos metabólicos exactos en los que estos se encontraban afectados, se trató de identificar el compuesto (o el conjunto de los mismos) que acumulaba cada uno de los mutantes.

Para ello, las cepas delecionadas se cultivaron en un medio de cultivo que contenía un esteroide (AB o testosterona) que actuaría como precursor de intermediarios y otra fuente de carbono adicional (succinato o citrato) para soportar el crecimiento bacteriano. Las moléculas que se acumularan en el sobrenadante del medio indicarían la reacción metabólica bloqueada, permitiendo así establecer la pérdida de la etapa bloqueada en cada caso.

Los intermediarios metabólicos acumulados en los caldos de cultivo fueron analizados mediante técnicas cromatográficas, bien HPLC, bien

## Resultados y discusión

mediante GC-MS, dependiendo de las características físico-químicas del metabolito en particular.



**Figura 30.** Cromatogramas de los sobrenadantes correspondientes a los cultivos de los mutantes *P. putida* DOC21  $\Delta stdA1$  (línea sólida) y *P. putida* DOC21  $\Delta stdA2$  (línea de puntos) en medio mínimo Chol1 suplementado con colato (5mM) y succinato (20mM). Los picos corresponden a los compuestos:  $\Delta^{1,4}$ -3-cetocolato (Ia),  $\Delta^{1/4}$ -3-cetocolato (Ib) y DHOPDC (II).

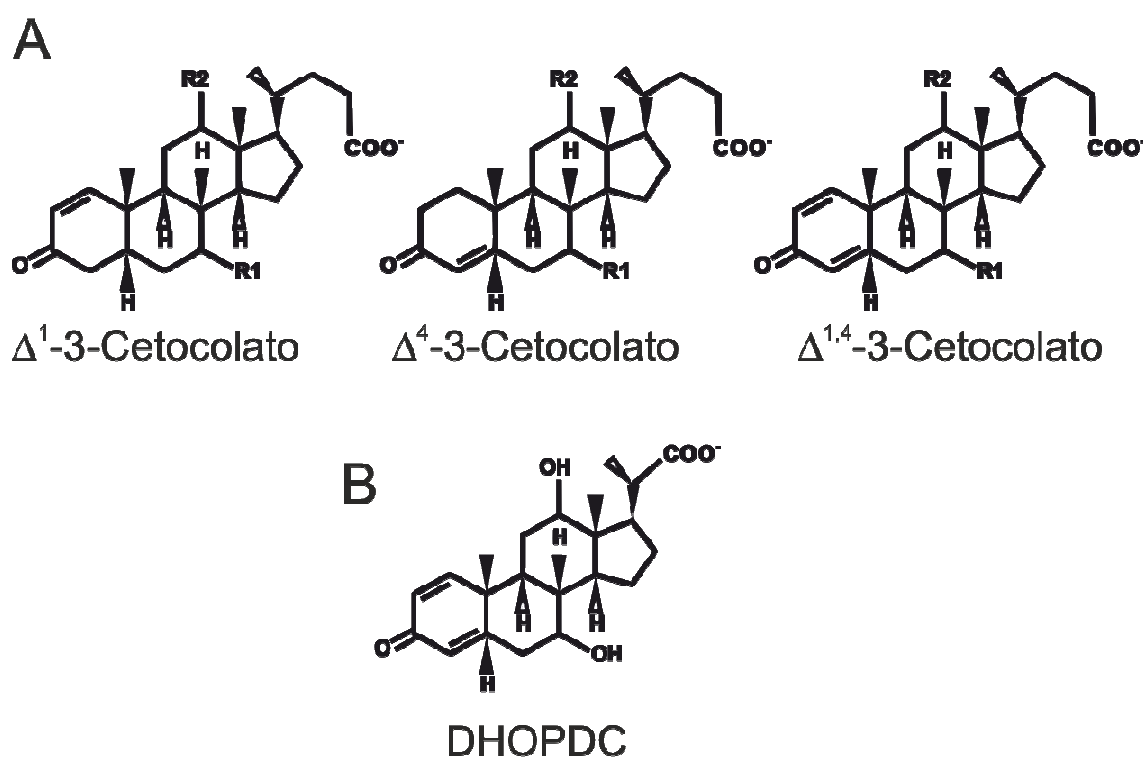
El análisis de los caldos de cultivo de los mutantes  $\Delta stdA1$  y  $\Delta stdA2$  reveló la presencia de compuestos que poseían un núcleo esteroídico con el mismo estado oxidativo en el anillo A. En todos estos intermediarios la posición 3 se encontraba ocupada por un grupo carbonilo, mientras que entre los enlaces 1-2 y 4-5 del anillo A habían sido introducidas sendas insaturaciones. Es decir, los intermediarios metabólicos acumulados por los mutantes defectivos en cada una de las actividades de las dos CoA ligasas StdA1 y StdA2, presentaban una estructura común correspondiente a un dieno no conjugado.

Los intermediarios acumulados mayoritariamente en los caldos de cada uno de los mutantes de delección diferían en la longitud de la cadena lateral unida al carbono en posición 17. Así, el mutante *P. putida*  $\Delta stdA1$

## Resultados y discusión

acumulaba principalmente un intermediario con un resto hidrocarbonado de 5 átomos de carbono de longitud,  $\Delta^{1,4}$ -3-cetocolato, así como pequeñas cantidades de estructuras monoinsaturadas ( $\Delta^1$ -3-cetocolato y  $\Delta^4$ -3-cetocolato) (Fig. 29).

Por su parte, el mutante defectivo en el segundo gen,  $\Delta stdA2$ , acumulaba principalmente un metabolito cuya cadena lateral se había acortado en dos átomos de carbono, y que correspondía al ácido  $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-3-oxopregna-1,4-dien-20-carboxílico (DHOPDC) (Fig. 29).



**Figura 31.** Intermediarios metabólicos identificados en el sobrenadante de los cultivos correspondientes a los mutantes *P. putida* DOC21  $\Delta stdA1$  (A) y *P. putida* DOC21  $\Delta stdA2$  (B).

La identificación de estas moléculas reafirmaba la participación de dos actividades CoA ligásicas diferentes en el proceso de degradación de la molécula de ácido biliar por parte de la cepa DOC21 y corroboraba que cada una de ellas era responsable de la esterificación de esteroides con cadena alifática con diferente número de carbonos.



## Resultados y discusión

---

Este resultado no encajaba con el modelo clásico de degradación que asumía la eliminación de la cadena lateral se llevaba a cabo mediante un típico proceso de  $\beta$ -oxidación. En tal caso, la eliminación de esa parte de la molécula del ácido biliar únicamente requeriría la participación de una actividad CoA ligásica, la que se precisaría para activar el grupo carboxilo terminal y, por lo tanto descartaría la participación de una segunda CoA ligasa en el proceso de degradación de la cadena.

Por el contrario, nuestros datos soportaban la implicación de dos acil-coA sintetasas. Además, la identificación de intermediarios metabólicos distintos en ambos mutantes demostraba irrefutablemente que se requieren ambas actividades para la activación de compuestos cuyo residuo hidrocarbonado posee cinco o tres átomos de carbono respectivamente.

### 4.2.2.2.3 Ensayos de complementación génica y metabólica de los mutantes de delección

Una vez establecida la participación de dos enzimas en la eliminación de la cadena alifática de los ácidos biliares, se comprobó la capacidad de los mutantes de revertir su incapacidad metabólica mediante la sobreexpresión de cada los genes *stdA1* y *stdA2* en los dos mutantes.

De este modo se pudo comprobar que la sobreexpresión del gen que había sido deletado en cada cepa restauraba el comportamiento metabólico de la cepa silvestre. Es decir, tanto *P. putida*  $\Delta$ *stdA1* pMC*std1* como *P. putida*  $\Delta$ *stdA2* pMC*std2* recuperaban la capacidad de crecer a expensas de ácidos biliares.

No obstante, las cepas *P. putida*  $\Delta$ *stdA1* pMC*std2* y *P. putida*  $\Delta$ *stdA2* pMC*std1*, a pesar de mantener la capacidad de utilizar testosterona y 4-AD como únicas fuentes de carbono, seguían siendo incapaces de procesar la cadena lateral unida al carbono en posición 17, condición imprescindible

## Resultados y discusión

---

para la degradación de los ácidos biliares. Este resultado demostraba que la sobreexpresión del gen complementario en cada uno de los mutantes de delección no produjo ninguna modificación del comportamiento metabólico de ambos mutantes. Este experimento demostraba de manera inequívoca que la actividad de cada una de las enzimas codificadas por los genes *stdA1* y *stdA2* resulta específica. En resumen, en condiciones fisiológicas, la pérdida de una de las actividades no puede ser sustituida por sobreexpresión de la actividad complementaria.

Adicionalmente, se llevaron a cabo otros dos experimentos con los que se trató de determinar la especificidad de ambas ligasas a la hora de reconocer y catalizar la esterificación con coA de sustratos esteroídicos cuya cadena lateral era de 3 o de 5 átomos de carbono. Estos experimentos se abordaron mediante la complementación metabólica de cada uno de los mutantes, esto es, inoculando cada una de las cepas mutantes en un caldo de cultivo donde había crecido la cepa mutante complementaria.

El primero de estos experimentos consistió en tomar el medio de cultivo en que se había cultivado el mutante *P. putida*  $\Delta$ *stdA2* durante 72 horas, centrifugarlo y esterilizarlo sometiéndolo a un ciclo estándar en el autoclave. El caldo resultante fue empleado como sustrato en el que se inoculó el mutante defectivo en la otra actividad CoA ligásica, *P. putida*  $\Delta$ *stdA1*. En tales condiciones, esta mutante creció y no acumuló intermediarios metabólicos. Este resultado demostraba que el mutante *P. putida*  $\Delta$ *stdA1* posee toda la maquinaria enzimática necesaria para degradar los metabolitos acumulados por el mutante *P. putida*  $\Delta$ *stdA2*.

El segundo experimento consistió en una variante del proceso anteriormente descrito. Para ello, el metabolito intermediario acumulado por el mutante  $\Delta$ *stdA2*, DHOPDC, fue extraído y parcialmente purificado desde un medio de cultivo en el que había crecido el mutante *P. putida*  $\Delta$ *stdA2*.

## Resultados y discusión

---

Este compuesto fue suplementado como única fuente de carbono a un medio químicamente definido en el que se cultivó la cepa *P. putida*  $\Delta stdA1$ . Este segundo mutante creció de manera normal, resultado que indica que el mutante *P. putida*  $\Delta stdA1$  es capaz de metabolizar este compuesto y utilizarlo como única fuente de carbono.

Ambos experimentos reflejaban que una vez superado el punto de bloqueo metabólico que supone la pérdida del gen *stdA1*, el mutante carente de esta actividad es capaz de procesar el resto de la molécula de ácido biliar y crecer, demostrando que esta cepa alberga todos los elementos genéticos y enzimáticos necesarios para el procesamiento del resto de la molécula.

En resumen, quedaba patentemente demostrado que:

- i) cada una de las dos actividades enzimáticas, StdA1 y StdA2, era la responsable de la esterificación de los compuestos esteroídicos generados durante el proceso de degradación, y que,
- ii) las etapas enzimáticas catalizadas son diferentes en la secuencia catabólica.

#### 4.2.2.2.4 Ensayos enzimáticos con las enzimas StdA1 y StdA2

Con el fin de completar la caracterización de las enzimas StdA1 y StdA2, se realizaron una serie de ensayos enzimáticos en los que se trató de reproducir *in vitro* la reacción de esterificación catalizada por sendas actividades coenzima A ligásicas. Para ello se emplearon diferentes sustratos y distintos extractos celulares.

En este tipo de experimento, la cepa silvestre y los diferentes mutantes de delección fueron cultivados en un medio que contenía ácido cólico para

## Resultados y discusión

asegurar la inducción génica de los elementos implicados en el catabolismo esteroídico y citrato como fuente alternativa de carbono para sustentar el crecimiento bacteriano. El extracto crudo se obtuvo según el protocolo indicado en la sección de Materiales y Métodos (3.13.1)

Estos extractos crudos correspondientes a las cepas *P. putida* DOC21 silvestre, *P. putida* DOC21  $\Delta stdA1$  y *P. putida* DOC21  $\Delta stdA2$  se ensayaron en diferentes experimentos.

Enzima	Fuente de extracto crudo	Sustrato	Tpo. de retención HPLC (min)	Producto	Tpo. de retención HPLC (min)
StdA1	<i>P. putida</i> DOC21 wt	Colato	n.d.	Colil-CoA	15,4
	<i>P. putida</i> $\Delta stdA2$	$\Delta^{1,4}$ -cetocolato	14	$\Delta^{1,4}$ -cetocolil-CoA	14,3
	<i>E. coli</i> DH10B pMCstdA1	$\Delta^{1,4}$ -cetocolato	13,7	$\Delta^{1,4}$ -cetocolil-CoA	14,1
StdA2	<i>P. putida</i> DOC21 wt	DHOPDC	11	DHOPDC-CoA	11,5
	<i>P. putida</i> $\Delta stdA1$				
	<i>E. coli</i> DH10B pMCstdA2				

**Tabla V.** Resultado de los ensayos enzimáticos realizados con diferentes enzimas y mezclas de reacción.

Para llevar a cabo estas pruebas, se emplearon como sustratos de reacción colato sódico, cetocolato o DHOPDC. Además, en todos los casos, se añadió a cada tubo de ensayo cloruro de magnesio y coenzima A como cofactor enzimático, obteniéndose los siguientes resultados:

- i) el extracto correspondiente a la cepa silvestre catalizaba la reacción de esterificación *in vitro*, utilizando todos los sustratos.
- ii) El extracto correspondiente al cultivo del mutante *P. putida*  $\Delta stdA1$  catalizó la reacción sólo cuando se utilizó como sustrato la molécula de DHOPDC, cuya cadena lateral presenta tres átomos de carbono.

## Resultados y discusión

---

- iii) El extracto crudo correspondiente al cultivo de *P. putida*  $\Delta$ *stdA2* catalizó la activación de las moléculas esteroídicas que contenían un residuo de 5 átomos de carbono en la cadena lateral (tales como el colato y el cetocolato), pero resultaba incapaz de llevar a cabo esta misma reacción cuando el sustrato empleado era el DHOPDC, que posee en C17 un residuo de tres átomos de carbono.

Adicionalmente, se llevaron a cabo idénticos ensayos enzimáticos utilizando como extracto crudo un lisado celular procedente de cultivos de *Escherichia coli* HB101 pMC*stdA1* y *E. coli* HB101 pMC*stdA2*. Estas cepas contenían un plásmido replicativo que albergaba una copia íntegra de cada uno de los genes. Los medios de cultivo de dichos recombinantes se suplementaron con IPTG (para asegurar la inducción y expresión del gen clonado dentro del plásmido) y, posteriormente, las células fueron recogidas y centrifugadas en fase exponencial de crecimiento. El precipitado bacteriano resultante se lisó según el protocolo descrito en Materiales y Métodos (3.13.1).

Los resultados obtenidos con los extractos correspondientes a las cepas recombinantes resultaron semejantes a los descritos con los extractos de *Pseudomonas*. Así, el lisado celular de *Escherichia coli* HB101 pMC*stdA1* activó las mismas moléculas que las cepas de *Pseudomonas* con una copia activa de la enzima StdA1; mientras que la actividad de los extractos de *Escherichia coli* HB101 pMC*stdA2* resultó coincidente con la del mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdA1*.

Estos resultados demostraban que ambas actividades enzimáticas, StdA1 y StdA2, mostraban una preferencia de sustrato claramente diferenciada que venía determinada por la longitud de la cadena lateral adherida en posición 17 de la molécula esteroídica. Sin embargo, la especificidad frente a

## Resultados y discusión

---

la estructura del anillo A de la molécula de esteroide sustrato se mostró mucho más baja. De este modo, la capacidad de la enzima StdA1 para catalizar la activación tanto del ácido cólico (con un sustituyente hidroxilo unido en posición 3 al anillo A del núcleo esteroideo), como del ácido cetocólico (que en lugar del hidroxilo presenta un grupo carbonilo), indica que el estado de oxidación del núcleo de la molécula no es un parámetro crítico o que actúe de manera excluyente para el reconocimiento del sustrato por el centro catalítico de la enzima.

Es interesante reseñar que la capacidad de reconocer sustratos con diferentes sustituyentes en posición 3 entraría en conflicto con la imposibilidad del mutante defectivo en la actividad  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de procesar la cadena lateral de los ácidos biliares, como se indicó con anterioridad. Es decir, el comportamiento del mutante *P. putida* DOC21  $\Delta stdH$  resulta a priori contradictorio con los datos obtenidos tras los ensayos enzimáticos. En este mutante, los ácidos biliares no son transformados pese a disponer de todas las enzimas necesarias para degradar la cadena alifática. En cambio, los ensayos *in vitro* mostraron que la enzima StdA1 cataliza la esterificación tanto de sustratos con un residuo hidroxilo (ácido cólico), como de sustratos con un residuo carbonilo (ácido cetocólico) en posición 3. No obstante, es necesario que las condiciones proporcionadas para realizar los ensayos *in vitro* son óptimas, mientras que en condiciones fisiológicas concurren múltiples factores que pueden impedir la reacción.

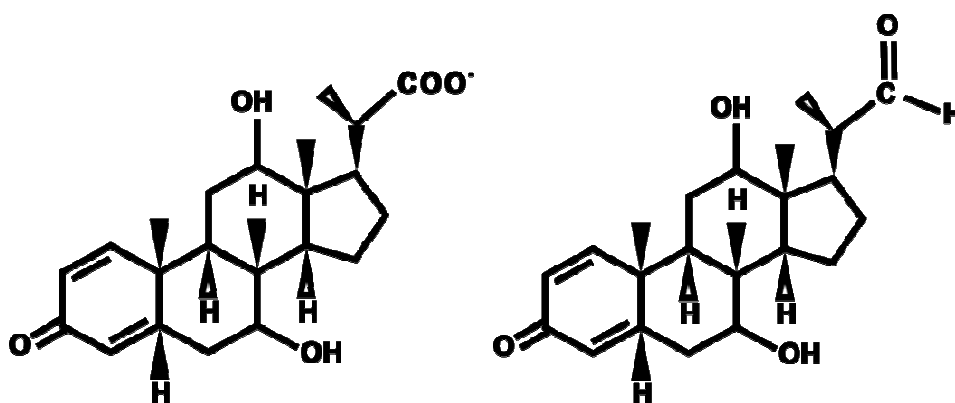
Una vez demostrado a que la ruta periférica responsable de la degradación del residuo alifático unido en C17 no se llevaba a cabo a través de una  $\beta$ -oxidación *sensu stricto* en la bacteria *Pseudomonas putida* DOC21, quedaba aún por dilucidar cuál era el mecanismo por el se llevaba a cabo este proceso.

## Resultados y discusión

---

Para tratar de esclarecer la secuencia de actividades enzimáticas implicadas en la degradación de la cadena lateral de los AB, se procedió al análisis de los intermediarios metabólicos presentes en los medios de cultivo de la cepa silvestre cuando crecía en un medio químicamente definido suplementado con colato como única fuente de carbono. Al no encontrarse bloqueada en ningún paso enzimático para el catabolismo de estos compuestos, la acumulación de estas moléculas se producía de manera transitoria en el sobrenadante de los cultivos de la cepa silvestre, por lo que el perfil del cromatograma evolucionaba durante el desarrollo de la fermentación.

De esta manera pudo comprobarse que los picos cromatográficos observados en la cepa *P. putida* DOC21 se superponían con los obtenidos con la cepa *Pseudomonas sp.* Chol1 cuando ambas cepas crecían en medio mínimo Chol1 suplementado con ácido cólico. Este hecho supone un claro indicio de que ambas cepas bacterianas empleaban idénticas rutas metabólicas para el catabolismo de ácidos biliares. Entre estos intermediarios se encontró un analito con naturaleza de aldehído cuya cadena lateral presentaba tres átomos de carbono. Este metabolito, fue anteriormente identificado por el grupo del doctor Philipp en los medios de cultivo de la cepa *Pseudomonas sp.* Chol1 (Holert *et al.*, 2013b) como el 3-oxopregna-1,4-dien-20 $S$ -carbaldehído (DHOPDCA) (Fig. 32) y su presencia aportaba otra evidencia de que el proceso de acortamiento de la cadena lateral no se produce mediante un mecanismo convencional de  $\beta$ -oxidación, dado que durante el transcurso de esta ruta catabólica no se generan metabolitos con esta estructura química.

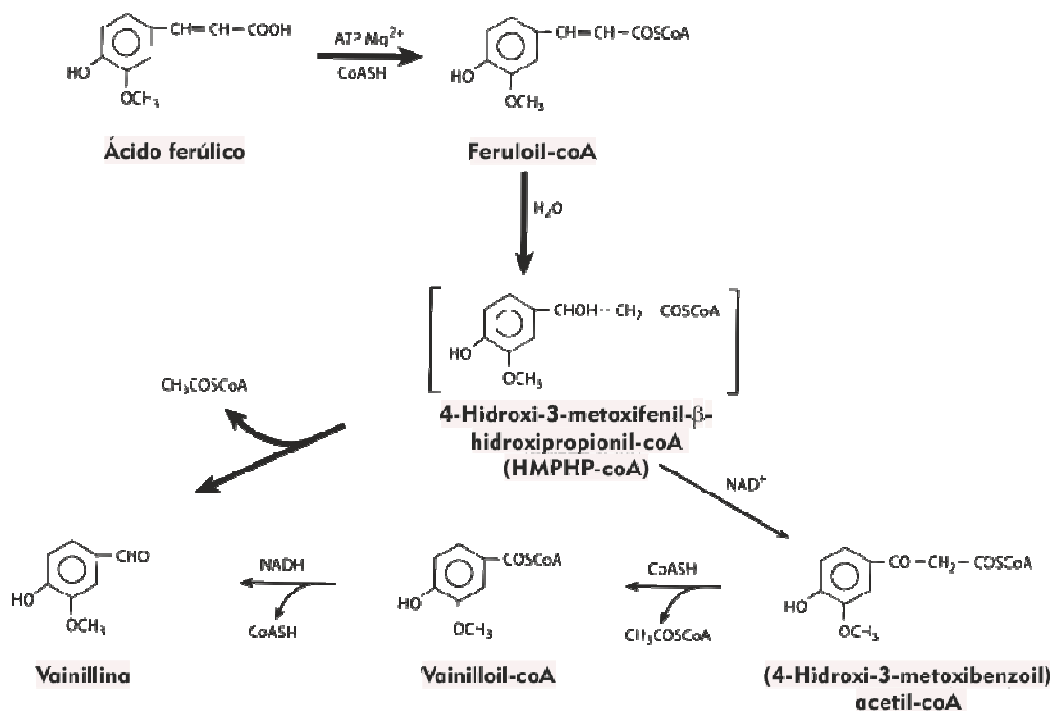


**Figura 32.** Estructuras de los compuestos DOHPDC (izquierda) y DHOPCA (derecha).

Este tipo de reacciones empleadas para la degradación de ácidos orgánicos caracterizadas por la aparición de un intermediario aldehídico, ya habían sido descritas con anterioridad en otras proteobacterias. De este modo, intermediarios aldehídicos se habían aislado durante el metabolismo de ácido ferúlico en *Pseudomonas fluorescens* (Narbad & Gasson, 1998; Overhage *et al.*, 1999) y otras varias especies de *Amycolatopsis* y *Paecylomyces* (Achterholt *et al.*, 2000; Rahouti *et al.*, 1989). Esta ruta degradativa implica la esterificación con coA de la molécula de ácido y su posterior ruptura aldólica para la obtención subsecuente de una molécula de vainillina, compuesto también de naturaleza aldehídica (Achterholt *et al.*, 2000; Gasson *et al.*, 1998; Rahouti *et al.*, 1989).



## Resultados y discusión



**Figura 33.** Ruta de degradación de ácido ferúlico en *Pseudomonas fluorescens* (Tomado de Gasson et al., 1998).

Este mecanismo de ruptura aldólica utilizado por un representante del género *Pseudomonas* en la degradación de ácido ferúlico suponía un antecedente y un punto de partida para plantear un proceso de eliminación de la cadena lateral alternativo a lo anteriormente propuesto.

La identificación en los caldos de cultivo del mismo intermediario de naturaleza aldehídica durante la degradación del ácido cólico en las cepas *Pseudomonas Chol1* y *P. putida DOC21*, unido a la participación de dos enzimas con actividad coA ligásica, hizo que se propusiese un mecanismo diferente de una β-oxidación para la eliminación de la cadena lateral de los ácidos biliares.

El grupo del profesor Philipp caracterizó varios genes y enzimas implicados en la eliminación de la cadena lateral de la molécula de colato. Entre estos genes se encontraba el gen *sal*, cuyo producto génico es responsable de catalizar la ruptura aldólica de la molécula esteroídica con resto de cinco átomos de carbono, rindiendo como producto DHOPDCA,

## Resultados y discusión

---

molécula con cadena lateral de tres átomos de carbono y naturaleza aldehídica (Holert *et al.*, 2013a).

La aparición de compuestos de naturaleza aldehídica en la degradación de ácidos biliares ya había sido caracterizada con anterioridad, si bien los mecanismos moleculares conducentes a la obtención de los mismos resultaban desconocidos. Entre ellos, se habían descrito esteroides de 22 átomos de carbono (correspondiente a cadena lateral de tres átomos de carbono, equivalente no hidroxilado de la molécula DHOPDCA) que aparecían durante el catabolismo de litocolato por parte de la cepa *Pseudomonas putida* ST-491 (Suzuki *et al.*, 1998).

El conjunto génico responsable del catabolismo esteroídico en la cepa *Pseudomonas Chol1* presenta posibles ortólogos en distintas cepas con capacidad de metabolizar esteroides, como *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC-125 y *Comamonas testosteroni* KF-1 (Holert *et al.*, 2013a).

Dentro del genoma de la cepa DOC21 se identifican genes cuyos productos codificados muestran similitud con las enzimas de la cepa *Ps. Chol1*, lo que indica su más que probable participación en la eliminación de la cadena lateral.

## Resultados y discusión

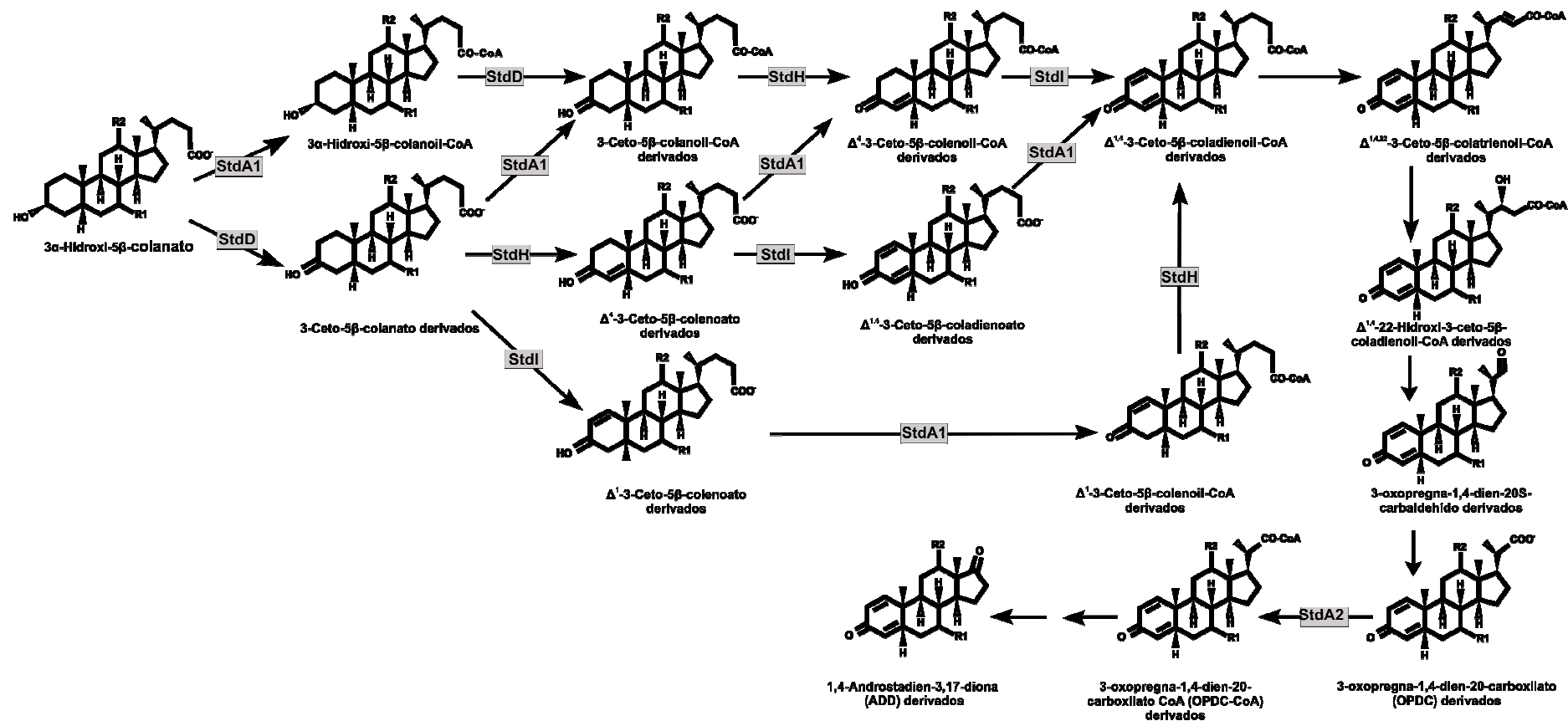


Figura 34. Esquema de la ruta metabólica propuesta para la degradación de la cadena alifática de los ácidos biliares en la cepa *P. putida* DOC21



## Resultados y discusión

---

Este proceso de degradación a través de una ruptura aldólica, que implica una desventaja energética con respecto a una  $\beta$ -oxidación clásica (al requerir un segundo paso de esterificación con coenzima A con el consiguiente gasto de ATP), parece ofrecer algún tipo de ventaja a los microorganismos, pues su uso es frecuente en aquellos con capacidad de catabolizar ácidos biliares. En la cepa *Rhodococcus jostii* RHA1 se han descrito dos enzimas con actividad coA ligásica, CasG y CasI, que reconocen sustratos cuya cadena lateral presenta 5 y 3 átomos de carbono respectivamente, que llevan a cabo la misma actividad enzimática que las enzimas StdA1 y StdA2 realizan en la cepa *P. putida* DOC21 (Casabon *et al.*, 2014).

Esta diversidad de proteínas con actividad acil-CoA ligasa está ampliamente distribuida dentro del grupo de las actinobacterias con capacidad de degradación de ácidos biliares. Así por ejemplo, en la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, la enzima Fad13 (Khare *et al.*, 2009), cumple la misma función en esta cepa que CasG en *R.jostii* RHA1 (Mohn *et al.*, 2012). Además, en estas actinobacterias, el estudio de esta actividad enzimática ha adquirido especial relevancia en los últimos años debido al posible uso de esta y otras proteínas relacionadas como diana terapéutica en el tratamiento de la tuberculosis (Jatana *et al.*, 2011).

En los representantes del género *Rhodococcus*, los genes implicados en el metabolismo de ácido cólico se agrupan en un *cluster* distribuido de manera más o menos extensa, si no de forma universal, entre todas las especies integrantes de dicho género bacteriano. En todas las cepas en las que hasta la fecha se ha testado el crecimiento en colato como única fuente de carbono, la presencia de esta agrupación génica confirió a la cepa portadora la capacidad de metabolizar este y otros compuestos esteroídicos.

Estas cepas están adscritas a distintas especies incluidas en el género *Rhodococcus*, tales como *R. ruber*, *R. opaca*, *R. erythropolis* o la especie con

## Resultados y discusión

---

un genoma reducido *R. equi*. Además, la cepa *Thermomonospora curvata* DSM 43183, con probada capacidad para utilizar ácido cólico, también presenta en su genoma un cluster ortólogo al de las cepas de *Rhodococcus* (Mohn *et al.*, 2012).

Esta agrupación génica alberga, entre otros, los anteriormente mencionados genes *casG* y *casI*, ortólogos de *stdA1* y *stdA2*, que codifican enzimas con actividad acil-coA ligásica que reconocen sustratos esteroídicos cuya cadena lateral unida al carbono en posición 17 presenta una longitud de 5 o 3 átomos de carbono respectivamente.

No obstante, pese a la presencia de estas dos enzimas con actividad enzimática equivalente (Casabon *et al.*, 2014), la ruta de degradación de los ácidos biliares en la cepa *Rhodococcus ruber* RHA1 parece diferir del empleado por *Pseudomonas*. De este modo, la capacidad demostrada *in vitro* por parte de la enzima CasI no tiene gran relevancia fisiológica en la activación de intermediarios esteroídicos, ya que los metabolitos mayoritariamente hallados en los caldos de cultivo de la cepa *R. jostii* RHA1 en presencia de ácido cólico presentan una estructura claramente diferenciada de los hallados en las cepas de proteobacterias tales como *P. putida* DOC21, *P. sp* Chol1 o *C. testosteroni*. En esta actinobacteria, se detectaron principalmente dos moléculas intermediarias de la degradación de ácido cólico: el ácido 3,7(*R*), 12(*S*)-trihidroxi-9-oxo-9,10-seco-23,24-bisnorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico (THSBNC) y 1 $\beta$ (2'propanoato)-3 $\alpha$ -H-4 $\alpha$ (3''(*R*)-hidroxi-3''propanoato)-7 $\alpha$  $\beta$ -metilhexahidro-5-indanona (HHIDP) (Swain *et al.*, 2012). Como puede apreciarse en la figura 35, en ambas moléculas, el núcleo esteroideo se encuentra parcialmente degradado, lo que demuestra que en esta cepa, la eliminación de la cadena lateral y la apertura del anillo B pueden transcurrir de manera simultánea.

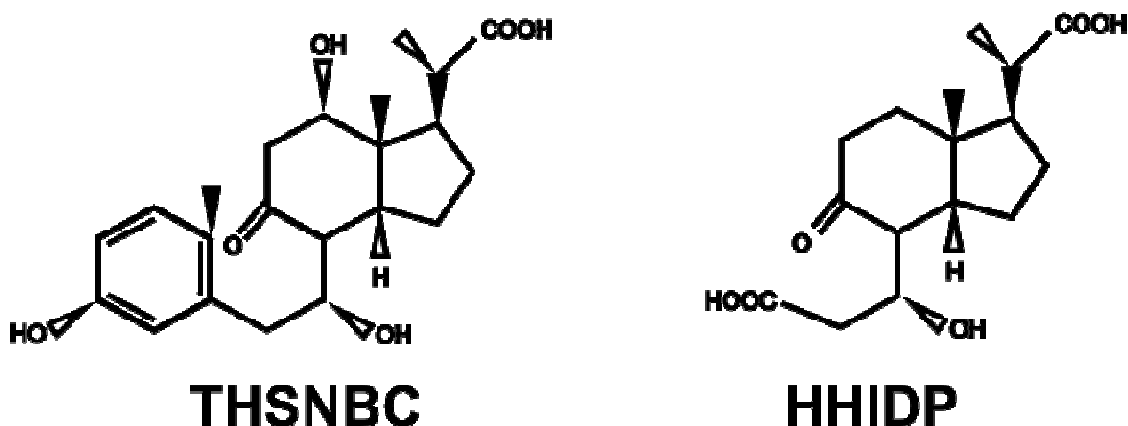


Figura 35. Estructura de los intermediarios aislados en los caldos de *R. jostii* RHA1

En consonancia con este fenómeno, la misma cepa *R. jostii* RHA1 posee transportadores específicos para la incorporación celular de los diferentes intermediarios esteroideos. Dichas proteínas de membrana resultan capaces de discriminar los sustratos en función del estado de degradación del anillo A. De este modo, el transportador CamB reconoce y transloca el intermediario THSNBC, mientras que el transportador CamM realiza la función análoga con el metabolito HHIDP (Swain *et al.*, 2012).

La presencia de estos intermediarios en la cepa *R. jostii* RHA1, cuyo núcleo central ha sido parcialmente degradado, es un indicativo de la diversidad de rutas metabólicas para la degradación de esteroides. Esta variedad de estrategias a la hora de metabolizar moléculas de naturaleza esteroídica se da de manera intragenérica entre diferentes especies que utilizan distintos mecanismos moleculares en el catabolismo del mismo compuesto (Holert *et al.*, 2014). Estos resultados no hacen sino destacar la plasticidad de las rutas microbianas responsables de la degradación de esteroides en el mundo bacteriano, lo que significa que las rutas empleadas por los diferentes microorganismos para catabolizar ácidos biliares son múltiples y que la secuencia de degradación no es única como se había postulado (Hayakawa, 1982).

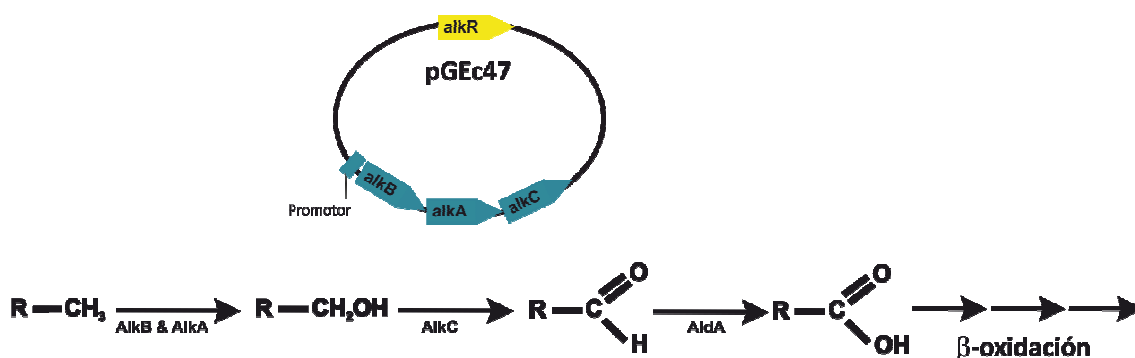
## Resultados y discusión

### 4.2.2.2.5 Funcionalización de la cadena alifática de los esteroides.

#### Catabolismo de esteroides

Dada la incapacidad de la cepa DOC21 silvestre para emplear colesterol como sustrato metabólico, se abordó la estrategia de introducir en *trans* los genes necesarios para la oxidación de compuestos alifáticos. La expresión de estos genes permitiría el mecanismo de oxidación del carbono terminal de la cadena lateral de naturaleza alifática del colesterol para, de este modo, permitir su posterior catabolismo por parte de la cepa transformante de DOC21.

Dichos genes se encuentran comprendidos dentro del operón *alkBAC*, que está formado por una alcano hidroxilasa de membrana, *alkB*, una alcano hidroxilasa soluble, *alkA*, y una alcano deshidrogenasa de membrana, *alkC*, todos ellos expresados bajo la regulación del inductor codificado por el gen *alkR*. Este complejo metabólico se caracterizó por primera vez en la cepa *P. putida* GPo1 (anteriormente denominada *P. oleovorans* GPo1) dentro del plásmido OCT (Chakrabarty *et al.*, 1973). Todo este conjunto génico fue clonado en el interior del vector pLAFRI por el grupo del profesor Witholt para constituir de este modo el plásmido pGEc47, que permite la transmisión y expresión de estos genes en diferentes representantes del grupo de los microorganismos G- (Eggink *et al.*, 1987).



**Figura 36.** Secuencia de actuación de las enzimas requeridas para la oxidación de alcanos. AlkA y AlkB corresponden a alcano hidroxilasas (A soluble y B de membrana) y AlkC a una alcohol deshidrogenasa de membrana. El resto de enzimas requeridas, entre ellas las necesarias para la  $\beta$ -oxidación y AldA, una aldehído deshidrogenasa, están codificadas en el genoma de *Pseudomonas*.



## Resultados y discusión

---

La transferencia de este plásmido a una cepa de *Pseudomonas* que albergue la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la  $\beta$ -oxidación permitiría el metabolismo de compuestos alifáticos de una longitud de 6 a 12 átomos de carbono.

Mediante el uso de esta estrategia se trató de comprobar si la cepa recombinante *P. putida* DOC21 pGEc47 adquiriría o no la capacidad para funcionalizar la cadena alifática de los esteroides que la cepa silvestre no es capaz de realizar *per se*. y comprobar si, de este modo, la cepa resultante era capaz de utilizar colesterol como única fuente de carbono y energía.

Una vez transferido el plásmido a la cepa DOC21, se comprobó la capacidad de la cepa resultante, *P. putida* DOC21 pGEc47, para crecer a expensas de alcanos. Para ello se sembró dicha cepa en una placa de MM y agar en presencia de tetraciclina (marcador de resistencia antibiótica plasmídica), sin adición de fuente de carbono. Para llevar a cabo este experimento, se colocó en el fondo de la placa, sin contacto con la superficie sembrada, un papel de filtro impregnado en hexano u octano, de modo que los vapores de estos hidrocarburos saturasen la cúpula de la placa. Al cabo de varios días en los que se añadió periódicamente el alcano correspondiente sobre el papel de filtro, se observó el crecimiento de las primeras colonias en la superficie de la placa.

Del mismo modo, se procedió a evaluar la capacidad de la cepa transformante para crecer en medio líquido. En este caso se dispuso un matraz con medio químicamente definido estéril y para administrar el hexano u octano se colocó un tubo de ensayo estéril suspendido mediante un alambre de tal manera que no entrase en contacto con la superficie del líquido. De esta manera el hidrocarburo se evaporaba saturando la atmósfera del matraz permitiendo así la asimilación del compuesto por las células bacterianas y evitando los efectos tóxicos que produciría el contacto directo con las membranas celulares. Al igual que sucedió en medio sólido,

## Resultados y discusión

---

se detectó aumento de turbidez al cabo de unas 48 horas. Estos experimentos demostraron la capacidad de *P. putida* DOC21 pGEc47 para crecer utilizando únicamente hexano u octano como fuentes de carbono.

Una vez demostrada la presencia del plásmido y la correcta expresión de los genes en él clonados, se procedió a comprobar si la adquirida capacidad de emplear hidrocarburos como único sustrato metabólico confería a la cepa transformante la posibilidad de catabolizar colesterol.

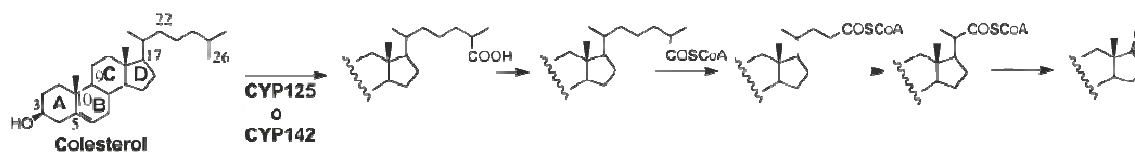
Con este objetivo se sembró la cepa recombinante tanto en medio sólido como en medio líquido consistente en MM suplementado con colesterol a una concentración de 2mM. En ninguno de los dos casos se observó crecimiento, lo que nos permitió concluir que la presencia de un sistema de alcano oxidasa no es suficiente para llevar a cabo la funcionalización del resto alifático de la molécula de colesterol.

Esta incapacidad para llevar a cabo la hidroxilación de la cadena lateral del colesterol y con ello iniciar el proceso de degradación de la molécula esteroidea con la expresión de los genes incluidos en el operón *alkBAC* sugiere que:

- i) bien se precisa de una maquinaria enzimática más compleja y específica, o
- ii) se pone de manifiesto la esencialidad de la conformación espacial adecuada (no olvidemos que el núcleo esteroídico supone un impedimento estérico relativamente voluminoso) para su reconocimiento por parte de la alcano hidroxilasa responsable de la oxidación del sustrato.

Estas conclusiones resultan coherentes con el hecho de que en algunos microorganismos con capacidad para asimilar esteroides, la etapa de oxidación de la cadena lateral adherida a los mismos está catalizada por el citocromo P450 (cyp125) y constituye la primera reacción en el proceso de degradación de colesterol por parte de *R. jostii* RHA1 (Rosloniec *et al.*, 2009) (Fig. 37).

## Resultados y discusión



**Figura 37.** Esquema de los pasos necesarios para la eliminación de la cadena lateral del colesterol donde se indica la función del citocromo Cyp125

No obstante, el proceso de eliminación de la cadena lateral de los esteroides ha demostrado ser un proceso intrincado y aún por esclarecer. Así, la presencia del gen *cyp125* resulta fundamental en el proceso de hidroxilación y posterior degradación del colesterol en la cepa *Mycobacterium bovis* BCG, mientras que en la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, muy próxima filogenéticamente a ella, un mutante de delección de dicho gen, H37Rv $\Delta$ *cyp125*, no mostró ninguna diferencia con respecto a la cepa silvestre cuando se empleó colesterol como sustrato (Capyk *et al.*, 2009). Este microorganismo, no obstante, presenta en su genoma tres genes codificantes para monooxigenasas, Rv1256c, Rv3121 y Rv3618, con potencial capacidad de suplir la actividad de Cyp125 en la hidroxilación inicial del residuo alifático, hecho que permite a esta cepa metabolizar la molécula de colesterol en ausencia de este citocromo.

Estos resultados sugieren, de nuevo, una gran complejidad de la ruta implicada en la degradación de los esteroides y una notable variabilidad dependiendo del microorganismo estudiado. Esta plasticidad genética y bioquímica se traduce en la multitud de estrategias a la hora de abordar el catabolismo de la molécula, bien realizando la secuencia de reacciones enzimáticas en distinto orden, bien utilizando una ruta de degradación diferente.

En el caso concreto de la eliminación de la cadena lateral del colesterol, se ha apuntado la posibilidad de que la subunidad reductasa del complejo

## Resultados y discusión

---

enzimático con actividad 9-hidroxilasa, KshB, esté implicada en este mecanismo actuando como donante de poder reductor en la cepa *R. erythropolis* SQ1 (van der Geize *et al.*, 2002). Este hecho no hace sino poner de manifiesto que el proceso de eliminación del residuo alifático característico de la molécula de colesterol y de otros esteroides es un proceso muy versátil dentro del universo microbiano y, en muchos casos específico para cada microorganismo.

Al igual que sucede con los ácidos biliares, existen microorganismos que no pueden comenzar la degradación del núcleo esteroídico del colesterol hasta que se ha completado la eliminación de la cadena lateral. Sin embargo otros, por el contrario, comienzan a metabolizar la estructura central con independencia del estado de degradación de la cadena lateral (Rosloniec *et al.*, 2009; van der Geize *et al.*, 2007).

De este modo, existen actinobacterias en las que la degradación de la cadena lateral puede transcurrir incluso aunque la hidroxilación del anillo se encuentre bloqueada, como *R. rhodochrous* DSM43269 (Arima *et al.*, 1978). Un mutante de esta cepa defectivo en la actividad 9-hidroxilasa, RG32, es capaz de degradar completamente la cadena lateral hasta acumular ADD (Wilbrink *et al.*, 2011).

Por el contrario, en otro grupo de microorganismos, la transformación del hidroxilo situado en posición 3 hasta un sustituyente carbonílico resulta una condición indispensable para progresar con el metabolismo de la cadena alifática. Entre estos se encuentran la bacteria anaerobia facultativa *Sterolibacterium denitrificans*, que lleva a cabo idénticas etapas iniciales en el metabolismo del colesterol tanto en condiciones de aerobiosis como en condiciones de anaerobiosis (Y. R. Chiang *et al.*, 2007), que incluyen en primer lugar la aparición de un resto carbonilo para proseguir con la degradación de la molécula.

## Resultados y discusión

---

En este sentido, el mecanismo de degradación de ácidos biliares que emplea la cepa *P. putida* DOC21 parece sugerir este mismo efecto, ya que la incapacidad de crecer con cualquier ácido biliar como único sustrato del mutante *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdH*, sugiere que el bloqueo de la oxidación del carbono 3 impide la asimilación de la cadena lateral.

### 4.2.3 TRANSFORMACIONES ENZIMÁTICAS EN EL ANILLO A

#### 4.2.3.1 Deshidrogenación dentro del anillo A

Como se indicó anteriormente, aquellas cepas capaces de metabolizar el colesterol, llevan a cabo una serie de transformaciones periféricas que permiten la obtención de un intermediario común a partir del cual se unifica la ruta degradativa de las diferentes moléculas de naturaleza esteroídica.

Estas reacciones incluyen la oxidación del sustituyente hidroxilo presente en la posición 3 de la molécula, catalizando la conversión a un grupo carbonilo tras la eliminación del protón mediante la actividad de una colesterol oxidasa o de una hidroxisteroide deshidrogenasa. Adicionalmente, y sin que esté definido una secuencia compartida de actividades enzimáticas en el conjunto microbiano, estas cepas llevan a cabo el progresivo acortamiento de la cadena alifática unida al carbono en posición 17, en un proceso similar al que se ha descrito en esta tesis en la cepa *P. putida* DOC21.

Si bien existen casos en los que la degradación de los anillos centrales comienza con anterioridad o simultáneamente a la eliminación completa de la cadena lateral (Bergstrand *et al.*, 2016), para la mayoría de las cepas, una vez se ha completado la eliminación de la cadena lateral característica del colesterol, la degradación tanto de este como de compuestos esteroídicos prosigue con la escisión del núcleo esteroideo a nivel del anillo A.

Para permitir la apertura del anillo dando comienzo a la pérdida de la estructura común de estos compuestos, es necesario llevar a cabo una serie de transformaciones que implican la modificación del anillo A. Este proceso de modificación implica la desaturación los enlaces carbono-carbono que se establecen entre los átomos en las posiciones 1-2 y 4-5. Estas reacciones

## Resultados y discusión

---

están catalizadas por dos enzimas con actividad 3-cetoesteroide- $\Delta^{1,2}$ -deshidrogenasa y 3-cetoesteroide - $\Delta^{4,5}$ -deshidrogenasa respectivamente (Kisiela *et al.*, 2012).

Como se indicó en el apartado 1.5.1 de la Introducción, la presencia de estas dos actividades enzimáticas está ampliamente distribuida en el mundo bacteriano, encontrándose representantes de las mismas en miembros incluidos tanto dentro del grupo de las G+ como del grupo de las G- (Kisiela *et al.*, 2012). La actuación de estas dos enzimas supone un paso fundamental en el proceso degradativo de los compuestos esteroideos al permitir la eliminación transaxial de dos átomos de hidrógeno unidos a dos átomos de carbono situados en posiciones vecinales sustituyéndolos por un doble enlace entre ambas posiciones. Los átomos de hidrógeno corresponden a los denominados C-1( $\alpha$ ) y C-2( $\beta$ ) en el caso de la actividad 3-cetoesteroide- $\Delta^{1,2}$ -deshidrogenasa y a los denominados C-4( $\beta$ ) y C-5( $\alpha$ ) en el caso de la enzima 3-cetoesteroide- $\Delta^{4,5}$ -deshidrogenasa.

Las hidroxiesteroide deshidrogenasas, encargadas de llevar a cabo sendas reacciones de desaturación en la estructura del anillo A, son flavoproteínas que utilizan FAD como grupo prostético. Pese a estar muy relacionadas, las proteínas 3-cetoesteroide- $\Delta^{1,2}$ -deshidrogenasa y 3-cetoesteroide - $\Delta^{4,5}$ -deshidrogenasa no pertenecen al subgrupo incluido en la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta en el que se adscriben las enzimas 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$  ó 12 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas. Sin embargo, al igual que las proteínas responsables de estas actividades enzimáticas, sendas deshidrogenas albergan en su estructura un dominio único de pliegue de Rossmann consistente en una lámina beta incluida entre dos estructuras planas paralelas constituidas por tres hélices alfa situadas a cada lado (Kavanagh *et al.*, 2008; Rohman *et al.*, 2013; van Oosterwijk *et al.*, 2011).

## Resultados y discusión

---

A pesar de las similitudes estructurales entre las distintas deshidrogenasas, independientemente de la familia en la que estas estuviesen incluidas, la identidad de secuencia aminoacídica resulta más bien escasa entre las hidrogenasas que actúan como catalizador biológico de la misma reacción enzimática entre microorganismos representativos de diferentes géneros bacterianos. Esta identidad de secuencia raramente supera el 30% en el caso de las 3-cetoesteroide- $\Delta^1$  y  $\Delta^4$ -deshidrogenasas pertenecientes a distinto género (Kallberg *et al.*, 2010; Kisiela *et al.*, 2012).

De estas dos deshidrogenasas, la responsable introducir la insaturación entre las posiciones 4 y 5 ha sido identificada y descrita en multitud de especies bacterianas. En *C. testosteroni*, que suele constituir el organismo modelo gram negativo para el estudio del catabolismo esteroídico, esta enzima se encuentra codificada por el gen *tesH* (Horinouchi *et al.*, 2010).

Por el contrario, en el caso de los miembros representantes del género *Rhodococcus*, como *R. ruber* Chol-4 o *R. erythropolis* SQ1 así como otras actinobacterias (normalmente adscritas a los géneros *Nocardia*, *Mycobacterium* o *Arthrobacter*), esta actividad suele llevarse a cabo por varias isoformas de esta proteína. Por este motivo, la insaturación del enlace establecido entre los átomos de carbono C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> puede ser catalizado por diferentes isoenzimas dependiendo del sustrato presente en cada caso. En el caso de la cepa *R. ruber* Chol-4, otra cepa normalmente tomada como modelo entre las G+ con capacidad de degradación de esteroides, estas isoenzimas son Kstd1, Kstd2 y Kstd3 (Bragin *et al.*, 2013; Fernández de las Heras *et al.*, 2012; Knol *et al.*, 2008; Rohman *et al.*, 2013).

Para analizar el gen implicado en esta reacción en la cepa *P. putida* DOC21, se tomó como referencia la proteína TesH de la cepa *C. testosteroni* TA441 por su proximidad filogenética y se analizó su secuencia aminoacídica



## Resultados y discusión

comparándola con la base de datos de hipotéticas proteínas que se sintetizarían por traducción del genoma secuenciado de nuestra cepa.

Como consecuencia de este análisis bioinformático se identificó un gen, *stdH*, presente en unos de los *clusters* genéticos que agrupan genes involucrados en el catabolismo esteroideo. En concreto se hallaba incluido dentro del cluster *std3* (Fig. 24), y la proteína resultante de la traducción del mismo presentaba una identidad de secuencia del 50,5% con TesH. Esta elevada similitud en la secuencia polipeptídica (Fig. 37) sugiere la intervención de la enzima StdH en la síntesis de la 4-ADD, el intermediario central comúnmente reconocido en esta ruta metabólica (Merino *et al.*, 2013) (Fig.34).

```

TesH -----MAEQEYDLIVVSGGAGAMLGAIRAQEQLKTLV
StdH MESAAGRIRRRPFLTSANGITMTAQVQSAYDVIVVSGGAGAMTSVAVFLADHGLRVLI
      :.  **:*~*****~. * :  :***:~*~

TesH VEKTELEFGGTSALSGGGIWIPLNYDQKTAGIKDDLETAFGYMKRCVRGBMATDDRVLAYVE
StdH VEKSDKYGGTSAISGGGIWIPNNHYFARMGGNDSPELARRYLQASAGEHVEPARLEAYLA
      ***:~:~*****~*****~ * :  * :~. * * * :~. . * :~**~

TesH TASKMAEYL-RQIGIPYRAMAKYADYYPHIEGSRPGGRTMDPVDFNAARLGLAALETMRP
StdH NAPKMI EALTRNSRVRYAVA AKYPDYYPHLPGLSLAGGRTLDPELFDTSLLGEE-LNNLRK
      . * * * * * :  : * . *** *****~ * * *****~** * :~:~ * * * :~.~*

TesH GPPGNQLFGRMSISAFEAHSMLSRELKSRFTILGIMLKYFLDYPWRNKTRRRDRMTGGQA
StdH PSPSTLLMGR IAWTARHAHKAMARNFGWRLIMGLMLRYKLD FKWRKSKYDRRAALGSS
      * .~. * :~**~:~:~* .~* .~:~:~:~ * :~ * :~*****~* *~:~* :~* * :~* :~*

TesH LVAGLLTAANKVGVEMWHNSPLKELVQDASGRVTGVIVERNGQRQQINARRGVLLGAGGF
StdH LVASLRRSLMDRNVPLWLNTDFRELLM-KDGKVAGIVERDGEQRIEARHGVI FGS GGF
      ***~* :  . * .~* * :~:~:~:~ * :~* :~* :~* :~* :~* :~* :~* :~* :~* :~*

TesH ERNQEMRDQYLNKPSKAEWATATPVGGNTGDAHRAGQAVGAQLALMDWSWGVPTMDVPKEP
StdH EQNQALRXQYLPKXTQMAWSATPXGNNTGTALLAGMKEGAATALMDWAWWAPT IAVPGED
      * :~**~:~* * * * :~:~ * :~**~* .~***~* * * * * * * *~* :~* :~* *

TesH AFRGIFVERS LPGCMVVNSRGRFLNESGPYP EFQQA MLAEHA-KNGGGVPAWIVFDASF
StdH KPRGIFAERAFPGAIVVNSLGRRFVNEAAPYLEFVDAMHRDNQKTGGCSVPAWIVFD AHF
      ***~.~* :~* :~* :~* * :~* :~* :~* .~* * * * :~* :~:~.~* .~* :~* :~* *

TesH RAQNPMGPLMPGSAVPDSKVRKSWLNNVYWKGETLEDLARQIGVDATGLQDSARRMTEYA
StdH RFHYAMGPLMPAQVMPDSRLRKEWLNTLYWKADTLAGLAAQIGVDADGLEN TVVKVNDYA
      * :  *****~.~.~:~* :~* :~* :~* :~* :~* .~* * * * * * * :~:~.~:~* :~*

TesH RAGKDLDFDRGGNVFDRYYGDPRLK-NPNLGP I EKGPFYAMRLWPGEIGTKGGLLTDREG
StdH RSGVDPDFGRGGNVFDRYYGDCNIKPNPCLAPLRKGPYAMRLDAGDIGTKGGLLTNEHA
      * :~* * * * .~*****~*****~ .~* * * * .~* :~.~*****~ * :~*****~:~* .~*
    
```

## Resultados y discusión

```
TesH   RVLDTQGRIIEGLYCVGNNSASVMGPAYAGAGSTLGPAMTFAFRAVADMLGKPLPIENPH
StdH   QVVREDGTP IAGLYAIGNCSASVMGTSYPGAGGTLGPAMTFGYVAANHLAREAS-----
      :*:   :*  *  ***_:**  *****  :*  **_.*****_:  *  .  .:  :

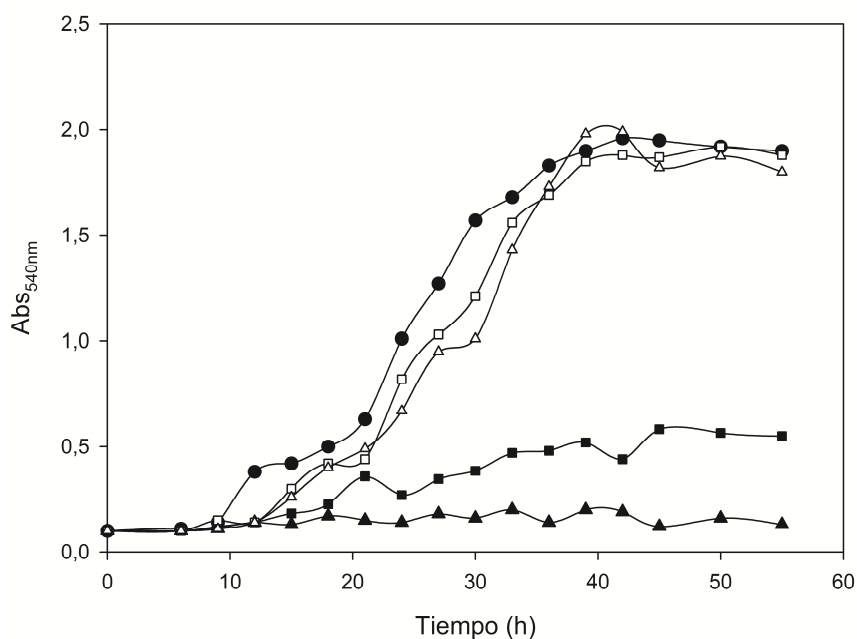
TesH   LLGKTV
StdH   -----
```

**Figura 37.** Resultado del alineamiento de la secuencia aminoacídica de las enzimas TesH (*C. testosteroni*) y StdH (*P. putida* DOC21)

Para corroborar esta hipótesis, se procedió a la delección y clonación ulterior en ese mutante del gen *stdH*. Utilizando la técnica de doble recombinación detallada en la sección de Materiales y Métodos, se obtuvo una cepa *knock-out* para este gen, el mutante *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdH*. Esta cepa era incapaz de crecer en un medio cuya única fuente de carbono fuese la testosterona, y su crecimiento era escaso cuando se utilizó cualquier ácido biliar como sustrato.

Cuando esta cepa mutante fue complementada en *trans* con una copia intacta del gen clonado dentro del plásmido pMC, recuperó la capacidad para degradar testosterona y ácidos biliares, creciendo hasta densidad óptica equivalente a la misma cualquiera que fuese la molécula esteroídica empleada como fuente de carbono (Fig. 38).

## Resultados y discusión



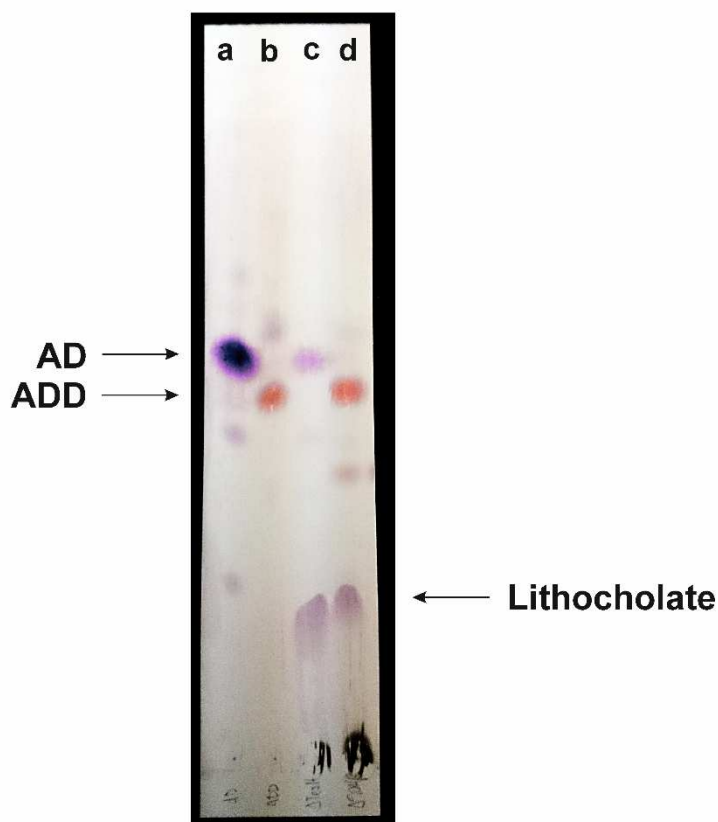
**Figura 38.** Curvas de crecimiento (medidas como  $Abs_{540nm}$ ) de las cepas *Pseudomonas putida* DOC21 wt (●), *P. putida* DOC21  $\Delta stdH$  pMCstdH (□) y *P. putida*  $\Delta stdH$  (■) cultivadas en MM suplementado con colato 5mM; y de las cepas *P. putida* DOC21  $\Delta stdH$  pMCstdH (Δ) y *P. putida*  $\Delta stdH$  (▲) cultivadas en MM suplementado con testosterona 5mM.

Con objeto de analizar si el punto de bloqueo metabólico de la cepa mutante DOC21 $\Delta stdH$  correspondía con el que causaría la pérdida de la actividad 3-cetoesteroide  $\Delta^4$ -deshidrogenasa, se procedió a cultivar en medio líquido dicho mutante en presencia de una fuente de carbono alternativa como el succinato, que actuase como sustrato energético y una molécula de naturaleza esteroídica cuya función fuese generar intermediarios metabólicos.

Cuando se analizaron los intermediarios presentes en el sobrenadante de este mutante en los medios de cultivo en los que el esteroide añadido fue el litocolato, se acumuló, fundamentalmente, la molécula 4-androstadiona (Fig 39). La acumulación de este intermediario metabólico suponía un indicio consistente con la propuesta de que la degradación del ácido litocólico transcurre mediante una secuencia que supone la eliminación de la cadena

## Resultados y discusión

alifática unida al carbono en posición 17 hasta la obtención del intermediario metabólico común que es la 4-AD (Merino *et al.*, 2013).



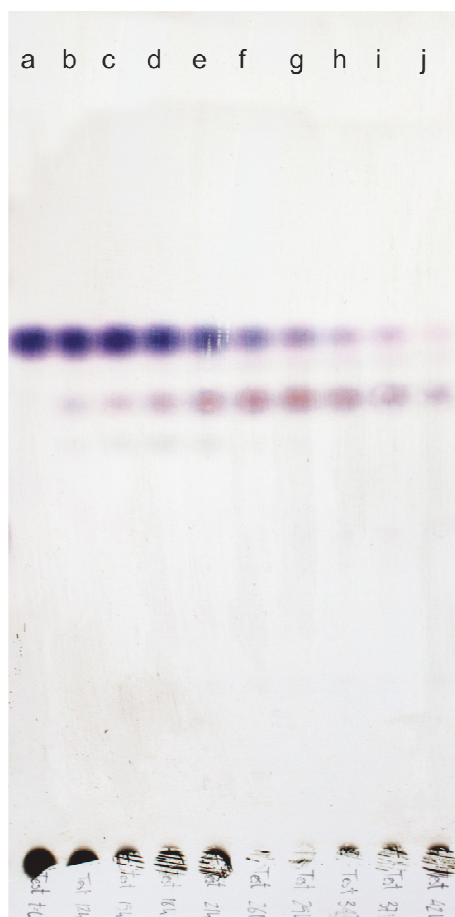
**Figura 39.** Resultado de la TLC correspondiente a los patrones de AD (calle a), ADD (calle b), muestra del sobrenadante del mutante  $\Delta stdH$  en presencia de litocolato (calle c) y muestra del sobrenadante del mutante  $\Delta stdJ$  en presencia de litocolato (calle d).

Así pues, la pérdida del gen delecionado, *stdH*, supondría el bloqueo en la introducción de la segunda insaturación requerida en el anillo A. Dicho bloqueo metabólico es consistente con el hecho de que esta enzima exhiba, en efecto, actividad  $\Delta^4$ -deshidrogenasa.

Siguiendo un método semejante al empleado para analizar los intermediarios metabólicos de la cepa  $DOC21\Delta stdH$ , se llevó a cabo un estudio de los intermediarios iniciales que se producirían durante el crecimiento de la cepa silvestre en un medio químicamente definido (Martínez-Blanco *et al.*, 1990) suplementado con testosterona a una

## Resultados y discusión

concentración 5mM como única fuente de carbono. Durante las primeras horas del cultivo, se detectó de manera transitoria la presencia de un intermediario de naturaleza esteroídica y estructura desconocida (Fig. 40).

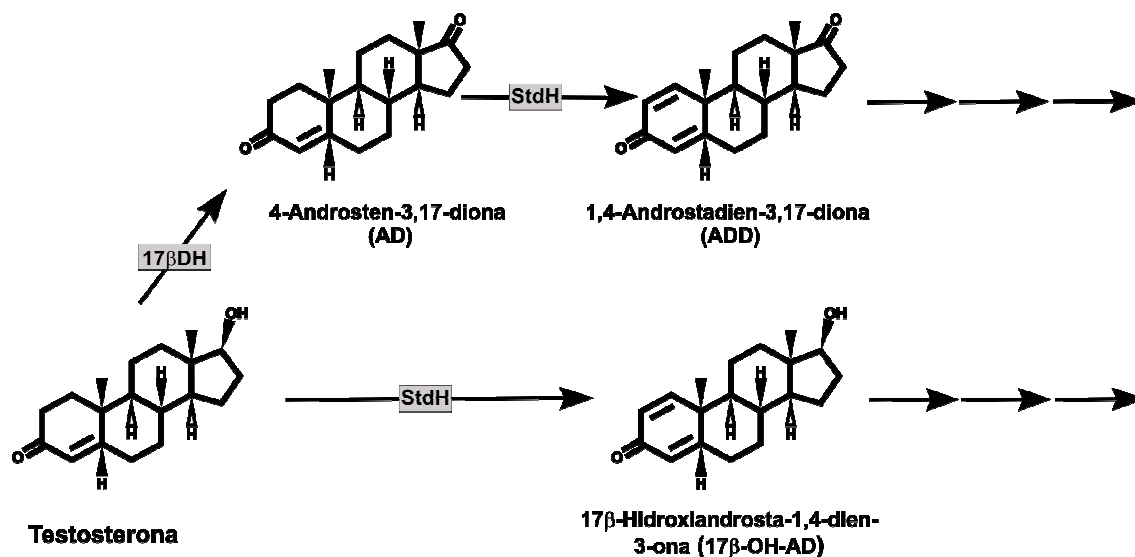


**Figura 40.** Resultado de la TLC correspondiente al sobrenadante del medio de cultivo de la cepa silvestre con testosterona 5mM a diferentes tiempos de cultivo correspondientes a los siguientes puntos: t=0h (calle a), t=12h (calle b), t=15h (calle c), t=18h (calle d), t=21h (calle e), t=26h (calle f), t=29h (calle g), t=34h (calle h), t=37h (calle i) y t=42h (calle j) .

Un análisis por resonancia magnética nuclear de esta molécula reveló que se trataba de 17 $\beta$ -OH-AD (Fig. 40). Este hecho sugiere que el sustituyente unido al carbono en posición 17 no es un parámetro excluyente en el proceso degradativo de los esteroides. Dicho de otro modo, la oxidación del anillo A y posterior apertura en meta del anillo B d puede producirse en la cepa *P. putida* DOC21 independientemente de si se encuentra un sustituyente de tipo hidroxilo u otro de tipo carbonilo adherido

## Resultados y discusión

al carbono en dicha posición. Este hecho supondría que la enzima StdH podría actuar sobre un sustrato que presentase tanto un hidroxilo como un carbonilo en posición C17 (Fig.41).



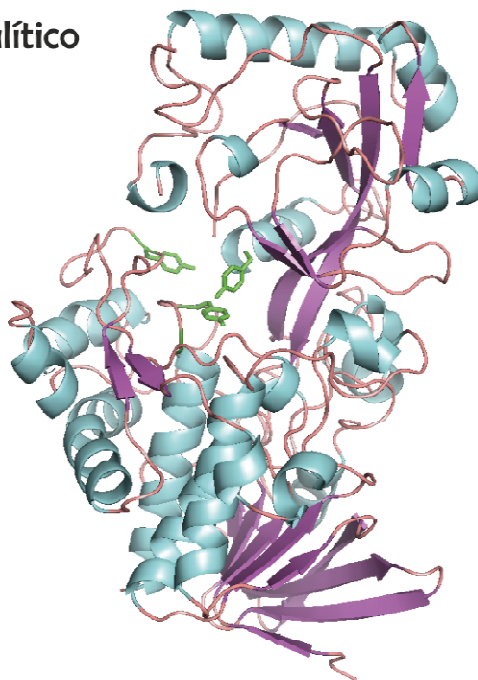
**Figura 40.** Esquema que representa el punto de actuación propuesto para la enzima StdH en la metabolización de la testosterona.

Como complemento a los experimentos de crecimiento, se realizó un modelado tridimensional de la enzimas StdH empleando el programa informático Phyre (Kelley & Sternberg, 2009), una herramienta computacional que predice mediante algoritmos el plegamiento y la estructura de una proteína dada su secuencia aminioacídica dada mediante su comparación frente a una base de datos que suministra posibles homologías de dominio.

Para la modelización, se empleó como molde la estructura cristalográfica de la 3-cetoesteroide  $\Delta^1$ -deshidrogenasa de *R. erythropolis* SQ1 (número de acceso de Protein Data Bank 4C3Y (Rohman et al., 2013)) con una resolución de 2,3 Å.

El análisis estructural llevado a cabo propuso la división de la proteína en dos dominios diferenciados: por un lado se encuentra el dominio de unión al cofactor FAD y por otro se encuentra el dominio catalítico (Fig. 41).

**Dominio catalítico**



**Dominio de unión  
a FAD**

**Figura 41.** Modelo tridimensional de la proteína StdH. Se aprecian sendos dominios, catalítico y de unión al FAD. Además, están coloreados en verde los residuos aminoacídicos que intervienen en el mecanismo catalítico.

El primero de los dominios, el de unión del nucleótido FAD, se organiza siguiendo la disposición espacial de un plegamiento de Rossmann, como el que típicamente se da en otras flavoproteínas (Dym & Eisenberg, 2001). Dentro de este dominio se halla el motivo consenso de unión a nucleótidos de secuencia **VIVGSGAGAMTSAVFLADHGLRVLIVE**, indicándose en negrita los residuos aminoacídicos conservados.

La otra parte de la estructura proteica corresponde al dominio catalítico. Dentro de este dominio se encuentran dos residuos conservados, una tirosina en posición 544 y otro residuo de glicina en posición 548, que están implicados en la tautomerización cetoenólica del sustrato. Además, dentro de la secuencia se hallan dos tirosinas adicionales, Y124 e Y367, que, junto con el dominio de unión al cofactor FAD participan en el mecanismo catalítico mediante la eliminación de un protón y un ión hidruro (Rohman *et al.*, 2013).

## Resultados y discusión

---

Adicionalmente, se llevó a cabo la clonación del gen *stdH* dentro del plásmido pMC. Este plásmido se transfirió a la cepa mutante *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdH* mediante una conjugación triparental. La cepa resultante, *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdH* pMC*stdH*, resultó indistinguible de la cepa silvestre, recuperando la capacidad de crecer con ácidos biliares, testosterona o cualesquiera de los esteroides metabolizables por la cepa silvestre como únicas fuentes de carbono.

Como conclusión a la vista de los datos expuestos, podría indicarse que:

i) la proteína StdH presenta una actividad enzimática 3-cetoesteroide- $\Delta^1$ -deshidrogenasa responsable de la eliminación transaxial de los átomos de hidrógeno correspondientes al anillo A de la estructura esteroídica C-1( $\alpha$ ) y C-2( $\beta$ ), y que

ii) en la cepa *P. putida* DOC21, esta proteína es la única enzima con capacidad para catalizar esta actividad.

Esta singularidad de la enzima en la cepa DOC21 no la comparten, sin embargo, los miembros otros grupos bacterianos. Así pues, en la cepa *R. ruber* Chol-4, se han descrito tres isoenzimas con actividad 3-cetoesteroide- $\Delta^1$ -deshidrogenasa (Fernández de las Heras *et al.*, 2012). Estas tres isoenzimas, denominadas KstD1, KstD2 y KstD3 respectivamente, son responsables de catalizar la misma reacción de deshidrogenación, pero presentan afinidades bien diferenciadas en función del sustrato metabólico de la reacción. En esta cepa microbiana, KstD2 ha demostrado estar implicada en la degradación de AD, mientras que, por el contrario, la isoforma KstD3 presenta una función relevante en el catabolismo de colesterol. La función de la tercera isoenzima KstD1, por el contrario, no ha sido esclarecida hasta el momento de publicación de este trabajo.



## Resultados y discusión

Este mismo patrón de multiplicidad de enzimas con capacidad de catalizar esta reacción se repite en representantes de otros géneros adscritos al grupo de los G+. De este modo, la actividad  $\Delta^1$ -cetoesteroide deshidrogenasa fue analizada en otros representantes del grupo de las actinobacterias, incluyendo representantes de los géneros *Rhodococcus* como *R. erythopolis* SQ1, *R. jostii* RHA1o *R. rhodochrous* DSM43269 (Mathieu *et al.*, 2010; Petrusma *et al.*, 2011; van der Geize *et al.*, 2002); *Mycobacterium* como las cepas *M. smegmatis* o *M. tuberculosis* (Brzostek *et al.*, 2005; van der Geize *et al.*, 2007) o *Gordonia*, como *G. neofelifaeces* (Zhang *et al.*, 2015). En todos estos microorganismos se observó una multiplicidad de isoformas de la mencionada actividad enzimática. En alguno de los microorganismos estudiados, la diversidad de enzimas se correspondía con una diferencia preferencia de sustrato y por consiguiente con la intervención preferencial de cada isoenzima en la degradación de cada compuesto específico. Por ejemplo, la cepa *Mycobacterium neoaurum* ATCC25795 contiene en su genoma tres genes que codifican polipéptidos con actividad 3-cetoesteroide- $\Delta^1$ -deshidrogenasa. Un estudio basado en ensayos enzimáticos demostró notables diferencias de afinidad de cada una de las distintas isoformas por cada sustrato esteroídico según los sustituyentes que presentase la molécula. Así pues, en esta cepa, la enzima KstD1 presenta una mucha mayor actividad frente a 9-OH-AD y KstD3 muestra preferencia por la molécula de AD (Yao *et al.*, 2014).

Se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de StdH frente a las tres isoenzimas presentes en la cepa *R. ruber* Chol-4, KstD1, KstD2 y KstD3 (Fig. 42).

```
StdH      MESAAGRIRRRPFLTSANGITTTMTAQVQSQSAYDVIVVGSAGAMTSVAVFLADHGLRVLI
KstD1     -----MVDWAEECDVLLVVGSGAGGCCGAYTAAREGLSVVL
KstD2     -----MATNPVPVSPTHDTTVDLLVIGSGT-GMAAALTAHELGLSTLI
KstD3     -----MIKQEYDIVVVGSGAGGMTAALTAHRGASVVL
                                     *:::***: . . * * .::
```

## Resultados y discusión

```

StdH      VEKSDKYGGTSAISG-GGIWIPNNHYFARMGGNDSPELARRYLQASAGEHVEPARLEAYL
KstD1     VEASEYFGGTTAYSGGGGVWFPTNAVLRRAGDDDTIDDALTYHAVVGDRTPRDLQDAYV
KstD2     VEKTEYVGGSTARSG-GAFWVPANPVLKAGSGDTLDRAGTYIRSVVGESAPAERGA AFL
KstD3     VEKAPHYGGSSARSG-GGVWIPNNEVLGAAGVTDTPEAARTYLHSIIIGDVVPAKIDTYI
          **: : ** : * ** * . . * . * * : * * : : * * : : * : . : : :

StdH      ANAPKMIEALTRNSRVRYAVAAKYPDYYPHLPGSLAGGRTLDPPELFDTSLLGEELNNLRK
KstD1     RGGAPLIDYLEADEDIEFT-AYPWPDYFGKAPKASAKGRHIAPTPRSVADDPPELNE SVRG
KstD2     DHGSATVEMLQRTTTPMRLFWAKGYSYHPELPGGSAVGRTCECRPFNVSVLGLERERLRP
KstD3     DRGPEMLSFVLEHSALELQWVPGYSDYYPEAPGGRLGGRSVEPKPFDGKRLGDDLALLEP
          . : . : : . : : * . . * . * * . : . :

StdH      PSPSTLLMGRIAWTARHAHKAMARNFGWRLLIMGLML-----RYKLDKFKWRKSKYDR
KstD1     PLGRER-----NGDP-----LPGD-----LPGD-----LPGD-----LPGD
KstD2     GLMKA----GLPM-----PVTGADYKWMNLMARKPSKAFPRIFRRLAQGVAGLAL-KRE
KstD3     DYVKG----PPNF-----VITQADYKWLNLLMRNPRGPVRAAKVG-VRYLWARAR-RRH

StdH      RAALGSSLVASLRRS-LMDRNVPLWLNTDFRELLMKDGKIVVERDQGEQRIEARHG
KstD1     KLIGGRALIGRFLVAMRKYPNVQLHRNTPLEELVVEDGAVVGAI VSHGEQRRAVRARKGV
KstD2     YVAGGQALAAGL FAG-VVRAGIPVWTE TTVLVRLLTEGDRVTGAVVACDQGEVTVTARRGV
KstD3     LLVRGQALMAGLRMG-LRDAGVPLLLNTALTDLVVEDGVVVRGVRVESDQQRVTRARRGV
          * : * . : . : : : * : * : * : . . * * * . * . : * * * *

StdH      IFGSGGFQEQNALRXQYL PKXTQMAWSATPXGNNTGTALLAGMKEGAATALMDWAWWAPT
KstD1     VLAAGGFHDNDEMRRARYGVPGA-ARDSMGPWS-NLGKAHQAAIAIGADVLMSEAWWSPG
KstD2     VLAAGGFHDMALRHKYQSERLGEHESLGAEG-NTGDGIRAALDVGAAATLMDQAWWFFPA
KstD3     VIASGGFEHNEQMRTQYQRAPIGTEWTVGAKA-NTGDGIRAGQSLGAAVDFMDDAWWGPS
          : : : * * : : : * : * : : : . * * . * . * * . : * . * * * *

StdH      IAVPGEDKPRGIFAERAFPGAIVVNSLGRRFVNEAAPYLEFVDAMHRDNQ---KTGGCSV
KstD1     LTHPDGRSFAFA---LCFTGGIFVDQDGNRFTNEYAPYDRLGRDIIARM---DKGEMTL
KstD2     VAAMKGRPPMVMLAERALPGSFIVDHTGRRRFVNEATDYMSFGQLVLDRE---RAGDPVE
KstD3     FPLTG--GPWFALSERSLPGSMMVNAAGRFRVNESAPYVEAVHMYGGRHGRGDGPGENI
          . : * . : * : * . * * * * : * : :

StdH      PAWVIFDAHFRFHYAMG-PLMPAQVMPDSRLRKEWLNT-LYWKADTLAGLAAQIGVDADG
KstD1     PFWMIYDDRSGVVPIAATNVPL-----VETEKYEAAAGLWKATDLAELAGQIGVSAEA
KstD2     SMWIVFDQRYRNSYIFGGGLFPRQ-----PVPEAWIRAGIAHRADDPALARAAGLPEGA
KstD3     PCWMILDQRYNRYTFA-GITPRS-----PFPKRWLKAGVVVRAGSIAELAGKIGVPAAA
          * : * : : . : * : : : : * . * * * * : : .

StdH      LENTVVKVNDYARSGVDPDFGRGGNVFDRYYGDCNIKPNPCLAPLRKGPFIYAMRLDAGDI
KstD1     LEATVARFNRLAAGGVDEDFGRGDEPYDVAFTG----GGSALVPIEKGPFHAAQFGISDL
KstD2     FTETFRRFNDAAAAGTDADFRRGASAYDRYYGDPTVEPNPNLRPLTDGPFYAVKMTLSDL
KstD3     LTATVERFNGFARAGREDFGRGESGYDHYGDPNKNPNPVLGVIDKAPFYAIKVVVPGDL
          : * . : . * * . * * * * * . : * : . * : . . * * * : . . * .

StdH      GTKGGLLTNEHAQVVREDGTP IAGLYAIGNCSASVMGTSYPGAGGTLGPAMTFGYVAANH
KstD1     GTKGGLRTDTVGRVLDGAGTPI PGLYAAGNTMAAPSGTVYPGGGNPIGTSALFAHLAVRH
KstD2     GTCGGVKADERARVLRREDGSSVVDGLYAIGNTAANAFGNTYYPGAGATIGQGVLVYGYIAAQD
KstD3     GTKGGLRTDADARVLRREDGTVIEGLYAAGNASGPMGHTYAGPGATIGPAMTFAYLAVLD
          * * * * : : . : * : * : * * * * . * * * * * : * . : : * * .

StdH      LAREAS-----
KstD1     MAGA-----
KstD2     AAKSR-----
KstD3     ALARPEQPAVPPVSETVEQH
    
```

**Figura 41.** Resultado del alineamiento de la secuencia aminoacídica de las enzimas StdH (*P. putida* DOC21) y KstD1, KstD2 y KstD3 (*R. ruber* Chol-4).

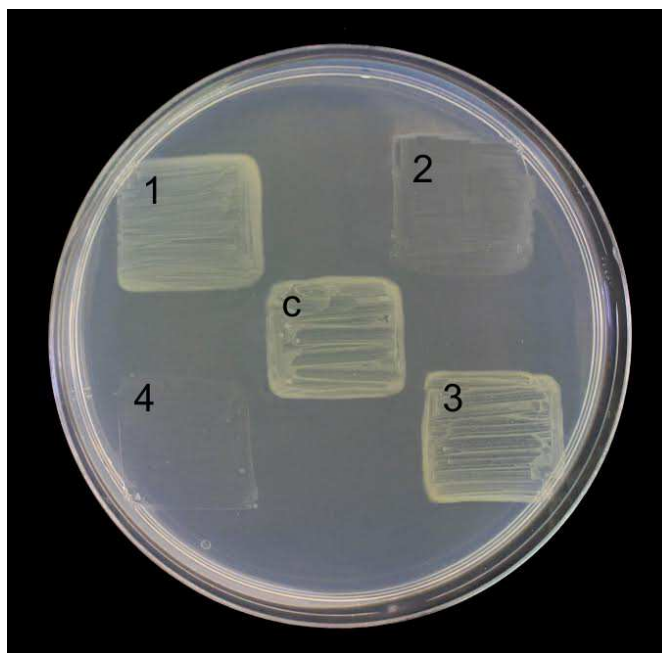
## Resultados y discusión

---

Como puede apreciarse en la figura 42, la identidad de secuencia entre StdH y las diferentes isoenzimas es limitada, situándose en 34,7% frente a KstD1; 36% frente a KstD2 y 41,5% frente a KstD3. Esta baja identidad de secuencia no es llamativa, dada la distancia filogénica que separa a ambas cepas. Más curioso es, sin embargo, el hecho de que esta identidad alcanza valores ligeramente superiores entre las propias isoenzimas, situándose en 35,7% (KstD1 vs KstD2), 39,4% (KstD1 vs KstD3) y 44% (KstD2 vs KstD3). Esta escasa identidad de secuencia es especialmente notable, ya que se trata de flavoproteínas con dominios conservados.

Dada la diferencia de afinidad por el sustrato descrita en la bibliografía para las diferentes isoenzimas de estos grupos bacterianos (Fernández de las Heras *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2014), se trató de comprobar si alguna de las tres actividades de la cepa *R. ruber* Chol-4 resultaba capaz de sustituir la función que la enzima StdA3 desempeña en la cepa DOC21. Con el objetivo de comprobar esta posibilidad, se procedió a la clonación de cada uno de los genes codificantes en *R. ruber* Chol-4, *kstD1*, *kstD2* y *kstD3* en el plásmido pMC para su expresión en trans en la cepa mutante *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdH*.

Cuando se analizó el comportamiento de cada una de las tres cepas resultantes, se observó que ni la cepa que albergaba una copia del gen *kstD1* ni la que albergaba la copia del gen *kstD3* mostraban ninguna diferencia con respecto a la cepa delecionada original, esto es, se mostraban incapaces de crecer a expensas de testosterona como único sustrato. Sin embargo, la cepa *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdH* pMC*kstd2* recuperó la capacidad para crecer en MM suplementado con testosterona como lo hacían las cepas sivestre y *P. putida* DOC21 $\Delta$ *stdH* pMC*stdH* (Fig. 43).



**Figura 43.** Placa de testosterona 2mM en que se sembraron las cepas control DOC21wt (c), y el mutante  $\Delta stdH$  complementado con las diferentes construcciones:  $\Delta stdH:pMC-stdH$  (1),  $\Delta stdH:pMC-kstD1$  (2),  $\Delta stdH:pMC-kstD2$  (3) y  $\Delta stdH:pMC-kstD3$  (4).

Los datos obtenidos concuerdan con la afirmación sostenida por Fernández de las Heras que apunta a que la enzima KstD2 estaría implicada en la degradación de la AD, mientras que KstD3 sería, por el contrario, responsable de la ruta catabólica del colesterol. La función de la tercera isoenzima, KstD1, no ha sido esclarecida aún, por lo que se desconoce su función metabólica.

En suma, KstD2 es capaz de sustituir la reacción enzimática que la enzima StdH cataliza en el metabolismo esteroideo en la cepa *P. putida* DOC21, mientras que KstD1 y KstD3, no presentan una afinidad de sustrato *in vivo* lo suficientemente elevada como para llevar a cabo esta misma reacción de oxidación del enlace entre los átomos de carbono 4 y 5 del anillo A.

Como se indicó anteriormente, esta preferencia de sustrato venía determinada, fundamentalmente, por la presencia o ausencia de un sustituyente hidroxilo situado en la posición 9 del núcleo esteroídico (Yao *et al.*, 2014). La incorporación de este sustituyente está catalizada por una

## Resultados y discusión

---

actividad 3-cetoesteroide 9-hidroxiásica, que desempeña un papel fundamental en el catabolismo general de los esteroides al constituir la etapa previa a la apertura del anillo B.

Por este motivo, la siguiente actividad que se fijó como objeto de estudio en nuestra cepa fue la responsable de catalizar la hidroxilación en posición 9 de la molécula esteroidea.

## Resultados y discusión

---

### 4.2.3.2 Hidroxilación en posición 9 del anillo B

La hidroxilación del carbono en posición 9 supone un paso clave en la degradación de esteroides, al considerarse la última que tiene lugar antes de producirse la pérdida de la estructura común tetraanular característica de estos compuestos. A continuación tendría lugar la apertura del anillo B de manera espontánea por las tensiones intramoleculares debidas a la presencia de este sustituyente (Horinouchi *et al.*, 2012).

La actividad responsable de catalizar esta reacción ha sido ampliamente estudiada en multitud de microorganismos, con especial foco fijado en la caracterización de las proteínas propias de los representantes incluidos dentro del grupo de las bacterias G+ (Petrusma *et al.*, 2014).

Esta enzima, perteneciente al grupo de las monooxigenasas de tipo IA, está integrada por dos subunidades catalíticas codificadas en las bacterias G+ por los genes *kshA* y *kshB*. De este sistema enzimático de dos componentes, la subunidad KshA actúa como una oxigenasa terminal con capacidad de transferir uno de los dos átomos que componen la molécula de oxígeno molecular al sustrato esteroídico (Petrusma *et al.*, 2009). Esta subunidad alberga un *cluster* de hierro azufre de tipo Rieske y un dominio de unión a  $\text{Fe}^{2+}$  de tipo no hemo (Harayama *et al.*, 1992; Mason & Cammack, 1992). El segundo componente, KshB, exhibe una actividad ferredoxin reductasa. Este componente es una flavoproteína que a su vez está subdividida en dos dominios catalíticos: uno de unión a NAD y un *cluster* hierro-azufre de tipo planta (Correll *et al.*, 1992). Ambas subunidades, KshA y KshB, se encuentran conectadas por una cadena transportadora de electrones que facilita la transmisión de los mismos entre sendas actividades enzimáticas. En conjunto, el sistema funciona mediante la cesión de electrones por parte del NADH al grupo flavina de la subunidad reductasa, que a continuación se los transfiere, a través de los *cluster*

## Resultados y discusión

---

hierro-azufre, al dominio oxigenasa que es el encargado de la hidroxilación del sustrato (Ferraro *et al.*, 2005; Tarasev & Ballou, 2005).

Al igual que sucede en el caso de *kstD*, estos genes presentan múltiples homólogos en el genoma de la mayor parte de bacterias que exhiben capacidad de metabolizar sustratos de naturaleza esteroídica. Muestra de ello son las cepas de *Rhodococcus R. erythropolis* SQ1, que presenta al menos 3 genes homólogos de la subunidad *kshA* (van der Geize *et al.*, 2008), y *R. rhodochrous* DSM43269, que alberga en su genoma cinco versiones de este mismo gen (Petrusma *et al.*, 2011). Esta diversidad parece estar favorecida evolutivamente para facilitar la adaptación del microorganismo al uso de diferentes sustratos metabólicos. La presencia de diferentes genes codificantes para esta actividad, cada uno con un perfil de expresión característico y con un rango de sustratos propio, permite un ajuste fino y dinámico del catabolismo esteroideo, lo que redundará en una mayor capacidad de hidroxilación del carbono en posición 9 en diferentes puntos del proceso de degradación del compuesto.

Dentro de las bacterias G-, esta actividad apenas ha sido caracterizada. La mayor parte de los escasos estudios que se han llevado a cabo han sido realizados en la cepa *C. testosteroni* TA441 (Horinouchi *et al.*, 2003). En esta cepa se ha identificado un marco abierto de lectura, ORF17, que presuntamente corresponde a la subunidad ferredoxin-reductasa de la hidroxilasa. Esta presunción se fundamentó en la acumulación de ADD por parte de un mutante de disrupción en ese gen cuando la fuente de carbono suministrada fue testosterona. En cambio, este mismo mutante acumuló 7 $\alpha$ -OH-ADD y 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -OH-ADD en los medios de cultivo en que la fuente de carbono empleada en su crecimiento fue ácido cólico (Horinouchi *et al.*, 2008).

En el caso de la cepa *P. putida* DOC21, el estudio de esta actividad se abordó siguiendo una estrategia semejante a la empleada en otros genes y

## Resultados y discusión

---

actividades enzimáticas. Así, se procedió a analizar el genoma secuenciado en busca de algún gen potencialmente codificante de una actividad 9-hidroxiesteroide hidroxilasa. De este modo, se identificaron dos marcos de lectura abiertos cuya secuencia aminoacídica presentaba cierta similitud con las subunidades hidroxilasa y reductasa de esta actividad enzimática en *C. testosteroni* TA441 que se denominaron *stdJ1* y *stdJ2* respectivamente. A continuación, se procedió a su delección mediante el procedimiento que ha sido descrito para otros casos.

Aplicando estas técnicas de manipulación genética, se obtuvo el mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdJ1*, sin embargo, los intentos para deleccionar el segundo gen y obtener el mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdJ2* han resultado infructuosos hasta la fecha.

El crecimiento del mutante  $\Delta$ *stdJ1* en diferentes sustratos esteroídicos fue comprobado mediante su cultivo en medio químicamente definido suplementado con ácido biliar o testosterona como únicas fuentes de carbono.

Una vez realizados los ensayos de crecimiento, el mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdJ1*, cuyo gen deleccionado presentaba similitud de secuencia con la subunidad hidroxilasa, mostraba un comportamiento distinto al de la cepa silvestre. Dicho mutante era capaz de crecer débilmente cuando la fuente de carbono era el ácido cólico o cualquier otro ácido biliar, pero resultaba incapaz de crecer a expensas de la testosterona.

Esta capacidad para degradar parcialmente la molécula de ácido biliar sería consistente con un bloqueo metabólico a nivel de la hidroxilación del carbono situado en posición 9. Una cepa que experimentase un bloqueo metabólico a este nivel mantendría la capacidad de degradar la cadena lateral del ácido biliar (de ahí el crecimiento débil cuando se empleó dicha fuente de carbono) pero sería incapaz de progresar con el catabolismo del núcleo esteroídico, razón por la cual no crecería en un medio que contuviera testosterona como única fuente de carbono.



## Resultados y discusión

Para corroborar esta hipótesis, se procedió al análisis de los intermediarios acumulados en los caldos de cultivo de dicho mutante empleando diferentes sustratos metabólicos de naturaleza esteroidea. Para ello, de igual manera en que se había procedido en el caso de otros genes, la cepa mutante fue cultivada en un medio mínimo con una fuente de carbono susceptible de ser utilizada como sustrato (succinato 10mM) y litocolato añadido en una concentración 2mM que actuase como fuente de intermediarios metabólicos. El sobrenadante de este medio de cultivo fue analizado mediante cromatografía en capa fina (TLC) (Fig. 39).

Este análisis reveló que el mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdJ1* acumulaba de manera mayoritaria androst-1,4-diendiona (ADD) cuando el ácido litocólico era añadido al medio de cultivo como sustrato de naturaleza esteroídica. Por el contrario, en los medios de cultivo en los que el sustrato esteroídico empleado fue la testosterona, se acumularon mayoritariamente dos intermediarios metabólicos: ADD y 17 $\beta$ -OH-androstadienona (Fig. 44).

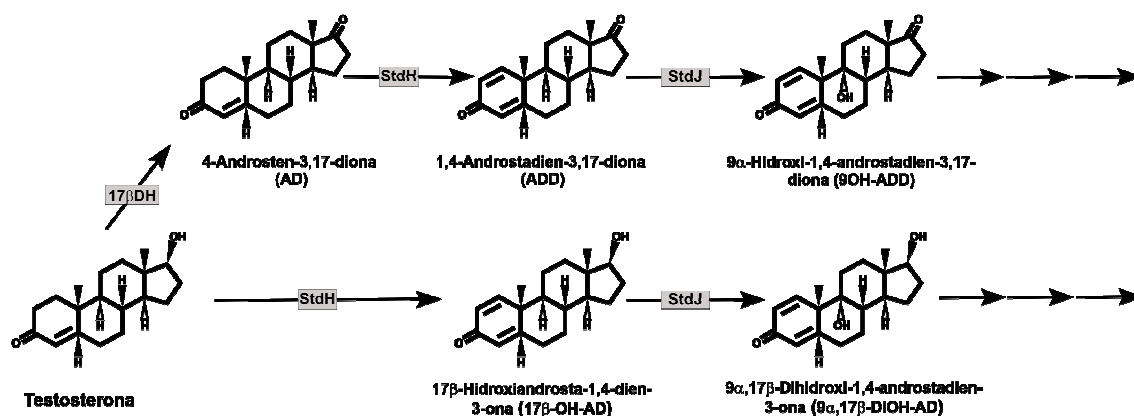


Figura 44. Esquema que representa los primeros pasos en la metabolización de la testosterona.

Los datos obtenidos sugieren que las enzimas StdH y StdI pueden catalizar sus respectivas actividades  $\Delta^1$  y  $\Delta^4$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa independientemente de si el grupo funcional adherido al C17 es un carbonilo o un hidroxilo.

## Resultados y discusión

---

En resumen, y en cuanto se refiere a hidroxilación del núcleo esteroideo en posición 9 del núcleo esteroídico en *P. putida* DOC21, los datos obtenidos demuestran que la pérdida de la actividad catalizada por la proteína StdJ1 supone la pérdida de la capacidad para completar el metabolismo de los esteroides.

El hecho de que el mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdJ1* resulte incapaz de degradar tanto ácidos biliares como testosterona sugiere que, tal como ocurre en el caso de la actividad  $\Delta^1$ -cetoesteroide deshidrogenasa, solo existe una enzima responsable de catalizar esta reacción. A diferencia de lo que sucede con las bacterias G+, no ha sido caracterizada hasta el momento ninguna actividad en esta cepa capaz en la que diferentes isoenzimas sean responsables de catalizar la reacción en función del sustrato esteroídico de partida.

### 4.2.4 STDA3. FUNCIÓN METABÓLICA DE LA TERCERA COA LIGASA IMPLICADA EN EL CATABOLISMO DE COMPUESTOS ESTEROIDES

Como indicamos anteriormente, las enzimas StdA1 y StdA3 son responsables en la cepa *P. putida* DOC21 de catalizar la esterificación de moléculas esteroídicas con cadena alifática unida a C17 de cinco y tres átomos de carbono respectivamente.

El tercer gen que codifica una proteína con potencial actividad CoA ligásica, *stdA3*, se sitúa dentro del genoma de la cepa *P. putida* DOC21 en otra agrupación génica que incluye otros genes relacionados con la degradación de esteroides.

El gen *stdA3* fue delecionado empleando una estrategia similar a la seguida con los genes *stdA1* y *stdA2*. Con esta técnica se pretendió estudiar

## Resultados y discusión

---

la participación de la proteína StdA3 en la degradación de diferentes esteroides.

El mutante de delección que se obtuvo, *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdA3*, se comportó de manera diferente a como lo hacían los dos mutantes anteriormente mencionados *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdA1* y *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdA2*. Este tercer mutante crecía en medio sólido cuando cualquier ácido biliar fue utilizado como única fuente de carbono y también crecía, aunque con notable dificultad, cuando el sustrato empleado fue testosterona o 4-AD. Cuando este mismo experimento fue realizado en medio líquido, la  $A_{540nm}$  alcanzada por el mutante fue menor que la de la cepa silvestre (Fig. 29).

Este comportamiento observado refería que el mutante era capaz de degradar parcialmente la molécula esteroídica. Para corroborar esta hipótesis, este mutante se cultivó en un medio de cultivo químicamente definido en el que adicionó succinato como fuente de carbono y energía y un ácido biliar o testosterona como fuente de intermediarios metabólicos. En todos los caldos de cultivo se acumuló de manera mayoritaria un metabolito denominado  $3\alpha$ -*H*- $4\alpha$ (3'(*R*)-hidroxi-3'-propanoico)- $7\alpha\beta$ -metilhexahidro-1,5-indanodiona (HIP) (cuando el ácido litocólico fue el sustrato esteroídico empleado) o el correspondiente derivado hidroxilado (cuando fueron otros ácidos biliares los utilizados) (Fig. 45). Todos estos compuestos son catabolitos generados como producto de la asimilación completa de la cadena lateral adherida al carbono en posición 17 de los ácidos biliares y la apertura de los anillos A y B del núcleo esteroideo. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en *Mycobacterium tuberculosis* y *R. jostii* RHA1 (Casabon *et al.*, 2013).

## Resultados y discusión

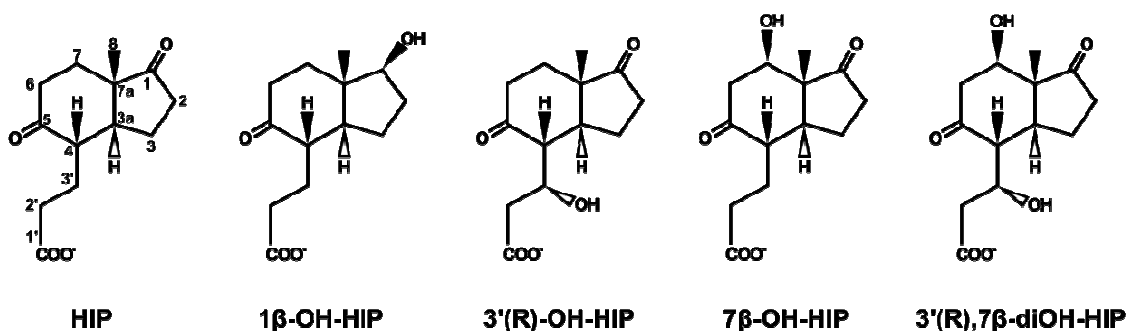


Figura 45. Estructura del HIP y alguno de sus correspondientes hidroxilados.

Otro dato interesante obtenido durante el transcurso de estos experimentos, fue el hallazgo de que cuando la testosterona fue empleada como sustrato, en el caldo de cultivo del mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdA3* se acumulaban cantidades equimolares de los compuestos HIP y 3'OH-HIP (Fig. 45).

Como hemos venido sugiriendo, la presencia de este segundo metabolito en los medios que contenían testosterona es un indicativo de que el estado de oxidación del carbono en posición 17 no resulta un condicionante para el progreso del proceso degradativo de los anillos A y B del núcleo. Este hecho revela que la presencia de un grupo hidroxilo en configuración  $\beta$  presente en la testosterona unido al C17 puede ser oxidado hasta un grupo carbonilo o bien mantenerse intacto durante el transcurso del proceso de oxidación y posterior escisión del anillo A sin que ese factor afecte al resto de enzimas intervinientes en la ruta metabólica.

En resumen, cuando la cepa *P. putida* DOC21 se cultivó en presencia de testosterona, que posee un grupo hidroxilo adherido en posición 17, puede mantener este sustituyente u oxidarlo hasta un carbonilo sin que esta oxidación influya en las sucesivas etapas enzimáticas requeridas para su degradación.

# Resultados y discusión

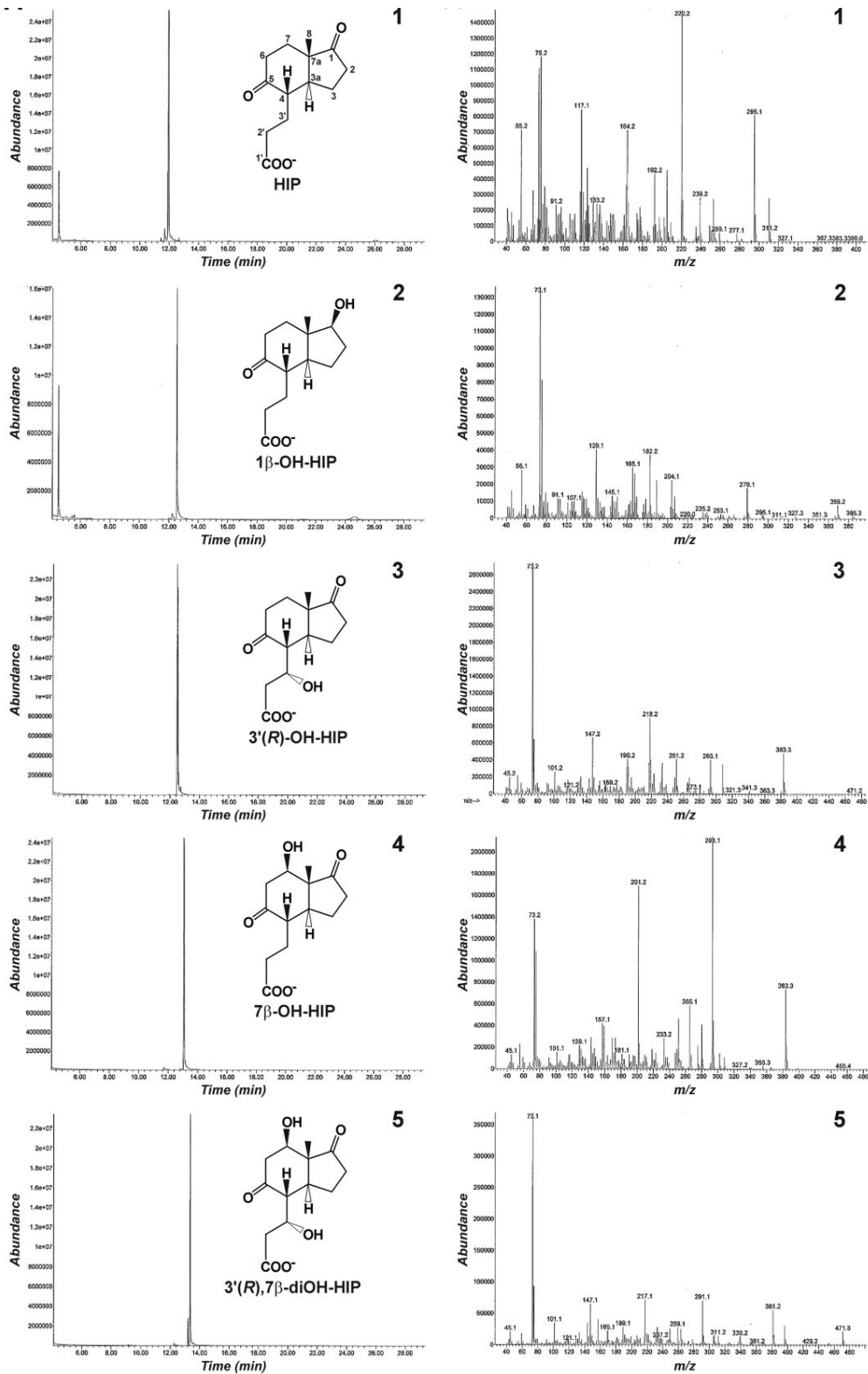


Figura 46. Cromatogramas de gases (Columna A) y espectrometría de masas (Columna B) de los intermediarios purificados acumulados por el mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ stdA3 cultivado en medio mínimo suplementado con: testosterona (1–2), quenodesoxicolato (3), desoxicolato (4) y colato (5).

## Resultados y discusión

De igual modo que cuando se estudiaron las otras dos actividades CoA ligasas anteriormente citadas, la actividad *in vitro* de esta proteína se analizó mediante ensayos enzimáticos. A través de estas pruebas se trató de comprobar la capacidad de esta enzima para catalizar la esterificación con coenzima A de diferentes sustratos estructuralmente relacionados con la molécula HIP. Para llevar a cabo estos ensayos, diferentes extractos celulares procedentes de varios mutantes fueron empleados como extracto crudo de la reacción enzimática.

Enzima	Fuente de extracto crudo	Sustrato	Tpo. de retención HPLC (min)	Producto	Tpo. de retención HPLC (min)
StdA3	<i>E. coli</i> pET-30a-stdA3	HIP	n.d.	HIP-CoA	12,3
		1-OH-HIP	n.d.	1-OH-HIP-CoA	12,2
		3-OH-HIP	n.d.	3-OH-HIP-CoA	10,8
		7'-OH-HIP	n.d.	7'-OH-HIP-CoA	10,8
		3,7'-OH-HIP	n.d.	3,7'-OH-HIP-CoA	9,5

Tabla VI. Resultados de los ensayos enzimáticos realizados con la enzima StdA3.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la cepa mutante defectiva en la actividad StdA3 mantenía la capacidad de catalizar la esterificación del grupo carboxilo terminal de los ácidos biliares. Del mismo modo, el compuesto DHOPDC también fue reconocido como sustrato de la reacción de esterificación por el extracto celular procedente de un cultivo de la cepa *P. putida* DOC21  $\Delta$ stdA3. De este modo, este mutante de delección es capaz de degradar la cadena lateral de los ácidos biliares, explicando esta característica metabólica el comportamiento fenotípico de este mutante.

Por el contrario, tanto el HIP como cualquiera de sus derivados hidroxilados no fueron reconocidos como sustrato de reacción por el extracto crudo de esta misma cepa, lo que a su vez explica el crecimiento dificultoso del mutante en presencia de testosterona como sustrato, al

## Resultados y discusión

---

permanecer intacta esta parte de la molécula que no puede continuar su degradación hasta intermediarios del metabolismo general.

Asimismo, la actividad de la enzima StdA3 se ensayó mediante la clonación del gen *stdA3* en el plásmido pET-30a en la cepa *E.coli* BL21 (DE3). Este vector constituye un plásmido de expresión que posibilita la traducción del gen clonado en fase junto a una cola de poli-His que permite la posterior purificación del polipéptido codificado por el gen clonado.

En el caso del gen *stdA3*, la proteína resultante fue sobreexpresada en *E. coli* y posteriormente purificada para utilizarla en los ensayos enzimáticos. Se optó por esta técnica, ya que cuando se utilizó en los ensayos enzimáticos el extracto de la cepa de *E.coli* DH10B pMC*stdA3*, que portaba el gen en un plásmido de clonación como el pMC, se obtuvieron unos resultados inconcluyentes que no permitieron determinar la participación de esta proteína en la esterificación del intermediario HIP (o cualquiera de sus derivados hidroxilados).

Así pues, la capacidad de tioesterificación de la enzima StdA3, se comprobó con la enzima sobreexpresada y purificada. La enzima aislada fue testada en frente a una batería de sustratos que compartían una estructura común. De este modo, los ensayos realizados con la proteína purificada demostraron la capacidad del producto enzimático codificado por el gen *stdA3* de catalizar la dondensación de coenzima A con la familia completa de moléculas estructuralmente relacionadas HIP, 1-OH-HIP, 3'-OH-HIP, 7-OH-HIP y 3', 7- diOH-HIP.

Además de la respectiva molécula coesterificada, cuya identidad se confirmó posteriormente mediante un análisis de espectrometría de masas acoplada a HPLC, el cromatograma del producto de la reacción enzimática ensayada reveló un segundo pico cuyo tiempo de retención y espectro de absorción correspondían a los de la molécula de AMP, uno de los productos moleculares obtenidos tras una reacción de esterificación, aportando otro

## Resultados y discusión

dato que confirmaba la participación de StdA3 en la reacción de activación con coenzima A del HIP y los compuestos estructuralmente próximos a él.

La actividad específica de la enzima StdA3 se determinó mediante un ensayo en que añadió una concentración igual (0,5mM) de cada uno de los sustratos de la reacción (ATP, coenzima A y el HIP o derivado hidroxilado correspondiente en cada ensayo). Este experimento permitió determinar que la actividad específica de esta enzima se situaba entre los  $6,3 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de actividad frente a 1-OH-HIP y los  $13,3 \pm 1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de actividad específica frente a 7-OH-HIP.

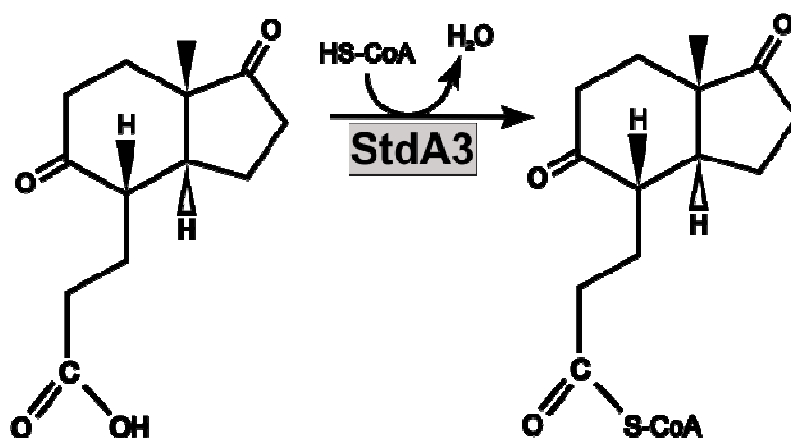


Figura 47. Esquema de la reacción catalizada por la enzima StdA3

Adicionalmente, se realizaron varios experimentos de bioconversión de una serie de esteroides. Para realizar dichos experimentos, las células de un cultivo de la cepa  $\Delta\text{stdA3}$  en fase exponencial de crecimiento se recogieron mediante centrifugación. Una alícuota de este precipitado fue añadida a un tubo de ensayo con algún compuesto esteroídico. Este esteroide era transformado hasta el intermediario metabólico en el punto en el que la ruta era interrumpida.

Estos experimentos de bioconversión reforzaron las conclusiones obtenidas mediante el cultivo en medio líquido del mutante  $\Delta\text{stdA3}$ . Al igual que sucedía en ese caso, esta cepa acumuló HIP y 3'-OH-HIP cuando se



## Resultados y discusión

---

utilizó testosterona como sustrato. En los experimentos en los que se añadieron los distintos ácidos biliares, el intermediario acumulado fue HIP (en el caso del ácido litocólico) o el correspondiente derivado hidroxilado (Fig. 44)

Esta serie de resultados son coherentes con los obtenidos en otros microorganismos con capacidad de catabolizar compuestos esteroídicos para esta reacción enzimática. De este modo, la misma reacción catalizada por StdA3 en la cepa *Pseudomonas putida* DOC21 la realiza la enzima FadD3 en las cepas *Rhodococcus jostii* RHA1 y *Mycobacterium tuberculosis* (Casabon et al., 2013). Otro dato que sustentó la hipótesis planteada fue la acumulación en el caso de cultivo de HIP por parte de un mutante de *R. jostii* para el gen *fadD3* que fue cultivado en colesterol.

En cuanto a las bacterias G-, no existía según nuestro conocimiento ninguna enzima con esta actividad caracterizada por completo, si bien había sido propuesto que en la cepa *C. testosteroni* TA441 el marco de lectura abierto 18 (ORF18) codificase un polipéptido encargado de llevar a cabo este mismo mecanismo en la degradación de testosterona (Horinouchi et al., 2003).

Todos estos datos obtenidos durante el estudio de la cepa mutante *P. putida* DOC21  $\Delta$ *stdA3* permitieron concluir de manera inequívoca que el gen *stdA3* codifica la actividad responsable de la tioesterificación del HIP (o el correspondiente derivado hidroxilado) en el catabolismo de los ácidos biliares. Esta actividad enzimática es necesaria para degradación completa de la molécula al participar en la activación con coenzima A del resto de la molécula correspondiente a los anillos C y D, permitiendo de este modo el progreso del catabolismo hasta llegar a la mineralización completa de los compuestos esteroideos.



### 5. CONCLUSIONES

## Conclusiones

---

- La cepa *Pseudomonas putida* DOC21 presenta capacidad de degradar una amplia variedad de compuestos de naturaleza esteroídica.
- En esta bacteria, la mayor parte de los genes implicados en el catabolismo de esteroides se encuentran agrupados dentro de varios *clusters* o agrupaciones génicas.
- La eliminación de la cadena lateral de los ácidos biliares en la cepa *P. putida* DOC21 transcurre mediante un proceso en el que intervienen dos acil-CoA ligasas, StdA1 y StdA2, con actividad frente a esteroides cuya cadena lateral posee cinco y tres átomos de carbono respectivamente. Estas enzimas se encuentran codificadas por dos genes cuya delección provoca la pérdida de la capacidad de metabolizar ácidos biliares.
- Existe una tercera actividad acil-CoA ligásica implicada en el metabolismo de moléculas de naturaleza esteroídica codificada en el gen *stdA3*. Esta enzima cataliza la esterificación de la molécula de HIP o sus respectivos derivados hidroxilados, correspondientes a los anillos C y D del núcleo esteroideo. La pérdida de esta actividad supone la incapacidad de la cepa carente de la actividad para completar el catabolismo de los esteroides.

## Conclusiones

---

- *P. putida* DOC21 alberga una única actividad 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa codificada en el gen *stdD*. La participación de esta enzima resulta imprescindible para la degradación de aquellos esteroides que presenten un hidroxilo con configuración  $\alpha$  en posición 3, como es el caso de los ácidos biliares.
- La presencia de un sistema de alcano oxidasas no proporciona a la cepa de DOC21 que lo alberga la capacidad para metabolizar colesterol, lo que sugiere que el proceso de eliminación de la cadena lateral es un proceso complejo que implica enzimas específicas con capacidad de llevar a cabo la funcionalización de la misma.
- La eliminación transaxial de los átomos de hidrógeno C1( $\alpha$ ) y C2( $\beta$ ) permitiendo que se establezca un enlace doble entre los átomos de carbono a los que están unidos está catalizada por la enzima StdH. Esta proteína es única en la cepa DOC21 y está codificada por el gen *stdH*, y cuya función puede ser sustituida por la enzima KstD2 de *Rhodococcus ruber* Chol-4.
- La enzima StdJ1 cataliza la hidroxilación de la posición 9 del núcleo de la molécula esteroidea y, por tanto, es necesaria para la degradación de los mismos.

## Conclusiones

---

- La presencia de un grupo hidroxilo o un grupo carbonilo en posición 17 de la molécula resulta indistinta para que prospere el proceso degradativo del núcleo central de los esteroides.

## Bibliografía

---

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía

---

Achterholt, S., Priefert, H., & Steinbuchel, A. (2000). Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *54*(6), 799–807.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389–3402.

Arilla, E. (1992). Metabolismo del calcio y del fósforo y su control hormonal. In E. Herrera (Ed.), *Bioquímica. Biología Molecular y bioquímica fisiológica*. (Vol. 2<sup>a</sup>, pp. 1227–1254). Madrid: Interamericana. McGraw-Hill.

Arima, K., Nakamatsu, T., & Beppu, T. (1978). Microbial production of 3-oxobisnorchola-1,4-dien-22-oic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, *42*(2), 411–416.

Attele, A. S., Wu, J. A., & Yuan, C. S. (1999). Ginseng pharmacology. Multiple constituents and multiple actions. *Biochemical Pharmacology*, *58*(11), 1685–1693.

Bagrov, A. Y., Shapiro, J. I., & Fedorova, O. V. (2009). Endogenous cardiotonic steroids. Physiology, pharmacology and novel therapeutic targets. *Pharmacological Reviews*, *61*(1), 9–38.

Bajguz, A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(2), 95–107.

Balandrin, M. F. (1996). Commercial utilization of plant-derived saponins: an overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *404*, 1–14.

Bauchop, T., & Elsdon, S. R. (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *Journal of General Microbiology*, *23*, 457–469.

Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular & General Genetics*, *154*(2), 203–

204.

Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A., & Wheeler, D. L. (2000). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 15–18.

Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., ... Smith, A. J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, *456*(7218), 53–59.

Bergstrand, L. H., Cardenas, E., Holert, J., Van Hamme, J. D., & Mohn, W. W. (2016). Delineation of steroid-degrading microorganisms through comparative genomic analysis. *mBio*, *7*(2).

Bird, C. W., Lynch, J. M., Pirt, F. J., & Reid, W. W. (1971). Steroids and squalene in *Methylococcus capsulatus* grown on methane. *Nature*, *230*(5294), 473–474.

Birkenmaier, A., Holert, J., Erdbrink, H., Moeller, H. M., Friemel, A., Schoenenberger, R., ... Philipp, B. (2007). Biochemical and genetic investigation of initial reactions in aerobic degradation of the bile acid cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. *Journal of Bacteriology*, *189*(20), 7165–7173.

Bloch, K. (1965). The biological synthesis of cholesterol. *Science*, *150*(3692), 19–28.

Bloch, K. E. (1983). Sterol structure and membrane function. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, *14*(1), 47–92.

Bode, H. B., Zeggel, B., Silakowski, B., Wenzel, S. C., Reichenbach, H., & Muller, R. (2003). Steroid biosynthesis in prokaryotes. Identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Molecular Microbiology*, *47*(2), 471–481.

Boyer, H. W., & Roulland-dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *41*(3), 459–472.

Bragin, E. Y., Shtratnikova, V. Y., Dovbnya, D. V., Schelkunov, M. I., Pekov, Y. A., Malakho, S. G., ... Donova, M. V. (2013). Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. strains. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *138*, 41–53.

## Bibliografía

---

- Brzostek, A., Dziadek, B., Rumijowska-Galewicz, A., Pawelczyk, J., & Dziadek, J. (2007). Cholesterol oxidase is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, *275*(1), 106–112.
- Brzostek, A., Sliwinski, T., Rumijowska-Galewicz, A., Korycka-Machala, M., & Dziadek, J. (2005). Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology (Reading, England)*, *151*(Pt 7), 2393–2402.
- Callow, R. K., & Young, F. G. (1936). Relations between optical rotatory power and constitution in the steroids. *Proceedings of the Royal Society of London A*, *157*, 194–212.
- Campbell, C. G., Borglin, S. E., Green, F. B., Grayson, A., Wozel, E., & Stringfellow, W. T. (2006). Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, *65*(8), 1265–1280.
- Capyk, J. K., Casabon, I., Gruninger, R., Strynadka, N. C., & Eltis, L. D. (2011). Activity of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase (KshAB) indicates cholesterol side chain and ring degradation occur simultaneously in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(47), 40717–40724.
- Capyk, J. K., Kalscheuer, R., Stewart, G. R., Liu, J., Kwon, H., Zhao, R., ... Mohn, W. W. (2009). Mycobacterial cytochrome P450 125 (CYP125) catalyzes the terminal hydroxylation of C27 steroids. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(51), 35534–35542.
- Casabon, I., Crowe, A. M., Liu, J., & Eltis, L. D. (2013). FadD3 is an acyl-CoA synthetase that initiates catabolism of cholesterol rings C and D in actinobacteria. *Molecular Microbiology*, *87*(2), 269–283.
- Casabon, I., Swain, K., Crowe, A. M., Eltis, L. D., & Mohn, W. W. (2014). Actinobacterial acyl coenzyme a synthetases involved in steroid side-chain catabolism. *Journal of Bacteriology*, *196*(3), 579–587.
- Chakrabarty, A. M., Chou, G., & Gunsalus, I. C. (1973). Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *70*(4), 1137–1140.
- Chiang, J. Y. (2004). Regulation of bile acid synthesis. Pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of Hepatology*, *40*(3), 539–551.

## Bibliografía

---

- Chiang, J. Y. (2009). Bile acids. Regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, *50*(10), 1955–1966.
- Chiang, Y. R., Ismail, W., Muller, M., & Fuchs, G. (2007). Initial steps in the anoxic metabolism of cholesterol by the denitrifying *Sterolibacterium denitrificans*. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(18), 13240–13249.
- Choi, K. P., Molnar, I., Yamashita, M., & Murooka, Y. (1995). Purification and characterization of the 3-ketosteroid- $\Delta$ 1-dehydrogenase of *Arthrobacter simplex* produced in *Streptomyces lividans*. *Journal of Biochemistry*, *117*(5), 1043–1049.
- Clouse, S. D., & Sasse, J. M. (1998). Brassinosteroids. Essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *49*, 427–451.
- Combalbert, S., & Hernandez-Raquet, G. (2010). Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(6), 1671–1692.
- Cong, Y., Zhou, Y. B., Chen, J., Zeng, Y. M., & Wang, J. H. (2008). Alkaloid profiling of crude and processed *Veratrum nigrum* L. through simultaneous determination of ten steroidal alkaloids by HPLC-ELSD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *48*(3), 573–578.
- Correll, C. C., Batie, C. J., Ballou, D. P., & Ludwig, M. L. (1992). Phthalate dioxygenase reductase. A modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. *Science*, *258*(5088), 1604–1610.
- Croft, S. L., Barrett, M. P., & Urbina, J. A. (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, *21*(11), 508–512.
- Dagley, S., & Gibson, D. T. (1964). Degradation of catechol by bacterial enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, *239*, 1284–1285.
- Dinan, L. (2001). Phytoecdysteroids. Biological aspects. *Phytochemistry*, *57*(3), 325–339.
- Dixon, H., Ginger, C. D., & Williamson, J. (1972). Trypanosome sterols and their metabolic origins. *Comparative Biochemistry and physiology B, Comparative Biochemistry*, *41*(1), 1–18.
- Dmitrieva, R. I., Bagrov, A. Y., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Stocco, D. M., & Doris, P. A. (2000). Mammalian bufadienolide is synthesized from

## Bibliografía

---

cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. *Hypertension*, *36*(3), 442–448.

Donova, M. V., & Egorova, O. V. (2012). Microbial steroid transformations. Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(6), 1423–1447.

Douglas, L. M., & Konopka, J. B. (2014). Fungal membrane organization: the eisosome concept. *Annual Review of Microbiology*, *68*, 377–393.

Doukyu, N. (2009). Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *83*(5), 825–837.

Dresen, C., Lin, L. Y. C., D'Angelo, I., Tocheva, E. I., Strynadka, N., & Eltis, L. D. (2010). A flavin-dependent monooxygenase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(29), 22264–22275.

Dumbacher, J. P., Deiner, K., Thompson, L., & Fleischer, R. C. (2008). Phylogeny of the avian genus *Pitohui* and the evolution of toxicity in birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*(3), 774–781.

Dumbacher, J. P., Wako, A., Derrickson, S. R., Samuelson, A., Spande, T. F., & Daly, J. W. (2004). Melyrid beetles (*Choresine*): A putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and toxic passerine birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(45), 15857–15860.

Dym, O., & Eisenberg, D. (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science*, *10*(9), 1712–1728.

Eggink, G., Lageveen, R. G., Altenburg, B., & Witholt, B. (1987). Controlled and functional expression of the *Pseudomonas oleovorans* alkane utilizing system in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(36), 17712–17718.

Erdal, S. (2012). Exogenous mammalian sex hormones mitigate inhibition in growth by enhancing antioxidant activity and synthesis reactions in germinating maize seeds under salt stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*(4), 839–843.

Erdal, S., & Dumlupinar, R. (2010). Progesterone and  $\beta$ -estradiol stimulate seed germination in chickpea by causing important changes in biochemical parameters. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *65*, 239–244.

## Bibliografía

---

Evans, W. C. (2009). Pharmacopoeial and related drugs of biological origin. *Pharmacognosy* (pp. 169–482). Toronto: El Sevier.

Fahrbach, M., Kuever, J., Meinke, R., Kämpfer, P., & Hollender, J. (2006). *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17 $\beta$ -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*, 1547–1552.

Fahrbach, M., Kuever, J., Remesch, M., Huber, B. E., Kampf, P., Dott, W., & Hollender, J. (2008). *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(Pt 9), 2215–2223.

Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M., & Cabral, J. M. S. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*(6), 688–705.

Fernández De Las Heras, L., Perera, J., & Navarro Llorens, J. M. (2014). Cholesterol to cholestenone oxidation by ChoG, the main extracellular cholesterol oxidase of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *139*, 33–44.

Fernández de las Heras, L., van der Geize, R., Drzyzga, O., Perera, J., & Maria Navarro Llorens, J. (2012). Molecular characterization of three 3-ketosteroid- $\Delta$ (1)-dehydrogenase isoenzymes of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *132*(3–5), 271–281.

Ferraro, D. J., Gakhar, L., & Ramaswamy, S. (2005). Rieske business. Structure–function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(1), 175–190.

Florin, C., Kohler, T., Grandguillot, M., & Plesiat, P. (1996). *Comamonas testosteroni* 3-ketosteroid- $\Delta$ 4(5 $\alpha$ )-dehydrogenase. Gene and protein characterization. *Journal of Bacteriology*, *178*(11), 3322–3330.

Fontana, J. M., Burlaka, I., Khodus, G., Brismar, H., & Aperia, A. (2013). Calcium oscillations triggered by cardiotonic steroids. *The FEBS Journal*, *280*(21), 5450–5455.

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *The British Journal of Nutrition*, *88*(6), 587–605.

Freier, T. A., Beitz, D. C., Li, L., & Hartman, P. A. (1994).



## Bibliografía

---

Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol-reducing anaerobe. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(1), 137–142.

Fujii, K., Satomi, M., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T., & Kikuchi, S. (2003). *Novosphingobium tardaugens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 1), 47–52.

Garrity, G. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria*. Springer.

Gasson, M. J., Kitamura, Y., McLauchlan, W. R., Narbad, A., Parr, A. J., Parsons, E. L., ... Walton, N. J. (1998). Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 4163–4170.

Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., ... Kliewer, S. A. (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular Cell*, 6(3), 517–526.

Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4645–4649.

Grosjean, K., Mongrand, S., Beney, L., Simon-Plas, F., & Gerbeau-Pissot, P. (2015). Differential effect of plant lipids on membrane organization: specificities of phytosphingolipids and phytosterols. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(9), 5810–5825.

Gupta, S., Stravitz, R. T., Dent, P., & Hylemon, P. B. (2001). Down-regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15816–15822.

Haiyan, R., Shulan, J., ud din Ahmad, N., Dao, W., & Chengwu, C. (2007). Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere*, 66(2), 340–346.

## Bibliografía

---

- Halperin, A. H., Quastel, J. H., & Scholefield, P. G. (1954). Bacterial oxidation of cholic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *52*(1), 5–17.
- Harayama, S., Kok, M., & Neidle, E. L. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology*, *46*, 565–601.
- Hartmann, M.-A. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, *3*(5), 170–175.
- Hatta, T., Wakabayashi, T., & Itagaki, E. (1991). 3-Keto-5 $\alpha$ -steroid- $\Delta$ 4-dehydrogenase from *Nocardia corallina*. Purification and characterization. *Journal of Biochemistry*, *109*(4), 581–586.
- Hayakawa, S. (1982). Microbial transformation of bile acids. A unified scheme for bile acid degradation, and hydroxylation of bile acids. *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie*, *22*(5), 309–326.
- Hayami, M., Okabe, A., Sasai, K., Hayashi, H., & Kanemasa, Y. (1979). Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms. *Journal of Bacteriology*, *140*(3), 859–863.
- Heasley, B. (2012). Chemical synthesis of the cardiotoxic steroid glycosides and related natural products. *Chemistry. A European Journal*, *18*(11), 3092–3120.
- Heftmann, E. (1983). Biogenesis of steroids in Solanaceae. *Phytochemistry*, *22*(9), 1843–1860.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, *172*(11), 6557–6567.
- Hochstrasser, D. F., Appel, R. D., Golaz, O., Pasquali, C., Sanchez, J. C., & Bairoch, A. (1995). Sharing of worldwide spread knowledge using hypermedia facilities & fast communication protocols (Mosaic and World Wide Web): The example of ExPASy. *Methods of Information in Medicine*, *34*(1–2), 75–78.
- Hoffmann, F., & Maser, E. (2007). Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metabolism Reviews*, *39*(1), 87–144.



## Bibliografía

---

Holert, J., Jagmann, N., & Philipp, B. (2013). The essential function of genes for a hydratase and an aldehyde dehydrogenase for growth of *Pseudomonas* sp. strain Chol1 with the steroid compound cholate indicates an aldolytic reaction step for deacetylation of the side chain. *Journal of Bacteriology*, *195*(15), 3371–3380.

Holert, J., Kulic, Z., Yucel, O., Suvekbala, V., Suter, M. J., Moller, H. M., & Philipp, B. (2013). Degradation of the acyl side chain of the steroid compound cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1 proceeds via an aldehyde intermediate. *Journal of Bacteriology*, *195*(3), 585–595.

Holert, J., Yucel, O., Suvekbala, V., Kulic, Z., Moller, H., & Philipp, B. (2014). Evidence of distinct pathways for bacterial degradation of the steroid compound cholate suggests the potential for metabolic interactions by interspecies cross-feeding. *Environmental Microbiology*, *16*(5), 1424–1440.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., & Kudo, T. (2006). ORF18-disrupted mutant of *Comamonas testosteroni* TA441 accumulates significant amounts of 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostane-5-oic acid and its derivatives after incubation with steroids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *101*(1), 78–84.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Kurita, T., & Kudo, T. (2005). Identification of 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostane-5-oic acid, 4-hydroxy-2-oxohexanoic acid, and 2-hydroxyhexa-2,4-dienoic acid and related enzymes involved in testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 5275–5281.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Malon, M., Yamamoto, T., & Kudo, T. (2008). Identification of genes involved in inversion of stereochemistry of a C-12 hydroxyl group in the catabolism of cholic acid by *Comamonas testosteroni* TA441. *Journal of Bacteriology*, *190*(16), 5545–5554.

Horinouchi, M., Hayashi, T., & Kudo, T. (2004). The genes encoding the hydroxylase of 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione in steroid degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *92*(3), 143–154.

Horinouchi, M., Hayashi, T., & Kudo, T. (2012). Steroid degradation in *Comamonas testosteroni*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *129*(1–2), 4–14.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Yamamoto, T., & Kudo, T. (2003). A new

## Bibliografía

---

bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consists of aromatic-compound degradation genes for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4421–4430.

Horinouchi, M., Kurita, T., Hayashi, T., & Kudo, T. (2010). Steroid degradation genes in *Comamonas testosteroni* TA441: Isolation of genes encoding a  $\Delta^4(5)$ -isomerase and  $3\alpha$ - and  $3\beta$ -dehydrogenases and evidence for a 100 kb steroid degradation gene hot spot. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 122(4), 253–263.

Horinouchi, M., Kurita, T., Yamamoto, T., Hatori, E., Hayashi, T., & Kudo, T. (2004). Steroid degradation gene cluster of *Comamonas testosteroni* consisting of 18 putative genes from meta-cleavage enzyme gene *tesB* to regulator gene *tesR*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(2), 597–604.

Hylemon, P. B., Zhou, H., Pandak, W. M., Ren, S., Gil, G., & Dent, P. (2009). Bile acids as regulatory molecules. *Journal of Lipid Research*, 50(8), 1509–1520.

Ismail, W., & Chiang, Y. R. (2011). Oxic and anoxic metabolism of steroids by bacteria. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 51, 1-13.

Itagaki, E., Hatta, T., Wakabayashi, T., & Suzuki, K. (1990). Spectral properties of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1040(2), 281–286.

Janeczko, A. (2012). The presence and activity of progesterone in the plant kingdom. *Steroids*, 77(3), 169–173.

Janeczko, A., & Filek, W. (2002). Stimulation of generative development in partly vernalized winter wheat by animal sex hormones. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24, 291–295.

Jatana, N., Jangid, S., Khare, G., Tyagi, A. K., & Latha, N. (2011). Molecular modeling studies of fatty acyl-CoA synthetase (FadD13) from *Mycobacterium tuberculosis*. A potential target for the development of antitubercular drugs. *Journal of Molecular Modeling*, 17(2), 301–313.

Jenkins, R. L., Wilson, E. M., Angus, R. A., Howell, W. M., & Kirk, M. (2003). Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent. *Toxicological Sciences*, 73(1), 53–59.

Jiang, L., Yang, J., & Chen, J. (2010). Isolation and characteristics of

## Bibliografía

---

17 $\beta$ -estradiol-degrading *Bacillus* spp. strains from activated sludge. *Biodegradation*, 21(5), 729–736.

Jobling, S., Sumpter, J. P., Sheahan, D., Osborne, J. A., & Matthiessen, P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(2), 194–202.

Kallberg, Y., Oppermann, U., & Persson, B. (2010). Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *FEBS Journal*, 277(10), 2375–2386.

Kang, Y., & Bashirullah, A. (2014). A steroid-controlled global switch in sensitivity to apoptosis during *Drosophila* development. *Developmental Biology*, 386(1), 34–41.

Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L., & Altmann, T. (1996). Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *The Plant Journal*, 9(5), 701–713.

Kavanagh, K. L., Jornvall, H., Persson, B., & Oppermann, U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(24), 3895–3906.

Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., ... Fujino, M. (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9435–9440.

Ke, J., Zhuang, W., Gin, K. Y., Reinhard, M., Hoon, L. T., & Tay, J. H. (2007). Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1163–1171.

Kelley, L. A., & Sternberg, M. J. (2009). Protein structure prediction on the Web: A case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, 4(3), 363–371.

Khare, G., Gupta, V., Gupta, R. K., Gupta, R., Bhat, R., & Tyagi, A. K. (2009). Dissecting the role of critical residues and substrate preference of a fatty acyl-CoA synthetase (FadD13) of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 4(12), e8387.

Kicha, A. A., Ivanchina, N. V, Gorshkova, I. A., Ponomarenko, L. P., Likhatskaya, G. N., & Stonik, V. A. (2001). The distribution of free

## Bibliografía

---

sterols, polyhydroxysteroids and steroid glycosides in various body components of the starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *128*(1), 43–52.

King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *44*(2), 301–307.

Kisiela, M., Skarka, A., Ebert, B., & Maser, E. (2012). Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria. A bioinformatic perspective. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *129*(1–2), 31–46.

Klein, U., Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (1995). Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with  $\beta$ -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*, *34*(42), 13784–13793.

Kloas, W., Lutz, I., & Einspanier, R. (1999). Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *The Science of the Total Environment*, *225*(1–2), 59–68.

Knol, J., Bodewits, K., Hessels, G. I., Dijkhuizen, L., & van der Geize, R. (2008). 3-Keto-5 $\alpha$ -steroid  $\Delta$ 1-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *The Biochemical Journal*, *410*(2), 339–346.

Kohl, W., Gloe, A., & Reichenbach, H. (1983). Steroids from the Myxobacterium *Nannocystis exedens*. *Journal of General Microbiology*, *129*(6), 1629–1635.

Kornman, K. S., & Loesche, W. J. (1982). Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity*, *35*(1), 256–263.

Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, *166*(1), 175–176.

Lange, I. G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D., & Meyer, H. H. D. (2002). Sex hormones originating from different livestock production systems. Fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica*, *473*, 27–37.

## Bibliografía

---

- Li, H. L., Tang, J., Liu, R. H., Lin, M., Wang, B., Lv, Y. F., ... Zhang, W. D. (2007). Characterization and identification of steroidal alkaloids in the Chinese herb *Veratrum nigrum* L. by HPLC/electrospray ionization with multi-stage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 21(6), 869–879.
- Luengo, J. M., Garcia, J. L., & Olivera, E. R. (2001). The phenylacetyl-CoA catabolon. A complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1434–1442.
- Macdonald, I. A., Bokkenheuser, V. D., Winter, J., McLernon, A. M., & Mosbach, E. H. (1983). Degradation of steroids in the human gut. *Journal of Lipid Research*, 24(6), 675–700.
- Macdonald, I. A., Hutchison, D. M., Forrest, T. P., Bokkenheuser, V. D., Winter, J., & Holdeman, L. V. (1983). Metabolism of primary bile acids by *Clostridium perfringens*. *Journal of Steroid Biochemistry*, 18(1), 97–104.
- MacLachlan, J., Wotherspoon, A. T. L., Ansell, R. O., & Brooks, C. J. W. (2000). Cholesterol oxidase. Sources, physical properties and analytical applications. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 72(5), 169–195.
- Mahato, S. B., Ganguly, A. N., & Sahu, N. P. (1982). Steroid saponins. *Phytochemistry*, 21(5), 959–978.
- Mahato, S. B., & Majumdar, I. (1993). Current trends in microbial steroid biotransformation. *Phytochemistry*, 34(4), 883–898.
- Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., ... Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, 284(5418), 1362–1365.
- Mallonee, D. H., White, W. B., & Hylemon, P. B. (1990). Cloning and sequencing of a bile acid-inducible operon from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *Journal of Bacteriology*, 172(12), 7011–7019.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., ... Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376–380.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L. B., & Luengo, J. M. (1990). Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the

## Bibliografía

---

catabolism of phenylacetic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(12), 7084–7090.

Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., ... Tanaka, K. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(5), 714–719.

Mason, J. R., & Cammack, R. (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annual Review of Microbiology*, 46, 277–305.

Mathieu, J. M., Mohn, W. W., Eltis, L. D., LeBlanc, J. C., Stewart, G. R., Dresen, C., ... Alvarez, P. J. (2010). 7-ketocholesterol catabolism by *Rhodococcus jostii* RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 352–355.

Mattos, K. A., Oliveira, V. C. G., Berrêdo-Pinho, M., Amaral, J. J., Antunes, L. C. M., Melo, R. C. N., ... Pessolani, M. C. V. (2014). *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages. A potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cellular Microbiology*, 16(6), 797–815.

Merino, E., Barrientos, A., Rodriguez, J., Naharro, G., Luengo, J. M., & Olivera, E. R. (2013). Isolation of cholesterol- and deoxycholate-degrading bacteria from soil samples. Evidence of a common pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 891–904.

Merino García, E. (2016). 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, Área de Publicaciones, León*.

Miclo, A., & Germain, P. (1990). Catabolism of methylperhydroindanedione propionate by *Rhodococcus equi*. Evidence of a MEPHIP-reductase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(5), 594–599.

Milla, S., Depiereux, S., & Kestemont, P. (2011). The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish. A review. *Ecotoxicology*, 20(2), 305–319.

Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. (Vol. 2<sup>a</sup>). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Mitchell, J. W., Mandava, N., Worley, J. F., Plimmer, J. R., & Smith, M. V.



## Bibliografía

---

(1970). Brassins. A new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*, *225*(5237), 1065–1066.

Möbus, E., & Maser, E. (1998). Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid-inducible  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(47), 30888–30896.

Mohn, W. W., Wilbrink, M. H., Casabon, I., Stewart, G. R., Liu, J., van der Geize, R., & Eltis, L. D. (2012). Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp. *Journal of Bacteriology*, *194*(24), 6712–6719.

Mukherjee, E., Banerjee, S., & Mahato, S. B. (1993). Transformation of cholic acid by *Arthrobacter simplex*. *Steroids*, *58*(10), 484–490.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction. *Biotechnology*, *24*, 17–27.

Narbad, A., & Gasson, M. J. (1998). Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, *144* (5), 1397–1405.

IUPAC-IUB Joint Venture Commission on Biochemical Nomenclature (1989). The nomenclature of steroids. *European Journal of Biochemistry*, *186*(3), 429–458.

Norrandar, J., Kempe, T., & Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, *26*(1), 101–106.

Oncina, R., Botía, J. M., Del Río, J. A., & Ortuño, A. (2000). Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chemistry*, *70*(4), 489–492.

Oppermann, U. C. T., & Maser, E. (1996). Characterization of a  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the Gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *European Journal of Biochemistry*, *241*(3), 744–749.

Orlov, S. N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S. V, Tremblay, J., & Hamet, P. (1999). Inversion of the intracellular  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(23), 16545–16552.

## Bibliografía

---

- Ouellet, H., Johnston, J. B., & de Montellano, P. R. O. (2011). Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, *19*(11), 530–539.
- Ourisson, G., & Nakatani, Y. (1994). The terpenoid theory of the origin of cellular life. The evolution of terpenoids to cholesterol. *Chemistry & Biology*, *1*(1), 11–23.
- Ourisson, G., Rohmer, M., & Poralla, K. (1987). Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. *Annual Review of Microbiology*, *41*, 301–333.
- Overhage, J., Priefert, H., & Steinbuchel, A. (1999). Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(11), 4837–4847.
- Palleroni, N. J. (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *64*(3–4), 231–251.
- Palleroni, N. J., Ballard, R. W., Ralston, E., & Doudoroff, M. (1972). Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology*, *110*(1), 1–11.
- Palmer, B. D., & Palmer, S. K. (1995). Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog. *Environmental Health Perspectives*, *103* (Suppl), 19–25.
- Pandey, A. K., & Sasseti, C. M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(11), 4376–4380.
- Park, R. J., Dunn, N. W., & Ide, J. A. (1986). A catecholic 9,10-seco steroid as a product of aerobic catabolism of cholic acid by a *Pseudomonas* sp. *Steroids*, *48*(5–6), 439–450.
- Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., ... Lehmann, J. M. (1999). Bile acids. Natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, *284*(5418), 1365–1368.
- Pauwels, B., Wille, K., Noppe, H., De Brabander, H., Van de Wiele, T., Verstraete, W., & Boon, N. (2008). 17 $\alpha$ -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 $\beta$ -estradiol and estriol. *Biodegradation*, *19*(5), 683–693.



## Bibliografía

---

Payne, D. W., & Talalay, P. (1985). Isolation of novel microbial 3  $\alpha$ -, 3  $\beta$ -, and 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. Purification, characterization, and analytical applications of a 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase from an *Alcaligenes* sp. *The Journal of Biological Chemistry*, *260*(25), 13648–13655.

Pearson, A., Budin, M., & Brocks, J. J. (2003). Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 15352–15357.

Pearson, W. R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*, *183*, 63–98.

Pearson, W. R., & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(8), 2444–2448.

Perrin, A., Brasmes, B., Chambaz, E. M., & Defaye, G. (1997). Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *126*(1), 7–15.

Petrusma, M., Dijkhuizen, L., & van der Geize, R. (2009). *Rhodococcus rhodochromus* DSM 43269 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase, a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase with subtle steroid substrate specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(16), 5300–5307.

Petrusma, M., Hessels, G., Dijkhuizen, L., & van der Geize, R. (2011). Multiplicity of 3-ketosteroid-9 $\alpha$ -hydroxylase enzymes in *Rhodococcus rhodochromus* DSM43269 for specific degradation of different classes of steroids. *Journal of Bacteriology*, *193*(15), 3931–3940.

Petrusma, M., van der Geize, R., & Dijkhuizen, L. (2014). 3-Ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase enzymes. Rieske non-heme monooxygenases essential for bacterial steroid degradation. *Antonie van Leeuwenhoek*, *106*(1), 157–172.

Philipp, B. (2011). Bacterial degradation of bile salts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*(4), 903–915.

Philipp, B., Erdbrink, H., Suter, M. J., & Schink, B. (2006). Degradation of and sensitivity to cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. *Archives of Microbiology*, *185*(3), 192–201.

Plesiat, P., Grandguillot, M., Harayama, S., Vragar, S., & Michel-Briand,

## Bibliografía

---

- Y. (1991). Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas testosteroni* gene encoding 3-oxosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 173(22), 7219–7227.
- Poole, A. J., Cord-Ruwisch, R., & Jones, F. W. (1999). Biological treatment of chemically flocculated agro-industrial waste from the wool scouring industry by an aerobic process without sludge recycle. *Water Research*, 33(9), 1981–1988.
- Prieto, J. C. (1992). Hormonas hipotalámicas, hipofisarias, tiroideas y esteroideas. In E. Herrera (Ed.), *Bioquímica. Biología molecular y bioquímica fisiológica*. (Vol. 2ª, pp. 1145–1172). Madrid: Interamericana. McGraw-Hill.
- Qazzaz, H. M., Cao, Z., Bolanowski, D. D., Clark, B. J., & Valdes, R. J. (2004). De novo biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. *Clinical Chemistry*, 50(3), 612–620.
- Qiao, L., Han, S. I., Fang, Y., Park, J. S., Gupta, S., Gilfor, D., ... Dent, P. (2003). Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 23(9), 3052–3066.
- Quandt, J., & Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*, 127(1), 15–21.
- Rahouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., & Eriksson, K.-E. (1989). Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2391–2398.
- Ramírez-Ortega, M., Maldonado-Lagunas, V., Melendez-Zajgla, J., Carrillo-Hernandez, J. F., Pastelin-Hernandez, G., Picazo-Picazo, O., & Ceballos-Reyes, G. (2006). Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis. *European Journal of Pharmacology*, 534(1–3), 71–76.
- Reznikoff, W. S. (1993). The Tn5 transposon. *Annual Review of Microbiology*, 47, 945–963.
- Ridlon, J. M., & Hylemon, P. B. (2012). Identification and characterization of two bile acid coenzyme A transferases from *Clostridium scindens*, a bile acid 7 $\alpha$ -dehydroxylating intestinal bacterium. *Journal of Lipid Research*, 53(1), 66–76.

## Bibliografía

---

Ridlon, J. M., Kang, D.-J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, *47*(2), 241–259.

Rohman, A., van Oosterwijk, N., Thunnissen, A.M. W. H., & Dijkstra, B. W. (2013). Crystal structure and site-directed mutagenesis of 3-ketosteroid  $\Delta$ 1-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 explain its catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(49), 35559–35568.

Rohmer, M., Bouvier-Nave, P., & Ourisson, G. (1984). Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *Journal of General Microbiology*, *130*(5), 1137–1150.

Rosloniec, K. Z., Wilbrink, M. H., Capyk, J. K., Mohn, W. W., Ostendorf, M., van der Geize, R., ... Eltis, L. D. (2009). Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Molecular Microbiology*, *74*(5), 1031–1043.

Russell, D. W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *72*, 137–174.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory*.

Sang, Y., Xiong, G., & Maser, E. (2012). Identification of a new steroid degrading bacterial strain H5 from the Baltic Sea and isolation of two estradiol inducible genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *129*(1–2), 22–30.

Schatz, A., Savard, K., & Pintner, I. J. (1949). The ability of soil microorganisms to decompose steroids. *Journal of Bacteriology*, *58*(2), 117–125.

Schoner, W., & Scheiner-Bobis, G. (2007). Endogenous and exogenous cardiac glycosides. Their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *293*(2), C509–36.

Selvaraj, G., & Iyer, V. N. (1983). Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *Journal of Bacteriology*, *156*(3), 1292–1300.

Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., & Hosomi, M. (2004). Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and

## Bibliografía

---

ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research*, *38*(9), 2322–2329.

Shimizu, T., Jikumaru, Y., Okada, A., Okada, K., Koga, J., Umemura, K., ... Yamane, H. (2008). Effects of a bile acid elicitor, cholic acid, on the biosynthesis of diterpenoid phytoalexins in suspension-cultured rice cells. *Phytochemistry*, *69*(4), 973–981.

Shore, L. S., Gurevitz, M., & Shemesh, M. (1993). Estrogen as an environmental pollutant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *51*(3), 361–366.

Shore, L. S., Kapulnik, Y., Gurevich, M., Winingar, S., Badamy, H., & Shemesh, M. (1995). Induction of phytoestrogen production in *Medicago sativa* leaves by irrigation with sewage water. *Environmental and Experimental Botany*, *35*(3), 363–369.

Shore, L. S., & Shemesh, M. (2003). Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure and Applied Chemistry*, *75*, 1859–1871.

Sih, C. J., Tai, H. H., Tsong, Y. Y., Lee, S. S., & Coombe, R. G. (1968). Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIV. Pathway of cholesterol side-chain degradation. *Biochemistry*, *7*(2), 808–818.

Sojo, M., Bru, R., Lopez-Molina, D., Garcia-Carmona, F., & Arguelles, J. C. (1997). Cell-linked and extracellular cholesterol oxidase activities from *Rhodococcus erythropolis*. Isolation and physiological characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *47*(5), 583–589.

Sorensen, P. W., Pinillos, M., & Scott, A. P. (2005). Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology*, *140*(3), 164–175.

Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A., Camon, E., Garcia-Pastor, M., Kanz, C., ... Tuli, M. A. (2001). The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Research*, *29*(1), 17–21.

Suzuki, Y., Doukyu, N., & Aono, R. (1998). Lithocholic acid side-chain cleavage to produce 17-keto or 22-aldehyde steroids by *Pseudomonas putida* strain ST-491 grown in the presence of an organic solvent, diphenyl ether. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *62*(11), 2182–2188.

Swain, K., Casabon, I., Eltis, L. D., & Mohn, W. W. (2012). Two

## Bibliografía

---

transporters essential for reassimilation of novel cholate metabolites by *Rhodococcus jostii* RHA1. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6720–6727.

Szentirmai, A. (1990). Microbial physiology of sidechain degradation of sterols. *Journal of Industrial Microbiology*, 6, 101–116.

Tarasev, M., & Ballou, D. P. (2005). Chemistry of the catalytic conversion of phthalate into its cis-dihydrodiol during the reaction of oxygen with the reduced form of phthalate dioxygenase. *Biochemistry*, 44(16), 6197–6207.

Tarlera, S., & Denner, E. B. (2003). *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the b-proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 4), 1085–1091.

Tateno, Y., Fukami-Kobayashi, K., Miyazaki, S., Sugawara, H., & Gojobori, T. (1998). DNA Data Bank of Japan at work on genome sequence data. *Nucleic Acids Research*, 26(1), 16–20.

Teles, M., Gravato, C., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2004). Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to b-naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17  $\beta$ -estradiol individual and combined exposures. *Chemosphere*, 57(2), 147–158.

Tenneson, M. E., Baty, J. D., Bilton, R. F., & Mason, A. N. (1979). The degradation of cholic acid by *Pseudomonas* sp. N.C.I.B. 10590. *The Biochemical Journal*, 184(3), 613–618.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics, Chapter 2*, Unit 2.3.

] Turfitt, G. E. (1944). Microbiological agencies in the degradation of steroids: I. The cholesterol-decomposing organisms of soils. *Journal of Bacteriology*, 47(6), 487–493.

Uhia, I., Galan, B., Morales, V., & Garcia, J. L. (2011). Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. *Environmental Microbiology*, 13(4), 943–959.

van der Geize, R., Hessels, G. I., Nienhuis-Kuiper, M., & Dijkhuizen, L. (2008). Characterization of a second *Rhodococcus erythropolis* SQ1 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase activity comprising a terminal oxygenase homologue, KshA2, active with oxygenase-reductase component KshB. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7197–7203.

van der Geize, R., Hessels, G. I., van Gerwen, R., van der Meijden, P., & Dijkhuizen, L. (2002). Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Molecular Microbiology*, 45(4), 1007–1018.

Van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M. H., Hara, H., Anderton, M. C., ... Eltis, L. D. (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1947–1952.

van Oosterwijk, N., Knol, J., Dijkhuizen, L., van der Geize, R., & Dijkstra, B. W. (2011). Cloning, overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of 3-ketosteroid  $\Delta$ 4-5 $\alpha$ -dehydrogenase from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Acta crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(Pt 10), 1269–1273.

Venkatachalam, K. V. (2005). Petromyzonol sulfate and its derivatives. The chemoattractants of the sea lamprey. *BioEssays*, 27(2), 222–228.

Wackett, L. P., & Gibson, D. T. (1988). Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), 1703–1708.

Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L. C., & Forman, B. M. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Molecular Cell*, 3(5), 543–553.

Wang, P.-H., Leu, Y.-L., Ismail, W., Tang, S.-L., Tsai, C.-Y., Chen, H.-J., ... Chiang, Y.-R. (2013). Anaerobic and aerobic cleavage of the steroid core ring structure by *Steroidobacter denitrificans*. *J Lipid Res*, 54(5), 1493–1504.

Wasserstrom, J. A., & Aistrup, G. L. (2005). Digitalis. New actions for an old drug. *American Journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(5), H1781–H1793.

Weber, S., Leuschner, P., Kampfer, P., Dott, W., & Hollender, J. (2005). Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 106–112.



## Bibliografía

---

- Wells, J. E., & Hylemon, P. B. (2000). Identification and characterization of a bile acid 7 $\alpha$ -dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7 $\alpha$ -dehydroxylating strain isolated from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1107–1113.
- Wilbrink, M. H., Petrusma, M., Dijkhuizen, L., & van der Geize, R. (2011). FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzyme A ligase essential for degradation of C-24 branched sterol side chains. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4455–4464.
- Wilbur, W. J., & Lipman, D. J. (1983). Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(3), 726–730.
- Williams, J. R., & Gong, H. (2007). Biological activities and syntheses of steroidal saponins: the shark-repelling pavoninins. *Lipids*, 42(1), 77–86.
- Wollam, J., & Antebi, A. (2011). Sterol regulation of metabolism, homeostasis, and development. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 885–916.
- Wovcha, M. G., Brooks, K. E., & Kominek, L. A. (1979). Evidence for two steroid 1,2-dehydrogenase activities in *Mycobacterium fortuitum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 574(3), 471–479.
- Yam, K. C., D'Angelo, I., Kalscheuer, R., Zhu, H., Wang, J. X., Snieckus, V., ... Eltis, L. D. (2009). Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000344.
- Yang, X., Dubnau, E., Smith, I., & Sampson, N. S. (2007). Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry*, 46(31), 9058–9067.
- Yao, K., Xu, L. Q., Wang, F. Q., & Wei, D.-Z. (2014). Characterization and engineering of 3-ketosteroid- $\Delta$ 1-dehydrogenase and 3-ketosteroid-9 $\alpha$ -hydroxylase in *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795 to produce 9 $\alpha$ -hydroxy-4-androstene-3,17-dione through the catabolism of sterols. *Metabolic Engineering*, 24(0), 181–191.
- Ying, G. G., Kookana, R. S., & Ru, Y. J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 28(6), 545–551.
- Yu, C. P., Deeb, R. A., & Chu, K. H. (2013). Microbial degradation of steroidal estrogens. *Chemosphere*, 91(9), 1225–1235.

## Bibliografía

---

Yu, C. P., Roh, H., & Chu, K. H. (2007). 17 $\beta$ -estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. *Environmental Science & Technology*, *41*, 486–492.

Zhang, Q., Ren, Y., He, J., Cheng, S., Yuan, J., Ge, S., ... Xie, G. (2015). Multiplicity of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase enzymes in *Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395 with preferences for different steroids. *Annals of Microbiology*, *65*(4), 1961–1971.

Zhou, W., Cross, G. A., & Nes, W. D. (2007). Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Lipid Research*, *48*(3), 665–673.