

03044 3
2ej.

Universidad Nacional Autónoma de México
Colegio de Ciencias y Humanidades - U. A. C. P. y P.

TRANSFORMACION GENETICA DE *Aspergillus*
Y SUS APLICACIONES

TRABAJO FINAL QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

SERGIO RUBEN TREJO ESTRADA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. INTRODUCCION.....	1
2. EL GENERO <i>Aspergillus</i>	2
2.1. ESPECIES DE IMPORTANCIA ECONOMICA.....	2
2.2. ESTRUCTURA DEL GENOMA EN <i>Aspergillus nidulans</i>	3
3. METODOLOGIA DE TRANSFORMACION.....	4
3.1. ENTRADA DE DNA.....	4
3.1.1. Cultivo y preparacion de Células	
3.1.2. Formacion de protoplastos	
3.1.3. Captacion de DNA	
3.1.4. Regeneracion de Protoplastos	
3.1.5. Integracion de protocolos de transformacion	
3.2. MARCADORES DE SELECCION.....	8
3.2.1. Marcadores auxotróficos	
3.2.2. Marcadores dominantes	
3.2.3. Fusión y selección visual	
3.2.4. Selección doble	
3.2.5. Criterios de utilización de marcadores	
3.3. VECTORES.....	11
3.3.1. Plásmidos	
3.3.2. Cósmidos	
3.4. SECUENCIAS IMPORTANTES PARA LA EXPRESION GENETICA.....	13
3.4.1. Secuencias mitocondriales	
3.4.2. Las secuencias ansl y unt	
3.4.3 Regiones de regulacion transcripcional	
3.5. SECRECION Y SENALES DE SECRECION.....	15
3.6. CEPAS RECEPTORAS.....	18
3.7. DESTINO DEL DNA TRANSFORMANTE.....	19
3.7.1. Integración cromosómica	
3.7.2. Cotransformación	
3.7.3. Análisis genético de los transformantes	
3.8. AISLAMIENTO Y CLONACION DE GENES.....	22
3.8.1. Aislamiento por hibridización	
3.8.2. Selección por complementación y autoclonación	
4. APLICACIONES EN BIOTECNOLOGIA.....	24
4.1. <i>Aspergillus</i> COMO SISTEMA DE EXPRESION Y SECRECION. VENTAJAS SOBRE LOS SISTEMAS CLASICOS.....	24
4.2. VECTORES DE EXPRESION Y SECRECION.....	27

4.3.	PRODUCCION DE QUIMOSINA BOVINA EN <i>Aspergillus</i>	27
4.3.1.	Expresión en <i>A. nidulans</i>	
4.3.2.	Expresión en <i>A. awamori</i>	
4.3.3.	Reemplazo de los genes de glucoamilasa y aspergillopepsina	
4.3.4.	Mejoramiento de plásmidos	
4.4.	PRODUCCION DE INTERFERON- α -2 EN <i>Aspergillus nidulans</i> ... 30	
4.4.1.	El regulón de etanol en <i>A. nidulans</i>	
4.4.2.	Construcción de vectores y transformación	
4.4.3.	Optimización de vectores	
4.4.4.	Utilización del sistema alcA	
4.5.	EXPRESION DE PROTEASA ASPARTICA FUNGAL EN <i>A. oryzae</i> ... 33	
4.5.1.	Clonación del gen de α -amilasa	
4.5.2.	Expresión de PRM	
4.5.3.	Características de PRM recombinante	
4.6.	SECRECION DE tPA HUMANO EN <i>A. nidulans</i> 34	
4.6.1.	Efecto del promotor en la expresión de tPA	
4.6.2.	Efecto del promotor en las modificaciones postraduccionales	
4.7.	OTRAS APLICACIONES EN BIOTECNOLOGIA	
5.	APLICACIONES EN INVESTIGACION BASICA	
6.	PROPUESTA DE APLICACION: PRODUCCION DE DEXTRANASA DE <i>Paecilomyces lilacinus</i> por <i>Aspergillus awamori</i> 38	
6.1.	OBTENCION DE DNA DE <i>P. lilacinus</i> Y CONSTRUCCION DE UN BANCO GENETICO EN p3SR..... 38	
6.2.	TRANSFORMACION..... 39	
6.3.	RECUPERACION DE PLASMIDOS..... 40	
6.4.	ENSAYOS DE PRODUCCION DE DEXTRANASA Y PECTINASA..... 40	
7.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS..... 42	
8.	BIBLIOGRAFIA..... 44	

1. INTRODUCCION

Los hongos son organismos eucarióticos heterótrofos con micelio característico y nutrición por absorción. La mayor parte son saprófitos, pues obtienen el alimento a partir de materia orgánica muerta que degradan mediante enzimas extracelulares (Deacon, 1984).

La reproducción en los hongos es sexual o asexual, y presentan un sistema de membranas y organelos que regula el transporte de solutos y macromoléculas en un sistema hifal con septos perforados. La diversidad metabólica de los hongos es muy amplia, y los hace capaces de degradar una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos (Deacon, 1984; Timberlake y Marshall, 1989).

Las actividades biológicas de los hongos tienen una gran influencia tanto benéfica como perjudicial para el ser humano. Por ejemplo, los hongos *Penicillium* y *Cephalosporium* son utilizados como productores de antibióticos. En contraste, *Aspergillus flavus* produce aflatoxinas contaminando los cereales y haciendo imposible su consumo. Los hongos son utilizados como alimento (los champiñones, por ejemplo) en la preparación de alimentos (pan y bebidas fermentadas) y en la producción de aditivos alimentarios (ácido cítrico). Sin embargo, algunos hongos fitopatógenos y contaminantes de granos de almacén ocasionan graves pérdidas económicas.

Debido a su relativa simplicidad y a su capacidad de crecer formando colonias en medios de cultivo utilizados en el laboratorio, se han podido estudiar muchas especies de hongos. Algunas, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* han sido utilizados como modelos biológicos para establecer los fundamentos fisiológicos, bioquímicos y genéticos que permiten entender los mecanismos de control del crecimiento, la diferenciación y el desarrollo en eucariontes (Timberlake y Marshall, 1989).

Dada la importancia que tiene los hongos filamentosos en medicina, agricultura, industria e investigación básica, se hace indispensable la actualización de las técnicas disponibles para su modificación genética, y en particular las relacionadas con el mejoramiento y desarrollo de especies de interés biotecnológico.

La transformación genética consiste en la introducción de una molécula de DNA en una célula viva, y constituye la herramienta principal para la manipulación genética dirigida de los microorganismos.

Mediante la transformación genética es posible aislar y clonar genes, modificarlos in vitro, e introducirlos en células de especies homólogas o heterólogas. De esa manera se pueden generar mutantes, alterar el número de copias de un gen, o proveer al organismo de nuevas capacidades metabólicas.

En el caso de hongos filamentosos, las metodologías de transformación desarrolladas durante la década pasada han permitido el mapeo genético, el estudio de los mecanismos de regulación genética, y la expresión de genes para la producción

comercial de metabolitos (Timberlake y Marshall, 1989).

En la presente monografía se establecen los principios básicos de la transformación genética de *Aspergillus*, y se resumen algunos ejemplos de aplicación en biotecnología.

2. EL GENERO *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece a la Subdivisión Deuteromycotina (Fungi imperfecti) de hongos verdaderos (División Eumycota). Los deuteromycetes se caracterizan por la ausencia de un estado sexual en su ciclo de vida.

Aspergillus se caracteriza morfológicamente por la presencia de un conidióforo denominado aspergilo, que consta de una hifa conidiogénica constituida por un "pie" y un estípote vesiculado en la parte superior. Alrededor de la vesícula se distribuyen una o dos capas de células especializadas que se forman de manera sincrónica, y una capa de esporas asexuales uninucleadas denominadas conidios. En la figura 1 se presenta un esquema del conidióforo de *Aspergillus*.

Algunas especies de *Aspergillus* tienen un estado asexual (anamórfico) y uno sexual o perfecto (teleomórfico). Los estados perfectos de *Aspergillus* se distribuyen en diez géneros (definidos por la estructura del ascocarpo) de la División Ascomycotina (Webster, 1981; Samson, 1992).

Dentro de los géneros teleomórficos de *Aspergillus*, algunos son homotáticos (*Emericella nidulans*, *Eurotium sp*) y otros heterotáticos (*Emericella heterotatica*) (Webster, 1981).

2.1. ESPECIES DE IMPORTANCIA ECONOMICA

Se conoce un gran número de especies de *Aspergillus*. Las de mayor importancia económica son:

- *A. niger*. Productora del 95% de las enzimas fúngicas comerciales, así como de ácidos cítrico y glucónico.

- *A. oryzae*. Productora de enzimas y utilizada en la producción de alimentos fermentados.

- *A. ficcum*. Productora de la enzima fitasa.

- *A. flavus* y *A. parasiticus*. Productores de toxinas carcinogénicas y contaminantes de alimentos almacenados.

En ninguna de las especies mencionadas se conoce la fase sexual. La reproducción se lleva a cabo sólo por conidiosporas asexuales, aunque durante el ciclo parasexual del estado diploide puede ocurrir recombinación mitótica.

Además de la importancia económica de algunas de sus

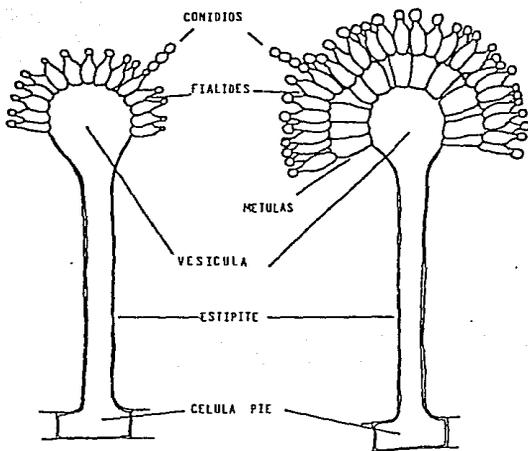


FIGURA 1.- CONIDIOFOROS REPRESENTATIVOS DE *Aspergillus*
(SAMSON, 1992).

especies, *Aspergillus* es un género filogenéticamente relacionado con *Penicillium* y *Cephalosporium*, que agrupan especies productoras de metabolitos secundarios de gran valor comercial.

La especie *A. nidulans* (teleomorfo: *Emericella nidulans*) es uno de los organismos mejor conocidos en lo que a fisiología y genética se refiere.

El ciclo de vida de *A. nidulans* es especialmente completo y facilita el análisis genético. En la figura 2 se presenta un esquema del mismo.

Además de su importancia como sistema genético (Ward, 1991), *A. nidulans* es capaz de secretar la mayor parte de las enzimas producidas por *A. niger*, aunque no en la misma cantidad, y sus vías biosintéticas de producción de pigmentos y antibióticos (incluida la de penicilina) son muy parecidas a las de las especies biológicamente relacionadas, como *P. chrysogenum* (Upshall, 1991). Por esta razón, *A. nidulans* es el modelo más utilizado en la actualidad para estudiar la regulación genética de la producción de metabolitos de importancia económica en *Aspergillus*, *Penicillium* y otros ascomycetes.

En la siguiente sección se sintetizan los aspectos de la estructura genómica de *Aspergillus* que mayor relevancia tienen para la exposición posterior sobre las metodologías de transformación.

2.2. ESTRUCTURA DEL GENOMA EN *Aspergillus nidulans*

A continuación se sintetizan los aspectos más importantes de la estructura genética de *A. nidulans* (Ward, 1991a; Ballance, 1991).

- Existe muy poco DNA repetitivo.
- No hay evidencia de mensajes policistrónicos, aunque se ha demostrado la presencia de clusters genéticos asociados a procesos tales como la esporulación.
- En lo que se refiere a la transcripción, el promotor, ubicado en general 100 p.b. hacia arriba del punto de iniciación, no presenta las secuencias consenso para las cajas CAAT y TATA, observadas en eucariontes superiores. En algunos casos, son determinantes de la funcionalidad del promotor, una región rica en pirimidinas y una secuencia semejante a la caja TATA.

No existen secuencias consenso para el inicio de transcripción.

Se desconocen las secuencias de terminación de transcripción y poliadenilación.

- La traducción se inicia en un triplete ATG, ubicado en un contexto en el que se encuentra la secuencia GC en posición +4.

Existe preferencia por la utilización de codones que terminan en pirimidinas.

- Los intrones (comunmente 1 a 3 por gen), presentes en el 70% de los genes secuenciados hasta ahora, tienen entre 48 y 250

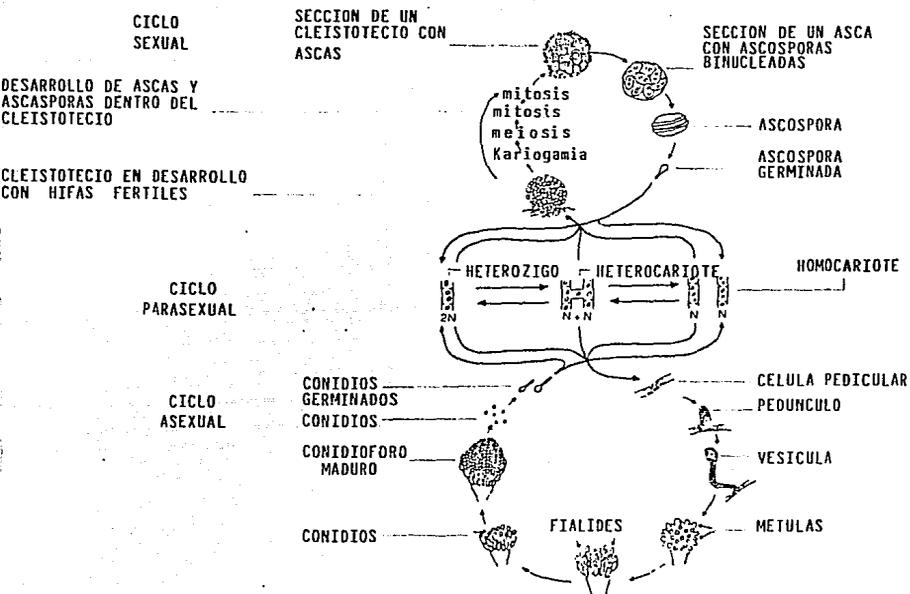


FIGURA 2.- CICLO VITAL DE *Aspergillus nidulans*
(TIMBERLAKE Y MARSHALL, 1988)

p.b., y contienen secuencias de edición 5' y 3' muy conservadas, y semejantes a las de *S. cerevisiae*.

3. METODOLOGIA DE TRANSFORMACION

La transformación genética es el proceso por el cual una célula receptora captura DNA exógeno y lo incorpora por integración cromosómica, o manteniéndolo como un replicón autónomo (Singleton y Sainsbury, 1987).

La transformación requiere de células tratadas para la incorporación del DNA, y de una partícula de DNA exógena, que permita la selección de las células que lo expresan (transformantes), capaces de regeneración.

En la tabla 1 se presenta la estrategia general de transformación de *Aspergillus*.

3.1. ENTRADA DEL DNA

Los hongos filamentosos tienen una pared celular gruesa y rígida que forma una barrera para la captación de macromoléculas. Por lo tanto, la mayoría de los protocolos de transformación en hongos están basados en la utilización de protoplastos preparados bajo condiciones de estabilización osmótica (Goosen et al, 1991).

La utilidad de los protoplastos (células desprovistas de pared celular) está basada en el hecho de que son células fisiológicamente normales, que retienen todas las propiedades de las células intactas de las que fueron obtenidas (Peberdy, 1979).

3.1.1. CULTIVO Y PREPARACION DE CELULAS

Los protoplastos aislados de un cultivo de hongos filamentosos constituyen una población fisiológicamente heterogénea, por lo que el cultivo es un factor determinante en el rendimiento de los protoplastos. Tanto la edad de cultivo como el tipo celular y la naturaleza del medio utilizado, tienen un efecto claro en la composición de la pared celular y su susceptibilidad a la lisis (Peberdy, 1979).

Las esporas constituyen una fuente homogénea de protoplastos, especialmente cuando se trata de conidiosporas uninucleadas, como en el caso de *Aspergillus*.

Sin embargo, las esporas tienen una pared celular más resistente, y sólo en algunos casos se han podido obtener protoplastos competentes. En general, se considera que el micelio de las fases tempranas de crecimiento exponencial es más susceptible a la lisis que el de la fase estacionaria (Peberdy, 1979).

En *Aspergillus* se han utilizado diferentes tipos celulares para la obtención de protoplastos:

a) Conidios hinchados inmediatamente antes de germinar en cultivo líquido (Wernars et al, 1987; Cullen et al, 1987).

TABLA 1. ESTRATEGIA GENERAL DE TRANSFORMACION EN Aspergillus

<u>ETAPA</u>	<u>PROCEDIMIENTO</u>
CULTIVO DE LA CEPA RECEPTORA	- 18 a 40 horas en medio líquido o celofán
OBTENCION DE MATERIAL CELULAR	- Filtración o centrifugación - Lavado y suspensión en buffer-solución estabilizadora (BSE) a pH 6-8
DIGESTION DE LA PARED CELULAR	- 1 a 5 horas de incubación con enzimas líticas en BSE a 27-30 C
VERIFICACION MICROSCOPICA DE FORMACION DE PROTOPLASTOS	
SEPARACION Y SUSPENSION DE PROTOPLASTOS	- Centrifugación o filtración y lavado con BSE
INCUBACION 1	- Adición de DNA, CaCl y PEG en BSE - Incubación 15 a 25 minutos en hielo o a temperatura ambiente
INCUBACION 2	- Adición de PEG a mayor concentración
REGENERACION Y SELECCION	- Centrifugación (opcional) - Plaqueo en medio selectivo, agar 0.2-2.0 % - Incubación por 2 a 3 días a 36-37 C

b) Conidios hinchados o recién germinados en cultivo líquido (Oakley et al, 1987).

c) Hifas de un cultivo líquido joven de 18 a 40 horas (Tilburn et al, 1983; John y Peberdy, 1984; Yelton et al, 1984; Mohr y Esser, 1990).

d) Hifas de un cultivo en celofán de 12 a 15 horas de edad (Ballance et al, 1983a).

Los medios base de un cultivo líquido comunmente utilizados para estudios genéticos de *Aspergillus* son el medio mínimo (MM) de Pontecorvo, y el medio completo (CM) de Kafer (Klich, 1992). Ambos medios se describen en el cuadro 1. Se han utilizado también medios más generales con extracto de levadura y glucosa (Cullen et al, 1987).

Para la producción de micelio, el cultivo se establece con una suspensión de conidiosporas (10^8 - 10^9 /ml), y se incuba de 25 a 37 °C, con agitación de 100 a 200 rpm (Tilburn et al, 1983; John y Peberdy, 1984; Yelton et al, 1984; Buxton et al, 1985; Mohr y Esser, 1990).

Los conidios o el micelio obtenidos se recuperan por filtración y se lavan centrifugando y resuspendiendo en soluciones osmoestabilizantes.

3.1.2. FORMACION DE PROTOPLASTOS

- SOLUCIONES DE ESTABILIZACION OSMOTICA

Los protoplastos son células osmoticamente sensibles que deben ser estabilizadas con soluciones de concentración conocida durante su preparación y manejo.

En general, se han utilizado azúcares, alcoholes polihídricos y sales inorgánicas en las soluciones estabilizadoras, siendo estas últimas las más efectivas en la preparación de protoplastos de hongos filamentosos (Peberdy, 1979; Goosen et al, 1991).

Las soluciones osmoestabilizadoras más utilizadas en la formación de protoplastos de *Aspergillus* contienen de 0.6 a 1.2 M de KCl (Ballance et al, 1983; Woloshuk et al, 1989; Oakley et al, 1987; Ballance y Turner, 1983), 0.5 a 1.3 M de sorbitol (Wernars et al, 1987; Mohr y Esser, 1990) y $MgSO_4$ 1.2 M (Yelton et al, 1984; Tilburn et al, 1983).

Peberdy (1979) y Goosen et al (1991) sugieren la utilización de $MgSO_4$ entre 0.6 y 1.2 M, debido a la observación de que se obtiene mayor fragmentación del micelio y formación de vacuolas, lo que ocasiona que los protoplastos floten y se facilite su separación.

- ENZIMAS HIDROLITICAS

La lisis de la pared celular se lleva a cabo con enzimas o mezclas de enzimas hidrolíticas en un buffer que contiene la

CUADRO 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA Aspergillus (Kilch, 1992)

MEDIO COMPLETO (CM)	MEDIO MINIMO (MM)	NaNO ₃ -----	6 g
		KCl -----	0.52 g
		MgSO ₄ · 7H ₂ O -----	0.52 g
		KH ₂ PO ₄ -----	1.52 g
		FeSO ₄ -----	TRAZAS
		ZnSO ₄ -----	
		CuSO ₄ -----	
		GLUCOSA -----	10 g
		AGAR -----	15 g
		AGUA DESTILADA -----	1 l
		HIDROLIZADO DE CASEINA -----	1.5 g
		PEPTONA -----	2 g
		EXTRACTO DE LEVADURA -----	0.5 g
		ADENINA -----	200 mg
		BIOTINA -----	2 ug
		ACIDO P-AMINOBENZOICO -----	100 ug
		PIRIDOXINA -----	500 ug
		ANEURINA -----	500 ug
NICOTINAMIDA -----	1000 ug		
RIBOFLAVINA -----	1000 ug		

Ajustar el pH a 6.5 antes de esterilizar a 121°C por 15 min.

solución de estabilización osmótica a un pH de entre 6 y 8.

La preparación enzimática más utilizada es Novozym-234, extraída de *Trichoderma harzianum*, de Novo industri (Turner y Ballance, 1985). Aunque en muchos casos dicha enzima se emplea en combinación con helicasa (Tilburn et al, 1983), β -glucuronidasa (Yelton et al, 1984; Woloshuk et al, 1989) celulasa (John y Peberdy, 1984), y driselasa (Oakley et al, 1987).

Se han utilizado también otras preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de cultivos de *Trichoderma harzianum*, con paredes celulares como sustrato (Wernars et al, 1987).

Kitamoto et al (1988) reportaron que, utilizando una preparación enzimática liofilizada de *T. harzianum*, obtuvieron una eficiencia de formación de protoplastos del doble de la obtenida con enzimas o mezclas de enzimas comerciales. La preparación enzimática, con actividad de quitinasa y β -1,3 glucanasa, se probó en 30 diferentes especies de hongos, incluidas tres de *Aspergillus*.

La incubación con enzimas se realiza a 27-30 °C durante 1 a 5 horas, y la formación de protoplastos se comprueba al microscopio (Fincham 1989).

- PURIFICACION DE PROTOPLASTOS

Una vez que se obtienen los protoplastos, se purifican por centrifugación o filtración. La decisión entre ambos métodos depende de la comprobación empírica.

Se recomienda efectuar lavados con el fin de eliminar enzimas contaminantes que puedan interferir en la transformación (DNAsas) o en la regeneración (enzimas líticas). El buffer utilizado en los lavados puede ajustarse para la etapa de transformación (Goosen et al, 1991).

Los protoplastos aislados pueden almacenarse a -80 °C antes de utilizarse (Cullen et al, 1987), pero se sugiere la adición de polietilenglicol (PEG) o dimetilsulfóxido (DMSO) para asegurar la estabilidad en congelación (Fincham, 1989).

3.1.3. CAPTACION DE DNA.

Los componentes típicos de una mezcla de transformación son: a) Una suspensión de protoplastos a concentración de 10^8 - 10^9 /ml; b) DNA a 5 μ g/ml; c) 10 a 50 mM de CaCl₂ y d) Un buffer, comunmente tris-HCl, a pH de 7.5 a 8.0 (Fincham, 1989).

El método más frecuente de transformación incluye dos períodos de incubación. En el primer período, se incuban los protoplastos en presencia del DNA, en frío o a temperatura ambiente durante 15 a 25 minutos. La mezcla contiene normalmente los componentes descritos y, en algunos casos (Ballance y Turner, 1983), una pequeña concentración de PEG.

En el segundo período de incubación (20 a 30 minutos a temperatura ambiente), se adiciona comunmente PEG como agente fusógeno (Turner y Ballance, 1985; Fincham, 1989; Goosen et al,

1991).

Tilburn et al (1983) encontraron que al incrementar la concentración de PEG de 25 a 60%, se registró un aumento notable de la frecuencia de transformación de *A. nidulans*.

La concentración de DNA parece tener un efecto crítico en la captación del mismo (Fincham, 1989). Yelton et al (1984) encontraron que la frecuencia de transformación de protoplastos de *A. nidulans* pasó de 300 transformantes/ μg DNA cuando se utilizaron 0.05 μg de DNA, a 20 cuando se usaron 10 μg de DNA. Asimismo, se encontró que la frecuencia de transformación no se modificaba por la utilización de DNA lineal.

Radford et al (1981) obtuvieron mayor eficiencia de transformación de *N. crassa* utilizando DNA encapsulado en liposomas, presumiblemente porque de esa manera se prevenía el ataque por DNAsas.

La transformación por electroporación en protoplastos de *A. nidulans* no tuvo resultados satisfactorios (Ward et al, 1988).

3.1.4. REGENERACION DE PROTOPLASTOS

Los protoplastos transformantes deben cultivarse en un medio que permita la regeneración de la pared y la proliferación celular, con el fin de facilitar la selección de las colonias.

La regeneración de protoplastos se puede ver afectada por el origen de los mismos con respecto a la organización hifal. Así, se ha observado que protoplastos originados de hifas distales no son capaces de reconstituir su pared celular (Peberdy, 1979).

La recuperación de protoplastos transformados se realiza después del segundo período de incubación. Los protoplastos pueden diluirse gradualmente con buffer (Mohr y Esser, 1990), centrifugarse y lavarse para eliminar el exceso de PEG (Tilburn et al, 1983), o incubarse durante dos horas en buffer fresco (Yelton et al, 1984). Posteriormente, la suspensión se plaquea en un medio selectivo que contiene agar (Goosen et al, 1991).

El plaqueo puede llevarse a cabo directamente en el medio selectivo de agar, o en un medio no selectivo al que después se adicióna una sobrecapa con el agente de selección (Mullaney et al, 1988). El plaqueo con sobrecapa no significó un aumento en la frecuencia de regeneración de protoplastos de *A. nidulans* al compararse con el plaqueo directo (Yelton et al, 1984).

La viabilidad de los protoplastos debe ser medida en las diferentes etapas del proceso de transformación, mediante el plaqueo de alícuotas de la suspensión en medio de regeneración (frecuentemente MM o CM suplementados), y expresándola como el porcentaje que los protoplastos viables (formadores de colonias) representan del total de protoplastos cuantificados en hematocitómetro (Dr. J. Aguirre, comunicación personal).

La frecuencia de transformación genética expresada como el No. de transformantes (t) / μg de DNA, depende no solo del

procedimiento seguido, sino del vector y el marcador de selección utilizados. Con vectores integrativos, se han registrado frecuencias de transformación de <1 hasta 7000 t/ μ g DNA.

Un porcentaje de las células que crecen en medio selectivo son transformantes "abortivas", que no se desarrollan totalmente como colonias, presumiblemente porque el DNA exógeno no tiene una integración estable, o porque se ha integrado en genes necesarios para el crecimiento prolongado, bajo las condiciones de selección utilizadas (Saunders et al, 1986).

Se recomienda entonces subcultivar las colonias transformantes hasta observar una morfología colonial estable. De esta manera, se purifican las colonias transformantes verdaderas.

Aunque no existe una correlación estricta entre la viabilidad los protoplastos y el número de transformantes obtenidas, es difícil la obtención de un número adecuado de transformantes si se tiene baja viabilidad de protoplastos. Se recomienda incluso sacrificar el número total de protoplastos obtenidos en favor de una buena viabilidad.

Un factor que tiene una notable influencia sobre la viabilidad es el tratamiento enzimático. Así, la digestión prolongada con Novozyme, reduce la viabilidad, debido a la presencia de proteasas en dicha preparación enzimática. La inclusión de albúmina en la mezcla de transformación, ayuda a reducir el problema.

Actualmente, existen preparaciones enzimáticas de *Trichoderma*, libres de proteasas, las cuales pueden utilizarse con mayor eficiencia para la digestión de paredes celulares (Dr. J. Aguirre, comunicación personal).

3.1.5. INTEGRACION DE PROTOCOLOS DE TRANSFORMACION

Se han empleado diferentes métodos de transformación genética de *Aspergillus*. En la tabla 2 se presentan seis de los más representativos.

3.2. MARCADORES DE SELECCION

Uno de los requisitos fundamentales para la transformación genética, es la presencia de un gen en el DNA transformante, que pueda actuar como marcador de selección en la célula fungal hospedera. Fue la ausencia de marcadores de selección adecuados lo que causó el retraso en el desarrollo de métodos de transformación en *Aspergillus* (Ward, 1991a).

Los marcadores genéticos utilizados en la selección de transformantes de *Aspergillus* se presentan en las tablas 3 y 4.

Para fines de este estudio, los marcadores de selección se dividirán en dos tipos: auxotróficos y dominantes.

TABLA 2.- COMPARACION DE METODOLOGIAS DE TRANSFORMACION EN Aspergillus

REFERENCIA	Tilburn, et al., 1983.	Yelton, et al., 1984.	Mohr y Esser, 1990.
ESPECIE	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i> .	<i>A. niger</i> .
MEDIO DE CULTIVO	- MM	- MM	- Medio Luria-Bertani.
INOCULO	5 x 10 ⁶ conidios/ml 18 horas a 25°C-100 rpm.	2 x 10 ⁶ conidios/ml. 18 horas, temperatura ambiente.	1 x 10 ⁶ conidios/ml. 20-40 horas a 27°C, 200 rpm.
OBTENCION DE CELULAS	Micelio filtrado.	- Micelio filtrado.	- Micelio filtrado.
SOLUCION ESTABILIZANTE	1.2 M MgSO ₄ , buffer fosfatos 10 mM pH, 5.8.	- 1.2 M MgSO ₄ , 10 mM Na ₃ PO ₄ pH, 5.8.	- 0.6 M KCl
DIGESTION DE PARED CELULAR	- Para 1 g de micelio húmedo, en 5 ml de buffer. 1 ml de Novozym 234, 10-20 mg/ml. 0.1 ml de helicasa. 3 mg de BSA. - 90 minutos a 30°C, 100 rpm. - Adición de un volumen de sorbitol, 600 mM, tris-HCl 100 mM, pH, 7.0. - Centrifugación y resuspensión en sorbitol 1M, 10 mM CaCl ₂ , 10 mM tris a pH, 7.5.	- Para 1 g de micelio húmedo, en 5 ml de buffer. 1 ml de Novozym 234-20 mg/ml. 5 minutos en hielo. 0.5 ml de BSA 12 mg/ml. - 90 minutos a 30°C, 80 rpm. - Centrifugación y resuspensión en 1.2 M de sorbitol; 10 mM CaCl ₂ ; tris-HCl 10 mM pH, 7.5.	- Novozym 234 (5 mg/ml) - 60 a 90 minutos a 27°C y 200 rpm. - Filtración, lavado y resuspensión en 1 M sorbitol, 50 mM CaCl ₂ .
1A. INCUBACION	- Suspensión: 400 ul - DNA (en buffer): 100 ul - Temperatura ambiente por 30 minutos.	- Suspensión: 100 ul - DNA (en buffer): 25 ul - Temperatura ambiente por 25 minutos.	- Suspensión: 200 ul - DNA (en agua): 10 ul - Solución (50 ul): PEG 6000 25%; 50 mM CaCl ₂ ; 10 mM tris-HCl, pH, 7.5. - En hielo por 20 minutos.
2A. INCUBACION	- Adición de 10 volúmenes de solución: PEG 4000 60%; CaCl ₂ ; 10 mM tris HCl. - Temperatura ambiente por 20 minutos. - Lavado con buffer.	- Adición de 200 ul de: PEG 4000, 60%; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM tris,-HCl, pH 7.5, en agitación. + 200 ul de solución-agitación. + 800 ul de solución-agitación. - 20 min. a temperatura ambiente. - Centrifugación y resuspensión en 1.2 M de sorbitol + Ext. levadura + glucosa.	- Adición de 2 ml de solución PEG y 4 ml de solución de sorbitol a intervalos de 5 minutos.
REGENERACION	- Plaqueo en MM con 0.25% de Agar.	- Plaqueo en MM + Agar 1.5%.	- Plaqueo en MM-Agar 1.3%
FRECUENCIA DE TRANSFORMACION	25 /ug DNA	- 300 /ug DNA	- 17,000 /ug DNA

TABLA 2.- COMPARACION DE METODOLOGIAS DE TRANSFORMACION EN Aspergillus

REFERENCIA	Oakley, et al., 1987.	Woloshuk, et al., 1989.	Ballance, et al., 1983.
ESPECIE	<i>A. nidulans</i>	<i>A. flavus</i> .	<i>A. nidulans</i> .
MEDIO DE CULTIVO	- CM	- Caldo papa-dextrosa.	- CM en celofán, 12 a 15 horas.
INOCULO	5 x 10 ⁶ conidios/ml	10 ⁷ conidios, 12 a 18 horas en agitación.	
OBTENCION DE CELULAS	Conidios hinchados, recuperados por centrifugación en YG.	- Micelio filtrado.	- Micelio
SOLUCION ESTABILIZANTE	1.1 MKCl; 0.1 M Ac. cítrico y pH 5.8	- 7% Na Cl, 20 mM CaCl ₂ 10 mM NaPO ₄ ; pH, 5.8.	- 0.6 M KCl
DIGESTION DE PARED CELULAR	- Driselasa: Novozym 234 (4 mg/ml) Beta-Glucuronidasa (20 ul/ml) En 20 mg/ul BSA. - 5 horas a 30°C. - Lavado y resuspensión de 5 x 10 ⁷ Protoplastos en 100 ul.	- Para 1 g de micelio húmedo: Novozym 234 (5 mg/ml) Beta-Glucuronidasa 1200 u/ml - 3 horas a 30°C. - Lavado y resuspensión de 10 ⁷ Protoplastos/ml.	- Novozym 234 5 mg/ml - 980 minutos a 30°C. - Lavado y resuspensión
1A. INCUBACION	- Suspensión: 100 ul - DNA (en buffer): 15 ul - Solución (50 ul): 0.6 MKCl; 0.05 M CaCl ₂ , 25% PEG; 10 Mm TRIS; Ph: 7.5. - En hielo por 25 minutos.	- Suspensión: 100 ul - DNA (en buffer): 15 ul - Solución (50 ul): 50 mM CaCl ₂ ; 0.6 M KCl; 10 mM tris, 25% PEG 8000; pH, 7.5. En hielo por 25 minutos. - En hielo por 15 minutos.	- Suspensión: 100 ul - DNA (en KCl, 0.6 M): 15-20 ul - Solución (50 ul): 50 mM CaCl ₂ ; 10 mM tris-HCl; 25% PEG 6000; pH, 7.5. - En hielo por 20-30 minutos.
2A. INCUBACION	- Adición de 1 ml de solución PEG 25%. - Temperatura ambiente por 30 minutos. - Lavado y centrifugación.	- Adición de 1 ml de la solución anterior, con PEG al 50%. - Temperatura ambiente por 30 minutos. - Lavado y centrifugación.	- Adición de 2.5 ml de la solución anterior. - Temperatura ambiente por 15 minutos. - Lavado y centrifugación.
REGENERACION	- YGA + 0.6 MKCl. - 36°C.	- MM + 0.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ + Agar. - 36°C.	- MM + 0.6 M KCl + Agar. - 37°C.
FRECUENCIA DE TRANSFORMACION	- 1985 t/ug DNA	- 20 t/ug DNA	- 10-15 t/ug DNA

TABLA 3.- MARCADORES AUXOTROFICOS DE SELECCION UTILIZADOS EN LA TRANSFORMACION DE Aspergillus spp.

MARCADOR	CLONADO POR	ORIGEN	FUNCION	METODO DE SELECCION	ESPECIES TRANSFORMADAS	REFERENCIA
Pyr G	Buxton y Radford (1983)	<u>N. crassa</u>	Orotidina-5' Fosfato decarboxilasa (síntesis pirimidinas)	Prototrofia a Uridina	<u>A. awamori</u> <u>A. flavus</u> <u>A. nidulans</u>	Cullen-Leong, 1986. Woloshuk, et al., 1989. Ballance, et al., 1983.
Pyr G	Oakley, et al. (1987)	<u>A. nidulans</u>	Orotidina-5' Fosfato decarboxilasa (síntesis pirimidinas)	Prototrofia a Uridina	<u>A. nidulans</u> <u>A. oryzae</u>	Oakuy, et al., 1987. Mattem, et al., 1987.
Pyr G	Hartingsveldt, et al. (1987)	<u>A. niger</u>	Orotidina-5' Fosfato decarboxilasa (síntesis pirimidinas)	Prototrofia a Uridina	<u>A. niger</u>	Hartingsveldt, et al., 1987. Goosen, et al., 1987.
arg B	Børse, et al. (1983)	<u>A. nidulans</u>	Omitín-Carbamil Transferasa (síntesis arginina)	Prototrofia a arginina	<u>A. nidulans</u> <u>A. niger</u> <u>A. oryzae</u>	John y Pabardy, 1984. Buxton, et al., 1985. Gomi, et al., 1987.
Irp C	Yelton, et al. (1983)	<u>A. nidulans</u>	Enzima trifuncional de biosíntesis de triptofano.	Prototrofia a triptofano	<u>A. nidulans</u>	Yelton, et al., 1984.
Irp C	Kos, et al. (1985)	<u>A. niger</u>	Enzima trifuncional de biosíntesis de triptofano.	Prototrofia a triptofano	<u>A. niger</u>	Goosen, et al., 1989.
met	*Limura, et al. (1987)	<u>A. oryzae</u>	Desconocida	Prototrofia a metionina	<u>A. niger</u>	Limura, et al., 1987.

* Creado por Grayne y Deuchand, 1982.

TABLA 4.- MARCADORES DOMINANTES DE SELECCION UTILIZADOS EN LA TRANSFORMACION DE Aspergillus spp.

MARCADOR	CLONADO POR	ORIGEN	FUNCION	METODO DE SELECCION	ESPECIES TRANSFORMADAS	REFERENCIA
amd S	Hynes, et al. (1983)	<u>N. nidulans</u>	Acetamidasa	Utilización de Acetamida o Acrilamida	<u>A. nidulans</u> <u>A. niger</u> <u>A. ficum</u>	Tilburn, et al., 1983. Cullen, et al., 1987 b. Mohr, et al., 1989. Mullaney, et al., 1989.
Olc	Ward, et al. (1986)	<u>A. nidulans</u>	Subunidad 9 de la ATP-Sintetasa Mitocondrial	Resistencia a Oligomicina	<u>A. nidulans</u> <u>A. niger</u>	Ward, et al., 1986. Ward, et al., 1988. Kelly y Hynes, 1985.
Olc	Ward, et al. (1988)	<u>A. niger</u>	Subunidad 9 de la ATP-Sintetasa Mitocondrial	Resistencia a Oligomicina	<u>A. niger</u>	Ward, et al., 1988.
ben A	Orbach, et al. (1986)	<u>A. crassa</u>	Beta-tubulina	Resistencia a benomyl.	<u>A. nidulans</u> <u>A. niger</u> <u>A. flavus</u>	Orbach, et al., 1986. Finkelstein, et al., 1989. Seip, et al., 1990.
ben A	Seip, et al. (1990)	<u>A. flavus</u>	Beta-tubulina	Resistencia a benomy.	<u>A. flavus</u>	Seip, et al., 1990.
ble R	-	Tn 5	Proteína inactivadora de Bleomicina y Fleomicina.	Resistencia Bleomicina y Fleomicina	<u>A. nidulans</u> <u>A. niger</u>	Goosen, et al., 1989. Mahern, et al., 1987.
hph.	-	<u>E. coli</u>	Higromicina Fosfotransferasa.	Resistencia higromicina.	<u>A. nidulans</u> <u>A. niger</u>	Finkelstein, et al., 1989. Punt, et al., 1987.
G 418	-	Tn 903	Genetica Fosfotransferasa.	Resistencia a G 418.	<u>A. niger</u>	Goosen, et al., 1991.

3.2.1. MARCADORES AUXOTROFICOS.

Los marcadores genéticos auxotróficos, son aquellos genes capaces de complementar una mutación auxotrófica en la célula receptora, restituyendo la prototrofia.

Los genes auxotróficos de *Aspergillus* fueron los primeros genes clonados. La estrategia general de clonación se describe a continuación (Buxton y Radford, 1983; Ward, 1991a):

- Se crea un banco genético utilizando DNA de *Aspergillus*.
- El DNA genómico se corta con endonucleasas de restricción y se liga a un vector apropiado, por ejemplo un plásmido.
- El banco genético se utiliza para transformar cepas de *E. coli* o *Saccharomyces*, que tengan una mutación auxotrófica bien definida.
- Se seleccionan las colonias cuyas mutaciones se hayan complementado (transformantes).
- El DNA del vector de las transformantes se reaisla, pues se espera que contenga la secuencia de DNA que codifica para la enzima para la cual la cepa original de *E. coli* o *Saccharomyces* es deficiente.
- Por análisis de restricción de los diferentes vectores aislados se puede hallar una región exógena constante que contiene el gen buscado. Dicha región podrá hibridizarse con DNA genómico total del hongo, para verificar su origen.
- El fragmento que contiene el gen puede incorporarse a un vector para transformar mutantes auxotrofos de hongos y restituir la prototrofia.

3.2.2. MARCADORES DOMINANTES

Los marcadores de selección dominantes no requieren de una mutación específica de la cepa receptora. Confieren resistencia a antibióticos (benomyl, oligomicina, etc.), o permiten la utilización de acetamida como fuente de nitrógeno (Goosen et al, 1991).

Los marcadores dominantes de selección son de tipos y orígenes diversos.

El gen estructural *amdS*, proveniente de *A. nidulans*, es un marcador nutricional que codifica para la acetamidasa, y que puede usarse para transformar una cepa incapaz de utilizar acetamida, pero normalmente se utiliza para transformar cepas silvestres, confiriéndoles una mayor tasa de crecimiento en dicho sustrato (Tilburn et al, 1983; Hynes, 1986).

Un segundo tipo de marcadores dominantes son genes nucleares mutantes de *Neurospora crassa* (*ben^r*) y *A. nidulans* (*olic^r*). Ambos son semidominantes, pues confieren resistencia débil o absoluta a antibióticos, dependiendo de si se establece heterozigosis o se lleva a cabo un remplazo de genes, respectivamente (Orbach et al, 1986 y Ward et al, 1986).

El tercer tipo comprende marcadores de origen procariótico, que confieren resistencia a altas concentraciones de antibióticos, tales como higromicina B o bleomicina. Debido al origen de dichos genes, su expresión sólo ha sido posible cuando se fusionan a señales de expresión fúngicas (Punt et al, 1987).

3.2.3. FUSION Y SELECCION VISUAL

Una de las herramientas que permiten la selección de transformantes de *Aspergillus*, es la desarrollada por van Gorcom et al (1985), que consiste en la fusión de la porción codificadora del gen LacZ de *E. coli*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, a las señales de inicio de transcripción y traducción del gen trpC de *A. nidulans*. La expresión del gen fusionado puede ser detectada *in vivo* por la formación de colonias azules en medio mínimo que contiene al sustrato cromogénico X-gal.

Dicho estudio constituyó la base para el desarrollo de marcadores dominantes de selección de naturaleza híbrida (hph y bleR), demostrando la expresión de genes procarióticos en *Aspergillus* (Goosen et al, 1991).

3.2.4. SELECCION DOBLE

Un desarrollo reciente es la transformación con genes que tienen un fenotipo seleccionable tanto para el alelo silvestre como para el mutante. Se utilizan dos sistemas:

a) El alelo silvestre pyr+ permite el crecimiento en ausencia de uridina, mientras que el pyr- confiere resistencia al ácido S-fluoroorótico (Goosen et al, 1991).

b) El alelo amdS+ permite la utilización de acetamida, y el amdS- confiere resistencia a fluoroacetamida (Debets et al, 1990).

Los sistemas de selección doble permiten la introducción sucesiva de genes mediante transformación con marcadores alternados, facilitando las técnicas de remplazo genético (Goosen et al, 1991).

3.2.5. CRITERIOS DE UTILIZACION DE MARCADORES

La decisión sobre cuál marcador de selección debe utilizarse, depende del tipo de estudio que se realice y de factores como precio y disponibilidad de los compuestos requeridos.

Los marcadores dominantes de selección permiten utilizar cepas receptoras silvestres. Los marcadores auxotróficos requieren de mutantes, difíciles de construir y que pueden tener asociados cambios genéticos indeseables en organismos de importancia industrial (Ward, 1991a).

Debido al elevado costo del benomyl, la oligomicina y otros antibióticos, los marcadores que confieren resistencia tienen un

uso restringido, en comparación con el marcador amdS, o los marcadores auxotróficos.

La utilización de amdS como marcador conlleva cierta interferencia (background) en la selección, pues las mutantes amdS- no transformadas pueden regenerar protoplastos en un medio que contenga acetamida en baja concentración (por amidásas no específicas) o impurezas del agar que generen fuentes alternativas de nitrógeno. La adición de CsCl reduce considerablemente dichas interferencias (Tilburn et al, 1983).

Asimismo, se prefiere la utilización de marcadores homólogos, los cuales permiten mayor frecuencia de transformación, e integración cromosómica dirigida (Hartingsveldt et al, 1987 y Woloshuk et al, 1989).

3.3. VECTORES

Los vectores utilizados en la transformación de *Aspergillus* son plásmidos y cósmidos. Ambos tipos de vectores se integran al genoma.

3.3.1. PLASMIDOS

No se han encontrado plásmidos nativos en *Aspergillus*. Los plásmidos empleados derivan en su mayoría de las series pBR322 a 329, y de la serie pUC (Cullen et al, 1988).

En una primera etapa, las construcciones contenían un origen de replicación y un marcador de selección para *E. coli*, normalmente proveniente de plásmidos pBR322 ó pBR323, además de un marcador de selección que se expresara en *Aspergillus nidulans*, tal como pyr4 de *N. Crassa*, o argB y amdS de *A. nidulans* (Ward, 1991). Un esquema simplificado del vector p3SR2 (Tilburn et al, 1983) se presenta en la figura 3.

Las eficiencias obtenidas con esos primeros vectores eran de entre 5 y 50 t/ μ g de DNA (Ballance et al, 1983; Tilburn et al, 1983; Yelton et al, 1984 y John y Peberdy, 1984).

Recientemente, Gems et al (1991) reportaron la utilización de un vector recombinante de replicación autónoma para la transformación de *Aspergillus*. El plásmido pARp1 consiste del plásmido pILJ16 (derivado de pUC8), y contiene el marcador argB de *A. nidulans* y la secuencia AMA1, de 6.1 kb, del mismo origen, responsable de la autoreplicación.

pARp1 fue aislado de transformantes inestables de *A. nidulans* y permite una frecuencia de transformación de 20 000 t/10⁸ protoplastos, 250 veces mayor a la obtenida con pILJ16 en *A. nidulans* y 30 veces mayor en *A. oryzae* y *A. niger*. El plásmido tiene una estabilidad mitótica de entre 35 y 53%, y puede ser transmitido a través del ciclo sexual.

Todo parece indicar que la secuencia AMA1 de pARp1 contiene un origen de replicación de *A. nidulans*, junto con otros elementos estructurales que permiten su autonomía.

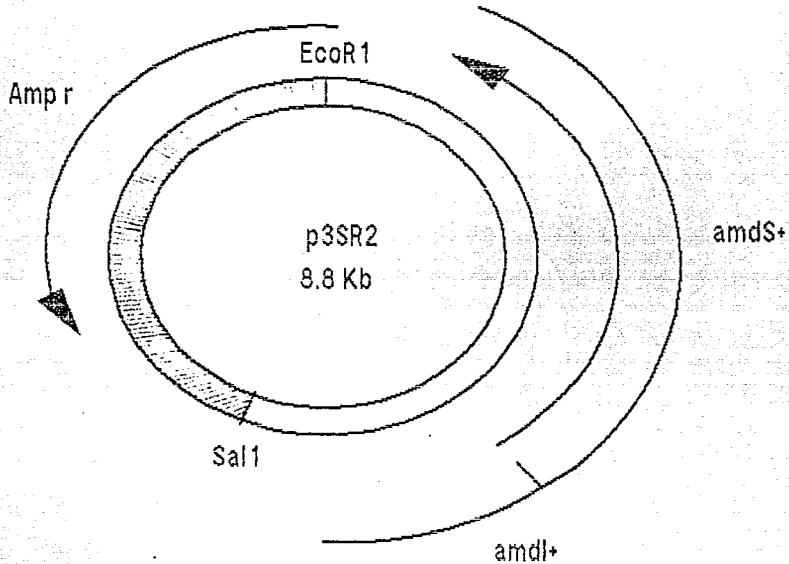


FIGURA 3. ESQUEMA DEL PLASMIDO p3SR2 (Tilburn et al, 1983)

amdS+ = gen estructural de acetamidasa

amdI+ = región de control transcripcional de amdS

▭ = secuencias de pBR322

▨ = secuencias de Aspergillus nidulans

Los ejemplos de plásmidos contruidos para la expresión de proteínas heterólogas en *Aspergillus*, se describen en la sección de aplicaciones (capítulo 4).

En una primera etapa se utilizaron genes de complementación de mutaciones auxotróficas, que pudieron ser identificados por transformación de *E. coli* o *Saccharomyces*. Dichos genes marcadores fueron clonados y utilizados en la transformación de hongos filamentosos.

Sin embargo, el procedimiento de clonación descrito (sección 3.2.1.) no es aplicable para el aislamiento de genes de *Aspergillus* que no puedan expresarse en otros géneros o especies. Por esa razón, se buscaron modificaciones técnicas que permitieran que genes de *Aspergillus* pudieran ser clonados por complementación de mutaciones en especies del mismo género, es decir, por autoclonación (ver sección 3.8.) (Goosen et al, 1991).

La autoclonación requiere de una frecuencia de transformación suficientemente elevada para que un banco genético pueda ser analizado utilizando cantidades razonables de DNA y protoplastos (Ward, 1991a).

3.3.2. COSMIDOS

Una aproximación para incrementar la frecuencia de transformación, consiste en incrementar el tamaño de los fragmentos de DNA clonados en el banco genético (genoteca). De esta manera, menos moléculas de DNA, y por lo tanto menor número de transformantes, necesitan ser analizadas para identificar el gen deseado.

Yelton et al (1985) construyeron el cósmido pKBY2. Dicho vector contiene un sitio cos del fago λ , que permite el ensamblaje *in vitro* de las partículas virales; un origen bacteriano de replicación y genes de resistencia para ampicilina y cloramfenicol derivados de pBR322, que permiten su propagación en *E. coli*; el gen *trpC* como marcador de selección de *A. nidulans*; y un único sitio de restricción BamHI, que permite la inserción de fragmentos producidos por digestión con BamHI, BglII, MboI ó Sau3A.

Este cósmido permitió la construcción de la genoteca de una cepa silvestre de *A. nidulans*, incorporando fragmentos de 35 a 40 Kb, 4 a 8 veces mayores a los clonados en plásmidos. Esto implica que existe una probabilidad de 0.98 de seleccionar una secuencia particular analizando 3000 clonas.

A pesar de una baja frecuencia de transformación (10 t/ μ g DNA), se pudo complementar la mutación *ya2* (esporas amarillas), para dar transformantes de fenotipo silvestre, y reasilar el cósmido con la copia de gen silvestre. Aproximadamente 3 de cada 1000 transformantes *trpC+* tenían esporas de color verde. Los cósmidos recuperados tuvieron patrones de restricción similares, y permitieron transformar cepas *trpC-* *ya-* para dar 85 transformantes con fenotipo *trpC+* *ya+* por cada 100 *trpC+*.

La ventaja principal de utilizar cósmidos radica en la construcción de genotecas más representativas del genoma de *Aspergillus*, que faciliten los estudios de transformación, complementación y aislamiento de genes.

3.4. SECUENCIAS IMPORTANTES PARA LA EXPRESION GENETICA

En *S. cerevisiae*, la eficiencia de transformación se incrementa con la utilización de vectores de replicación autónoma. Lo anterior ha llevado a la búsqueda, hasta el momento infructuosa, de plásmidos nativos de *Aspergillus* equivalentes al 2µm de *Saccharomyces* (Ballance, 1991; Ward, 1991a).

Otra aproximación para incrementar la frecuencia de transformación, consiste en el aumento de homología entre el vector y el genoma. Para ello, se incorporaron en plásmidos, fragmentos de cromosoma originados de genes repetitivos de rRNA y mtRNA (Tilburn y Scazzochio, 1983), que no mostraron efecto alguno en la frecuencia de transformación.

La investigación posterior ha buscado orígenes de replicación de *Aspergillus* (AMA1 de pARp1), o fragmentos cromosómicos nucleares o mitocondriales que presenten actividad autoreplicativa en *Saccharomyces*. Asimismo, se han incorporado en los vectores promotores y señales de secreción que permiten la modulación de la expresión de genes estructurales.

Recientemente, el grupo del Dr. Timberlake en la Universidad de Georgia, logró la clonación de un centrómero de *A. nidulans*, lo cual promete generar vectores autoreplicativos más eficientes (Dr. J. Aguirre, comunicación personal).

3.4.2. SECUENCIAS MITOCONDRIALES

Debido a que los orígenes de replicación mitocondriales de *Saccharomyces* y *Neurospora* funcionan como secuencias de replicación autónoma en vectores de levadura (Samac y Leong, 1989), Tiburn et al (1983) utilizaron secuencias mitocondriales de *A. nidulans*, incluidas en un plásmido que contenía *amdS* como marcador. Sin embargo, no se observó incremento en la frecuencia de transformación, ni evidencia de replicación autónoma.

Turner y Ballance (1985) reportaron un ligero incremento en la frecuencia de transformación en *A. nidulans*, utilizando una región de mtDNA de la misma especie, que guarda homología con la región 1 de mtDNA de *A. amstelodami*, ambas con actividad autoreplicativa en levadura.

3.4.3. LAS SECUENCIAS ANS1 y UNT

Ballance y Turner (1985), utilizando el hecho de que el gen *pyr4* es capaz de expresarse en *Saccharomyces*, utilizaron un genoteca de *A. nidulans* para transformar levadura con el plásmido

pFB6, que contiene a pyr4 como marcador de selección.

Alrededor de 100 levaduras transformantes, que presentaban inestabilidad mitótica fueron purificadas, y los plásmidos recuperados en *E. coli*. Dichos plásmidos se utilizaron para transformar una cepa pyrG- de *A. nidulans* a prototrofia con respecto a uridina. Uno de los plásmidos, pFB6-An2, mejoró la frecuencia de transformación en aproximadamente dos ordenes de magnitud (3000 a 5000 transformantes/ μ g DNA), y bajó de 90 a 5% el número de transformantes abortivas.

A partir de ese plásmido, se aisló la secuencia ans1, como un fragmento de 3.5 Kb, que muestra homología múltiple con diferentes regiones del genoma.

La incorporación de ans1 en otros vectores con diferentes marcadores de selección, ha generado mayor frecuencia de transformación, lo cual indica un efecto intrínseco de la secuencia, independiente de la posición o del marcador utilizado (Ballance y Turner, 1985 y Hynes, 1988). Ningún plásmido que incluya ans1 ha mostrado claramente replicación autónoma en *Aspergillus* (Fincham, 1989).

Se ha propuesto un esquema (Ballance y Turner, 1985) que sugiere que ans1 sufre varios ciclos de replicación antes de la integración al cromosoma, lo cual explicaría el incremento en la frecuencia de transformación.

Otra secuencia, denominada unt₃, aislada mediante la misma estrategia, incrementó hasta 10⁴ la frecuencia de t/ μ g DNA (Hynes, 1988), aunque las transformantes presentaron baja estabilidad mitótica (Esser y Mohr, 1986).

La inclusión de ans1 en el plásmido pDJB3 permitió una frecuencia de transformación en *A. nidulans* de 5×10^4 / μ g DNA, permitiendo la complementación de la mutación AcuD- y el aislamiento por autoclonación del gen que codifica para la enzima isocitrato liasa (Ballance y Turner, 1986).

3.4.4. REGIONES DE REGULACION TRANSCRIPCIONAL

Además de las secuencias utilizadas como marcadores de selección, es importante incorporar en los vectores de transformación, regiones reguladoras de la transcripción (Gwynne y Devchand, 1992).

Las regiones de regulación transcripcional incluyen las secuencias asociadas al promotor (CAAT y TATA), ubicadas dentro de los 100 p.b. hacia arriba del inicio de transcripción, y las descritas como "enhancers", ubicadas en esa misma región. Dichas secuencias constituyen sitios de reconocimiento de la RNA polimerasa II, y de factores protéicos necesarios para la iniciación de la transcripción.

Otra región importante incluye las secuencias de terminación de transcripción, sitio de reconocimiento de nucleasas que generan un nuevo extremo 3' del mRNA, que a su vez permite la acción de la poliiA-polimerasa, enzima que adiciona al nuevo extremo 3' una

secuencia de poliadenina (100 p.b. aprox.), necesaria para el paso del mRNA del núcleo al citoplasma. La secuencia poliA funciona también como protector contra el ataque enzimático durante el proceso de traducción (Lewin, 1990; Ballance, 1991; Gwynne y Devchand, 1992).

Los promotores de transcripción que se han utilizado para la expresión en *Aspergillus* incluyen los de tipo constitutivo, como el de *gpd* (gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa), y los inducibles, tales como el *alcA* (alcohol deshidrogenasa I), y *gla* (glucoamilasa). En la tabla 5 se presentan las regiones de regulación transcripcional utilizadas para dirigir la expresión genética en *Aspergillus*.

Utilizando promotores inducibles, la expresión del gen deseado puede ser modulada, dependiendo de la fuente de carbono que se utilice en el cultivo (Upshall et al, 1991).

Para evaluar el efecto de diferentes promotores de transcripción en la expresión genética de β -galactosidasa, van Gorcom et al (1986) construyeron un vector con un único sitio de clonación (BamHI), situado en fase con el gen estructural *LacZ* de *E. coli*. El plásmido, con un marcador *argB*, permitió la inserción de las regiones reguladores de los genes *trpC* y *gpd*, fusionados a *LacZ*.

En aproximadamente el 10% de las transformantes de *A. nidulans*, se obtuvo la inserción de una sola copia del plásmido en el locus *argB*. De esta manera, se pudo evaluar la eficiencia de los promotores siempre en el mismo contexto, cuantificando la actividad de β -gal. Los resultados indicaron que la expresión del gen fusionado *LacZ* es más eficiente bajo el control de los elementos reguladores de *gpd*, que bajo los de *trpC*.

3.5. SECRECIÓN Y SEÑALES DE SECRECIÓN

Una de las principales razones para la utilización de hongos filamentosos como sistemas de expresión, es su alta capacidad secretora. En general, el aparato celular de eucariontes que intervienen en la secreción, incluye modificaciones postraduccionales, que determinan las actividades biológicas, catalíticas e inmunogénicas de las proteínas (Upshall, 1991).

El aparato de secreción en hongos filamentosos parece seguir los mismos principios del modelo de transferencia vectorial propuesto para mamíferos y levaduras (Priest, 1984; Tuite, 1991). Dicho modelo se sintetiza en los siguientes puntos (Priest, 1984; Alberts et al, 1990; Tuite, 1991):

- La síntesis de proteínas extracelulares (PE) se efectúa parcial o totalmente en ribosomas asociados a retículo endoplásmico (RE).

- El producto primario de traducción de PE tiene en general un péptido en el extremo N-terminal, que no presenta la proteína

TABLA 5.- REGIONES DE REGULACION TRANSCRIPCIONAL UTILIZADAS PARA DIRIGIR LA EXPRESION GENETICA EN Aspergillus (MODIFICADO DE GWYNNE Y DEVCHAND, 1992)

ELEMENTO REGULATORIO	GEN	TIPO	ESPECIE DE ORIGEN	ESPECIE DE EXPRESION	REFERENCIA
alc A	Alcohol deshidrogenasa 1	Inducible	<u>A. nidulans</u>	<u>A. nidulans</u>	Gwynne, et al., 1987. Gwynne-Devchand, 1992.
Olic	Subunidad 9 de ATP asa mitocondrial	Constitutivo	<u>A. nidulans</u>	<u>A. nidulans</u>	Ward, et al., 1990.
tpi A	Triosafosato-isomerasa	Constitutivo	<u>A. nidulans</u>	<u>A. niger</u>	Upshall, et al., 1987.
amd S	Acetamidasa	Inducible	<u>A. nidulans</u>	<u>A. nidulans</u>	Turnbull, et al., 1989.
gla	Glucoamilasa	Inducible	<u>A. niger</u>	<u>A. niger</u>	Gullen, et al., 1987.
Alfa-amilasa		Inducible	<u>A. oryzae</u>	<u>A. oryzae</u>	Christensen, et al., 1988.
gpd	Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa	Constitutivo	<u>A. nidulans</u>	<u>A. nidulans</u> <u>A. niger</u>	Van Gorcom, et al., 1986.
adh A	Alcohol deshidrogenasa	Constitutivo	<u>A. niger</u>	<u>A. nidulans</u>	Saunders, et al., 1989.

madura. Dicho péptido, denominado en un principio secuencia señal, permite que la proteína sea procesada por el aparato de secreción.

- Una vez que se ha sintetizado la secuencia señal, ésta interacciona con una proteína citosólica, que la reconoce y que detiene la traducción. La unión del complejo traduccional con una proteína receptora de la membrana del RE (docking protein), desbloquea la traducción, la cual procede a partir de ese momento acoplada a la secreción a través de la membrana del RE (translocación cotraduccional).

- A medida que la traducción ocurre, la proteína extracelular pasa hacia el lumen del RE, donde es procesada por proteasas específicas que escinden la secuencia señal (generando un nuevo N-terminal), y adquiere su conformación tridimensional.

- Dentro de las vesículas del RE y del aparato de Golgi, ocurren las siguientes modificaciones postraduccionales:

a) Glicosilación. Grupos de oligosacáridos, típicamente acetilglucosamina, glucosa y manosa, se ligan por un enlace N-glucosídico a los residuos de asparagina, o por un enlace O-glucosídico a los residuos de serina y treonina de la proteína.

b) Acilación. Se adicionan ácidos grasos de cadena larga por la acción enzimática de acilasas específicas.

c) Modificación de oligosacáridos. Ocurre por la acción de manosidasas presentes en el aparato de Golgi.

d) Formación de enlaces disulfuro. Por la acción de disulfuro isomerasas específicas.

e) Fosforilación del extremo N-terminal.

- Finalmente, las vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi se fusionan con la membrana plasmática para liberar el contenido de proteínas extracelulares.

Las señales de secreción de procariontes y eucariontes son variables en tamaño (15 a 32 aa.), y presentan poca homología superficial. Sin embargo, cuando se compara la distribución de aminoácidos hidrofóbicos y polares, se pueden definir dos dominios; Un segmento hidrofílico N-terminal, seguido de un núcleo central predominantemente hidrofóbico.

La región hidrofílica está cargada positivamente, y es la responsable de la longitud variable de las secuencias señal.

El núcleo hidrofóbico, de 12 a 19 aa. en promedio, termina en una secuencia de reconocimiento de tres aminoácidos, que permite la escisión por peptidasas específicas, y contiene en general un residuo de glicina o prolina en el centro.

La región hidrofóbica tiene un papel crucial en la secreción, pues su longitud (40-50 A), permite el paso del producto primario de traducción a través de la membrana (Priest, 1984; Tuite, 1991).

Perlman y Halvorson (1983) definieron las características del sitio de reconocimiento de la peptidasa para 39 señales de secreción de proteínas procariontes y eucariontes, y propusieron

la secuencia modelo A-X-B, donde A puede ser Ala, Ile, Val, y Leu; y B Ala, Gln y Ser, siendo la secuencia más frecuente Ala-X-Ala.

Aunque las señales de secreción de eucariontes pueden ser reconocidas por procariontes y viceversa, se ha observado que la utilización de señales homólogas puede favorecer la secreción (Davis y Thai, 1980; Priest, 1984; Tuite, 1991).

El aparato secretor de hongos filamentosos no se ha descrito totalmente, y se desconocen muchas de las proteínas receptoras y las enzimas involucradas en el proceso de secreción y modificación postraduccional de proteínas (Priest, 1984; Upshall et al, 1991).

Se conocen sin embargo algunas características de las señales peptídicas de secreción.

Mediante la comparación de la secuencia N-terminal de la glucoamilasa extracelular de *A. niger*, con la secuencia de traducción primaria del cDNA, se ha podido definir el fragmento peptídico que permite la secreción, y determinar dos sitios de escisión enzimática. En la figura 4 se comparan las secuencias de secreción de glucoamilasa de *A. niger* y de β -lactamasa de *E. coli*.

La hidrólisis en el primer sitio remueve la secuencia señal hidrofóbica, o prepeptido. La acción enzimática en el segundo, libera el hexapéptido líder o prosecuencia, que en el extremo C-terminal tiene los residuos His-Arg (Innis et al, 1985; Upshall et al, 1991).

Las secuencias o señales de secreción del gen de glucoamilasa se han utilizado para la expresión y secreción de quimosina bovina (Ward et al, 1990), y de otras proteínas homólogas y heterólogas en *A. niger* (Davies, 1991).

Devchand et al (1988, 1989 a y b), desarrollaron un sistema *in vitro* que permite estudiar el proceso de translocación cotraduccional en *A. nidulans*. El sistema consistió en aislar los microsomas (derivados del RE rugoso), activos en la traducción del factor α en su forma pre-pro (es decir, con las señales de secreción). El tratamiento de la fracción microsomal con tritón-x y una proteasa específica, permitieron demostrar el proceso de translocación y traducción del factor α , así como la glicosilación del mismo en el lumen del RE.

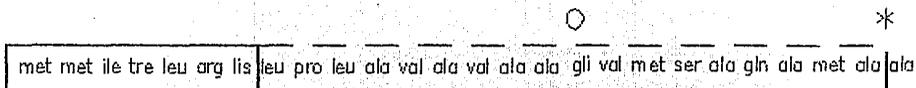
Este sistema puede permitir la evaluación del efecto de diferentes señales de secreción en las características de las proteínas secretadas.

Davies (1991) sugiere que en el desarrollo de sistemas de expresión y secreción en *Aspergillus*, es necesario incluir señales funcionales en los vectores de transformación. Sin embargo, aclara que la optimización de dichas secuencias no es relevante en el rendimiento si la transcripción y traducción operan eficientemente.

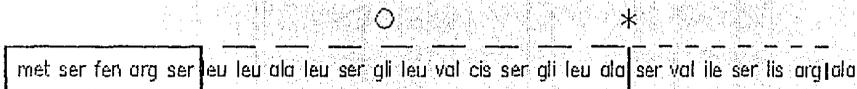
El aparato secretor de levadura glicosila en forma atípica a ciertas proteínas heterólogas como el tPA humano, adicionando un ¹Proteína extracelular de *Saccharomyces*, determinante del factor de heterotalismo.

FIGURA 4. SECUENCIAS DE SECRECION DE GLUCOAMILASA DE *A. niger*
 Y B - LACTAMASA DE *Escherichia coli* (Priest, 1984; Cullen, 1987)

B - lactamasa



Glucosamilasa



-  Segmento hidrofílico
-  Segmento hidrofóbico
-  Propéptido (hexapéptido)
-  Residuo central de glicina
-  Sitio de reconocimiento de la peptidasa

exceso de manosas (Tuite, 1991). Esa misma proteína, producida en *A. nidulans*, contiene oligosacáridos del mismo tipo y en los sitios adecuados con respecto a la humana (Davies, 1991).

3.6. CEPAS RECEPTORAS

La tecnología de expresión genética en *Aspergillus* depende de vectores eficientes, y de un método de transformación adecuado. Sin embargo, la frecuencia de transformación es fuertemente dependiente de la especie y cepa receptoras (Gwynne y Devchand, 1992).

Se han utilizado tres especies de *Aspergillus* como sistemas de expresión-secreción: *A. nidulans*, *A. niger* y *A. oryzae*.

El conocimiento genético de *A. nidulans* y la existencia de su estado sexual han permitido generar un banco isogénico de cepas, derivado de un solo aislamiento. Asimismo, se cuenta con "cepas maestras", que contienen marcadores genéticos en cada cromosoma, facilitando así el análisis genético de las transformantes.

La mayor parte de las cepas de *A. nidulans* provienen del Fungal Genetics Stock Center (FGSC) del Departamento de Microbiología del Centro médico de la Universidad de Kansas (Kansas City, Kansas 66103). Varias mutantes, predominantemente auxotróficas se han utilizado como cepas receptoras para expresión, y fueron utilizadas en los primeros estudios de transformación (Ward, 1991). Otras cepas provienen de un banco de mutantes originadas de un solo aislamiento hecho por Pontecorvo en la Universidad de Galsgow. Sin embargo, no existen productos industriales derivados de *A. nidulans*, por lo que no ha sido establecido su status sanitario (Schechtman, 1992).

Para *A. niger* no existían cepas genéticamente caracterizadas, hasta que recientemente, Bos et al (1988), obtuvieron un banco isogénico de mutantes auxotróficas y de color de esporas a partir de una sola cepa. Asimismo, construyeron cepas maestras con marcadores en seis cromosomas.

Por otro lado, tanto *A. niger* como ocho enzimas producidas por él, tienen el status GRAS y la aprobación de FDA para uso en alimentos, lo cual facilita la aprobación de productos recombinantes que utilicen cepas receptoras de dicha especie (Schechtman, 1992).

Las enzimas producidas por *A. oryzae*, lo mismo que el microorganismo, son internacionalmente aceptados para su uso en alimentos (Barbesgaard et al, 1992).

En general, se reconoce que siempre que el microorganismo receptor y el producto de los genes transferidos sean inocuos, la cepa manipulada genéticamente (recombinante) puede considerarse inocua también (Barbesgaard et al, 1992).

Partiendo de dicho criterio, se han aprobado en Europa y Japón la producción de quimosina bovina expresada en *A. niger* var. *awamori* de Genencor Inc. (Gwynne y Devchand, 1992), y de lipasa (Novo Industri) de *Rhizomucor miehei* expresada en *A. oryzae*

(Basbesgaard et al, 1992).

Asimismo, otra lipasa de Novo (de *Humicola lanuginosa*), producida también en *A. oryzae*, se ha aceptado para su aplicación en detergentes en Europa, Japón y E.U.

Debido a que se conoce bien el sistema genético de *A. nidulans*, las primeras cepas receptoras pertenecían a dicha especie. La tecnología de transformación desarrollada en *A. nidulans* se puede transferir fácilmente a *A. niger*, especie cuyos requerimientos de cultivo a gran escala se conocen mejor, y cuenta además con un status CRAS, lo cual favorece la aplicación biotecnológica (Davies, 1991).

En el desarrollo de sistemas en *A. niger* y *A. oryzae*, se han utilizado preferentemente cepas hiperproductoras de enzimas extracelulares. Ward (1987) utilizó una cepa de *A. niger* var. *awamori* UVK143, hiperproductora de glucoamilasa, para la producción de quimosina bovina. Christensen et al (1988) utilizaron una cepa industrial, productora de amilasa para la expresión de enzimas fungales.

En ambos casos, el gen estructural exógeno se expresó bajo el control del promotor de la enzima nativa.

3.7. DESTINO DEL DNA TRANSFORMANTE

3.7.1. INTEGRACION CROMOSOMICA

En todos los estudios de transformación de *Aspergillus*, se ha reportado la integración de las secuencias de DNA transformante al genoma de la cepa receptora (Goosen et al, 1991; Gwynne y Devchand, 1992).

Se pueden distinguir básicamente tres tipos de integración cromosómica, que coinciden con los descritos por Hinnen et al (1978) para *Saccharomyces* (figura 5):

Tipo 1.- Ocurre por un entrecruzamiento simple entre dos copias del mismo gen, una cromosómica nativa, y otra exógena. Da como resultado la duplicación del gen. Las copias aparecen en forma ligada, separadas sólo por las secuencias bacterianas del vector. La integración se lleva a cabo en el locus homólogo de la cepa receptora.

Tipo 2.- Ocurre cuando el vector se integra al genoma en un locus no homólogo.

En los tipos 1 y 2 los transformantes contienen frecuentemente más de una copia del vector, integradas en forma de tandem.

Tipo 3.- Ocurre por un proceso de entrecruzamiento doble, o por conversión genética. Da como resultado el remplazamiento del alelo residente por el transformante.

En algunos casos, se ha demostrado la transformación por más

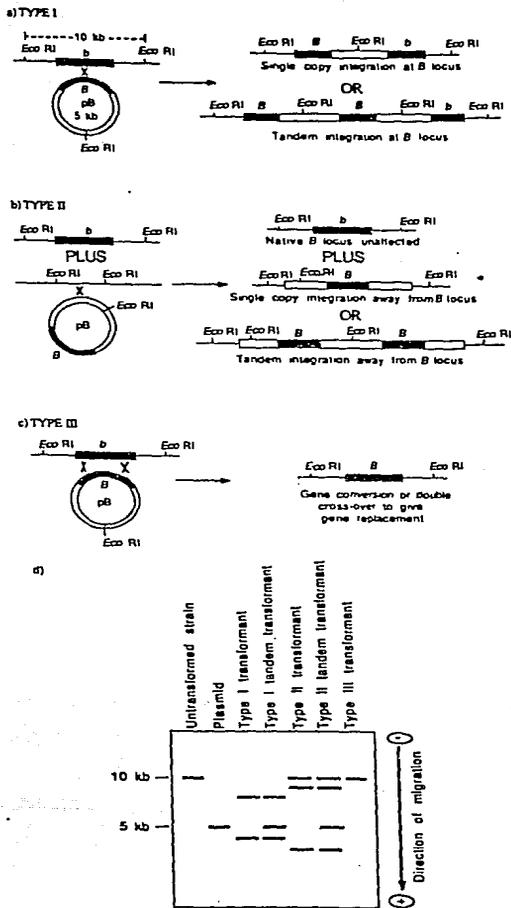


FIGURA 5. PATRONES DE INTEGRACION DEL PLASMIDO pB EN *A. nidulans* (a-c). (d): REPRESENTACION DE LOS RESULTADOS DEL ANALISIS DE HIBRIDACION (SOUTHERN BLOT) DE DNA GENOMICO DE LAS TRANSFORMANTES CON EL PLASMIDO pB. TODO EL DNA SE DIGIRIO CON EcoRI. (Ward, 1991a).

de un tipo para una misma célula transformante.

El tipo de integración se puede definir por un análisis Southern blot, en el cual se hibridizan los fragmentos de restricción del DNA genómico del transformante con el vector marcado (32 P). El patrón de hibridización indica el tipo de integración cromosómica (figura 5).

Se han analizado los tipos de integración de diferentes genes marcadores utilizados en la transformación de *A. nidulans* (Esser y Mohr, 1984; Fincham, 1989; Goosen et al, 1991).

Tilburn et al (1983), utilizando el marcador amdS, encontraron un predominio de integración tipo 1, mientras que Wernars et al (1985, 1986), utilizando el mismo marcador, encontraron la integración tipo 1 en una cepa e integración múltiple tipo 2 en otra.

Yelton et al (1984) obtuvieron los tres tipos de integración con vectores que contenían el marcador trpC. Mientras que John y Peberdy (1984) y Upshall (1986) obtuvieron predominantemente integración tipos 1 y 3 utilizando argB.

La transformación con marcadores heterólogos, como pyr4 de *N. crassa*, genera comunmente integración múltiple de tipo 2 (Ballance et al, 1983). Sin embargo, la incorporación de una secuencia propia de *A. nidulans* (el gen benA) a un vector con marcador pyr4, generó un 90% de transformantes con el vector integrado en el locus benA.

La utilización de otro marcador homólogo (oliC) permitió la obtención de transformantes con integración cromosómica predominante de tipo 3 (Ward et al, 1986).

En el caso de *A. niger*, la integración cromosómica utilizando el marcador homólogo pyrG permitió la integración en el locus homólogo (tipos 1 y 3) (Goosen et al, 1987; van Hartingsveldt, 1987).

El marcador heterólogo amdS de *A. nidulans* es el más utilizado en estudios de transformación de *A. niger*. Mohr y Esser (1990) observaron que las deleciones de los extremos 3' y 5' de las regiones no codificadoras de dicho gen, influenciaban el número de transformantes y el tipo de integración obtenida. Mohr et al (1989) observaron que la mayor parte de las transformantes de *A. niger* con el mismo marcador, contenían insertos en un solo sitio de integración.

Debets et al (1990), trabajando también con amdS, encontraron que la integración ocurre al azar en cualquiera de los cromosomas de *A. niger*, y en muchas ocasiones en una sola copia, debido probablemente al hecho de que no existe un gen de acetamidasa residente, equivalente al de *A. nidulans*.

En una revisión sobre transformación en hongos filamentosos, Goosen et al (1991) concluyen que en *Aspergillus*, la integración del DNA transformante no sigue una regla general. Su tipo depende de la naturaleza del vector, del marcador de selección, de la historia genética de la cepa receptora, e incluso de la

relación DNA/protoplastos empleada.

3.7.2. COTRANSFORMACION

Tal y como ocurre en *Saccharomyces* y eucariontes superiores, en *Aspergillus* es posible la cotransformación.

Si dos diferentes plásmidos se incluyen durante el proceso de transformación, pero sólo se aplica selección para uno de ellos, el otro también se integrará en una alta proporción en el genoma de los transformantes (Ward, 1991; Hynes, 1988).

Wernars et al (1987) utilizaron la cotransformación como herramienta para reemplazar un gen silvestre, *trpC* de *A. nidulans*, por el mutante. Utilizando un plásmido con *amdS* como marcador, lograron cotransformación con un fragmento de DNA que contenía el gen *trpC* no funcional fusionado al *lacZ* de *E. coli*. Los factores que influyeron en la eficiencia de cotransformación fueron, la relación molar entre los dos vectores, y el marcador de selección utilizado.

El hecho de que el vector cotransformado tenga homología con el genoma receptor ha permitido la mutación dirigida del gen *trpC* de *A. niger* (Goosen et al, 1989), y el estudio de las señales reguladoras del gen *amdS* de *A. nidulans* (Davis et al, 1988).

3.7.3. ANALISIS GENETICO DE LOS TRANSFORMANTES

Para verificar la integración al genoma de las secuencias de DNA transformante, es necesario el análisis genético.

El primer aspecto es verificar la estabilidad mitótica del transformante, la cual se determina cultivando las conidiosporas en un medio no selectivo, y haciendo un cultivo réplica en medio selectivo. Varias rondas de subcultivos pueden servir para establecer el porcentaje de conidiosporas que conservan el fenotipo transformante (Esser y Mohr, 1984).

Para establecer la estabilidad meiótica, puede efectuarse un análisis de las ascosporas obtenidos de cleistotecios formados por autofertilización. La frecuencia con la cual aparece el fenotipo mutante es un indicador de la estabilidad del gen exógeno, silvestre, durante el ciclo sexual (Fincham, 1989).

Para la asignación de un gen transformante a cromosomas, el procedimiento más utilizado es el análisis paraxenial, el cual se basa en la formación de un diploide entre la cepa transformante y una cepa maestra. La adición de *benomyl* acelera el proceso natural de haploidización, por lo que pueden estudiarse cepas haploides con diferentes combinaciones cromosómicas. Aquel marcador cromosómico de la cepa maestra, que no esté asociado al fenotipo transformante al analizar las haploides, corresponde al cromosoma o grupo en el cual está integrado el DNA transformante.

Upshall (1986) caracterizó genéticamente un gran número de transformantes argB+ de *A. nidulans*. El marcador argB se integró preferentemente al cromosoma III, donde se encuentra el locus correspondiente.

Wernars et al (1986) y Debets et al (1990) caracterizaron cepas transformantes amdS de *A. nidulans* y *A. niger* respectivamente. En el primer estudio se demostró la integración no homóloga del marcador en varios cromosomas. En el caso de *A. niger*, la integración de amdS se efectuó en cualquiera de los cromosomas, como un solo inserto, característica que ha permitido utilizar ese marcador en el mapeo cromosómico.

3.8. AISLAMIENTO Y CLONACION DE GENES

Los primeros genes aislados de *Aspergillus* (ver sección 3.2.1.) fueron seleccionados por complementación de las mutantes auxotróficas correspondientes de *E. coli* y *S. cerevisiae*. Tal es el caso de los genes trpC (Yelton et al, 1983) y argB (Berse et al, 1983).

Sin embargo, el método de aislamiento por complementación interespecífica no puede ser aplicable a todos los genes de *Aspergillus*. Muchos no se expresan en *E. coli*, o sus intrones no son procesados eficientemente en *Saccharomyces* (Goosen et al, 1991).

3.8.1. AISLAMIENTO POR HIBRIDIZACION

Una forma de detección y aislamiento de genes es hibridizar una biblioteca genómica con una sonda marcada de DNA o mRNA.

Para aislar genes evolutivamente conservados, se pueden utilizar sondas de genes de otras especies. Por ejemplo, el gen de isopenicilin-sintetasa de *A. nidulans* se pudo aislar utilizando cDNA del gen correspondiente de *P. chrysogenum* (Ramón et al, 1987).

La sonda de cDNA puede sintetizarse a partir de la secuencia conocida de aminoácidos de una proteína, o a partir del mRNA purificado de cepas hiperproductoras, generando un cDNA por la acción de transcriptasa reversa (Ward, 1991).

El fragmento de DNA genómico detectado y aislado se incorpora a un vector, y se utiliza para transformar una cepa en la cual pueda verificarse su expresión.

3.8.2. SELECCION POR COMPLEMENTACION Y AUTOCLONACION

En principio, la autoclonación en *Aspergillus* consiste en construir una biblioteca genómica de una cepa silvestre, y utilizarla para transformar otra cepa con una mutación particular. Las transformantes son seleccionadas por complementación. Se

aisla entonces el plásmido que contiene la secuencia complementante.

Ballance y Turner (1986) lograron aislar por autoclonación el gen *acuD* de isocitrato liasa de *A. nidulans*.

En el experimento, se aislaron fragmentos de entre 5 y 15 Kb de DNA genómico de *A. nidulans* silvestre y se incorporaron al plásmido pDJB3, de alta frecuencia de transformación, que contiene el marcador *pyr4* y la secuencia *ans1*.

El banco genético se utilizó para transformar una cepa mutante en los loci *pyrG* y *acuD*.

La selección de transformantes (4 en total) se hizo en un medio sin uridina, y con acetato de potasio como fuente de carbono. El DNA de las cepas *pyrG+* *acuD+* se digirió parcialmente con *EcoRI* y se utilizó para transformar *E. coli* Amp^r a Amp^s.

A partir de las clonas de *E. coli* Amp^r se preparó DNA de plásmidos, el cual se utilizó para transformar *A. nidulans* a *acuD+*.

Subfragmentos del plásmido pAcu22, que contenía la secuencia responsable de complementación, se utilizaron para transformar una cepa mutante (*acuD-*) de *A. nidulans*. El análisis de los fragmentos capaces de complementar la mutación, permitió aislar el gen de isocitrato liasa.

A partir de entonces, se han aislado muchos genes reguladores y estructurales de diferentes especies de *Aspergillus* (ver Goosen et al, 1991).

La elevada frecuencia de transformación y la posibilidad de fácil recuperación de marcadores que ofrece el nuevo vector pARp1, permitirán en un futuro el aislamiento de gran cantidad de genes por autoclonación.

4. APLICACIONES EN BIOTECNOLOGIA

El establecimiento de los sistemas de transformación genética en hongos filamentosos descritos anteriormente, generó una gran actividad de investigación dirigida al desarrollo de sistemas de expresión en dichos microorganismos. Las tecnologías disponibles han permitido mejorar genéticamente algunas cepas productoras de enzimas, y probar la expresión de productos de genes heterólogos de gran importancia económica (Cullen y Leong, 1986; Berka y Barnett, 1989).

4.1. Aspergillus COMO SISTEMA DE EXPRESION Y SEGRECION. VENTAJAS SOBRE LOS SISTEMAS CLASICOS.

La capacidad de ciertas cepas del género *Aspergillus* para secretar grandes cantidades de enzimas (hasta 20 g/l), el conocimiento disponible sobre sus sistemas genéticos y las herramientas generadas de clonación y transformación, han permitido recientemente el desarrollo de sistemas de expresión y secreción en *Aspergillus*.

Algunas características de *Aspergillus* lo hacen un género con gran potencial como sistema de expresión y secreción de proteínas heterólogas.

- CAPACIDAD SECRETORA. La mayor parte de las enzimas de secreción de hongos filamentosos difunden libremente a través de la pared celular. Las enzimas extracelulares son más fáciles de recuperar y purificar, pues se evita el rompimiento celular y la separación de ácidos nucleicos. Además, su producción no depende de la biomasa producida durante el cultivo (Priest, 1984).

Algunas especies de *Aspergillus*, por ejemplo *A. niger* y *A. oryzae*, son capaces de secretar enzimas nativas (glucoamilasa y amilasa, por ejemplo) hasta concentraciones de 10 a 20 gramos por litro de sobrenadante, y las proteínas heterólogas secretadas en algunos sistemas alcanzan el 5% de la proteína celular total (Saunders et al, 1986).

En contraste, las proteínas producidas por *E. coli* son fundamentalmente citoplásmicas, y se depositan en corpúsculos de inclusión en forma de agregados insolubles que requieren de tratamientos de solubilización y purificación muy costosos, como en el caso de quimosina bovina (Ward, 1991b), lisozima de huevo (Archer et al, 1990) y tPA humano (Pennica et al, 1983).

Saccharomyces cerevisiae no presenta la capacidad secretora de *Aspergillus*. La mayoría de las enzimas naturalmente secretadas por la levadura (invertasa y fosfatasa ácida, por ejemplo) se localizan en el espacio periplásmico o en la pared celular. Sólo las proteínas pequeñas como el factor α y algunas toxinas pueden difundir. En general, menos del 1% de la proteína total de levaduras se secreta al medio (Tuite, 1991).

En el caso de la quimosina bovina y el interferon α 2 humano por ejemplo, la mayor parte de la proteína permanece en el citoplasma, y sólo una pequeña fracción es secretada y se asocia a la pared celular (Mellor et al, 1983). La fracción citoplásmica de

quimosina producida por *S. cerevisiae* se encuentra incluida parcialmente en las vacuolas (Smith et al, 1985).

Aún cuando se han aislado mutantes "supersecretoras" de *S. cerevisiae* (Smith et al, 1985), que incrementan la concentración extracelular de enzimas hasta en 10 veces, los niveles de secreción de quimosina son menores a los reportados para *A. awamori* (Ward, 1991b).

Recientemente, van den Berg et al (1990), reportaron la producción de quimosina bovina extracelular utilizando el sistema de expresión de *Kluyveromyces fragilis*, una levadura de alta capacidad secretora.

- RECONOCIMIENTO DE SEÑALES DE TRANSCRIPCIÓN Y EDICIÓN DE INTRONES

Tanto *E. coli* como *S. cerevisiae* requieren de un cDNA del gen estructural para la expresión correcta de proteínas heterólogas de eucariotes superiores.

Las regiones reguladoras de transcripción en procariontes son diferentes de las de eucariotes, además de que aquellos no reconocen intrones ni tienen la capacidad de edición de mRNA (Lewin, 1990).

En el caso de *S. cerevisiae*, se conocen muy pocos genes que contengan intrones, los cuales se caracterizan por tener una secuencia interna (5'TACTAACAA3'), necesaria para su remoción, pero que está ausente en la mayoría de los genes de hongos filamentosos y eucariotes superiores. Consecuentemente, la levadura es capaz de transcribir DNA eucariótico heterólogo, pero incapaz de escindir los intrones en la etapa postranscripcional. Por otra parte, la secuencia poli-A en mRNA de levaduras es considerablemente más corta (32 nucleótidos) que la de otros eucariotes (Beggs et al, 1980; Tuite, 1991).

A pesar de que la secuencia 5'TACTAACAA3' está presente en algunos intrones de *Aspergillus*, esto no parece ser un requisito para la edición correcta del mRNA (Ballance, 1991).

Se ha demostrado que *A. nidulans* expresa eficientemente proteínas bacterianas tales como LTB y β -galactosidasa de *E. coli* (van Gorcom y van Hondel, 1988; Turnbull et al, 1989) y endoglucanasa de *Cellulomonas fimi* (Gwynne et al, 1987), así como el factor α de *Saccharomyces* (Devchand et al, 1988). *Aspergillus* puede también procesar intrones de genes fúngicos heterólogos como el de proteasa de *Rhizomucor miehei* y celulasa de *Trichoderma reesei*, a diferencia de la levadura que requirió de cDNA (sin intrones) para la expresión de celulasa de *T. reesei* y glucoamilasa de *A. niger* (Cullen y Leong, 1986).

Algunos genes estudiados en *A. nidulans*, como el de trifosfato isomerasa, guardan homología con los correspondientes de plantas y animales, tanto en el número y secuencia de los intrones, como en la longitud y ubicación de los mismos. El gen de tpiA en *E. coli*, *S. cerevisiae* y

Schizosaccharomyces pombe no contiene intrones (McNight et al, 1986). Por esa razón, se atribuye mayor potencial a la expresión de genes de eucariontes superiores en *Aspergillus*, cuando no existe disponibilidad del cDNA correspondiente (Cullen y Leong, 1986).

- MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

La ausencia de glicosilasas específicas en procariontes limita su utilización como sistema de expresión de proteínas de eucariontes.

Por ejemplo, el tpA de origen humano producido por *E. coli*, es una proteína no glicosilada y con una conformación anormal, por lo que no presenta la actividad de la proteína original (Pennica et al, 1983). De igual forma, la ausencia de oligosacáridos de la proteína Bm86 (de un parásito bovino) producida por *E. coli*, disminuye su poder inmunogénico (Turnbull et al, 1990).

En *Saccharomyces* sí existen los sistemas enzimáticos de modificación postraduccionales asociados a la secreción. Sin embargo, las señales de secreción heterólogas ocasionan fallas de reconocimiento del sitio de escisión por peptidasas. Algunas proteínas heterólogas como el antígeno de la hepatitis B y el tpA humano, son glicosilados en forma incompleta o con grupos atípicos ricos en manosa (Tuite, 1991).

En contraste, varias proteínas humanas como el tpA, la hormona del crecimiento y la interleucina-6, se pudieron expresar exitosamente en *A. nidulans* con niveles de secreción de 10-50 mg/l, fueron procesadas correctamente en el extremo N-terminal, y glicosiladas en forma normal. Sin embargo, el tpA humano producido por *A. niger* fue glicosilado en exceso (Gwynne y Devchand, 1992).

La modificación postraduccionales de proteínas heterólogas es más eficiente en *Aspergillus* que en levadura, aunque el grado de eficiencia depende de la proteína y la cepa utilizadas.

- CONOCIMIENTO DEL CULTIVO A GRAN ESCALA

Una buena cantidad de cepas de *A. niger*, *A. oryzae* y *A. awamori*, han sido caracterizadas morfofisiológicamente en cultivo sumergido. Tanto el medio como las condiciones de fermentación han sido establecidas para la producción de enzimas extracelulares.

El conocimiento de Microbiología básica e Ingeniería Bioquímica generado para esas cepas, puede ser utilizado ventajosamente para la producción a gran escala de proteínas heterólogas (Berka et al, 1992). Asimismo, su status GRAS puede acelerar la aprobación legal que se requiere para la venta y aplicación de proteínas recombinantes.

Otra ventaja que los hongos filamentosos tiene sobre levaduras y bacterias como sistemas de expresión, es la riqueza de su metabolismo secundario. Algunas vías biosintéticas de pigmentos, antibióticos y hormonas se estudian en *Aspergillus*

(Peñalva et al, 1989; Ramón et al, 1987; Timberlake y Marshall, 1989).

-EL PROBLEMA DE LAS PROTEASAS

Una desventaja que *Aspergillus* comparte con las levaduras es la presencia de proteasas nativas, capaces de degradar otras proteínas de interés (Saunders et al, 1986).

La presencia de aspartil-proteasas intra y extracelulares es particularmente importante en *A. oryzae*. Es muy probable que algunas cepas de dicha especie, hiperproductoras de enzimas no proteolíticas, sean deficientes en proteasas nativas (Upshall, 1986b).

Ward (1991) obtuvo mayor producción de quimosina bovina en una cepa transformante de *A. awamori*, en la cual el gen de aspergillopepsina nativa fue reemplazado.

4.2. VECTORES DE EXPRESION-SECRECION

Los elementos funcionales de los vectores utilizados para la transformación de *Aspergillus* con fines biotecnológicos, consisten de las siguientes regiones (figura 6):

- a) Región de control transcripcional (promotor).
- b) Secuencia-sígnal de secreción.
- c) Sitio de inserción de DNA para expresión.
- d) Terminador, que contenga las señales de poliadenilación y de escisión del mRNA (Berka y Barnett, 1989; Gwynne y Devchand, 1992).

A continuación se sintetizan algunos de los trabajos más relevantes de aplicación biotecnológica de la transformación genética de *Aspergillus*, se ejemplifican los conceptos descritos en las secciones anteriores, y se introducen algunos nuevos, como el reemplazo de genes.

4.3. PRODUCCION DE QUIMOSINA BOVINA EN *Aspergillus*

Una de las primeras proteínas heterólogas producidas en *Aspergillus* fue la quimosina (o renina) de origen bovino.

La estrategia que llevó a Genencor Inc. a la producción comercial de quimosina ha sido publicada (Cullen et al, 1987; Ward, 1989; Ward et al, 1990; Ward, 1991b).

La quimosina es una aspartil-proteasa que se encuentra naturalmente en el cuarto estómago de los bovinos, y es la principal enzima utilizada en la manufactura de quesos, en la hidrólisis de caseína.

La quimosina es secretada como un zimógeno precursor (proquimosina), cuyo extremo N-terminal (42 aminoácidos) es escindido autocatalíticamente a pH ácido.

La comparación del extremo N-terminal inferido de su cDNA, con el determinado de la secuenciación de proquimosina, indica que ésta es procesada a partir de un precursor mayor, denominado

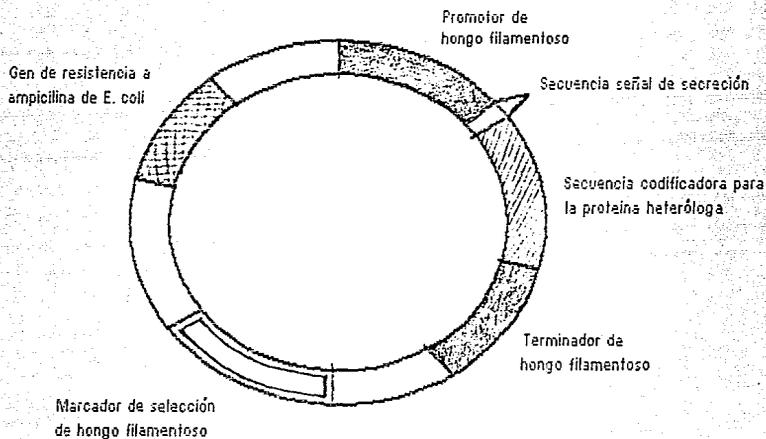


FIGURA 6. ESQUEMA DE UN VECTOR IDEAL PARA LA EXPRESION DE GENES HETEROLOGOS EN Aspergillus. (Ward, 1991a)

preproquimosina, que contiene un péptido señal de 16 aminoácidos.

La estrategia para expresión y producción de proquimosina se dividió en dos etapas. La primera utilizando *A. nidulans*, y la segunda utilizando *A. niger* var. *awamori* (*A. awamori*).

4.3.1. EXPRESION EN *A. nidulans*

En la primera etapa, se construyeron 4 vectores de expresión (pGRG1 a pGRG4, figura 7), en los cuales las regiones de control transcripcional, traduccional y de secreción del gen de glucoamilasa (gla) de *A. niger*, se fusionaron a las secuencias codificadoras de proquimosina o preproquimosina. Los plásmidos, derivados de pDJB3, contenían el marcador pyr4 de *N. crassa*, y la secuencia ans1, de *A. nidulans*.

La transformación se llevó a cabo por el método de Ballance et al (1983).

La función del promotor gla se indujo cultivando las transformantes en maltodextrinas al 5% como única fuente de carbono. No se detectó la producción de proquimosina en medios con xilosa como única fuente de carbono.

En general, los transformantes pGRG1 produjeron los mayores niveles de proquimosina extracelular (146 µg/g de peso seco) a los 3.5 días de cultivo. Se obtuvo también producción de la enzima (93 µg/g de peso seco) con transformantes pGRG3, que expresaban las secuencias de preproquimosina, lo cual indica que *A. nidulans* es capaz de reconocer y procesar el péptido señal de proteínas de mamífero.

Aproximadamente el 90% de la proquimosina producida fue extracelular.

El análisis de hibridización (Southern), demostró la integración de copias múltiples del vector. Sin embargo, el nivel de producción de proquimosina no se correlacionó con el número de copias integradas.

Debido al bajo rendimiento de proquimosina obtenido bajo el control del promotor inducible gla, se probó un sistema de expresión similar, que incluía al promotor de un gen constitutivo de alto nivel de expresión, el oliC de *A. nidulans*. Se esperaba que este gen se expresaría activamente durante el crecimiento celular, en contraste con el gla, que se expresa después de una fase lag de inducción. El plásmido pOR1, esencialmente igual a pGRG1 tenía el promotor de oliC en lugar del de gla, y carecía de la secuencia ans1.

El mejor transformante, OR1-10, se comparó con el mejor GRG1. Aún cuando se alcanzó la misma concentración de proquimosina en ambos cultivos (2 µg/ml), tal y como se esperaba, la producción por OR1-10 empezó 20 horas antes.

El rendimiento final de quimosina de OR1-10 y GRG1 fue semejante, a pesar de que GRG1 producía mayores niveles de mRNA de proquimosina en el estado estacionario.

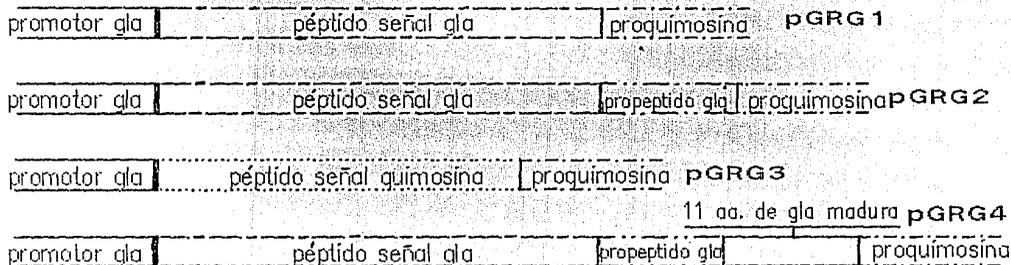
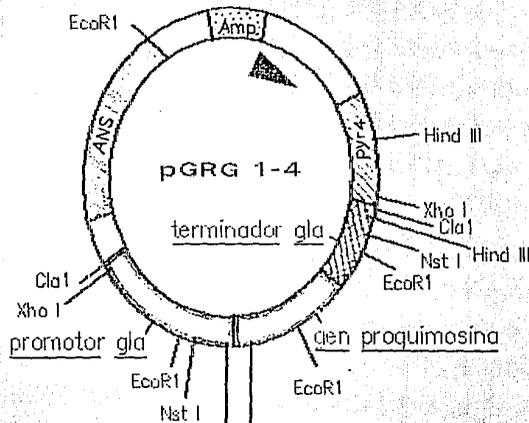


FIGURA 7. ESQUEMA DE LOS PLASMIDOS pGRG 1 A pGRG4.
SE MUESTRAN LAS SECUENCIAS FUSIONADAS DE LOS GENES DE
GLUCOAMILASA Y QUIMOSINA (Cullen et al, 1987).

4.3.2. EXPRESION EN *A. awamori*

Después de la utilización de *A. nidulans*, se buscó la expresión de proquimosina en una cepa de *A. awamori*, la UVK143f derivada de NRRL3112, hiperproductora de glucoamilasa.

Mutantes espontáneas pyrG- de *A. awamori* fueron transformadas utilizando los plásmidos pCRG1 a pGRG4, utilizados en la primera etapa. En la tabla 6 se presentan los resultados de producción de quimosina y glucoamilasa por transformantes pyrG+, GRG1 y GRG3.

La producción simultánea de glucoamilasa junto con la enzima deseada constituía, se pensó, una competencia por el aparato secretor. De esta manera, se esperaba que las transformantes que tenían reducida la producción de glucoamilasa darian la clave para incrementar la de proquimosina.

Se demostró que la cepa 62, con menor producción de glucoamilasa, tenía integradas un gran número de copias de pGRG1. La integración de muchas copias del promotor gla aparentemente saturaban factores reguladores de transcripción, disminuyendo la transcripción del gen de glucoamilasa.

Sin embargo, experimentos de transformación de *A. awamori* con múltiples copias del gen gla, demostraron un incremento correlativo en la producción de glucoamilasa. Esto significa que los factores reguladores de transcripción no están en concentraciones limitantes.

Por otro lado, el nivel de mRNA de proquimosina era del mismo orden del de glucoamilasa, y presentaba poliadenilación, lo cual descartaba un problema de ineficiencia de transcripción.

Otra posible limitante de la producción de quimosina era la secreción. La cepa 107, la mejor productora de quimosina, presentó también una eficiencia de secreción elevada.

Agotadas las opciones de mejoramiento dirigido, y con el objeto de incrementar la producción de quimosina, se recurrió a los métodos convencionales. Después de 4 rondas de mutagénesis con NTC de la cepa 107, se obtuvieron cepas productoras hasta de 100 µg/ml de quimosina bovina. Curiosamente, el incremento en producción de quimosina correlacionó claramente con la disminución en la producción de aspergiloepsina, una proteasa nativa.

4.3.3. REEMPLAZO DE LOS GENES DE GLUCOAMILASA Y ASPERGILOPEPSINA

Dos enzimas nativas de *A. awamori* pueden interferir con la producción de quimosina. La glucoamilasa, que constituye la principal enzima secretada (5 g/l), y la aspergiloepsina, capaz de degradar quimosina y de producir sabores desagradables en el queso cuando se encuentra en el producto final.

Con el fin de eliminar los genes que codifican para las enzimas referidas, se recurrió a la técnica de remplazo de genes, desarrollada en *A. nidulans* por Miller et al (1985). Un esquema de la estrategia de remplazo del gen de glucoamilasa se presenta en la figura 8.

El primer paso consistió en clonar los genes de glucoamilasa

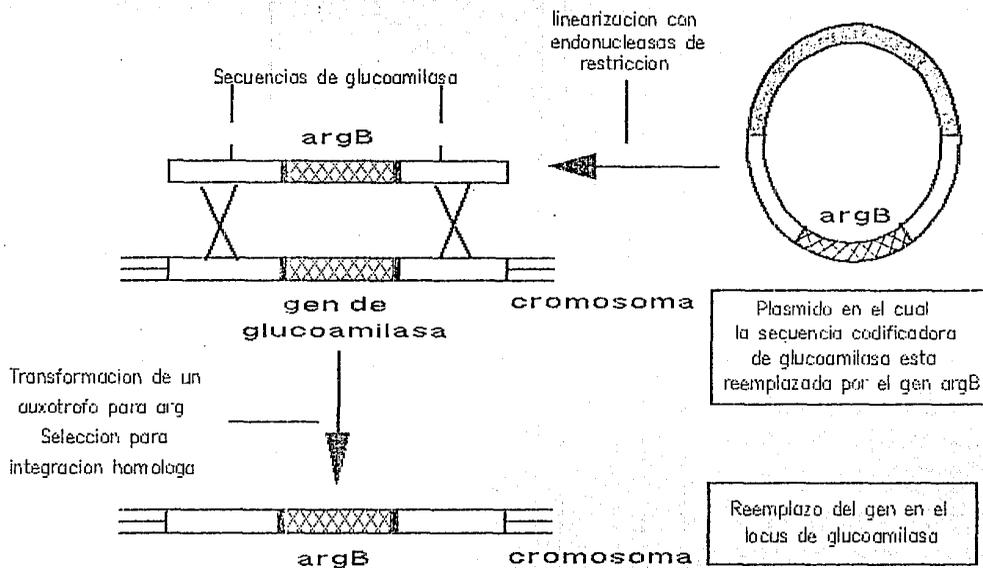


FIGURA 8. ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LA ESTRATEGIA DE DELECCION DE LA SECUENCIA CODIFICADORA DE GLUCOAMILASA DEL GENOMA DE *Aspergillus awamori* (Ward, 1991b)

y aspergillopepsina. Se construyeron entonces dos plásmidos que contenían las secuencias 5' y 3' de cada uno, pero las secuencias codificadoras reemplazadas por la del gen *argB*.

Fragmentos linealizados de DNA con los extremos homólogos al gen que se reemplazaría se utilizaron para transformar una cepa de *A. awamori* doblemente auxótrofa, *argB⁻ pyrG⁻*. Los fragmentos lineales permiten mayor frecuencia de transformación que los circulares, y se integran en la región de homología en 20 a 50% de las transformantes.

En aproximadamente 50% de las transformantes *argB⁺ pyrG⁻* se redujo la producción de glucoamilasa en un caso y de aspergillopepsina en otro.

Las mutantes de delección de *gla* se transformaron con plásmidos de la serie *pGRG pyrG⁺*. La reducción en producción de glucoamilasa no ocasionó ningún incremento en la producción de proquimosina.

La cepa transformante GC12, *argB⁺ pyrG⁻*, con interrupción en el gen de aspergillopepsina, se transformó también con plásmidos *pGRG*. Tanto el rendimiento como la tasa de producción de proquimosina fueron mayores en las transformantes que carecían del gen de la proteasa nativa.

4.3.4. MEJORAMIENTO DE PLASMIDOS

Recientemente, se construyó el nuevo plásmido *pGAMPR*, que contiene fusionados el promotor *gla*, la secuencia codificadora completa de glucoamilasa, y la secuencia codificadora de proquimosina. El plásmido se utilizó para transformar una cepa que tenía el gen de aspergillopepsina reemplazado por el de *argB*.

Se obtuvo la transcripción fusionada de glucoamilasa y proquimosina, así como la secreción fusionada de las proteínas.

Durante el cultivo a pH 6, la mayor parte de la proquimosina se encuentra unida a glucoamilasa. La disminución del pH a un valor de 2 durante 30 minutos permite la remoción de la prosequencia y de la glucoamilasa ligada, liberando quimosina por un proceso autocatalítico.

La mutagénesis de las mejores cepas transformadas con el plásmido mejorado ha permitido la obtención de quimosina secretada en niveles suficientes para su comercialización.

4.4. PRODUCCION DE INTERFERON α 2 EN *Aspergillus nidulans*

En investigaciones realizadas por la empresa canadiense Allelix Inc., se ha logrado la producción de interferon α 2 humano (IFN2), utilizando *A. nidulans* como sistema de expresión. La estrategia general del estudio se publicó en un primer reporte experimental (Gwynne et al, 1987), y dos revisiones posteriores (Devchand et al, 1989; Davies, 1991).

En el desarrollo del sistema de producción de proteínas recombinantes, se logró transformar una cepa genéticamente conocida de *A. nidulans* (derivada de FGSC-4), sin ninguna capacidad metabólica de importancia industrial, en una cepa

comercialmente competitiva.

4.4.1. EL REGULON DE ETANOL EN *A. nidulans*

El sistema se basó en las propiedades genéticas de control de la expresión del regulón de etanol en *A. nidulans*, y su influencia en la fisiología del organismo.

El regulón de etanol, clonado y caracterizado por Lockington et al (1985), comprende dos genes estructurales y uno regulatorio. Los estructurales son *alcA*, que codifica para la alcohol deshidrogenasa I (ADHI), y *aldA*, que codifica para la aldehído deshidrogenasa (aldDH). El producto del gen regulador *alcR* actúa como activador positivo de los genes *alcA* y *alcB*, y está ligado al gen *alcA* en el cromosoma VII. *aldA* se localiza en el VII. Los tres genes están sujetos a represión catabólica por glucosa, mediada por el gen de control negativo *creA*.

Aunque el inductor fisiológico no ha sido totalmente identificado, se utiliza 100 mM de treonina como inductor gratuito.

La región de regulación de transcripción del gen *alcA* tiene las características requeridas para utilizarse en un sistema de expresión: 1) Un promotor fuerte e inducible; 2) Un nivel basal bajo; 3) Inductores gratuitos disponibles; 4) Un tiempo (lag) de una hora para alcanzar la máxima síntesis proteica después de la inducción; 5) Genes estructurales dispensables y 6) Un sistema de control simple y definido.

4.4.2. CONSTRUCCION DE VECTORES Y TRANSFORMACION

El vector inicial de expresión *pALCA1s*, se basó en el vector *pUC12* de *E. coli*. Contenia 2 Kb hacia arriba del inicio de traducción de *alcA*, con excepción de 50 nucleótidos de la región líder, en lugar de los cuales se incorporó una señal de secuencia de secreción.

La señal de secreción fue diseñada de acuerdo a secuencias consenso de aminoácidos, y contenía dos residuos N-terminales con carga positiva, una estructura mayoritariamente hidrofóbica, y una secuencia de escisión optimizada.

El gen de *IFN2*, proveniente de otro vector, se incorporó inmediatamente después de la secuencia señal, para dar el plásmido *pALCA1SIFN* (figura 9).

El método de transformación de Yelton et al (1984) se utilizó para la introducción de dos vectores por cotransformación. El vector marcador (de la serie *pDG*), que contiene *argB*, y el vector construido para la expresión de *IFN2*, *pALCA1SIFN*.

El 80% de las transformantes *argB+* (derivadas de cepas *argB-*) también eran transformadas por el otro vector. Con ese sistema de transformación se lograron detectar por análisis de hibridación Southern, transformantes hasta con 50 copias integradas del vector de expresión. 11 transformantes secretaron *IFN2* al cultivarse en medio mínimo con fructosa al 1%. La producción de *IFN2* en dichas cepas estuvo sujeta a inducción y regulación por catabolito (figura 10).

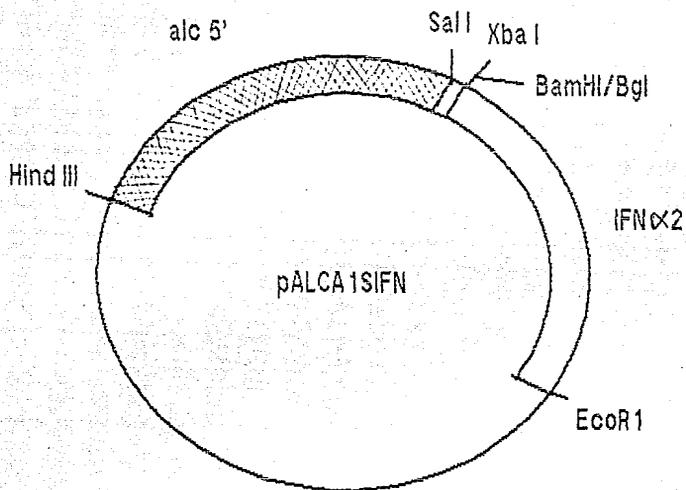


FIGURA 9. ESQUEMA DEL PLASMIDO pALCASIFN (Gwynne et al, 1987)

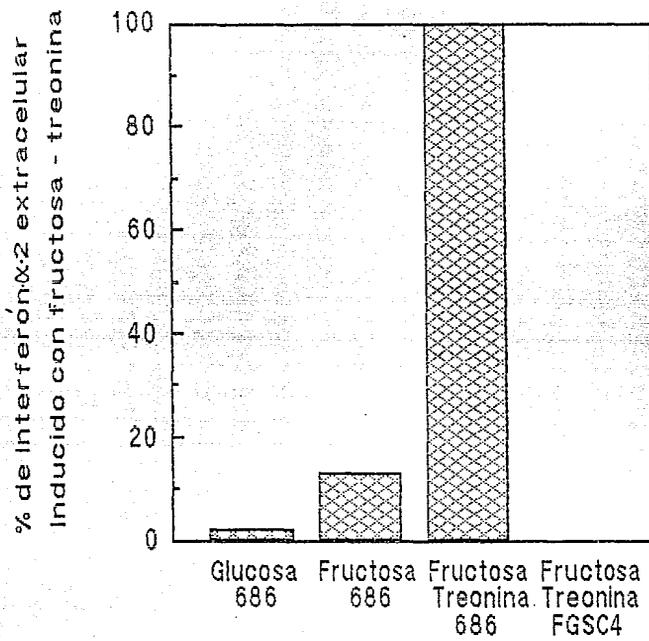


FIGURA 10. REGULACION DE LA EXPRESION Y SECRECION DE INTERFERON α 2 HUMANO EN TRANSFORMANTES DE *Aspergillus nidulans* QUE CONTIENEN EL PLASMIDO pALCASIFN. (Davies, 1991)

- La expresión se realiza bajo el control del promotor *alcA*.
- La cepa transformante 686, fue cultivada en medio mínimo MM Adicionando: Glucosa 1%, Fructosa 1%, o el medio de inducción de Fructosa 1% - Treonina 100 mM.
- En medio de inducción se cultivo también la cepa silvestre FGSC4

En medio de inducción (fructosa-treonina) la concentración de IFN2 secretada fue de 0.05 mg/l.

4.4.3. OPTIMIZACION DE VECTORES

Para incrementar los niveles de expresión de IFN2 los vectores pALCA1S fueron modificados:

1) Se incluyó un terminador de transcripción del gen de glucoamilasa de *A. niger*.

2) Todas las construcciones se hicieron con fusiones precisas del péptido señal y la secuencia codificadora del gen exógeno, eliminando restos de la señal de secreción de IFN2, así como secuencias derivadas de construcciones anteriores.

3) Se incorporó al extremo 3' del promotor alca la secuencia líder de mRNA, y la secuencia natural, anterior a ATG de ese gen.

4) Se redujo el tamaño del extremo 5' de alca de 2 Kb a 320 pb. Esta región del promotor alca contiene todos los elementos de interacción en cis, que definen la activación por alcr y la iniciación de transcripción, pero se ha eliminado un supuesto sitio de unión del producto de creA (responsable de la represión por glucosa).

Las modificaciones 2 y 4, de manera independiente, generaron incrementos en la producción de IFN2 extracelular de 15 y 2 veces respectivamente.

4.4.4. UTILIZACION DEL SISTEMA alca

Se observó que el rendimiento de IFN2 no se incrementaba en correspondencia al número de copias integradas del vector de expresión. Lo anterior se atribuyó a que el producto de alcr se encontraba en menor proporción que el gran número de promotores alca incorporados, lo que ocasionaba una reducción en la expresión de los promotores ligados al gen de IFN2.

En estudios en los que se evaluó el rendimiento de ADHI (producto del gen alca) en *A. nidulans* FGSC-4 silvestre, se llegó a las siguientes conclusiones:

- La presencia de copias múltiples de alca en cepas con una sola copia de alcr tenían poco efecto en los niveles de ADHI.

- El incremento en copias de alcr tenía poco efecto en un solo gen alca.

- En cepas con alto número de copias de alca, el incremento en copias de alcr aumenta los niveles de ADHI.

- En cepas con alto número de copias de alcr, el incremento en copias de alca también aumenta el nivel de ADHI.

Considerando lo anterior, se decidió utilizar cepas derivadas de FGSC-4 con alto número de copias de alcr, y transformarlas con el vector optimizado, pALCA1SIFN2, obteniéndose niveles de expresión suficientes para el escalamiento del sistema.

Dado que el sistema de expresión descrito está sujeto a

fuerte represión por glucosa, los procedimientos de fermentación se han adaptado para separar la fase de producción de biomasa de la de producción de IFN2. Durante la primera fase se genera biomasa rápidamente en un medio de cultivo complejo que contiene glucosa. Al término de dicha fase, los niveles de glucosa bajan lo suficiente como para permitir la inducción. El inductor (treonina) se agrega junto con una fuente de carbono que no ocasiona represión (fructosa, por ejemplo).

Actualmente, Allelix Inc. ha logrado la expresión regulada de otras nueve proteínas heterólogas con el sistema alcA de *A. nidulans*: proquimosina bovina, endoglucanasa de *Cellulomonas fimi*, y las proteínas humanas, superóxido dismutasa, activadora del plasminógeno tisular (tPA), factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormona paratiroidea (PTH), interleucina 6, hormona del crecimiento, y globulina de unión a corticosteroides (CGB).

4.5. EXPRESION DE PROTEASA ASPARTICA FUNGAL EN *A. oryzae*

Christensen et al (1988) del Instituto de Investigación de Novo reportaron un nuevo sistema de expresión y secreción de proteínas heterólogas: *Aspergillus oryzae*.

A partir de una cepa hiperproductora, los autores clonaron el gen de α amilasa, y desarrollaron un sistema de expresión utilizando la región del promotor. El sistema se probó construyendo cepas recombinantes de *A. oryzae* productoras de una proteasa de *Rhizopus miehei* (PRM).

4.5.1. CLONACION DEL GEN DE α AMILASA

Para aislar el gen de α amilasa, se preparó DNA genómico de una cepa mutante de *A. oryzae* (HW325). Se hidrolizó con la enzima Sau3A, y se separaron fragmentos de entre 5 y 10 Kb. Dichos fragmentos se ligaron con pBR322 predigerido por BamHI.

Los plásmidos recombinantes propagados en *E. coli*, se reaislaron y se hibridizaron con un oligonucleótido de secuencia:

G G G/A T T A/G T C A/G T G A/G T T

complementaria a la secuencia que codifica para los aminoácidos 295 a 299 de la α amilasa comercial de *A. oryzae*.

El plásmido pTAKA-17 (figura 11), que contiene el gen de α amilasa, y 2.1 Kb hacia arriba del inicio de transcripción, se utilizó como fuente de la región promotora.

Utilizando el plásmido p3SR2 que contiene el marcador amdS de *A. nidulans*, y pTAKA-17, se transformaron protoplastos de una cepa silvestre de *A. oryzae* (A 1560). el 90% de las transformantes amdS+ incorporaron por cotransformación el vector pTAKA-17, presentando un gran incremento en producción de α amilasa (Tabla 6).

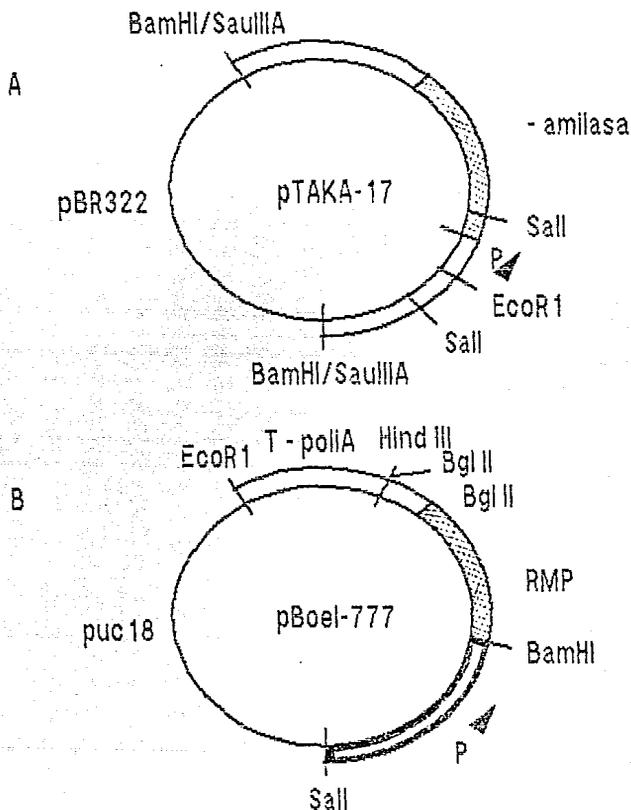


FIGURA 11. (A). PLASMIDO pTAKA-17. Contiene el DNA genómico de α -amilasa de *A. oryzae*, incluidas las secuencias codificadora y promotora (P)

(B). PLASMIDO pBoel-777. Contiene la secuencia codificadora de proteasa de *Rhizomucor miehei* (RMP), insertada 3' al promotor (P) de α -amilasa de *A. oryzae*, y 5' a las secuencias de terminación (T) y poliadenilación (poliA), del gen de glucoamilasa de *A. niger* (Christensen et al, 1988)

TABLA 6. PRODUCCION DE AMILASA Y PROTEASA ASPARTICA
 POR Aspergillus oryzae. (Christensen, 1988).

CEPA	AMILASA DE <u>A. oryzae</u> (mg/ml de sobrenadante)
A-1560 (Silvestre)	1
Transformante 10 p-TAKA-17/A-1560	12

PROTEASA DE Rhizomucor miehei (PRM)
 (mg/ml de sobrenadante)

A-1560 (Silvestre)	0
Transformantes Boel-777/A-1560	7 ----- 3.3
	9 ----- 0.5
	15 ----- 2.4

4.5.2. EXPRESION DE PRM

Para la expresión de PRM, se construyó el plásmido pBoel-777 (figura 11), derivado de pUC19, y que contenía tres elementos:

- a) El promotor de α amilasa de *A. oryzae* (1.1 Kb)
- b) El marco de lectura abierto de preproteinasas de *R. miehei*.
- c) El extremo 3' (terminación y poliadenilación) del gen de glucoamilasa de *A. niger*.

La cepa A 1560 de *A. oryzae*, en contraste con otras de su misma especie, presentaba muy poco crecimiento (interferencia) en medios con acetamida, por lo cual se seleccionó como cepa receptora.

Los vectores p3SR2 y pBoel-777, se utilizaron para transformar a A 1560. De cada 9 transformantes amd^{S+}, 8 produjeron PRM. El análisis de hibridización del DNA de 3 transformantes mostró patrones diferentes de integración del vector en cada uno. La producción de PRM no correlacionó con el número de copias integradas.

Al cultivarse en un medio líquido con dextrina de papa como fuente de carbono, las transformantes de A 1560 produjeron PRM extracelular, secretada en un 95%. (Tabla 6).

4.5.3. CARACTERISTICAS DE PRM RECOMBINANTE

Se encontraron dos formas de proteasas en los sobrenadantes de fermentación, una del mismo peso molecular de PRM, y la otra 5 KD mayor. Bajo las condiciones de cultivo en dextrinas, se observó solo la primera forma, correspondiente a PRM.

La PRM producida por *A. oryzae* presentó una actividad de 4950 Ku/g, semejante a la encontrada para PRM nativa, de 5000 Ku/g.

La PRM recombinante contenía una mayor proporción de oligosacáridos (extraglicosilación) que la natural, y dos diferentes extremos N-terminales. Sin embargo, dichas modificaciones no alteraron la actividad específica de la enzima.

Un sistema de expresión y secreción semejante al reseñado, es el que Novo Industri emplea actualmente para la producción de una lipasa fungal recombinante en *A. oryzae* (Gwynne y Devchand, 1992).

4.6. SECRECION DE tPA HUMANO EN *A. nidulans*

El activador del plasminógeno tisular (tPA) humano, es una serin proteasa importante en la disolución de coágulos sanguíneos. El tPA activo se deriva del producto primario de traducción por un proceso proteolítico. El péptido señal y la proseuencia son

removidos para generar una proteína madura con glicina como extremo N-terminal. La subsecuente acción de aminopeptidasas genera un nuevo extremo N-terminal de serina. Ambas formas, con glicina o serina en el extremo amino, son activas.

Los intentos por producir tPA humano activo en *E. coli* y *Saccharomyces* han fracasado. Se han obtenido proteínas intracelulares y poco solubles en el primer caso, y tPA hiperglicosilado y localizado en el espacio periplásmico en el caso de levaduras.

Upshall et al (1987) y Upshall (1991), reportaron la utilización de *A. nidulans* como sistema de expresión del tPA humano, en un desarrollo de ZymoGenetics Inc.

4.6.1. EFECTO DEL PROMOTOR EN LA EXPRESION DE tPA

Se evaluaron tres diferentes promotores para expresar tPA en *A. nidulans*:

a) El alcC (alcohol deshidrogenasa 3) de *A. nidulans*, sujeto a inducción por etanol, pero no a represión por glucosa.

b) El tpi (triosafosfato isomerasa) de *A. nidulans*, constitutivo de expresión media.

c) El adhA (alcohol deshidrogenasa) de *A. niger*, constitutivo y de alto nivel de expresión.

Los vectores (figura 12) se construyeron a partir de un derivado de pBR322 que contiene el marcador argB. El fragmento del promotor fue en todos los casos de 1 Kb de longitud, y contenía todas las regiones reguladoras de transcripción y traducción, con excepción de la secuencia ATG de inicio. El cDNA de la región codificadora del tPA era seguido por el terminador del gen tpi. En algunos vectores, se sustituyó la secuencia de secreción natural de tPA por la del gen de glucoamilasa de *A. niger*.

Los tres vectores se utilizaron para transformar en forma independiente a una misma cepa receptora de *A. nidulans* argB-, derivada de la colección de la Universidad de Galsgow. La transformación se realizó por el método de Yelton et al (1984), seleccionando las transformantes argB+.

Al cultivarse en matraz agitado con medio mínimo (+ 1% de etanol en el caso de transformantes con promotor alcC), se obtuvo un promedio de producción de tPA para cada tipo de promotor (tabla 7).

La mayor producción se obtuvo de transformantes que contenían la secuencia promotor adhA/tPA-cDNA, y la menor de las alcC/tPA-cDNA inducidas con etanol.

La variación observada entre transformantes de un mismo vector se atribuyó a que la integración ocurrió en diferentes cromosomas, y por lo tanto la expresión se modificaba dependiendo del contexto. No se observó correlación entre la producción de tPA y el número de copias integradas del vector.

El nivel medio de tPA obtenido cuando se utilizó la secuencia pre-pro de glucoamilasa fue menor al obtenido cuando se expresó el cDNA completo de tPA. Este resultado difiere del obtenido para la expresión de proquimosina por Cullen et al (1987).

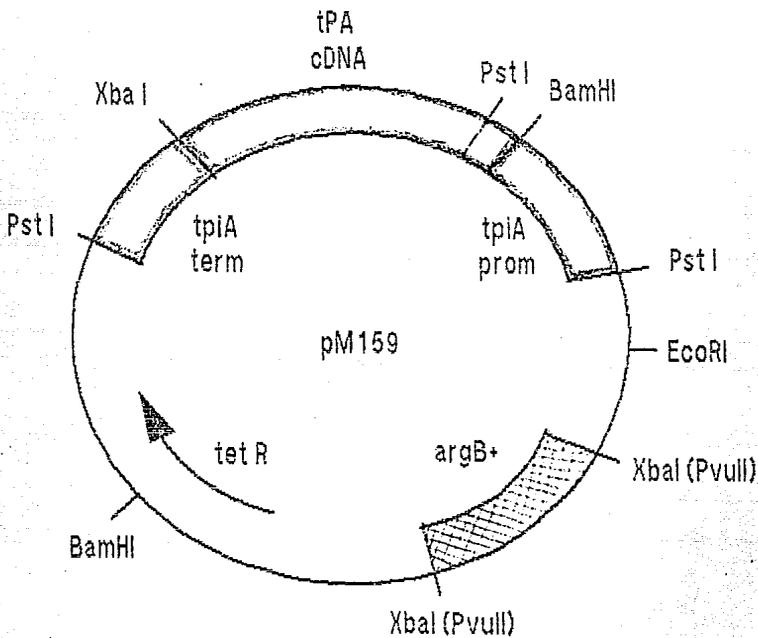


FIGURA 12. ESQUEMA DEL PLASMIDO pM 159; PARA LA EXPRESION DE tPA HUMANO (Upshall et al, 1987).

4.6.2. EFECTO DEL PROMOTOR EN LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

Para estudiar la eficiencia del procesamiento proteolítico del producto primario de traducción, se analizó la secuencia N-terminal del tPA secretado, obteniéndose los siguientes resultados:

a) Cultivos de 28 horas de transformantes que contenían la secuencia promotor-tpi/tPA-cDNA, con 100 µg/l de tPA activo, presentaron las formas de serina y glicina en proporción equimolar.

b) En un experimento posterior, se observó que en cultivos de 96 horas de transformantes con secuencia promotor-adhA/tPA-cDNA (2.5 µg tPA/l), el procesamiento proteolítico generaba sólo la forma de serina.

Los resultados indican que el procesamiento proteolítico en *A. nidulans* reconoce las secuencias señal de tPA humano, hidrolizándolas con especificidad.

En el experimento (a), utilizando el promotor tpi, la proteína tPA secretada presentó la misma migración que la tPA humana en SDS-PAGE, indicando un nivel semejante de glicosilación. En contraste, el tPA producido en (b), bajo el control del promotor adhA, mostró un exceso de grupos de oligosacáridos.

La hiperglicosilación de tPA se interpretó de la siguiente forma: En las transformantes altamente productoras, la tasa de traducción de mRNA a proteína es mayor a la tasa de procesamiento de la proteína a través del aparato secretor. La acumulación de tPA en el aparato de Golgi causaría entonces una adición continua de monosacáridos.

4.7. OTRAS APLICACIONES EN BIOTECNOLOGIA

El desarrollo de sistemas de expresión-secreción ha sido la aplicación biotecnológica de mayor impacto económico que ha generado la transformación genética en *Aspergillus*.

Se ha logrado recientemente la producción de interleucina-6 humana (Contreras et al, 1991) en *A. nidulans*, y de lisozima de huevo (Archer et al, 1990) en *A. niger*. En esta última especie, se logró obtener también una glicoproteína inmunogénica de importancia veterinaria (Turnbull et al, 1990).

La tecnología genética ha permitido no sólo la producción de proteínas heterólogas, sino el mejoramiento dirigido de cepas industriales. Tal es el caso de *A. awamori* NRRL3112, cepa hiperproductora de glucoamilasa, que mediante transformación logró triplicar la producción de la enzima (Finkelstein et al, 1989).

Por otro lado, el análisis genético de ciertas vías biosintéticas, generará en un futuro nuevas aplicaciones industriales. Algunos ejemplos son: la síntesis de penicilina producida por *A. nidulans*, y cuya regulación se estudia activamente (Peñalva et al, 1989), la de aflatoxinas, producidas

por *A. flavus* (Payne et al, 1989), y la de compuestos aromáticos hidroxilados, como el benzoato, en *A. niger* (Boschloo, 1990). En esos casos, mediante el uso de sistemas de transformación genética, se pueden identificar y aislar los genes que complementan mutaciones asociadas a las vías biosintéticas. Posteriormente, se puede estudiar el efecto que la dosis o la expresión modulada de dichos genes tiene en los diferentes metabolitos de la vía.

5. APLICACIONES EN INVESTIGACION BASICA

Las herramientas de manipulación genética desarrolladas en *Aspergillus*, han hecho posibles estudios sobre los mecanismos reguladores de eucariontes (Timberlake y Marshall, 1989). Actualmente, se han caracterizado decenas de genes reguladores en *A. nidulans*, y se han podido estudiar los sistemas genéticos del metabolismo del nitrógeno, carbono y azufre (Davis y Hynes, 1989).

Otra línea de investigación en *A. nidulans* es la regulación genética de la diferenciación celular. La aplicación de la genética molecular ha permitido establecer modelos funcionales de regulación del desarrollo del conidióforo, y generar al mismo tiempo valiosos conocimientos sobre los mecanismos de regulación genética en eucariontes (Timberlake y Marshall, 1988; Aguirre y Timberlake, 1990).

6. PROPUESTA DE APLICACION: PRODUCCION DE DEXTRANASA DE *Paecilomyces lilacinus* POR *Aspergillus niger*

La dextrana es un polisacárido bacteriano compuesto por unidades monoméricas de glucosa unidas por enlaces α (1-6).

Las dextranas participan desfavorablemente en dos aspectos de suma importancia. Por un lado, su formación en la caña de azúcar y en el jugo extraído ocasiona problemas durante los procesos de refinación, clarificación y evaporación. Además, como constituyentes de la placa dental bacteriana, participan en la promoción de la caries dental (Godfrey y Reichelt, 1983).

El problema de las dextranas en la industria azucarera está bien estudiado. La dextrana producida por *Leuconostoc mesenteroides*, forma una masa gelatinosa que bloquea la filtración y retarda la cristalización (Honig, 1974).

Como alternativa a los tratamientos habituales de destrucción de dextrana en los ingenios azucareros (aplicación de vapor, cal etc.) se han utilizado exitosamente dextranasas de origen fungal aplicadas al jugo de caña. Este sistema reduce costos y permite la destrucción de la dextrana sin detener las operaciones de extracción y filtración (Scott, 1975; Ward, 1985; Gálvez, 1992).

Debido a la importancia que tiene la industria azucarera en la economía de nuestro país, y a la necesidad de actualizarla en materia tecnológica, se han hecho los primeros esfuerzos para producir dextranasas con tecnología mexicana, y aplicarlas a nivel industrial (Gálvez, 1992).

En un primer screening, se aislaron cepas de hongos productoras de dextranasa, y se seleccionaron dos, de las especies *Penicillium purpurogenum* y *Paecilomyces lilacinus* (6R) (Trejo, 1989).

La dextranasa de *P. lilacinus* 6R tiene características apropiadas para la producción industrial (Gálvez y López-Munguía, 1991). Sin embargo, su producción en cultivo sumergido es lenta y está desfasada del crecimiento micelial (Trejo, 1989).

Debido a que la dextranasa de *P. lilacinus* tiene posibilidades de aceptación para uso industrial (Godfrey y Reichelt, 1983), y su producción podría facilitarse en un sistema fúngico hipersecretor, en el presente estudio se propone la producción de dextranasa de *P. lilacinus* en el sistema de expresión de *A. niger*. A continuación se describe la estrategia general.

6.1 OBTENCION DE DNA DE *P. lilacinus* 6R Y CONSTRUCCION DE UN BANCO GENETICO EN p3SR2

Para la obtención del DNA genómico para transformación se requerirá:

a) Micelio filtrado de *P. lilacinus* 6R de un cultivo de 24 horas de edad (fase log) en medio de Hultin-Nordstrom (1949), bajo las condiciones establecidas de fermentación: matraces Erlenmeyer de 250 ml con 20% de volumen, 28 °C y 110 RPM.

b) Obtención y purificación de DNA genómico por el método de

Minuth (1982). Dicho método fue establecido para *Penicillium* y *Cephalosporium*; ambos géneros filogenéticamente cercanos a *Paecilomyces* (Samson, 1974).

c) Digestión parcial del DNA genómico con EcoRI, por métodos estándar.

d) Separación de fragmentos de restricción en gel de agarosa, y recuperación de los de 3 a 10 Kb de longitud.

Hasta la fecha no ha sido posible definir el peso molecular de la dextranasa de *P. lilacinus* GR, pero resulta factible que los fragmentos de DNA de entre 3 y 10 Kb contengan el gen estructural y las secuencias de regulación transcripcional y terminación, requeridas para la expresión.

Los fragmentos de DNA se incorporarán al plásmido p3SR2 (figura 3; Tilburn et al, 1983), derivado de pBR322. p3SR2 tiene incorporado el gen de acetamidasa (amdS) de *A. nidulans*, y se ha utilizado en la transformación de *A. niger* con buenos resultados (Debets et al, 1990; Mohr y Esser, 1990), observándose integración múltiple en el genoma.

El marcador amdS de *A. nidulans* ofrece ventajas para la transformación de *A. niger*. En primer término, no existe un gen equivalente en *A. niger*, por lo cual las transformantes amdS+ pueden seleccionarse fácilmente en un medio con acetamida o acrilamida como fuentes de nitrógeno. Además, la cepa receptora no requiere de mutaciones previas, como es el caso con marcadores auxotróficos de selección, manteniéndose así la integridad genética original.

Para la construcción de un banco genético de *P. lilacinus* en p3SR2, se requiere de:

e) Digestión del plásmido p3SR2 con EcoRI, y defosforilación de los extremos 5' con fosfatasa alcalina.

f) Unión de los fragmentos de DNA genómico con p3SR2 por la acción de la ligasa de DNA de T4.

Opcionalmente, las construcciones en p3SR2 podrían linealizarse por digestión parcial con Sall, con el fin de incrementar la frecuencia de transformación (Christensen et al, 1988).

En los incisos c), d), e) y f) se seguirá la metodología estándar (Maniatis et al, 1982).

6.2 TRANSFORMACION

La cepa receptora que se propone, PEC-601, perteneciente a la especie *Aspergillus niger* var *awamori*, reconocida como GRAS (Schechtman, 1992), es hiperproductora de pectinasas extracelulares.

Es de esperarse que el aparato secretor de una cepa de este tipo permita la secreción de proteínas heterólogas, tal y como se obtuvo para la producción de quimosina bovina en una cepa de la

misma especie (Ward, 1991b).

Es indispensable verificar que la cepa PEC-601 no produzca dextranasa extracelular, ni presente crecimiento en acetamida.

Para transformar PEC-601 con el banco genético de *P. lilacinus* 6R, se sugiere la metodología de Mohr y Esser (1990) (ver tabla 2), utilizando como medio de selección CM adicionado con acetamida 10 mM (Wernars et al, 1986).

Deben efectuarse entonces plaqueos sucesivos de las transformantes amdS+ en CM-acetamida, hasta obtener estabilidad colonial. Las transformantes estables se cultivan en medio de dextrana-azul 2000 (Pharmacia) (Gálvez, 1992). En dicho medio, las cepas dextranolíticas producen un halo de decoloración alrededor de la colonia.

Las cepas transformantes productoras de dextranasa se someten a pruebas de cultivo en medio líquido, en matraz agitado (ver sección 6.4).

6.3 RECUPERACION DE PLASMIDOS

Para recuperar los insertos que contienen p3SR2 y el gen de dextranasa, se seguirá la siguiente estrategia:

a) Aislamiento del DNA genómico de las transformantes amdS+/dextranasas+, siguiendo la metodología de Mohr y Esser (1990).

b) Digestión del DNA purificado con Sall, y recuperación de los fragmentos de entre 10 y 18 Kb.

c) Transformación de *E. coli* k12-MH1 (Amp-s) y selección de las transformantes Amp-r. Propagación.

d) Separación de plásmidos en gel de agarosa.

En los incisos b), c) y d) se seguirá la metodología estandar (Maniatis et al, 1982).

Los plásmidos recuperados se utilizarán para transformar nuevamente a la cepa , y verificar la expresión de dextranasa en las transformantes.

Asimismo, los fragmentos recuperados de DNA genómico de *P. lilacinus* 6R permitirían aislar y caracterizar el gen de dextranasa.

6.4 ENSAYOS DE PRODUCCION DE DEXTRANASA Y PECTINASA EN MEDIO LIQUIDO

Una vez seleccionadas las transformantes dextranolíticas que presenten den placa los mayores halos de decoloración en medio de dextrana azul, se verificará la producción de dextranasa extracelular en cultivo sumergido en el medio optimizado de

Kosaric (Gálvez y López-Munguía, 1991).

Las cepas transformantes podrían utilizarse para producir dextranasa, pectinasa o ambas enzimas, y mediante mutagénesis generar cepas mutantes que produjeran preferentemente dextranasa a mayores concentraciones (ver Ward, 1991).

En el terreno de la investigación básica, una cepa con dichas características permitiría el estudio de dos sistemas inducibles de polisacaridas.

Se buscaría establecer por ejemplo un modelo de "competencia secretora" en el cual se investigarían las relaciones de producción de dextranasa y pectinasa en medios de cultivo que incluyeran inductores para ambas enzimas. De esa manera, utilizando medios con pectina, dextrana, o ambos sustratos en diferentes composiciones, se podrían establecer algunas bases estequiométricas de la secreción en *Aspergillus*.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Considerando la literatura consultada para la elaboración de la presente revisión, resulta evidente que durante los próximos años, las técnicas de DNA recombinante tendrán un creciente impacto en todas las áreas de la micología básica e industrial.

Hasta el momento, existen las metodologías básicas para la transformación de *Aspergillus* y otros hongos filamentosos, y para la producción de transformantes estables, en las cuales se puede manipular la producción de proteínas específicas mediante el incremento del número de copias del gen, la interrupción o reemplazo de genes, y la expresión bajo control de regiones promotoras de funcionamiento conocido.

Sin embargo, con excepción de algunos sistemas establecidos, la producción de proteínas recombinantes en *Aspergillus* no ha alcanzado los niveles esperados. En algunos casos, ha sido necesaria la aplicación de procedimientos de genética clásica para incrementar los rendimientos de producto de cepas transformadas. Es de esperarse que esta combinación de técnicas se siga utilizando, mientras no se alcance un conocimiento mayor de los mecanismos que regulan la expresión a nivel molecular.

Las principales limitantes de la producción eficiente de proteínas heterólogas en *Aspergillus* son, la producción simultánea de proteasas, y en algunos casos, las modificaciones postraduccionales anormales.

La caracterización genética de cepas industriales, hiperproductoras de enzimas extracelulares, puede aportar algunas de las claves que permitan el mejoramiento y transformación genética de cepas, orientados a la aplicación biotecnológica.

Asimismo, será determinante el estudio de los sistemas enzimáticos involucrados en la modificación postraducciona, tales como las glicosil-transferasas y las proteasas específicas de hongos filamentosos.

Es indudable que los hongos filamentosos, y en particular los del género *Aspergillus*, constituyen buenos sistemas de expresión y secreción, y son los candidatos ideales para la producción de glicoproteínas complejas de mamíferos, de gran importancia terapéutica, y para el estudio y producción de enzimas y metabolitos secundarios de importancia económica.

Resulta importante destacar que existe una clara tendencia a investigar y generar conocimientos básicos a partir de proyectos orientados a la aplicación biotecnológica. Así, por ejemplo los mecanismos celulares y moleculares de la secreción en *Aspergillus*, están siendo estudiados por grupos de investigación asociados a empresas biotecnológicas.

Aún cuando existen sistemas de transformación para diferentes especies de hongos filamentosos (*Podospora*, *Trichoderma*, *Penicillium*, etc.), la mayor parte de los avances sobre regulación genética y estructura genómica, se han generado en los

modelos de *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*.

A medida que se conozca mejor el genoma de los hongos filamentosos, y se establezcan homología entre los genes estructurales y reguladores de diferentes especies, se harán posibles aplicaciones más ambiciosas en las áreas de biotecnología, fitopatología y biomedicina.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Aguirre, J.; Adams, T.H.; Timberlake, W.E. (1990) Spatial control developmental regulatory genes in *A.nidulans*. Exp. Mycol. 14, 290-293.
2. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (1990). Molecular Biology of the Cell. 2nd ed. Garland Pub. U.S.A.
3. Archer, D.B.; Jeenes, D.J.; MacKenzie, D.A., et al. (1990) Hen egg white lysozyme from *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. Biotechnology 8, 741-745.
4. Ballance, D.J. (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. Yeast 2, 229-236.
5. Ballance, D.J. (1991). Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. En: Molecular Industrial Mycology. Leong, S.A. y Berka R.M. eds. Marcel Dekker Inc. U.S.A.
6. Ballance, D.J.; Buxton, F.P.; Turner, G. (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 284-289.
7. Ballance, D.J. y Turner, G. (1985). Development of a high frequency transformation vector for *Aspergillus nidulans*. Gene 36, 321-331.
8. Ballance, D.J. y Turner, G. (1986). Gene cloning in *Aspergillus nidulans*: Isolation of the isocitrate lyase gene (AcuD). Mol. Gen. Genet. 202, 271-275.
9. Barbesgaard, P.; Heldt-Hansen, H.P.; Diderichsen, B. (1992). On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl. Microbiol. Technol. 36, 569-572.
10. van den Berg, J.A.; van der Laken, K.J.; van Ooyen, A.J.J. et al. (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. Biotechnology 8, 135-140.
11. Beggs, J.D.; van den Berg, J.A.; van Ooyen A.; Weissmann, C. (1980). Abnormal expression of chromosomal rabbit β -globin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 283, 835-840.
12. Berka, R.M. y Barnett, C.C. (1989). The development of gene expression systems for filamentous fungi. Biotech. Adv. 7, 127-154.
13. Berka, R.M.; Dunn-Coleman, N.; Ward, M. (1992). Industrial enzymes from *Aspergillus* species. En: *Aspergillus*: Biology and Industrial applications. Bennett,

J.W. y Klich, M.A. eds. Butterworth-Heinemann. U.S.A.

14. Berse, B.; Dmochowska, A.; Skrzypek, M. et al (1983). Cloning and characterization of the ornithine carbamoyl transferase gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene* 25, 109-117.
15. Bos, C.J.; Debets, A.J.M.; Swart, K. et al (1988). Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.* 14, 437-443.
16. Boschloo, J.C.; Paffen, A.; Koot, T. et al (1990). Genetic analysis of benzoate metabolism in *Aspergillus niger*. *Appl. Microb. Biotechnol.* 34, 225-228.
17. Buxton, F.P.; Gwynne, D.I. Davies, R.W. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *A. nidulans*. *Gene* 37, 207-214.
18. Buxton, F.P.; Radford, A. (1983). Cloning of the structural gene of orotidine-5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 190, 403-405.
19. Christensen, T.; Woeldike, H.; Boel, E. et al. (1988) High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology* 6, 1419-1422.
20. Contreras, R.; Carrez, D.; Kinghorn, J.R. et al (1991). Efficient KEX-2 like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. *Biotechnology* 9, 378-381.
21. Cullen, D.; Leong, S. (1986). Recent advances in the molecular genetics of industrial filamentous fungi. *Tibtech.* Nov. 285-287.
22. Cullen, D.; Gray, G.L.; Wilson, L.J. et al. (1987). Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology* 5, 369-377.
23. Cullen, D.; Leong, S.A.; Wilson, L.J. y Henner, D.J. (1987). Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, *hph*. *Gene* 57, 21-26.
24. Cullen, D.; Gray, G.L.; Berka, R.M. (1988). Molecular cloning vectors for *Aspergillus* and *Neurospora*. En: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodriguez, R.L. y Denhardt, D.T. eds. Butterworths. U.S.A.
25. Davies, R.W. (1991). Molecular Biology of a high level recombinant protein production system in *Aspergillus*. En: *Molecular Industrial Mycology*. Leong, S.A. y Berka R.M. eds. Marcel Dekker Inc. U.S.A.

26. Davis, D.B. y Tai, P. (1980). The mechanism of protein secretion across membranes. *Nature* 283, 433-437.
27. Davis, M.A.; Cobbett, C.S. y Hynes, M.J. (1988). An amdS-lacZ fusion for studying gene regulation in *Aspergillus*. *Gene* 63, 199-212.
28. Davis, M.A. y Hynes, M.J. (1989). Regulatory Genes in *Aspergillus nidulans*. *TIG* 5.
29. Deacon, J.W. (1984). *Introductory Mycology*. Blackwell Scientific, U.K.
30. Debets, A.J.M.; Swart, K.; Holub, E.F., et al. (1990). Genetic analysis of amdS transformants of *Aspergillus niger* and their use in chromosome mapping. *Mol. Gen. Genet* 222, 284-290.
31. Devchand, M.; Gwynne, D.; Buxton, F.P. y Davies, R.W. (1988). An efficient cell-free translation system from *Aspergillus nidulans* and in vitro translocation of prepro- α -factor across *Aspergillus* microsomes. *Curr. Genet.* 14, 561-566.
32. Devchand, M.; Williams, S.A.; Johnstone, J.A., et al. (1989). Expression System from *Aspergillus nidulans*. En: *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*. Hershberger, C.; Queener, S.W. y Hegeman, G. eds. American Society for Microbiology. U.S.A.
33. Esser, K. y Mohr, G. (1986). Integrative transformation of filamentous fungi with respect to biotechnological application. *Process Biochemistry* Oct., 153-159.
34. Fincham, J.R.S. (1989). Transformation in fungi. *Microbiological Reviews* Mar., 148-170.
35. Finkelstein, D.B.; Rambosek, J.; Crawford, M.S., et al. Protein Secretion in *Aspergillus niger*. En: *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*. Hershberger, C.; Queener, S.W. y Hegeman, G. eds. American Society for Microbiology. U.S.A.
36. Gálvez, A. (1992). Establecimiento de un sistema de producción y aplicación de dextranasas. Tesis para obtener el grado de doctor en biotecnología. UNAM, México.
37. Gálvez, A. y López Munguía, A. (1991). Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paeclilomyces lilacinus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 327-331.
38. Gems, D.; Johnstone, I.L. y Clutterbuck, A.J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98, 61-67.
39. Godfrey, T. y Reichelt, J. (1983). *Industrial enzymology. The applications of enzymes in industry*. The Nature Press.

40. Gomi, K.; Limura, Y. y Hara S. (1987). Integrative Transformation of *Aspergillus oryzae* with plasmid containing the *Aspergillus nidulans* argB gene. Agric. Biol. Chem. 51, 2549-2555.
41. Goosen, T.; Bloemheugel, G.; Cysler, C., et al. (1987). Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5'-phosphate-decarboxylase gene. Curr. Genet. 11, 499-504.
42. Goosen, T.; Van Engelenburg, F.; Debets, F., et al. (1989). Tryptophan auxotrophic mutants in *Aspergillus niger*: inactivation of the trpC gene by cotransformation mutagenesis. Mol. Gen. Genet. 219, 282-288.
43. Goosen, T.; Bos, C.J. y van den Broek, H. (1991). Transformation and gene manipulation in filamentous fungi: an overview. En: Industrial Mycology.
44. van Gorcom, R.F.M.; Pouwels, P.H.; Goosen, T., et al. (1985). Expression of an *Escherichia coli* β -galactosidase fusion gene in *Aspergillus nidulans*. Gene 40, 99-106.
45. van Gorcom, R.F.M.; Punt, P.J.; Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1986). A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. Gene 48, 211-217.
46. van Gorcom R.F.M. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1988). Expression analysis vectors for *Aspergillus niger*. Nucleic Acid Res. 16, 9052.
47. Gwynne, D.I.; Buxton, F.P.; Williams, S.A., et al. (1987). Genetically Engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*. Biotechnology 5, 713-719.
48. Gwynne, D.I. y Devchand, M. (1992). Expression of foreign proteins in the genus *Aspergillus*. En: *Aspergillus: Biology and Industrial applications*. Bennett, J.W. y Klich, M.A. eds. Butterworth-Heinemann. U.S.A.
49. van Hartingsveldt, W; Mattern, I.E.; van Zeijl, C.L.J. et al. (1987) Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the pyrG gene. Mol. Gen. Genet. 206, 71-75.
50. Hinnen, A.; Hicks, J.B. y Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1929-1935
51. Honig, P. (1974). Principios de tecnologia azucarera. Tomo I. C.E.C.S.A. México, p. 38.
52. Hultin, E. y Nordstrom, L. (1949). Investigations on dextranase I. On the occurrence and assay of dextranase. Acta Chemica Scandinava 3, 1405.

53. Hynes, M.J.; Corrick, C.M.; King, J.A. (1983). Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1430-1439.
54. Hynes, M.J. (1986). Transformation of filamentous fungi. *Exp. Mycol* 10, 1-8.
55. Innis, M.A.; Holland, M.J.; McCabe, P.C. et al. (1985). Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus glucoamylase* by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 228, 21-26.
56. John, M.A. y Peberdy, J.F. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* using the *argB* gene. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 386-389.
57. Kelly, J.M.; Hynes M.J. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 4, 475-479.
58. Kitamoto, Y.; Nobuhiro, M.; Yamamoto, M. et al. (1988). A simple method for protoplast formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi, using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Appl. Microbiol. Technol.* 28, 445-450.
59. Klich, M.A. (1992). Selected media used for Aspergilli. En: *Aspergillus: Biology and Industrial applications*. Bennett, J.W. y Klich, M.A. eds. Butterworth-Heinemann. U.S.A.
60. Kos, A.; Kuijvenhoven, J.; Wernars, K. et al. (1985). Isolation and characterization of the *Aspergillus niger trpC* gene. *Gene* 39, 231-238.
61. Lewin, B. (1990) *Genes IV*. Oxford University Press-Cell Cambridge Press. U.K.
62. Lockington, R.A.; Sealy-Lewis, H.L.; Scazzocchio, C.; Davies, R.W. (1985). Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 33, 147-149.
63. Maniatis, T.; Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor N.Y. U.S.A.
64. Mattern, I.E.; Unkles, S.; Kinghorn, J.R. et al. (1987). Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrC* gene. *Mol. Gen. Genet.* 21, 460-461.
65. McKnight, G.L.; O'Hara, P.J. y Parker, M.L. (1986). Nucleotide sequence of the triosephosphate isomerase gene from *Aspergillus nidulans*: implications for a differential loss of introns. *Cell* 46, 143-147.
66. Mellor, J.; Dobson, M.A.; Roberts, M.F. et al. (1983).

Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 24, 1-14.

67. Miller, B.L.; Miller, K.Y. y Timberlake, W.E. (1985). Direct and indirect gene replacement in *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. 5, 1714-1721.

68. Minuth, W.; Tudzynski, P. y Esser, K. (1982). Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*. Curr. Genet. 5, 227-231.

69. Mohr, J.; Wilmanska, D. y Esser, K. (1989). Analysis of *Aspergillus niger* transformants for single site integration and vector recombination. Appl. Microb. Biotechnol. 32, 160-166.

70. Mohr, G. y Esser, K. (1990). Improved transformation frequency and heterologous promoter recognition in *Aspergillus niger*. Appl. Microb. Biotechnol. 34, 63-70.

71. Mullaney E.J.; Punt, P.J. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1988). DNA mediated transformation of *Aspergillus ficuum*. Appl. Microb. Biotechnol. 28, 451-454.

72. Oakley, B.R.; Reinhart, J.E.; Mitchell, B.L. et al. (1987). Cloning, mapping, and molecular analysis of the *pyrC* gene of *Aspergillus nidulans*. Gene 61, 385-399.

73. Orbach, M.J.; Porro, E.B.; Yanofsky, C. (1986). Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. Mol. Cell. Biol. 6, 2452-2461.

74. Payne, G.A.; Woloshuk, C.P. (1989). Transformation of *Aspergillus flavus* to study aflatoxin production. Mycopathologia 107, 139-144.

75. Peberdy, J.F. (1979). Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. Ann. Rev. Microbiol. 33, 21-39.

76. Pennica, D.; Holmes, W.E.; Kohr, W.E. et al. (1983). Cloning and expression of human tissue plasminogen activator cDNA in *E. coli*. Nature 301, 214-221.

77. Peñalva, M.A.; Vian, A.; Patiño, C. et al. (1989). Molecular Biology of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. En: Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. Hershberger, C.; Queener, S.W. y Hegeman, C. eds. American Society for Microbiology. U.S.A.

78. Perlman, D. y Halvorson, H.A. (1983). A putative signal peptidase recognition site in prokaryotic and eucaryotic signal peptides. J. Mol. Biol. 167: 391-409.

79. Priest, F.C. (1984). Extracellular Enzymes. American

Society for Microbiology.

80. Punt, P.J.; Oliver, R.P.; Dingemans, M.A. et al. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli* gene. 56, 117-124.
81. Radford, A.; Pope, S.; Saczi, A. et al. (1981). Liposome mediated genetic transformation of *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. 184, 567-569.
82. Ramón, D.; Carramolino, M.; Patiño, C. et al. (1987). Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the β -lactam ring in *Aspergillus nidulans*. Gene 57, 171-181.
83. Samac, D.A. y Leong, S.A. (1989). Mitochondrial plasmids of filamentous fungi: Characteristics and use in transformation vectors. Mol. Plant-Microbe Interact. 2, 155-159.
84. Samson, R.A. (1974). *Faecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Studies in Mycology No.6. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters.
85. Samson, R.A. (1992). Current Taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. En: *Aspergillus: Biology and Industrial applications*. Bennett, J.W. y Klich, M.A. eds. Butterworth-Heinemann. U.S.A.
86. Saunders, G.; Tuite, M.F.; Holt, G. (1986). Fungal cloning vectors. Tibtech, Abr, 93-98.
87. Saunders, G.; Pickett, T.M.; Tuite, M.F. y Ward, M. (1989). Tibtech 7, 283-287.
88. Schechtman, M.G. (1992). United States government regulations affecting *Aspergilli* and their products. En: *Aspergillus: Biology and Industrial applications*. Bennett, J.W. y Klich, M.A. eds. Butterworth-Heinemann. U.S.A.
89. Seip, E.R.; Woloshuk, C.P.; Payne, G.A. y Curtis, S.E. (1990). Isolation and sequence analysis of a β -tubulin gene from *Aspergillus flavus* and its use as a selectable marker. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3686-3692.
90. Singleton, P. y Sainsbury, D. (1987). Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. 2nd ed. J. Wiley & Sons.
91. Smith, R.A.; Duncan, M.J. y Moir, D.T. (1985). Heterologous protein secretion in yeast. Science, 229: 1219-1224.
92. Tilburn, J.; Scazzocchio, C.; Taylor, G.G. et al. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene 26, 205-221
93. Timberlake, W.E. y Marshall, M.A. (1988). Genetic

regulation of development in *Aspergillus nidulans*. TIC 4, 162-169.

94. Timberlake, W.E. y Marshall, M.A. (1989). Genetic engineering of filamentous fungi. Science 244, 1313-1317.

95. Trejo, S. (1989). Caracterización de cepas productoras de dextranasa. Tesis profesional. Biología. Facultad de Ciencias UNAM México.

96. Tuite, M.F. (1991). Expression of heterologous genes. En: *Saccharomyces*. Tuite, M.F. y Oliver, S.G. eds. Plenum press. U.S.A.

97. Turnbull, I.F.; Rand, K.; Willets, N.S. y Hynes, M.J. (1989). Expression of the *Escherichia coli* enterotoxin subunit B gene in *Aspergillus nidulans* directed by the amdS promoter. Biotechnology 7, 169-174.

98. Turnbull, I.F.; Smith, D.R.J.; Sharp, P.J. et al. (1990). Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick *Boophilus microplus*, by using the fungal amdS promoter system. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2847-2852.

99. Turner, G. y Ballance, J.D. (1985). Cloning and transformation in *Aspergillus*. En: Gene manipulations in fungi. Academic Press.

100. Upshall, A. (1986). Genetic and molecular characterization of argB positive transformants of *Aspergillus nidulans*. Curr. Genet. 10, 593-600.

101. Upshall, A. (1986)b. Filamentous fungi in biotechnology. Biotechniques 4, 158-166.

102. Upshall, A.; Kumar, A.A.; Bailey, M.C. et al. (1987). Secretion of active tissue plasminogen activator from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Biotechnology 5, 1301-1304.

103. Upshall, A.; Kumar, A.A.; Kaushansky, K. y McNight, G.L. (1991). Molecular manipulation of and heterologous expression from filamentous fungi. En: Molecular Industrial Mycology. Leong, S.A. y Berka R.M. eds. Marcel Dekker Inc. U.S.A.

104. Ward, O.P. (1985). Hydrolytic Enzymes. En: Comprehensive Biotechnology, vol. 3. Ed. M. Moo-Young. Pergamon Press.

105. Ward, M.; Wilkinson, B. y Turner, G. (1986). Transformation of *Aspergillus nidulans* with a cloned oligomycin resistant ATP-synthetase subunit 9 gene. Mol. Gen. Genet. 202, 265-270.

106. Ward, M. (1989). Production of calf chymosin by *Aspergillus awamori*. En: Genetics and Molecular Biology of

Industrial Microorganisms. Hershberger, G.; Queener, S.W. y Hegeman, G. eds. American Society for Microbiology. U.S.A.

107. Ward, M. (1991). *Aspergillus* and other filamentous fungi as genetic systems. En: Modern Microbial Genetics. Wiley-Liss.

108. Ward, M. (1991)b. Chymosin production in *Aspergillus*. En: Molecular Industrial Mycology. Leong, S.A. y Berka R.M. eds. Marcel Dekker Inc. U.S.A.

109. Ward, M.; Wilson, L.J.; Carmona, C.L. y Turner, G. (1991). The *OliC3* gene of *Aspergillus niger*: Isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. *Curr. Genet.* 14, 37-42.

110. Ward, M.; Wilson, L.J. et al. (1990). Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Biotechnology* 8, 435-440.

111. Webster, J. (1981) Introduction to Fungi. 2nd ed. Cambridge University Press. U.K.

112. Wernars, K.; Goosen, T.; Wennekes, B.M.J. et al. (1985) Gene amplification in *Aspergillus nidulans* by transformations with vectors containing the *amdS* gene. *Curr. Genet.* 9, 361-368.

113. Wernars, K.; Goosen, T.; Swart, K. y van den Broek, H.W.J. (1986) Genetic analysis of *Aspergillus nidulans amdS* positive transformants. *Mol. Gen. Genet.* 205, 312-317.

114. Wernars, K.; Goosen, T.; Wennekes, B.M.J. et al. (1987) Cotransformation of *Aspergillus nidulans*: a tool for replacing fungal genes. *Mol. Gen. Genet.* 209, 71-77.

115. Woloshuk, C.P.; Seip, E.R.; Payne, G.A. y Adkins, C.R. (1989). Genetic transformation system for the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 86-90.

116. Yelton, M.M.; Hamer, J.E. et al. (1983) Developmental regulation of the *Aspergillus nidulans trpC* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 7576-7580.

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

118. Yelton, M.M.; Timberlake, W.E. y van den Hondel C.A.M.J.J. (1985) A cosmid for selecting genes by complementation in *Aspergillus nidulans*: selection of the developmentally regulated *yA* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 834-838.