



CARACTERIZACIÓN DE KSTD1 Y KSTD2 DE *RHODOCOCCUS RUBER*
KSTD1 AND KSTD2 CHARACTERIZATION FROM *RHODOCOCCUS RUBER*

García de la Morena, D.

Facultad de Biología de la UCM; dgarciad@ucm.es

RESUMEN

La diversidad de rutas metabólicas de *Rhodococcus* proporciona intermediarios metabólicos que pueden ser de gran interés para la industria farmacéutica. En la ruta de degradación del colesterol, la actividad de KstD cataliza la conversión de AD en ADD. Sin embargo, es frecuente la presencia de diversas actividades KstDs en la misma cepa. En este estudio se sobreexpresan dos KstDs de *R. ruber* con el fin de caracterizarlas en cuanto a su preferencia de sustratos.

Palabras clave: Degradación, intermediarios, esteroides, AD, ADD, *Rhodococcus*.

SUMMARY

The diverse metabolic pathways of *Rhodococcus* can be an important source of metabolic intermediates for the pharmaceutical industry. In the cholesterol degradation pathway, the activity of the KstD converts AD into ADD. Nonetheless, there is redundancy of KstD activities in the genome. In this study we overexpress two KstDs from *R. ruber* in order to characterize their substrate preference.

Key words: Degradation, intermediates, steroids, AD, ADD, *Rhodococcus*.

INTRODUCCIÓN

Rhodococcus es un género de bacterias Gram-positivas, pertenecientes al grupo de los Actinomicetos, capaces de catabolizar un amplio rango de compuestos en parte debido a la

diversidad y multiplicidad enzimática con la que cuenta. Por todo ello es una cepa de múltiples aplicaciones biotecnológicas (Yam y Okamoto, 2011).

Los esteroides son un amplio grupo de compuestos orgánicos derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno de gran interés biológico, medioambiental e industrial. Los *Rhodococci* se utilizan en la biotransformación de esteroides ya que de este proceso se puede obtener intermediarios muy valiosos como el 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD) y el 4-androsten-3,17-diona (AD) (Donova y Egorova (2012)). La ruta de degradación del colesterol se ha determinado muy recientemente aunque quedan muchos aspectos sin determinar (García *et al.*, 2012). Por ejemplo, aunque uno de los puntos clave es la conversión del AD a ADD llevado a cabo por la flavoproteína 3-cetoesteroide- Δ -deshidrogenasa (KstD), existe multiplicidad de estas enzimas en los genomas. Se sabe que el genoma de *R. ruber* posee hasta tres KstDs (Fernández *et al.*, 2012), aunque se desconoce qué función particular puede tener cada una. El presente trabajo tiene como objetivo el estudio de la diferente funcionalidad de dos enzimas KstDs de *R. ruber* como un paso previo para poder conocer sus posibilidades biotecnológicas. Para ello se van a sobreexpresar utilizando el vector pTip-QC1 en otra cepa de *Rhodococcus*, *R. erythropolis* CET3014, ya que no se ha descrito todavía un vector de expresión adecuado para *R. ruber*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana, medio y condiciones de cultivo. La cepa de *R. ruber* Chol-4 (CECT 7469) aislada a partir de aguas residuales (Fernández *et al.* (2009)) y *R. erythropolis* (CET3014), se cultivan en medio LB en condiciones aeróbicas, a 30° y 250rpm. La cepa de *E. coli* se cultivó en medio LB a 37° y 250rpm.

Técnicas de ingeniería genética: Extracción de DNA, PCR y Clonaje en pTip-QC1. La extracción del ADN de *R. ruber* se basa en el protocolo de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Hosek *et al.* (2006)).

Los marcos de lectura de las KstDs se amplificaron mediante PCR (Fig. 1). El resultado de la PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%, 200v) y se clonaron en pTip-QC1 (vector lanzadera *E. coli* –*Rhodococcus*, (Nakashima y Tamura, 2004).) entre las dianas *NdeI*-*BglIII*. *R. erythropolis* se electroporó con el plásmido con inserto y sin inserto (control). Los clones positivos fueron capaces de crecer en placas de LB con cloranfenicol (Cm 34 μ g/mL).

Preparación de las muestras y estudio de la actividad de KstD. Se prepararon cultivos de 50mL de *R. erythropolis* conteniendo los plásmidos pKstD1, pKstD2 y pTip-QC1 vacío (Fig.

1) en LB con Cm 34µg/mL hasta una OD_{600nm} entre 0,6-0,8, tras lo cual se indujo la expresión con Tioestreptona 1µg/mL (Sigma) durante 24 horas. Tras la centrifugación (5000 rpm, 10 min), el pellet se resuspendió en tampón fosfato 50 mM a pH 7.0 y se dieron un par de lavados. Las células se sonicaron y el extracto se congeló a -20°C hasta su uso. Los sustratos usados para la actividad fueron: AD, 5α-testosterona y progesterona de Sigma, 9OHAD de Organon Biosciences y 4BNC (ácido 4-pregнено-3-ona-20β-carboxílico) de Steraloids. La determinación de la actividad de KstD se hizo por triplicado a 25° usando DCPIP como aceptor final de electrones. La mezcla de reacción (1mL) consistió en 50mM tris (pH 7.0), 80µM de DCPIP, extracto libre de células y 200 µM de esteroides en etanol. La actividad se expresa como valores medios ± SD en unidades por miligramo de proteína; una unidad es definida como la cantidad de enzima que provoca la reducción de 1micromol de DCPIP/min ($\epsilon_{600} = 21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), descontando la presencia de actividades inespecíficas (valores obtenidos por la cepa control). La concentración total de enzima (mg/mL) se mide por Bradford. (Bradford (1976)) y analizamos la expresión de proteínas con un gel PAGE-SDS (20µg totales de proteína por célula) con posterior tinción por Coomassie.

RESULTADOS

Clonaje de las KstD1 y KstD2 de *R. ruber* en *R. erythropolis*. Expresión de las construcciones de KstD1 y KstD2 en *R. erythropolis*

La figura 1 recoge los pasos que se han seguido para la obtención de las cepas de *R. erythropolis* conteniendo los plásmidos pKstD1, pKstD2 o el vector pTip-QC1 vacío. Los extractos de estas cepas recombinantes se utilizaron en la determinación de la actividad KstD utilizando diferentes sustratos. Los valores obtenidos y expresados en U de actividad KstD por mg de proteína total, se recogen en la Figura 1.

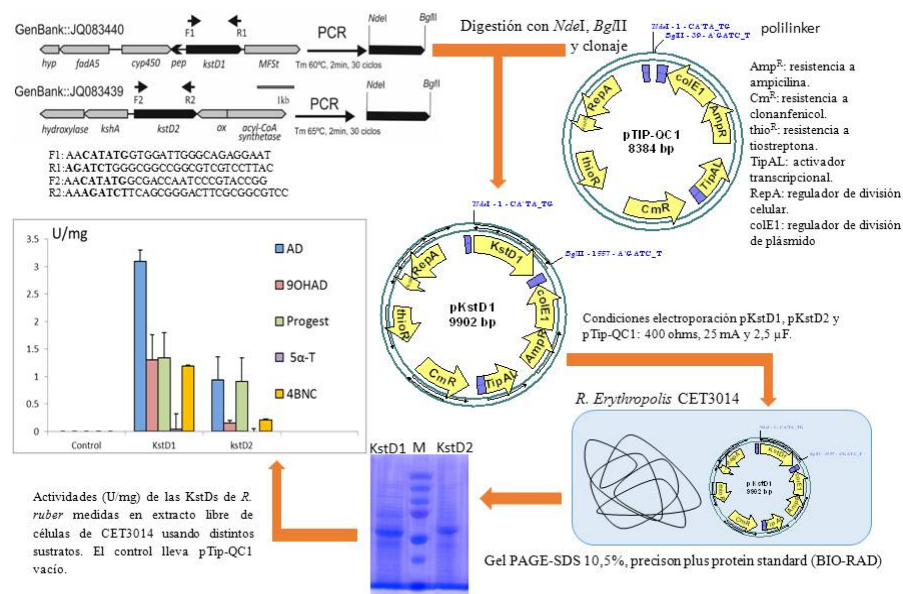


Figura 1.- Pasos para la obtención de las cepas de CET3014 recombinantes usadas para el análisis de expresión de proteínas y los experimentos de actividad.

DISCUSIÓN

Los genomas de Actinobacterias contienen multiplicidad de algunas de las enzimas del metabolismo de esteroides como es el caso de las KstDs. Esta redundancia podría dotar a la célula de una gran versatilidad y mayor capacidad de respuesta a las condiciones medioambientales. Las funciones particulares de cada KstD parecen ser específicas del tipo de cepa (Knol, *et al.* (2008); Yao, *et al.* (2014)).

La sobreexpresión de las KstDs de *R. ruber* en *R. erythropolis* fue satisfactoria (Fig. 1). La KstD1 de *R. ruber* es capaz de actuar sobre el AD, seguido de progesterona, 9OHAD y 4-BNC casi al mismo nivel. La KstD2 presenta una clara preferencia frente a AD y progesterona, dando bajos niveles de actividad frente a 9OHAD y 4-BNC. Tanto la KstD1 como la KstD2 no dieron actividad frente a 5 α -T. En otros *Rhodococci* también las enzimas similares a KstD1 y KstD2 prefieren sustratos esteroideos que presenten la estructura 3-ceto-4-eno como el AD o ADD, y no un anillo A saturado, como la 5 α -T (Knol *et al.* (2008)). Sin embargo, hay diferencias entre ambas cepas, ya que para evitar el crecimiento en AD en *R. erythropolis* SQ1 se necesita el mutante doble para KstD1 y KstD2 mientras que en *R. ruber* Chol-4 basta con el mutante simple de la KstD2 para lograr el mismo efecto (Fernández *et al.* (2012)).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que tanto la KstD1 como la KstD2 de *R. ruber* actúan en la conversión de AD a ADD (o de 9OHAD a 9OHADD) de forma similar a lo descrito en *R. erythropolis* SQ1 (Knol *et al.* (2008)) pero existen ligeras diferencias en cuanto a su preferencia por otros sustratos.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Dpto. de BBMI de la UCM, es especial al Profesor Julián Perera, a la profesora María Navarro y a Govinda Guevara, la posibilidad de realizar este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Donova, M.V. y O.V. Egorova. 2012. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1423–1447. doi 10.1007/s00253-012-4078-0.
- Fernández, L., E. García, et al. 2009. Morphological, physiological, and molecular characterization of a newly isolated steroid-degrading actinomycete, identified as *R. ruber* strain Chol-4. *Curr. Microbiol.* **59**(5): 548-553. doi: 10.1007/s00284-009-9474-z.
- Fernández, L., R. van der Geize, et al. 2012. Molecular characterization of three 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase isoenzymes of *R. ruber* strain Chol-4. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132, 271–281. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.06.005.
- García, J.L., I. Uhía, et al. 2012. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb. Biotechnol.* 5(6): 679-699. doi:10.1111/j.1751-7915.2012.00331.x
- Hosek, J., P. Svastova, et al. (2006). Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinary Research* **524**: 180-192.
- Knol, J., K. Bodewits, et al. 2008. 3-Keto-5 α -steroid Delta(1)-dehydrogenase from *R. erythropolis* SQ1 and its orthologue in *M. tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *Biochem. J.* **410**(2): 339-346. doi: 10.1042/BJ20071130.
- Nakashima, N y Tamura, T. 2004. Isolation and Characterization of a Rolling-Circle-Type Plasmid from *R. erythropolis* and Application of the Plasmid to Multiple-Recombinant-Protein Expression. *Appl Environ Microbiol.* 70(9): 5557–5568.
- Yam, K.C. y S. Okamoto. 2011. Adventures in *Rhodococcus* - from steroids to explosives. *Can. J. Microbiol.* **57**(3): 155-168. doi: 10.1139/W10-115.
- Yao, K., L.Q. Xu, et al. 2014. Characterization and engineering of 3-ketosteroid- big up tri, open1-dehydrogenase and 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase in *M. neoaurum* ATCC 25795 to produce 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione through the catabolism of sterols. *Metab Eng* **24**: 181-191. doi:10.1016/j.ymben.2014.05.005.