

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultat de Ciències Biològiques

Modificaci3n genètica del Ascomycete
Aspergillus terreus.



TESIS DOCTORAL
M^a Luisa Ventura Montoliu
València, 1996

UMI Number: U607694

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607694

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

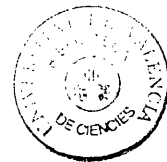
Nº EXP. 9228
DATA 6.8.96

SIGNATURA
418.T.D

Nº LIBIS: 120641977

→ Biología

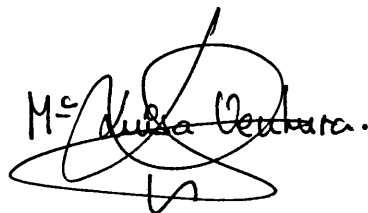
30 cms.



Modificación genética del Ascomycete

Aspergillus terreus.

Trabajo presentado por María Luisa Ventura Montoliu, Licenciada en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València.



M.^a Luisa Ventura.

València, Mayo de 1996

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Dirección postal: Apartado de Correos 73 - 46100 Burjassot. Valencia

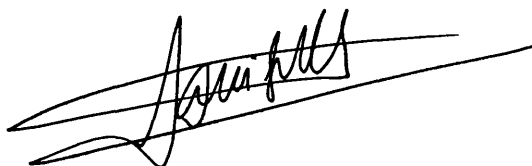
Domicilio social: Polígono La Coma, s/n - 46980 Paterna. Valencia

Teléfono: 34 (9)6 390 00 22 - Telefax: 34 (9)6 363 63 01

DANIEL RAMÓN VIDAL, Investigador Científico del C.S.I.C.
con destino en el Departamento de Biotecnología del Instituto de
Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC).

Hace constar que el presente trabajo ha sido realizado bajo su
dirección por la Licenciada en Ciencias Biológicas María Luisa Ventura
Montoliu en el Departamento de Biotecnología del Instituto de
Agroquímica y Tecnología de los Alimentos.

València, Mayo de 1996

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Daniel Vidal', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Dr. Daniel Ramón Vidal

A Fernando
A mis padres

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de algún modo han contribuido a la realización de este trabajo.

A Daniel Ramón por hacer posible esta tesis, por su apoyo constante y por todo lo que me ha enseñado.

A Agustí Flors, director de la antigua Unidad de Bioingeniería de Alimentos por haber permitido la realización de este trabajo y por su interés a lo largo de estos años.

A José Antonio Pérez por su participación en el trabajo relacionado con la OTCasa. A Luís González por su colaboración en la parte de glucoamilasa, y por su ayuda con el ordenador. A los dos por escucharme siempre que les he necesitado.

Al Dr Vicente Rubio por su ayuda en el tema de OTCasa y por facilitarnos el material necesario para determinar dicha actividad.

A Silvia Bort, becaria de iniciación a la investigación del CSIC, que participó en la clonación y secuenciación del gen *arg1*.

A Pepe Sendra por su interés en solucionar los problemas que me ha dado el ordenador durante la escritura de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, a los presentes y a los ausentes, especialmente a "las chicas", por tantas horas (y fiambreras) compartidas y por crear un ambiente de trabajo excepcional que sólo se consigue entre amigos.

A los compañeros de los distintos laboratorios del Departamento de Biotecnología, y al grupo de plantas del antiguo IATA por prestar su ayuda cuando fue necesaria. A Quico por su ayuda con las fotos y la bibliografía y sobre todo por su buen humor.

A Mariángeles por su cariño, sus consejos y por seguir estando tan cerca.

A Ana y Pepa por tantos años de amistad, por su apoyo en los malos momentos y por todos los buenos ratos.

A Espe, Marilén, Javi, Mariano, Carmina, Concha y todos los amigos que me animaron a seguir.

A mis padres, por su gran esfuerzo y comprensión, a Santi, a Juan y Rosa y a toda mi familia por su apoyo e interés durante todo este tiempo.

A Fernando, porque esta tesis es también la suya, por su ayuda y ánimo constantes y por soportar con paciencia todo el tiempo que he dedicado a este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología ALI90-0842 y ALI93-0809.

LISTA DE ABREVIATURAS

3AT	3-amino-1,2,4-triazol
A	Adenina
aa	aminoácido
alm	almidón
amd	acetamida
arg	arginina
ARS	Secuencia de replicación autónoma
ATCasa	Aspartato transcarbamilasa
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Citosina
cDNA	DNA copia
CECT	Colección española de cultivos tipo
cit	citrulina
CMI	concentración mínima inhibitoria
Da	Dalton
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Trifosfatos de desoxinucleósidos
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad
G	Guanina
GLA	Glucoamilasa
glc	glucosa
h	hora(s)
HmB	Higromicina B
kb	Mil pares de bases
mal	maltosa
min	minuto(s)
mRNA	RNA mensajero

nt	nucleótido(s)
orn	ornitina
OTCasa	Ornitina transcarbamilasa
p/v	Relación peso/volumen
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilén glicol
pp	páginas
Pu	Purina
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
S	C o G
SDS	Dodecil sulfato sódico
seg	segundos
T	Timina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidades
ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
wt	Cepa silvestre
X-Gal	5-cloro-4-bromo-3-indolil- β -D-galactopiranosido
xil	xilosa
Y	C o T

Los aminoácidos se abrevian según el código de una o tres letras recomendado por la IUB-IUPAC.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.

1. LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS.	1
1.1. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN.	1
1.1.1. Transformación de protoplastos.	2
1.1.2. Métodos de transformación alternativos al empleo de protoplastos.	4
1.2. SISTEMAS DE SELECCIÓN DE LOS CLONES TRANSFORMANTES.	5
1.2.1. Resistencia a inhibidores del crecimiento.	6
1.2.2. La resistencia a higromicina B: un marcador de selección de uso generalizado en hongos filamentosos.	7
1.2.3. Complementación de auxotrofías.	10
1.2.4. La complementación de mutantes en ornitina transcarbamilasa: un marcador común en hongos filamentosos.	11
1.2.5. Sistemas basados en la utilización de acetamida.	15
1.2.6. Marcadores seleccionables bidireccionalmente.	15
1.3. DESTINO MOLECULAR DEL DNA TRANSFORMANTE.	17
1.3.1. Integración del DNA transformante en el genoma del hongo.	17
1.3.2. Sistemas de replicación autónoma.	19
2. LAS GLUCOAMILASAS FÚNGICAS.	23
2.1. GENERALIDADES.	25
2.2. CLONACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN GLUCOAMILASAS: ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS GLUCOAMILASAS FÚNGICAS.	27
2.2.1. El dominio catalítico.	29
2.2.2. Dominio de unión al almidón.	30
2.2.3. Región altamente glicosilada.	31
2.2.4. Clasificación de las glucoamilasas.	33
2.3. REGULACIÓN EN HONGOS FILAMENTOSOS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN GLUCOAMILASAS.	34
2.4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS GENES FÚNGICOS	

QUE CODIFICAN GLUCOAMILASAS.	36
2.4.1. Sobreproducción de glucoamilasa.	36
2.4.2. Producción de proteínas heterólogas bajo el control de promotores de genes de glucoamilasas.	37
2.4.3. Expresión de genes fúngicos que codifican glucoamilasas en levaduras.	38
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	40
 MATERIALES Y MÉTODOS.	
1. MICROORGANISMOS.	43
1.1. Bacterias.	43
1.2. Hongos filamentosos.	43
2. PLÁSMIDOS.	43
3. MEDIOS DE CULTIVO.	44
4. TAMPONES Y SOLUCIONES.	47
5. OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS.	49
6. PRODUCTOS.	50
7. CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.	50
8. MUTAGÉNESIS DE <i>A. terreus</i> .	50
9. OBTENCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS DE <i>A. nidulans</i> y <i>A. terreus</i> .	51
10. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> .	52
11. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO.	52
12. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.	52
13. EXTRACCIÓN DE RNA DE <i>A. terreus</i> .	53
14. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA.	54
15. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA.	54
16. CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE <i>A. terreus</i> .	55
17. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	55

18. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	55
19. SECUENCIACIÓN DEL DNA.	56
20. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	57
21. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.	57
22. DETERMINACIÓN DE PESO SECO.	58

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN PARA	
<i>Aspergillus terreus</i>.	59
1.1. SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN POR RESISTENCIA A HmB.	59
1.1.1. Resistencia de la cepa silvestre de <i>A. terreus</i> a la HmB.	59
1.1.2. Transformación de protoplastos.	59
1.1.3. Análisis molecular de los transformantes.	60
1.1.4. Estabilidad mitótica de los transformantes.	65
1.1.5. Nivel de resistencia de los transformantes.	65
1.1.6. Producción de enzimas por los transformantes.	67
1.2. SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN POR COMPLEMENTACIÓN	
DE UN MUTANTE DE <i>A. terreus</i> CON EL ALELO SILVESTRE DEL	
GEN <i>argB</i> DE <i>A. nidulans</i> .	67
1.2.1. Aislamiento y caracterización de un mutante de <i>A. terreus</i>	
deficiente en OTCasa.	68
1.2.2. Transformación heteróloga del mutante <i>A. terreus arg1</i>	
con el gen <i>argB</i> de <i>A. nidulans</i> .	71
1.2.3. Análisis molecular de los transformantes.	75
1.2.4. Estabilidad mitótica de los transformantes.	76
1.2.5. Producción de enzimas por los transformantes.	76
1.3. CLONACIÓN DEL GEN <i>arg1</i> DE <i>A. terreus</i> .	79
1.3.1. Clonación del gen <i>arg1</i> de <i>A. terreus</i> .	79
1.3.2. Secuenciación del gen <i>arg1</i> .	81
1.3.3. Estructura primaria de la OTCasa de <i>A. terreus</i> .	84

1.3.4. Expresión del gen <i>arg1</i> de <i>A. terreus</i> en <i>A. nidulans</i> .	90
1.3.5. Estudios previos sobre la regulación del gen <i>arg1</i> .	90
1.4. SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN POR COMPLEMENTACIÓN HOMÓLOGA DEL MUTANTE EN OTCasa DE <i>A. terreus</i> .	99
2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>gla1</i> DE <i>Aspergillus terreus</i>.	101
2.1. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE UN GEN DE <i>A. terreus</i> . HOMÓLOGO AL GEN <i>glaA</i> DE <i>A. niger</i> .	101
2.1.1. Clonación del gen <i>gla1</i> de <i>A. terreus</i> .	101
2.1.2. Secuenciación del gen <i>gla1</i> .	106
2.1.3. Estructura primaria de la glucoamilasa de <i>A. terreus</i> .	109
2.1.4. Estudios previos sobre la regulación de la expresión del gen <i>gla1</i> .	117
2.2. SOBREPDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA GLA1 DE <i>A. terreus</i> .	125
2.2.1. Sobreproducción de la proteína GLA1 en <i>A. terreus</i> .	125
2.2.2. Expresión del gen <i>gla1</i> en <i>A. nidulans</i> .	127
CONCLUSIONES.	133
BIBLIOGRAFÍA.	135

INTRODUCCIÓN.

1. LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS.

El avance en el conocimiento de la biología de los organismos está directamente relacionado con la aplicación de técnicas genéticas. En este sentido, una de las más eficaces es la transformación. Los primeros organismos transformados fueron especies bacterianas, aunque pronto se pensó en el potencial que supondría la aplicación de estas técnicas a otros sistemas de mayor complejidad. La primera transformación genética de una especie fúngica se llevó a cabo en *Neurospora crassa* (Mishra y Tatum, 1973). Este logro fue recibido con escepticismo por la comunidad científica, ya que en aquel momento se pensaba que la transformación de un eucariota era, si no difícil, imposible. El procedimiento no era reproducible y no se disponía de técnicas para demostrar de manera inequívoca la presencia de DNA exógeno dentro de las células receptoras. Un avance considerable fue la transformación de protoplastos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen *et al.*, 1978; Beggs, 1978). Posteriormente, la transformación de protoplastos se extendió al grupo de los hongos filamentosos desarrollándose protocolos para *N. crassa* (Case *et al.*, 1979), y *Aspergillus nidulans* (Ballance *et al.*, 1983; Tilburn *et al.*, 1983; Yelton *et al.*, 1984). En la actualidad las técnicas de transformación en hongos filamentosos están muy extendidas y se han aplicado a una gran variedad de especies.

1.1. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN.

La transformación genética de un organismo requiere que éste incorpore y exprese un DNA exógeno que confiera una ventaja selectiva a las células que lo han recibido. Las células que son capaces de incorporar DNA exógeno se denominan competentes. Algunas bacterias como *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae* presentan un estado fisiológico natural de competencia (Santos, 1983). En otros microorganismos como *Escherichia coli* (Hanahan, 1983) o *S. cerevisiae* (Beggs, 1978; Hinnen *et*



al., 1978) este estado debe inducirse artificialmente. Los hongos filamentosos no presentan un estado de competencia natural, de forma que ésta se consigue de artificialmente mediante la obtención de protoplastos, el tratamiento con iones alcalinos o la electroporación.

1.1.1. Transformación de protoplastos.

Un protoplasto es una célula viva a la que se le ha eliminado la pared celular. Cuando conservan restos de pared se denominan esferoplastos. Se han obtenido protoplastos de muchas especies de hongos filamentosos utilizando enzimas que degradan los distintos componentes de la pared celular (Davis, 1985). En la mayoría de los casos estas enzimas se han purificado a partir de microorganismos, incluyendo los propios hongos filamentosos, como es el caso de las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Hamlyn *et al.*, 1981). Los protoplastos se pueden generar tanto a partir de micelio joven como de esporas (Bos *et al.*, 1983). Los primeros son con frecuencia multinucleados mientras que los procedentes de esporas son generalmente uninucleados. Esta última característica es deseable en los experimentos de recombinación, ya que la presencia de más de un núcleo puede dificultar la interpretación de los resultados. A pesar de ello, y debido a la resistencia de la pared celular de los conidios a la acción enzimática, está más extendida la obtención de protoplastos a partir de micelio.

Para obtener transformantes utilizando protoplastos fúngicos se pueden seguir distintos protocolos que se comentan a continuación.

a) Transformación mediada por polietilén glicol (PEG). Es el sistema más tradicional, y se basa en las técnicas de fusión de protoplastos. Para llevar a cabo la transformación, los protoplastos se incuban durante un tiempo variable con soluciones que contienen CaCl_2 , PEG y el DNA transformante. Posteriormente los protoplastos se siembran en placas con un medio adecuado que permita la selección de los clones transformantes. El mecanismo por el que el tratamiento con CaCl_2 y PEG facilita la entrada del DNA es desconocido, aunque algunos autores sugieren que el calcio permite la unión del DNA a los protoplastos mediante la compensación de la repulsión entre cargas negativas. La adición posterior de PEG induce la fusión de

membranas adyacentes y las moléculas de DNA se internan en la célula durante esta fusión (Hinnen, 1985). Otros sugieren que las concentraciones de PEG relativamente altas en combinación con los cationes divalentes producen partículas de DNA precipitado que penetran en los protoplastos (Maas y Werr, 1989).

b) Transformación mediada por liposomas. En 1981, Radford y colaboradores desarrollaron un método alternativo para transformar *N. crassa*. En este sistema el DNA se encapsula en liposomas y se induce su fusión con los protoplastos. La comparación de las frecuencias de transformación obtenidas con DNA desnudo y con DNA encapsulado en liposomas indica que la eficacia del segundo método es mayor, pero no lo suficiente como para justificar el trabajo adicional que supone la preparación de liposomas.

c) Transformación por electroporación. La electroporación es un proceso físico que, de modo transitorio, hace permeables las membranas biológicas a distintas macromoléculas (nucleótidos, proteínas, carbohidratos, colorantes, partículas víricas y moléculas de DNA o RNA), mediante la aplicación de un campo eléctrico de corta duración. Es una técnica rápida y reproducible que evita el uso de reactivos químicos como el PEG o el acetato de litio que pueden ser tóxicos para las células. Con su desarrollo se posibilita la transformación de especies fúngicas que no se podían transformar por otros métodos (Richey *et al.*, 1989).

Con este sistema se ha transferido DNA a células animales (Stopper *et al.*, 1985), protoplastos vegetales (Riggs y Bates, 1986), levaduras (Hashimoto *et al.*, 1985; Karube *et al.*, 1985) y bacterias (Fiedler y Wirth, 1988; Miller *et al.*, 1988). La aplicación de esta técnica al grupo microbiano de los hongos filamentosos es más reciente y los resultados obtenidos han sido dispares. Richey y colaboradores (1989) transformaron protoplastos de *A. nidulans* y *Fusarium solani* y obtuvieron frecuencias de transformación menores a las obtenidas con PEG y CaCl₂. Chakraborty y Kapoor (1990) transformaron conidios en germinación de *N. crassa* y *Penicillium urticae* obteniendo frecuencias de transformación muy elevadas. Ozeki y colaboradores (1994) transformaron conidios de *Aspergillus niger* y las frecuencias obtenidas fueron ligeramente más bajas que las obtenidas con protoplastos y PEG. Asimismo,

Goldman y colaboradores (1990) transformaron esferoplastos de *T. harzianum*, con una frecuencia de transformación similar a la obtenida con el método tradicional, pero, en contraste, todos los transformantes obtenidos fueron estables.

1.1.2. Métodos de transformación alternativos al empleo de protoplastos.

La obtención de protoplastos es un proceso laborioso ya que debe determinarse el tiempo óptimo de incubación para cada lote de enzima y seguir en cada experimento la degradación de la pared celular. Por ello se han desarrollado otros métodos alternativos de transformación que se detallan a continuación.

a) Transformación inducida por iones alcalinos. En este método se utilizan altas concentraciones de iones metálicos alcalinos para inducir en células intactas la permeabilidad al DNA. No se conoce la manera exacta en que estos iones pueden facilitar la entrada del DNA al interior de la célula.

Imura y colaboradores (1983) usaron CaCl_2 0.2 M para transformar células de levadura y obtuvieron frecuencias de transformación ligeramente superiores a las obtenidas con protoplastos. Ito y colaboradores (1983) transformaron células de levadura mediante tratamiento con varios cationes (Li, Cs, Rb, K y Na) y encontraron que el acetato de litio 0.1 M producía las frecuencias de transformación más elevadas. Este procedimiento también se ha utilizado con éxito en *N. crassa* (Dhawale *et al.*, 1984) y *Ustilago violacea* (Bej y Perlin, 1989). En ambos casos se incubaron conidios en germinación junto al DNA transformante en presencia de dicha sal. Las frecuencias de transformación obtenidas fueron significativas. La ventaja de este método radica en su sencillez pero los resultados pueden ser muy variables.

b) Transformación biolística. La metodología de transformación biolística fue desarrollada por Sanford y colaboradores en 1987 para introducir ácidos nucleicos a través de la pared intacta de células vegetales. Las células son bombardeadas con microproyectiles metálicos recubiertos de ácidos nucleicos que pueden llegar a transformarlas de forma estable o transitoria.

Con este método se han transformado gran variedad de tejidos de distintas especies de plantas (Klein, *et al.*, 1988a, b), incluyendo especies que

con otros métodos eran difíciles de transformar (Gordon-Kamm *et al.*, 1990; McCabe *et al.*, 1988). También se ha utilizado con éxito en células animales (Williams *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1990), lo cual ha llevado a especular sobre su uso en la producción de anticuerpos y en terapia génica (Sanford, 1990). Este procedimiento hizo posible la transformación de orgánulos subcelulares como mitocondrias (Johnston *et al.*, 1988; Fox *et al.*, 1988) y cloroplastos (Boynnton *et al.*, 1988; Daniell *et al.*, 1990). De la misma manera se han transformado especies microbianas, incluyendo bacterias (Shark *et al.*, 1991), levaduras y hongos filamentosos (Armaleo *et al.*, 1990).

Aunque en el grupo de los hongos filamentosos esta técnica no se usa de manera rutinaria, su aplicación ha servido para transformar especies refractarias a las técnicas citadas anteriormente (Hilber *et al.*, 1994). Se ha utilizado en *T. harzianum* y *Gliocladium virens*, obteniéndose mayores frecuencias de transformación y transformantes más estables que utilizando protoplastos (Lorito *et al.*, 1993). Sin embargo en *N. crassa* este sistema fue menos eficaz (Armaleo *et al.*, 1990).

La transformación biolística es una técnica reproducible de aplicación muy simple ya que los tejidos o las células a transformar no necesitan ningún tratamiento previo. Esta característica hace la técnica atractiva para su aplicación en el grupo de los hongos filamentosos ya que evita la formación de protoplastos con el consiguiente ahorro de tiempo.

1.2. SISTEMAS DE SELECCIÓN DE LOS CLONES TRANSFORMANTES.

Cualquier sistema de transformación necesita un sistema de selección adecuado que permita distinguir las células que han incorporado el DNA transformante de las que no lo han hecho. El sistema de selección depende del vector utilizado en la transformación, ya que éste debe incluir un gen que codifique la característica fenotípica a seleccionar. Dependiendo del marcador selectivo incluido en el plásmido transformante, en el grupo de los hongos filamentosos se han desarrollado sistemas de selección basados en la resistencia a inhibidores del crecimiento, en la complementación de auxotrofías, o en la utilización de determinadas fuentes nutricionales (figura 1).



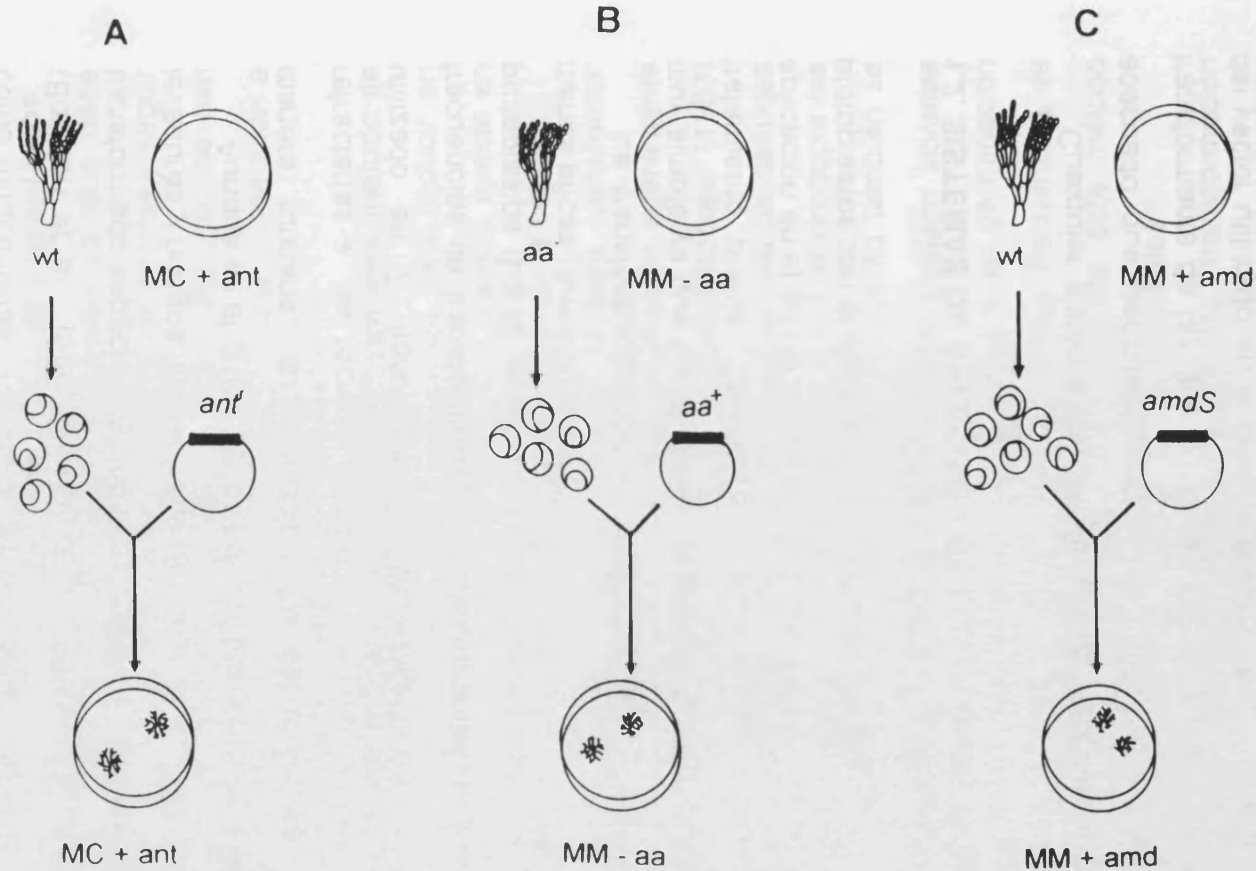


FIGURA 1. Sistemas de selección de los clones transformantes. A) Selección por resistencia a inhibidores del crecimiento. B) Selección por complementación de auxotrofías. C) Selección por utilización de acetamida como única fuente de carbono. (*aa*: aminoácido, *aa*⁻: mutante auxótrofo en la síntesis de un determinado aminoácido, *aa*⁺: alelo silvestre que codifica el gen mutado, *amd*: acetamida, *amdS*: gen que codifica la acetamidasa, *ant*: inhibidor, *ant'*: gen de resistencia al inhibidor, MC: medio completo, MM: medio mínimo, wt: cepa silvestre).

1.2.1. Resistencia a inhibidores del crecimiento.

En este sistema el vector de transformación porta un gen cuyo producto inactiva una droga que es capaz de inhibir el crecimiento de la cepa silvestre del hongo. Este sistema de selección únicamente requiere que el organismo a transformar sea sensible a la droga utilizada, presentando la ventaja de poder utilizarse directamente sobre la cepa silvestre (figura 1A). Esta característica hace posible transformar la mayoría de especies fúngicas, incluidas aquellas poco estudiadas para las que no existen colecciones de mutantes. Como contrapartida, las drogas suelen ser caras y las frecuencias de transformación obtenidas no son muy elevadas. Esto último es debido a que muchas veces los genes de resistencia son de origen bacteriano y sus señales reguladoras no son funcionales en hongos. Para solucionar este problema se han desarrollado vectores de transformación en los cuales el gen de resistencia está bajo el control de señales reguladoras de hongos (Peñalva *et al.*, 1985; Turgeon *et al.*, 1987). De esta manera se han conseguido frecuencias de transformación comparables a las obtenidas con el sistema de complementación de auxotrofías (ver apartado 1.2.3 de esta sección).

Algunos sistemas usan como marcadores selectivos alelos mutantes dominantes. En estos el producto génico del gen mutado presenta una sensibilidad reducida o nula al inhibidor. Este es el caso de los genes que confieren resistencia a oligomicina (*oliC*) en *A. nidulans* (Ward *et al.*, 1986) y a benomilo en *A. nidulans* (*benA*) y *N. crassa* (*Bml*) que son respectivamente alelos mutantes de los genes que codifican la subunidad 9 de la ATP sintasa mitocondrial y la β -tubulina (Orbach *et al.*, 1986; Dunne y Oakley, 1988).

1.2.2. La resistencia a higromicina B: un marcador de selección de uso generalizado en hongos filamentosos.

Uno de los marcadores de resistencia más utilizados en hongos filamentosos es el de la resistencia a la higromicina B (HmB). Este compuesto es un antibiótico aminoglicósido producido por *Streptomyces hygroscopicus* que inhibe la síntesis de proteínas tanto en organismos procariontas como eucariotas, interfiriendo en el proceso de translocación (Cabañas *et al.*, 1978;

González *et al.*, 1978) y causando errores de lectura en la traducción (Singh *et al.*, 1979). La mayoría de los antibióticos aminoglicósidos pueden ser inactivados por tres mecanismos enzimáticos distintos: acetilación, adenilación y fosforilación (Haas y Dowding, 1975). Ciertos microorganismos poseen algunas de estas actividades enzimáticas, con lo cual presentan resistencia a estos inhibidores del crecimiento. Así, *Escherichia coli* posee una HmB-fosfotransferasa que inactiva HmB por fosforilación (Gritz y Davies, 1983; Rao *et al.*, 1983). Estudios más detallados utilizando espectrofotometría de masas y resonancia magnética nuclear, establecen que dicho enzima fosforila el grupo 4-OH adyacente al metilamino del carbono 3, dando lugar al producto inactivo 4-O-fosforil-HmB. También *S. hygroscopicus* se protege de los efectos tóxicos de la HmB mediante fosforilación del grupo 7"OH (Leboul y Davies, 1982; Pardo *et al.*, 1985). En la figura 2 se indican los sitios de modificación en ambas especies.

Los genes de *E. coli* (Gritz y Davies, 1983; Kaster *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1983) y *S. hygroscopicus* (Malpartida *et al.*, 1983; Zalacaín *et al.*, 1986) que codifican estas HmB-fosfotransferasas han sido clonados y secuenciados, no presentando homología entre ellos (Zalacaín *et al.*, 1986). Este hecho no sorprende sabiendo que la enzima de *E. coli* y la de *S. hygroscopicus* modifican grupos OH distintos en la HmB (Pardo *et al.*, 1985). El gen de la HmB-fosfotransferasa de *E. coli* (*hph*) ha sido muy utilizado como marcador de selección en sistemas de transformación para *E. coli* (Gritz y Davies, 1983; Kaster *et al.*, 1983), *S. cerevisiae* (Gritz y Davies, 1983; Kaster *et al.*, 1984), distintas especies de hongos filamentosos (Fincham, 1989), células de plantas (van den Elzen *et al.*, 1985; Waldron *et al.*, 1985) y células de mamífero (Bernard *et al.*, 1985). Utilizando este gen se han desarrollado sistemas de transformación por resistencia a HmB en especies de hongos filamentosos de interés industrial como *A. niger* (Punt *et al.*, 1987; Mohr y Esser, 1990), *Cephalosporium acremonium* (Queener *et al.*, 1985), *Penicillium roqueforti* (Durand *et al.*, 1991) y *Trichoderma longibrachiatum* (Sánchez-Torres *et al.*, 1994); en hongos patógenos de plantas como *Cochiobolus heterostrophus* (Turgeon *et al.*, 1987), *Fulvia fulva* (Oliver *et al.*, 1987) y *Ustilago maydis* (Tsukuda *et al.*, 1988, Wang *et al.*, 1988), e incluso en hongos patógenos de

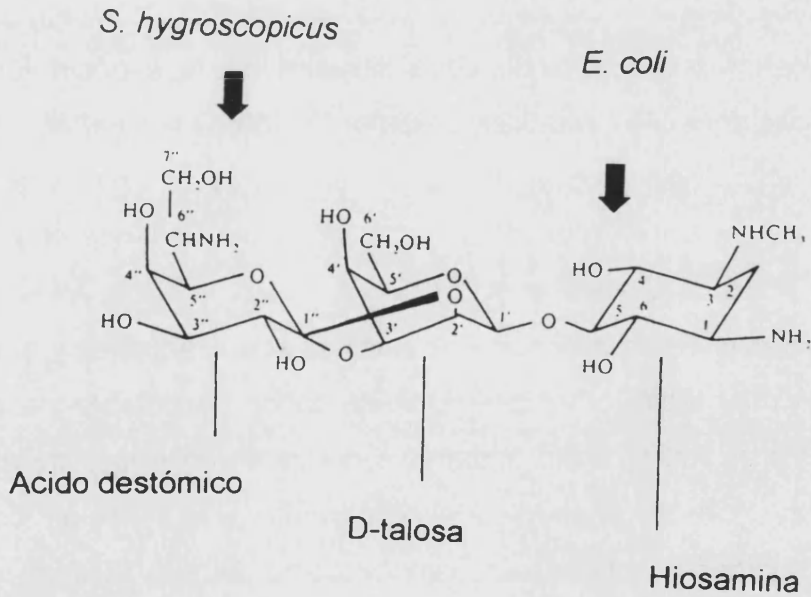
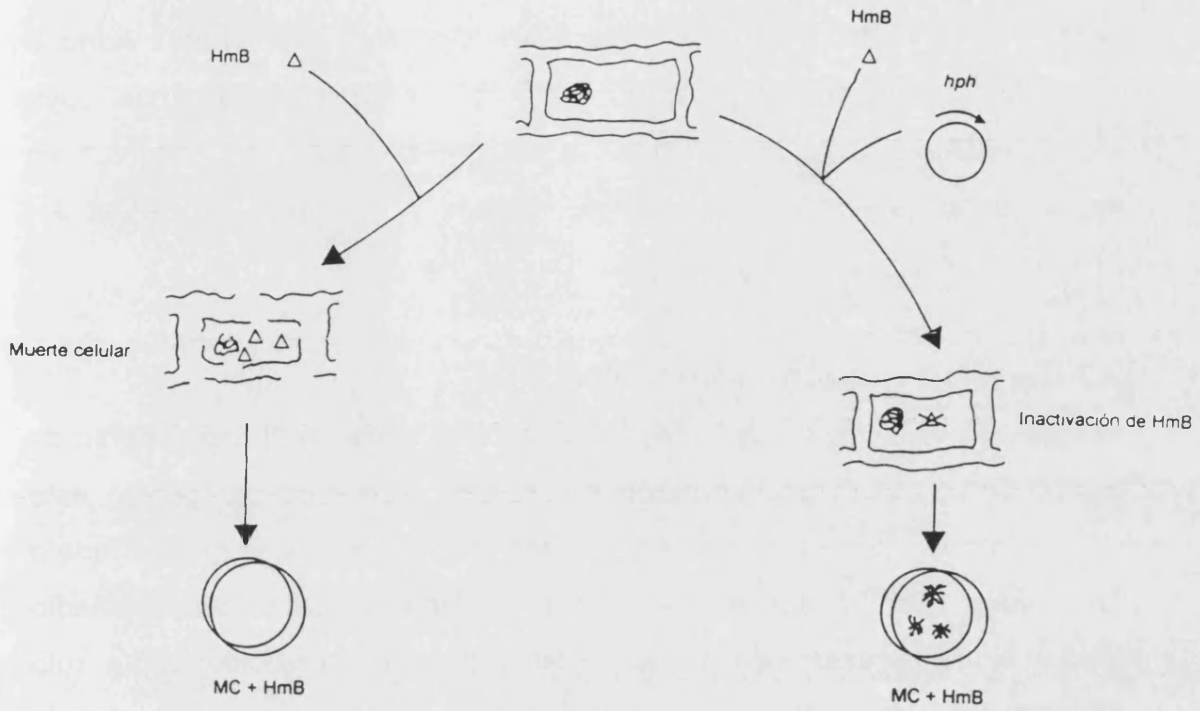


FIGURA 2. Esquema del modo de acción de las HmB fosfotransferasas. Las flechas indican el sitio de fosforilación en la molécula de HmB que conlleva su inactivación.

animales como *Trichophyton mentagrophytes* (González *et al.*, 1989). Aunque este sistema es particularmente útil en aquellos microorganismos cuya genética no ha sido muy estudiada, también se ha usado en hongos bien caracterizados genéticamente como *A. nidulans* y *N. crassa* (Cullen *et al.*, 1987a; Punt *et al.*, 1987; Chakraborty y Kapoor, 1990).

1.2.3. Complementación de auxotrofías.

Este sistema exige que la cepa receptora utilizada en el experimento de transformación posea una mutación en un gen cuyo producto génico esté implicado en la ruta de biosíntesis de un aminoácido, una base nitrogenada o una vitamina. Esta mutación impide que la cepa pueda crecer en medio mínimo, a menos que éste se suplemente con un metabolito de la ruta producido en un paso posterior al mutado. El vector usado en la transformación debe contener el alelo silvestre del gen mutado. De esta manera los clones que hayan incorporado este alelo podrán crecer en medio mínimo (figura 1B).

Este sistema de selección se ha utilizado en sistemas homólogos en los cuales el marcador procede de la cepa silvestre de la especie fúngica a transformar (Case *et al.*, 1979; Buxton y Radford, 1983; Oakley *et al.*, 1987a) y también en sistemas heterólogos utilizando marcadores de una especie para transformar otras especies filogenéticamente próximas (Ballance *et al.*, 1983; Chumley *et al.*, 1985; Mattern *et al.*, 1987).

Las frecuencias de transformación obtenidas son aceptables y el sistema de selección es muy efectivo, ya que no suele haber crecimiento inespecífico de células no transformadas. Sin embargo, una limitación al uso de este tipo de selección es que se debe disponer tanto de una mutación con baja frecuencia de reversión en la cepa receptora, como del gen silvestre clonado que complementa la mutación. En muchas ocasiones disponer de mutantes adecuados no es un requisito trivial, especialmente en hongos patógenos o de interés industrial. En ellos la introducción de mutaciones específicas puede ser difícil y a menudo resultar perjudicial, ya que durante el proceso de mutagénesis pueden producirse modificaciones genéticas no deseadas que afecten a las características por las cuales el hongo es utilizado (Rambosek y

Leach, 1987). Algunos de los marcadores auxotróficos utilizados con más frecuencia en hongos filamentosos aparecen en la tabla 1.

TABLA 1. Algunos de los marcadores de auxotrofia más utilizados en sistemas de transformación de hongos filamentosos.

MARCADOR	SELECCIÓN	REFERENCIA
<i>argB</i>	Prototrofia para la arginina	John y Peberdy, 1984
<i>pyrG</i>	Prototrofia para la uridina	Ballance <i>et al.</i> , 1983
<i>pyroA</i>	Prototrofia para la piridoxina	Hull <i>et al.</i> , 1989
<i>riboB</i>	Prototrofia para la riboflavina	Oakley <i>et al.</i> , 1987b
<i>trpC</i>	Prototrofia para el triptófano	Yelton <i>et al.</i> , 1984

1.2.4. La complementación de mutantes en ornitina transcarbamilasa: un marcador común en hongos filamentosos.

En el presente trabajo se ha utilizado como marcador el gen *argB* de *A. nidulans* que codifica la ornitina transcarbamilasa (OTCasa). La OTCasa (carbamil fosfato: L-ornitina carbamil transferasa, E.C. 2.1.3.3.) es una enzima trimérica que interviene en la ruta de biosíntesis de la arginina catalizando la condensación de ornitina y carbamil fosfato para formar citrulina (figura 3). En hongos, la OTCasa está codificada por un gen nuclear, se sintetiza en el citoplasma y se dirige a la mitocondria donde tiene lugar la reacción que cataliza.

En algunas especies de hongos filamentosos los genes que codifican esta enzima han sido clonados y secuenciados. En *A. nidulans* el gen que codifica la OTCasa (denominado *argB*) se clonó por complementación de la mutación correspondiente en *S. cerevisiae* (Berse *et al.*, 1983). Este gen codifica una proteína de 359 aminoácidos que presenta una secuencia señal

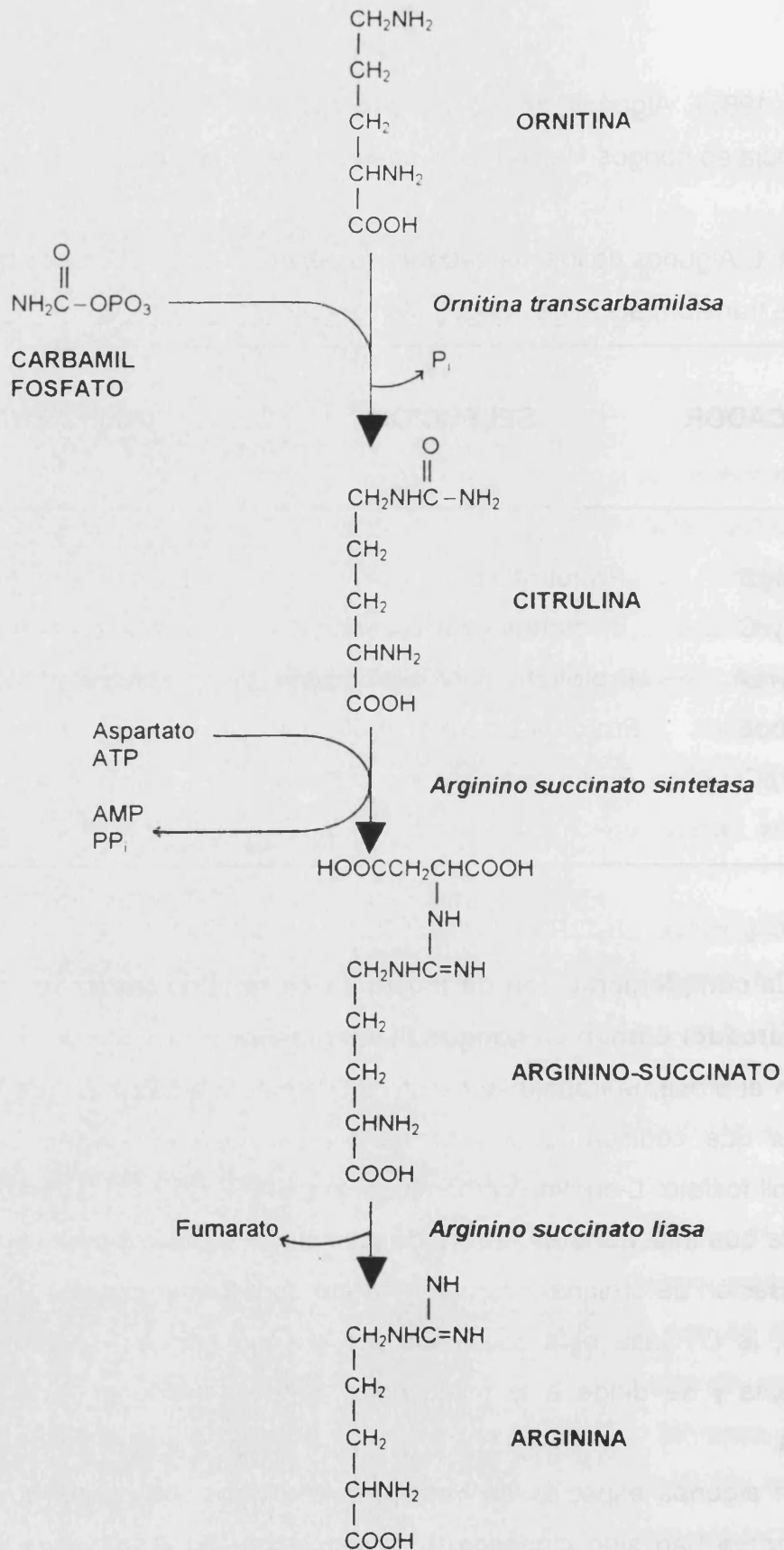


FIGURA 3. Ruta de síntesis de la arginina a partir de carbamil fosfato y ornitina.

de 20 aminoácidos (Upshall *et al.*, 1986). El gen *argB* de *A. nidulans* ha sido utilizado como marcador de selección en numerosos experimentos de transformación de *A. nidulans* (John y Peberdy, 1984; Johnstone *et al.*, 1985; Upshall, 1986; Upshall *et al.*, 1986; Fungaro *et al.*, 1995). También se ha utilizado para transformar, entre otras, cepas mutantes de *A. niger* (Buxton *et al.*, 1985), *Aspergillus. oryzae* (Gomi *et al.*, 1987; Christensen *et al.*, 1988; Hahm y Batt, 1988), *Magnaporthe grisea* (Parsons *et al.*, 1987), *N. crassa* (Weiss *et al.*, 1985) y *Trichoderma reesei* (Penttilä *et al.*, 1987). El gen de la OTCasa de *A. niger* (denominado también *argB*) se clonó por complementación de un mutante *argB* de *A. nidulans* y codifica una enzima de 370 aminoácidos que presenta una identidad del 87% con la OTCasa de *A. nidulans* y de un 40% con la OTCasa humana (Buxton *et al.*, 1987).

Los péptidos señal de la mayoría de las OTCasas de eucariotas presentan baja homología de secuencia pero comparten una estructura similar. Están compuestos por aminoácidos básicos e hidroxilados y carecen de residuos ácidos, características comunes de los péptidos señal de las proteínas que se dirigen a la mitocondria. Además, en la zona amino terminal de las OTCasas de hongos se ha encontrado una secuencia de procesamiento consenso compartida con otras proteínas fúngicas que también se localizan en la mitocondria (Skrzypek *et al.*, 1990).

Todas las OTCasas secuenciadas comparten cierta homología de secuencia con la aspartato transcaramilasa (carbamilfosfato: L-aspartato carbamil transferasa, ATCasa, EC 2.1.3.2) de *E. coli* (Huygen *et al.*, 1987). Esta enzima condensa aspartato y carbamil fosfato para formar carbamilaspartato en una reacción análoga a la de la OTCasa. La ATCasa consta de dos trímeros de cadenas catalíticas unidas por tres dímeros de cadenas reguladoras. Por cristalografía de rayos X se han determinado algunos componentes de la estructura secundaria de uno de los péptidos catalíticos que forman esta proteína y se han organizado en dos dominios, el polar y el ecuatorial. Su secuencia primaria puede dividirse en dos mitades que se corresponden con estos dominios. La mitad N-terminal de la proteína se corresponde con el dominio polar y la mitad C-terminal con el dominio ecuatorial. Utilizando análogos de sustratos se han podido determinar los

residuos que intervienen en la unión del carbamilfosfato y el aspartato (Houghton *et al.*, 1984). La comparación de las secuencias primarias de OTCasas de distintos orígenes con la ATCasa de *E. coli* ha permitido identificar algunos residuos implicados en la función de estas enzimas. Así, en el dominio polar, zona en la que se han encontrado los elementos de estructura secundaria más conservados, se han podido identificar los residuos responsables de la unión con el carbamil fosfato, el sustrato común de estas enzimas. El dominio ecuatorial que presenta una estructura secundaria menos conservada, se ha propuesto como la zona de unión de los sustratos distintos (Houghton *et al.*, 1984; Huygen *et al.*, 1987; Skrzypek *et al.*, 1990). La similitud de estructura entre las OTCasas ha permitido expresar la OTCasa de rata en un mutante *argB* de *A. nidulans*. La presencia de OTCasa catalíticamente activa indica que *A. nidulans* es capaz de reconocer el precursor de la OTCasa de rata, importarlo hacia la mitocondria y ensamblar los tres monómeros para conseguir la proteína activa (van Heeswijck *et al.*, 1990).

La síntesis de arginina en *A. nidulans* y *N. crassa* está controlada por un sistema de regulación general en el cual los niveles de varias enzimas implicadas en la síntesis de algunos aminoácidos aumentan como respuesta a la limitación en el medio de cultivo de alguno de ellos (Carsiotis y Jones, 1974; Carsiotis *et al.*, 1974; Piotrowska, 1980; Davis, 1986). Este sistema de regulación general contrasta con el sistema de control que predomina en bacterias en las cuales las enzimas de una ruta concreta sólo responden al producto final de dicha ruta. En la levadura *S. cerevisiae*, la limitación de aminoácidos conlleva el aumento de la proteína GCN4. Esta proteína se une específicamente a la secuencia TGACTC presente en los promotores de los genes de la biosíntesis de aminoácidos sometidos al control general para activar su transcripción (Davis, 1986; Hinnebusch, 1988). Esta secuencia también se encuentra presente en los promotores de los genes *argB* de *A. nidulans* y *A. niger*. En *A. nidulans* se ha demostrado que la respuesta del gen *argB* al control general de aminoácidos depende de la presencia de determinadas copias de esta secuencia (Goc y Weglenski, 1988). En *N. crassa* se ha identificado el gen *cpc1* (Barthelmess, 1982) que codifica la síntesis de una molécula que regula positivamente la transcripción de los genes

sometidos al control general. Los mutantes en este gen, como los mutantes en el gen *GCN4* de *S. cerevisiae*, no presentan aumento de los niveles de OTCasa o de su mRNA como respuesta a la limitación de algún aminoácido. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *cpc1* y *GCN4* presentan una elevada homología en las regiones implicadas en la activación de la transcripción y en los dominios de unión al DNA (Paluh *et al.*, 1988), y la proteína CPC1, tal como GCN4, presenta afinidad específica por la secuencia consenso TGACTC (Ebbole *et al.*, 1991; Paluh y Yanofsky, 1991).

1.2.5. Sistemas basados en la utilización de acetamida.

En algunos organismos se han usado como marcadores dominantes genes que permiten la utilización de fuentes nutricionales que no son metabolizadas por la cepa receptora. Así, se han desarrollado sistemas de selección basados en la utilización de acetamida como única fuente de nitrógeno (figura 1C). Este fenotipo parece estar confinado al género *Aspergillus*. En concreto *A. nidulans* es capaz de utilizar la acetamida como fuente de carbono y de nitrógeno por poseer un gen denominado *amdS* que codifica una acetamidasa, enzima que cataliza la conversión de acetamida en acetato y amonio. Se han desarrollado vectores que portan el alelo silvestre del gen *amdS* y se han utilizado para transformar varias especies fúngicas (Tilburn *et al.*, 1983, Kelly y Hynes, 1985, Christensen *et al.*, 1988). Este sistema proporciona una forma directa de selección de los transformantes por su capacidad para crecer en acetamida como única fuente de nitrógeno (Hynes y Davis, 1986). La integración en el genoma receptor de varias copias del gen *amdS* hace que el crecimiento de la cepa transformada sea más vigoroso, proporcionando un criterio de selección adicional.

1.2.6. Marcadores seleccionables bidireccionalmente.

En ocasiones es muy útil disponer de un gen marcador que pueda seleccionarse por la pérdida y la restauración de su función. En hongos hay algunos genes marcadores que cumplen este requisito. Por ejemplo, la mayoría de los hongos filamentosos pueden utilizar el nitrato como única fuente de nitrógeno. Los mutantes en el gen estructural de la nitrato reductasa

(*niaD*) se obtienen fácilmente mediante selección por su resistencia a clorato. Una vez obtenidos se identifican por su incapacidad de crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno. Cuando al transformar se complementa la mutación con el gen silvestre, la cepa vuelve a ser capaz de crecer en presencia de nitrato y es sensible a clorato. El proceso de obtención de mutantes en *niaD* no implica el uso de mutágenos, por lo que la posibilidad de que aparezcan mutaciones en otros genes es muy reducida. Además, la ruta de asimilación de nitrato no es indispensable para el crecimiento ni interfiere con otras rutas metabólicas celulares. Por todo ello es un sistema muy adecuado para hongos de interés industrial en los cuales la aparición de mutaciones no deseadas es un problema (Whitehead *et al.*, 1989). La estabilidad de los transformantes es muy fácil de detectar pues sólo los inestables recuperan su capacidad de crecer en medio con clorato. Las ventajas de este sistema han extendido su uso a una gran variedad de hongos filamentosos, usando tanto genes homólogos (Unkles *et al.*, 1989a; Horng *et al.*, 1990; Whitehead *et al.*, 1990; Gouka *et al.*, 1991) como heterólogos (Whitehead *et al.*, 1989; Malardier *et al.*, 1989; Daboussi *et al.*, 1989; Unkles *et al.*, 1989b; Sánchez-Fernández *et al.*, 1991).

Existen sistemas similares al descrito anteriormente que usan mutantes en la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (*pyrG* en *A. nidulans*, *pyr4* en *N. crassa*), o mutantes *sC* deficientes en adenosina trifosfato sulfurilasa. En el primer caso los mutantes pueden seleccionarse por su resistencia al ácido 5-fluoroótico (Díez *et al.*, 1987). En el segundo, los mutantes *sC* no pueden crecer con sulfato como única fuente de azufre y son resistentes al análogo tóxico selenato (Buxton *et al.*, 1989). A diferencia de los mutantes *pyrG*, los mutantes *niaD* y *sC* pueden seleccionarse por mutación espontánea.

Aunque estos tres marcadores se han agrupado por su capacidad para seleccionarse bidireccionalmente, los mutantes *pyr* son mutantes auxótrofos y los mutantes *niaD* y *sC* son mutantes nutricionales incapaces de utilizar nitrato y sulfato respectivamente.

1.3. DESTINO MOLECULAR DEL DNA TRANSFORMANTE.

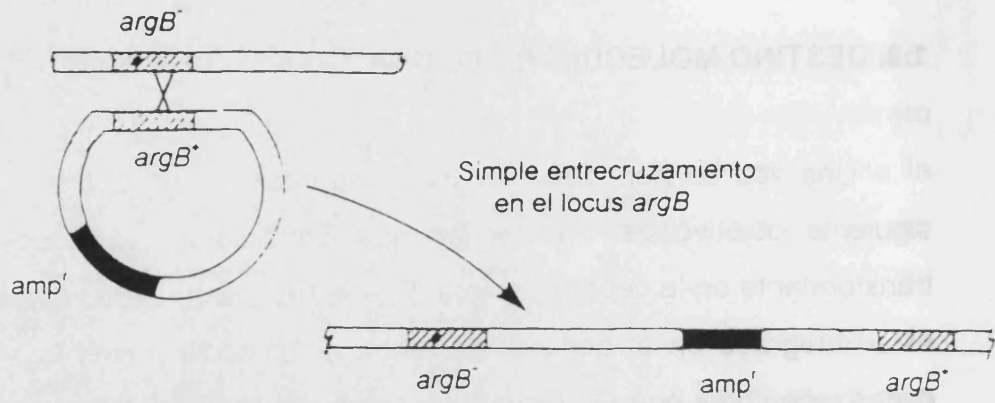
Una vez se han obtenido transformantes de un determinado hongo el siguiente objetivo es conocer en que condiciones se encuentra el DNA transformante en la cepa receptora. Puede replicarse extracromosomalmente o estar integrado en el genoma de forma homóloga o heteróloga. Además las cepas receptoras pueden recibir una o más copias del DNA transformante.

1.3.1. Integración del DNA transformante en el genoma del hongo.

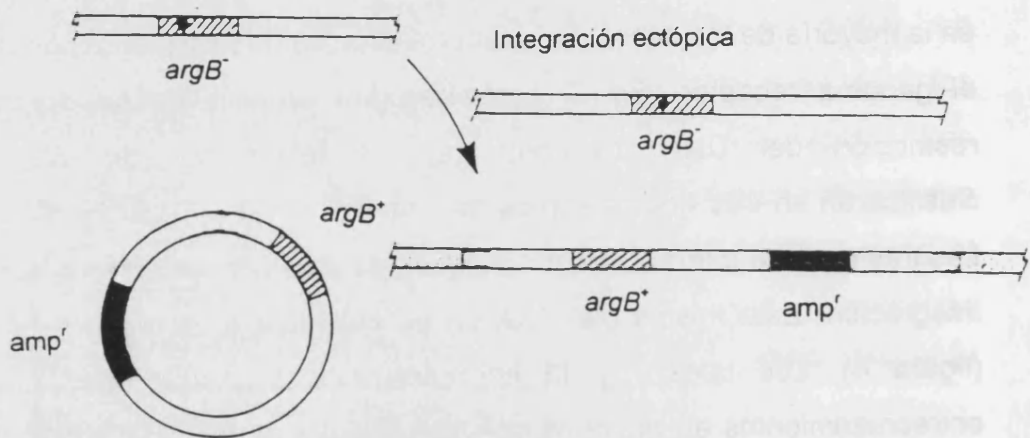
El análisis molecular del DNA de los transformantes fúngicos revela que, en la mayoría de los casos, la transformación se da por integración del DNA en el genoma receptor. En *S. cerevisiae* por análisis de los fragmentos de restricción del DNA transformante, los fenómenos de integración se clasificaron en tres tipos distintos denominados I, II y III (Hinnen *et al.*, 1978). Los tres tipos se diferencian por la naturaleza del acontecimiento que lleva a la integración. Esta misma clasificación es aplicable a los hongos filamentosos (figura 4). Los tipos I y III implican respectivamente simples y dobles entrecruzamientos en regiones homólogas entre el vector y el DNA genómico. Por el contrario el tipo II implica recombinación no homóloga, también denominada ilegítima o ectópica, entre secuencias del genoma fúngico y del vector. Algunos autores piensan que la recombinación no homóloga como tal no existe, sino que los transformantes de tipo II pueden obtenerse por recombinación homóloga entre secuencias cortas del DNA transformante que a su vez están presentes en zonas dispersas del genoma repetidas varias veces. Asimismo, en el transcurso de la transformación, además de los tres fenómenos citados, pueden producirse deleciones del DNA transformante o integraciones múltiples en uno o varios sitios del genoma (revisado por Fincham, 1989).

En la transformación de hongos es frecuente observar la presencia de los llamados transformantes abortivos. Estos forman colonias que inicialmente crecen en medio selectivo, pero son incapaces de crecer cuando se transfieren a medio fresco en el que se mantiene la presión selectiva. En general su

TIPO I



TIPO II



TIPO III

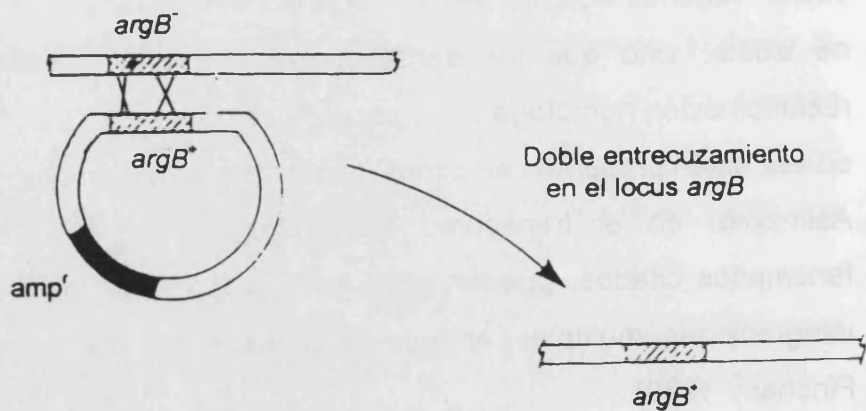


FIGURA 4. Modos de integración del DNA transformante. (Tomado de Fincham, 1989).

aparición es posterior a la de los verdaderos transformantes y su crecimiento no es tan vigoroso. Algunos autores sugieren que su aparición podría deberse a la integración del DNA transformante en genes que son necesarios para el crecimiento continuado en medio selectivo (Saunders *et al.*, 1986). Otros piensan que en las colonias abortivas el DNA no se ha integrado y se expresa de manera transitoria. Así, en principio el transformante crece, pero cuando el efecto del gen que elimina la presión selectiva se diluye, el crecimiento cesa. Esta hipótesis se apoya en los resultados de Tilburn y colaboradores que observaron DNA transformante en las colonias abortivas después de cesar el crecimiento, así como que en ocasiones a partir de estas colonias surgían sectores de crecimiento más vigoroso en los cuales este DNA se había estabilizado por integración (Tilburn *et al.*, 1983).

1.3.2. Sistemas de replicación autónoma.

En comparación con los sistemas de transformación de levaduras, una deficiencia notable en la transformación de hongos filamentosos es la carencia de plásmidos nucleares que puedan mantenerse extracromosomalmente. Por ello la mayoría de plásmidos usados en la transformación de hongos filamentosos se mantiene por integración en el cromosoma. Una excepción constituyen los zigomicetes en los cuales predomina la replicación autónoma de los plásmidos utilizados en transformación, incluso en algunos casos se han encontrado problemas para integrar el DNA transformante en el genoma del hongo (Ballance, 1991). Varios grupos han dirigido sus esfuerzos a encontrar sistemas de replicación autónoma similares a los que existen en levaduras, algunos se describen a continuación.

a) Plásmidos de hongos filamentosos. En el grupo microbiano de los hongos filamentosos no se han descrito plásmidos nucleares, pero en algunas especies se han encontrado plásmidos naturales asociados a la mitocondria (Griffiths, 1995). Generalmente se hallan en cepas aisladas de la naturaleza y no se encuentran en cepas de laboratorio. Estos plásmidos pueden clasificarse en dos categorías. La primera comprende aquellos que no tienen ningún tipo de homología con el genoma mitocondrial, y la segunda aquellos que derivan o muestran alguna homología con el genoma mitocondrial. Estos últimos

generalmente aparecen asociados con deficiencias en el crecimiento del hongo como es el caso de los mutantes “ragged” de *Aspergillus* (Lazarus y Kuntzel, 1981), “poky” y “stopper” de *Neurospora* (Bertrand *et al.*, 1980; de Vries *et al.*, 1981) o con estados de senescencia (Stahl *et al.*, 1978; Jamet-Vierny *et al.*, 1980). Aunque estos plásmidos podrían usarse para construir vectores de clonación su utilidad sería limitada ya que la introducción de estos vectores en células sanas daría lugar a cepas más débiles o senescentes (Kinsey, 1985).

Los plásmidos del primer grupo o verdaderos plásmidos mitocondriales, son constituyentes naturales de las mitocondrias de células sanas (Kinsey, 1985). Los mejor caracterizados son los plásmidos de *Neurospora* (Collins *et al.*, 1981; Stohl *et al.*, 1983; Nargang *et al.*, 1983, 1984), descubiertos por Collins y colaboradores (1981) al estudiar variantes estructurales del genoma mitocondrial en cepas silvestres de *Neurospora*. Stohl y colaboradores (1982), identificaron en la cepa LaBelle de *Neurospora intermedia* un plásmido mitocondrial y utilizaron secuencias de éste para construir un vector híbrido que se replicara autónomamente. La eficiencia de transformación de este plásmido fue por lo menos 5 ó 10 veces mayor que la obtenida al transformar con el mismo plásmido sin las secuencias LaBelle (Stohl y Lambowitz, 1983). Este aumento de la frecuencia de transformación fue atribuido en un principio a la presencia del origen de replicación del plásmido mitocondrial. Sin embargo, un plásmido derivado de éste que había sufrido una deleción espontánea de las secuencias LaBelle daba resultados similares. Por ello la mayor frecuencia de transformación no podía atribuirse a la presencia de algún origen de replicación en las secuencias LaBelle y se pensó que al introducir el plásmido en *Neurospora* se había seleccionado un origen de replicación más eficaz, o que durante la deleción se había creado uno de manera fortuita (Stohl *et al.*, 1984). Estos plásmidos no se han utilizado en experimentos de transformación porque en *Neurospora* es difícil recuperar plásmidos sin modificar después de la transformación. Además, el efecto exacto que tienen las secuencias LaBelle en la transformación de *Neurospora* es diferente según la cepa o el plásmido utilizados (Kuiper y de Vries, 1985; Buxton y Radford, 1984, Grant *et al.*, 1984)

Se han aislado plásmidos a partir de otras especies fúngicas, y se ha intentado aprovechar su capacidad para replicarse autónomamente. A partir de un plásmido mitocondrial de *Nectria haematococca* se construyó un vector que se replica autónomamente en *Ustilago maydis* aunque no lo hace en *N. haematococca* (Samac y Leong, 1989). En *Phanerochaete chrysosporium* también se ha descrito un vector derivado de un plásmido endógeno que se replica autónomamente. La secuencia que le confiere replicación autónoma se denomina ME-1 (Randall *et al.*, 1991). El plásmido existe en bajo número de copias y es estable incluso en ausencia de presión selectiva.

b) Secuencias de replicación autónoma (ARS). De forma similar a la descrita en levaduras, se han intentado aislar secuencias genómicas de hongos filamentosos que confieran replicación autónoma. Las secuencias ARS de *S. cerevisiae* no funcionan bien en otras especies y la búsqueda de estas secuencias en hongos no ha tenido éxito. En *Mucor circinelloides* algunos plásmidos que contienen secuencias cromosómicas pueden replicarse indefinidamente bajo presión selectiva (Roncero *et al.*, 1989, van Heeswijck, 1986). En *N. crassa* se encontraron fragmentos genómicos con origen de replicación que podían conferir una autonomía limitada a los plásmidos que los contenían (Grant *et al.*, 1984). También se encontraron algunas secuencias tipo ARS que funcionaban en *S. cerevisiae* pero no eran funcionales en la cepa fúngica de la que se habían aislado. Por ejemplo, la secuencia *ars8* de *N. crassa*, aislada por Stinchomb y colaboradores (1980) en levadura, fue ensayada en *N. crassa* y no mejoraba la frecuencia de transformación ni confería replicación autónoma en el hongo. El mismo resultado obtuvieron Tilburn y colaboradores (1983) en *A. nidulans* al añadir a un vector que portaba el gen *amdS* secuencias de DNA mitocondrial seleccionadas como ARS en levadura.

Seleccionando secuencias de *A. nidulans* que dieran replicación autónoma en *S. cerevisiae* se identificó una secuencia que aumentaba la frecuencia de transformación por integración unas cien veces. Esta secuencia llamada *ans1* es rica en AT y se encuentra repetida y dispersa en el genoma (Ballance y Turner, 1985, Cullen *et al.*, 1987b). El mecanismo por el cual *ans1* aumenta el número de transformantes estables se desconoce y no está

relacionado con la multiplicidad de sitios en el genoma donde puede integrarse (Cullen *et al.*, 1987b).

Siguiendo una aproximación similar, Johnstone (1985) pensó que algunos insertos de una librería genómica de *A. nidulans* podrían conferir replicación autónoma. Los plásmidos que portaran estos insertos podrían identificarse por la inestabilidad de sus transformantes. Con esta aproximación aisló un plásmido que transformaba con mayor frecuencia que el vector original. Este plásmido replicativo, denominado ARp1, transformaba con frecuencias dos mil veces mayores que las obtenidas con el plásmido integrativo parental y presentaba todas las características esperadas para un plásmido de replicación autónoma (Gems *et al.*, 1991). El inserto que portaba este plásmido se denominó AMA 1 y constaba de una región central corta, flanqueada por dos zonas de 2.8 kb invertidas y repetidas (Aleksenko y Clutterbuck 1996). ARp1 se recuperaba a partir de los transformantes sin reordenaciones.

El valor principal de los plásmidos derivados de ARp1 es su efectividad aumentando la frecuencia de transformación en *A. nidulans* y especies relacionadas (Ozeki *et al.*, 1994, 1995). También son particularmente útiles como vehículos de cotransformación (Gems y Clutterbuck, 1993). Aprovechando estas características se ha desarrollado un método rápido para la clonación de genes por complementación de mutantes en *A. nidulans* (Gems *et al.*, 1994; Bowyer *et al.*, 1994). Sin embargo, su inestabilidad los hace inadecuados cuando se necesita una expresión génica estable (Clutterbuck *et al.*, 1994).

De forma similar a la obtención de ARp1, varios autores han conseguido plásmidos autoreplicativos por recombinación *in vivo* en *Fusarium oxysporum* (Powell y Kistler, 1990; García-Pedrajas y Roncero, 1996) y *Pleurotus ostreatus* (Peng *et al.*, 1993).

2. LAS GLUCOAMILASAS FÚNGICAS.

El almidón es el principal polisacárido de reserva en el reino vegetal. Después de la celulosa, es el polímero más abundante sintetizado por las células vegetales. Se encuentra principalmente en granos de cereales, tubérculos y raíces, donde se deposita en forma de pequeños gránulos desde 1 a 100 μm de diámetro cuya forma y tamaño son típicos de cada variedad de almidón (Swinkels, 1985). Su estructura está formada por unidades de α -D-glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos formando grandes macromoléculas. El almidón está compuesto por dos polímeros, la amilosa y la amilopectina. La amilosa es una molécula lineal formada por moléculas de glucosa unidas a través de enlaces α -(1,4). Tiene una estructura cristalina en doble hélice que contiene 6 unidades de glucosa por vuelta. El tamaño de la molécula depende de su origen y de las condiciones empleadas en la obtención del almidón, pudiendo tener desde 100 hasta 6000 unidades de glucosa. La amilopectina está formada por cortas cadenas lineales de residuos de glucosa (entre 10 y 60, con un tamaño medio de 20), unidos por enlaces α -(1,4). Estas cadenas están unidas a su vez por enlaces α -(1,6) formando una estructura altamente ramificada. El grado de polimerización y la relación amilosa/amilopectina varía según el origen y la edad del almidón (Swinkels, 1985; Nigam y Singh, 1995).

En general, las enzimas que degradan el almidón se denominan amilasas. Estas enzimas se clasifican según diferentes criterios como la configuración del carbono anomérico de los productos resultantes de su acción, su origen biológico, modo de acción (exo o endo) o el tipo de enlace que hidrolizan. Estos criterios se basan en diferentes atributos de las enzimas y no se excluyen mutuamente. En la figura 5 se muestra el mecanismo de acción de algunas de estas enzimas. Entre todas ellas las más usadas en la industria son las siguientes:

- a) α -amilasas (EC 3.2.1.1). Hidrolizan enlaces α -(1,4) internos en las cadenas de amilosa y amilopectina.

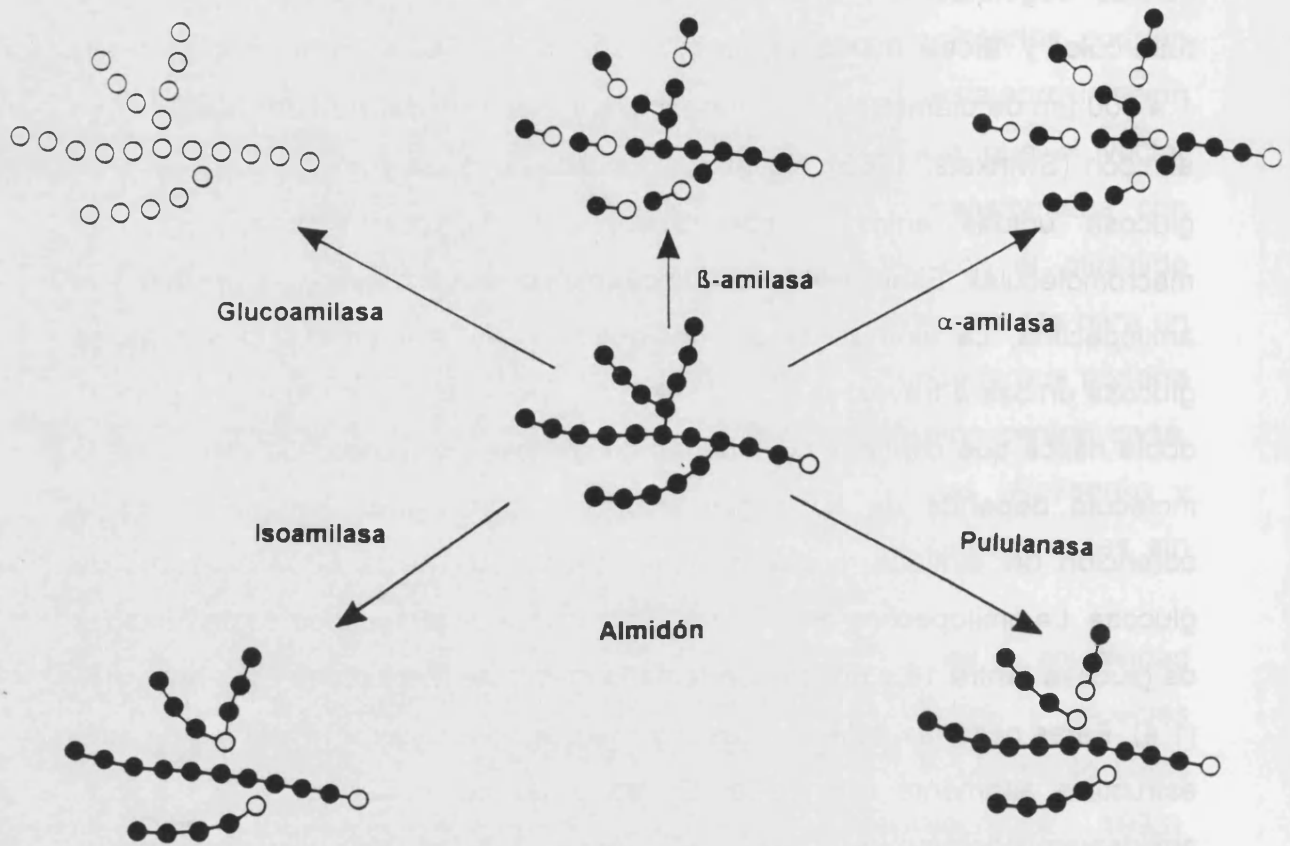


FIGURA 5. Hidrólisis del almidón por algunas enzimas amilolíticas. Los círculos rellenos representan los residuos de glucosa no reductores y los residuos reductores se representan como círculos vacíos. (Tomado de Kennedy *et al.*, 1988).

- b) Glucoamilasas (EC 3.2.1.3). Liberan de manera consecutiva unidades de glucosa a partir del extremo no reductor del sustrato.
- c) β -amilasas (EC 3.2.1.2). Hidrolizan enlaces α -(1,4) liberando subunidades de maltosa partiendo del extremo no reductor del sustrato.
- d) Isoamilasa (EC 3.2.1.68) y pululanasa (EC 3.2.1.41). Son enzimas desramificantes que hidrolizan específicamente enlaces α -(1,6) glicosídicos de las cadenas de amilopectina.

2.1. GENERALIDADES.

El almidón tiene un gran potencial como material crudo para la industria química, ya que la glucosa obtenida como producto de su hidrólisis se usa en la producción de alcohol, fructosa, aminoácidos, antibióticos y ácidos orgánicos (Kennedy *et al.*, 1988). En la industria agroalimentaria el almidón se utiliza para la producción de hidrolizados que se utilizan como edulcorantes en bebidas y en pastelería o como espesantes en alimentos semisólidos del tipo de salsas, natillas, pasteles rellenos y postres. El almidón puede ser convertido en glucosa por medio de hidrólisis ácida o enzimática. La hidrólisis ácida fue la primera que se aplicó a escala industrial y presenta problemas como la formación de gentibiosa que da sabor amargo, o de sal. Frente a ella, la hidrólisis enzimática ofrece considerables ventajas, ya que su especificidad evita la formación de subproductos y se obtiene un mayor rendimiento de glucosa (Kanno, 1988; Nigam y Singh, 1995).

Como se indicó anteriormente, la enzima que libera glucosa a partir del extremo no reductor de la molécula de almidón y polisacáridos derivados se denomina glucoamilasa. Esta enzima además de hidrolizar los enlaces α -(1,4), también actúa, aunque más lentamente, sobre los enlaces α -(1,6), por lo que teóricamente la glucoamilasa es capaz de hidrolizar la totalidad del almidón en glucosa. Para designar este tipo de actividad enzimática también se han utilizado en la literatura los nombres de amiloglucosidasa, glucamilasa, maltasa y γ -amilasa. Esta enzima es producida por distintos microorganismos,



así como por vegetales y algunos tejidos animales (Manjunath *et al.*, 1983). Sin embargo, los mejores productores se encuentran en el grupo de los hongos filamentosos y la mayoría de glucoamilasas comerciales se obtienen a partir de caldos de cultivo de especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus*.

Las glucoamilasas fúngicas son glicoproteínas extracelulares. Este hecho, sumado a su gran estabilidad, ha facilitado la purificación y caracterización de varias de ellas. En general son proteínas monoméricas con punto isoeléctrico ácido que presentan un tamaño molecular que varía entre 38000 y 125000 Da y un pH óptimo entre 4 y 5 unidades. La temperatura óptima difiere en función del origen biológico. Las purificadas a partir de especies del género *Rhizopus* presentan una temperatura óptima alrededor de 40°C mientras que las obtenidas desde caldos de cultivo de especies del género *Aspergillus* tienen temperaturas óptimas entre 50 y 60°C. Generalmente una cepa fúngica produce varias formas de glucoamilasa que varían en tamaño molecular y composición de aminoácidos y carbohidratos. En general sólo la mayor de estas formas es capaz de unirse a almidón crudo e hidrolizarlo, mientras que todas las formas tienen idénticas propiedades enzimáticas frente a almidón soluble y oligosacáridos. Como se verá posteriormente, en *Aspergillus awamori*, *A. niger*, y *A. oryzae* se ha comprobado que en el genoma existe un único gen que codifica una glucoamilasa, sugiriendo que las múltiples formas de la enzima surgen de modificaciones postranscripcionales o postraduccionales. La glucoamilasa de *A. niger* existe en dos formas G1 y G2. Ambas tienen en común la región N-terminal pero G2 carece de la región C-terminal. La forma G2 probablemente se origina por proteólisis limitada de G1 (Svensson *et al.*, 1986), aunque también se ha descrito su formación por procesamiento diferencial de intrones (ver apartado 2.3 de esta sección) (Boel *et al.*, 1984a). Por el contrario, en *Hormoconis resinae* se han descrito dos formas de glucoamilasa codificadas por distintos genes (Joutsjoki y Torkkeli, 1992).

TABLA 2. Tamaños moleculares de algunas glucoamilasas fúngicas. (Tomado de Manjunaht y colaboradores, 1983 y Sakaguchi y colaboradores, 1992).

MICROORGANISMO	TAMAÑO MOLECULAR (Da)
<i>A. awamori</i>	125000
<i>A. awamori var kawachi</i>	83000, 90000
<i>Aspergillus candidus</i>	60000, 75000
<i>Aspergillus foetidus</i>	60000, 78000
<i>A. niger</i>	95000, 112000
<i>A. oryzae</i>	38000, 76000
<i>Aspergillus phoenicis</i>	63600
<i>Aspergillus saitoi</i>	90000
<i>Cladosporium resinae</i>	70000, 82000
<i>Coniophora cerebella</i>	48000
<i>Lentinus eodes</i>	55000
<i>Mucor rouxianus</i>	49000, 59000
<i>Paecilomyces varioti</i>	69000
<i>Penicillium oxalicum</i>	84000, 86000
<i>Rhizopus niveus</i>	60000
<i>Rhizopus sp.</i>	59000-74000

2.2. CLONACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN GLUCOAMILASAS: ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS GLUCOAMILASAS FÚNGICAS.

Se han clonado y secuenciado varios genes que codifican glucoamilasas fúngicas. En el año 1984, dos grupos publicaron de forma independiente la secuencia del gen que codifica esta enzima en *A. awamori* (Nunberg *et al.*, 1984) y *A. niger* (Boel *et al.*, 1984a,b). Dada la gran proximidad filogenética de

estas dos especies las dos secuencias coincidían nucleótido a nucleótido. Posteriormente se han publicado las secuencias de los genes que codifican las glucoamilasas de *H. resinae*, *N. crassa*, *Rhizopus oryzae* y de otras especies del género *Aspergillus* (tabla 3). Todos ellos están interrumpidos por intrones y sus secuencias presentan un porcentaje de identidad superior al 50%, con la excepción de la glucoamilasa de *Rhizopus* que presenta valores mucho menores.

TABLA 3. Genes de glucoamilasa secuenciados y número de intrones que presentan. (ND: no descrito, *: uno de ellos sometido a procesamiento diferencial).

MICROORGANISMO	GEN	INTRONES	REFERENCIA
<i>A. awamori</i>	<i>glaA</i>	4	Nunberg <i>et al.</i> , 1984.
<i>A. awamori</i> var. <i>Kawachi</i>	<i>glaA</i>	4	Hayashida <i>et al.</i> , 1989.
<i>A. niger</i>	<i>glaA</i>	5*	Boel <i>et al.</i> , 1984b.
<i>A. oryzae</i>	<i>glaA</i>	4	Hata <i>et al.</i> , 1991.
<i>Aspergillus shirousamii</i>	<i>glaA</i>	4	Shibuya <i>et al.</i> , 1990.
<i>H. resinae</i>	<i>gamP</i>	3	Joutsjoki y Torkkeli 1992.
<i>H. resinae</i>	<i>gamS</i>	N.D.	Fagerström <i>et al.</i> , 1990.
<i>N. crassa</i>	<i>gla1</i>	1	Stone <i>et al.</i> , 1993.
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>gluc1</i>	4	Ashikari, <i>et al.</i> , 1986.

La secuencia de los genes, el estudio de los péptidos y su glicosilación han permitido identificar tres regiones estructurales claramente diferenciadas en la secuencia de estas enzimas: un dominio catalítico, una región altamente glicosilada y un dominio de unión al almidón que confiere a la enzima la capacidad de unir y digerir almidón crudo (Boel *et al.*, 1984a; Gunnarson *et al.*, 1984; Svensson *et al.*, 1986a). En general el dominio catalítico corresponde a

la región N-terminal de la proteína y el dominio de unión al almidón crudo a la región C-terminal, excepto en las glucoamilasas del género *Rhizopus* donde esta estructura está invertida.

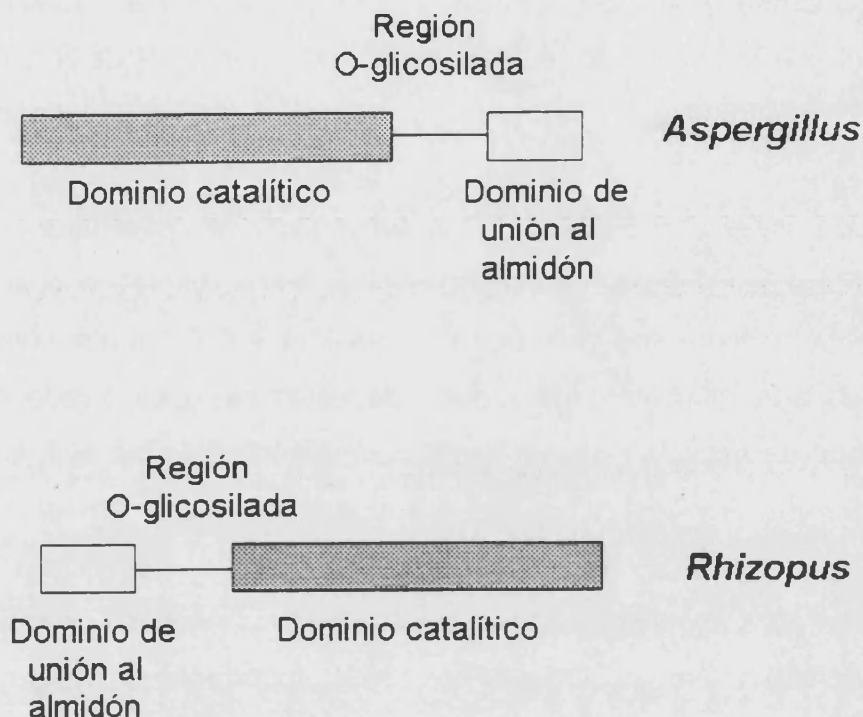


FIGURA 6. Estructura de las glucoamilasas fúngicas.

2.2.1. El dominio catalítico.

Recientemente se ha obtenido el modelo de la estructura tridimensional del cristal del dominio catalítico de la glucoamilasa de *A. awamori*, tanto en su forma nativa (Aleshin *et al.*, 1992) como en complejos con inhibidores como la 1-deoxinojirimicina (Harris *et al.* 1993), la acarbosa (Aleshin *et al.*, 1994) o la D-gluco-dihidroacarbosa (Stoffer *et al.*, 1995). Este dominio está compuesto por 13 α -hélices, doce de ellas emparejadas dos a dos formando una estructura en barril α/α , rodeadas por una espiral O-glicosilada. El sitio activo se sitúa en el centro del barril. Estudios cinéticos demuestran que el sitio activo consta de 6 ó 7 subsitios que acomodan las unidades de glucosa, con el sitio catalítico situado entre los subsitios 1 y 2 (Sierks *et al.*, 1989). Utilizando los datos de estructura primaria se han realizado estudios de homología y, en el dominio

catalítico, se han identificado cinco segmentos (denominados S₁ a S₅) conservados en la mayoría de las glucoamilasas secuenciadas (Itoh *et al.*, 1987; Coutinho y Reilly, 1994a). En el modelo tridimensional estos cinco segmentos forman parte del centro del barril (Aleshin *et al.*, 1992). En este modelo del dominio catalítico también se incluyen dos sitios de N-glicosilación que están conservados en varias glucoamilasas fúngicas (Coutinho y Reilly 1994b).

Analizando el alineamiento de las secuencias de los segmentos S₁ a S₅ se comprueba que los residuos situados en el sitio activo se encuentran muy conservados en todas las glucoamilasas estudiadas. Por mutagénesis se ha demostrado que el cambio de alguno de estos residuos puede causar la pérdida total de actividad o una disminución significativa de ella (Coutinho y Reilly, 1994a). Por estudios de cristalografía (Harris *et al.*, 1993) y mutagénesis dirigida (Frandsen *et al.*, 1995) se ha identificado el Glu₄₀₀ (numeración de *A. niger*) como base catalítica. Otros residuos esenciales para la actividad son el Trp₁₂₀ (Sierks *et al.*, 1989), importante en la formación del complejo enzima-sustrato, y el Glu₁₇₉ considerado el ácido catalítico (Sierks *et al.*, 1990).

Aunque se conocen los residuos implicados en la catálisis, no se conoce el mecanismo exacto de la reacción catalizada (Harris *et al.*, 1993). Tanaka y Takeda (1995) proponen para la glucoamilasa de *Rhizopus* un modo de ataque al azar, por lo menos sobre oligosacáridos. Según este modelo después de la hidrólisis de un enlace glucosídico del extremo no reductor, los productos se separan de la enzima dejando ésta libre para atacar otra molécula de sustrato. Dependiendo del grado de polimerización del sustrato, es posible que se de un ataque múltiple.

2.2.2. Dominio de unión al almidón.

Las ciclodextrin glucosiltransferasas de *Bacillus circulans* y *Bacillus stearothermophilus* han sido cristalizadas y se conocen sus modelos tridimensionales en estado nativo y en complejo con sustratos. Todas las glucoamilasas fúngicas tienen secuencias homólogas a estas enzimas en su dominio de unión al almidón, por lo que ha sido posible identificar los residuos

esenciales para su función mediante comparación de secuencias (Coutinho y Reilly, 1994a). El sitio de unión al almidón tiene una estructura formada por 6 a 8 hojas β (Klein y Schulz, 1991). En los dominios de unión a almidón se encuentra mayor variabilidad entre los residuos que interaccionan con el sustrato, lo cual probablemente se debe a que la capacidad de unirse al almidón crudo no es crítica para la enzima dado que en ocasiones este dominio es eliminado por proteólisis (Coutinho y Reilly, 1994b). En la glucoamilasa de *A. niger* se han identificado dos residuos, Trp₅₉₀ y Trp₆₁₅, cuya modificación química elimina la capacidad de unir almidón granular (Svensson *et al.*, 1986b).

Estudiando glucoamilasas de *A. awamori* var *kawachi* truncadas en este dominio, se ha demostrado la reducción o la pérdida de la capacidad de estas para unirse a almidón crudo. Asimismo, se ha determinado una zona mínima alrededor del Trp₅₆₂ necesaria para la digestión del almidón crudo, y se sugiere que el Trp₅₆₂ contribuye a la formación de un complejo de inclusión con el sustrato. De la misma manera se propone que la secuencia cercana al Trp₅₈₉ es necesaria para la unión estable al almidón crudo, probablemente por su ayuda en la formación del complejo de inclusión (Goto *et al.*, 1994a,b). Este complejo se formaría entre el Trp₅₆₂ y una cavidad hidrofóbica de la amilosa que forma parte del almidón crudo. La interacción hidrofóbica entre el almidón crudo y el Trp₅₆₂ podría causar la liberación de moléculas de agua incluidas en la amilosa para romper puentes de hidrógeno internos (Goto *et al.*, 1994a, 1995). La zona O-glicosilada anexa al dominio de unión a almidón crudo (ver siguiente apartado), interaccionaría con las moléculas de agua y las suministraría al dominio de unión a almidón permitiendo una digestión eficaz del polímero (Goto *et al.*, 1994a; 1995).

2.2.3. Región altamente glicosilada.

La región O-glicosilada que une los dominios catalítico y de unión al almidón en la glucoamilasa de *A. niger* contiene un 70% de carbohidratos. Esta región consta de cortas cadenas de oligosacáridos, formadas principalmente por unidades de manosa unidas por enlaces α -(1,2) y α -(1,6) que se unen a residuos de Ser y Thr (Gunnarsson *et al.*, 1984). Las regiones de unión O-

glicosiladas son muy variables ya que su función de conectar no depende de una secuencia específica. Las glucoamilasas de *A. oryzae*, *H. grisea*, *H. resinae* y *N. crassa* tienen una región de unión muy corta, mientras que las glucoamilasas de otras especies del género *Aspergillus* la presentan más larga y conservada (Coutinho y Reilly, 1994a).

En cuanto a la función de esta región hay distintas opiniones. Algunos autores sugieren que actuaría como una barra semirígida que dotaría a la proteína de un armazón que mantendría una distancia fija entre el dominio de unión y el dominio catalítico (Williamson *et al.*, 1992a), mientras otros postulan una implicación en la digestión del almidón crudo (Hayashida *et al.*, 1989). Semimaru y colaboradores (1995), estudiaron en *A. awamori* var *kawachi* la función de la región O-glicosilada y concluyeron que la región C-terminal de la zona O-glicosilada es esencial para la secreción de la enzima y que las cadenas de manosa unidas a este dominio, junto con el dominio de unión al almidón, juegan un papel importante en la digestión eficaz del almidón crudo. Estos resultados apoyan el modelo de acción mencionado en el apartado anterior que propone que las cadenas de manosa dispuestas paralelamente en este dominio, pueden disociar los grupos de moléculas de agua que se encuentran alrededor de las micelas de almidón y facilitar la hidratación parcial del almidón crudo (Goto *et al.*, 1995). Investigadores del mismo grupo, al sustituir las cadenas de manosa por glucosa, observaron una disminución de la actividad sobre almidón crudo (Fukuda *et al.*, 1992). Estas cadenas de azúcares también se han relacionado con la estabilidad de la proteína. Según Williamson y colaboradores (1992b), la presencia de una pequeña región O-glicosilada es esencial para la máxima estabilidad de los dominios de la glucoamilasa, y ese efecto es ejercido por la zona de unión más próxima al dominio catalítico. La eliminación o la modificación de las cadenas de oligosacáridos lleva consigo la disminución de la estabilidad frente al pH y la temperatura (Shenoy *et al.*, 1984; Neustroev *et al.*, 1993).

Como se indicó previamente, las regiones de unión O-glicosiladas son de longitud variable y se ha relacionado la influencia de una larga región O-glicosilada con una secreción más eficaz. Por ejemplo, en la subfamilia *Saccharomyces* (ver siguiente apartado), la glucoamilasa de *S. cerevisiae* que

carece de región glicosilada no se secreta y las deleciones en la región O-glicosilada de la glucoamilasa de *S. diastaticus* afectan a la secreción de la enzima (Yamashita, 1989). También disminuye el nivel de secreción de glucoamilasa cuando se realizan deleciones en la región O-glicosilada de *A. awamori* var *kawachi* (Semimaru et al., 1995).

2.2.4. Clasificación de las glucoamilasas.

Utilizando el alineamiento de las secuencias primarias de las glucoamilasas y el análisis de estas mediante grupos de hidrofobicidad, Coutinho y Reilly (1994a; b) han agrupado las secuencias de glucoamilasas de distintos orígenes en cinco subfamilias estructuralmente similares (tabla 4).

TABLA. 4. Subfamilias de glucoamilasas (Tomado de Coutinho y Reilly, 1994a).

SUBFAMILIA	MICROORGANISMO
A - <i>Aspergillus</i>	<i>A. awamori</i> var <i>kawachi</i> <i>A. niger</i> / <i>A. awamori</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. shirousamii</i> <i>H. resinae</i> <i>Humicola grisea</i> var <i>thermoidea</i> <i>N. crassa</i>
B - <i>Rhizopus</i>	<i>R. oryzae</i>
C - <i>Saccharomycopsis</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> <i>S. fibuligera</i> KZ
D - <i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>Saccharomyces diastaticus</i>
E - <i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> sp.

El análisis de grupos de hidrofobicidad indica que todas las glucoamilasas estudiadas comparten la misma estructura de dominio catalítico que la determinada para *A. awamori* y que los dominios de unión a almidón de las glucoamilasas fúngicas presentan elementos de estructura secundaria comunes con los dominios de unión a almidón de las ciclodextrin glucosiltransferasas de *B. circulans* y *B. stearrowthermophilus* (Coutinho y Reilly, 1994a).

2.3. REGULACIÓN EN HONGOS FILAMENTOSOS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN GLUCOAMILASAS.

La expresión de la mayoría de los genes de hongos filamentosos que codifican glucoamilasas es inducida por la presencia de almidón en el medio de cultivo y reprimida por la presencia de fuentes de carbono fácilmente metabolizables. El caso más estudiado ha sido el de los genes *glaA* de *A. awamori* y *A. niger* en los que la regulación de la síntesis de glucoamilasa sigue un patrón bastante complejo y se ejerce a nivel de la transcripción. Como se indicó en el apartado 2.1. de esta sección, en *A. niger* existen dos glucoamilasas que difieren en tamaño. Ambas están codificadas por un mismo gen que contiene cinco intrones (ver tabla 3), de forma que el procesamiento diferencial del último de ellos da lugar a los dos tipos de enzima. Esta regulación postranscripcional delimita la concentración de cada una de las glucoamilasas en el medio de cultivo (Boel *et al.* 1984a,b). En *A. niger* la producción de glucoamilasa se induce en medio con almidón y maltosa como fuente de carbono y se reprime en presencia de xilosa. Curiosamente, la glucosa no sólo parece no inhibir la transcripción del gen, sino que la activa. Este monosacárido y la maltosa inducen la síntesis de glucoamilasa incluso en presencia de xilosa, mientras que el almidón no es capaz de suprimir el efecto inhibitorio de la xilosa. Esta situación sugiere que el almidón por sí mismo no es la señal para la síntesis de glucoamilasa. Una posible explicación a este fenómeno es que alguna hidrolasa presente en bajo nivel actúe sobre el almidón y que los productos de hidrólisis actúen como inductores de la síntesis de glucoamilasa. Si así ocurriera la xilosa debería reprimir la acción de esta

hidrolasa. Este modelo sería análogo al propuesto en *T. reesei* para la inducción de la celobiohidrolasa por celulosa (Fowler *et al.*, 1990).

En cepas de *A. niger* sobreproductoras de glucoamilasa se ha comprobado que no existe correlación entre el número de copias integradas del gen *glaA* y la proteína secretada al medio, indicando que algún factor limitante impide obtener un elevado nivel de expresión (Verdoes *et al.*, 1993). Para comprobar si en la regulación del gen *glaA* estaban implicadas proteínas activadoras se introdujeron múltiples copias del promotor de la glucoamilasa en cepas de *A. niger* que portaban el promotor de la glucoamilasa fusionado a un gen indicador. La introducción de más copias dió como resultado la disminución de la expresión del gen indicador, concluyéndose que la expresión del gen *glaA* estaba regulada al menos por un factor regulador positivo (Verdoes *et al.*, 1994). Sin embargo, el número de copias del promotor no influyó en la represión por xilosa.

En *A. oryzae* la expresión del gen de la glucoamilasa también se regula a nivel de la transcripción y está inducida por almidón y maltosa como fuente de carbono y reprimida por glucosa (Hata *et al.*, 1992). Por el contrario, la regulación en *Rhizopus chinensis* es bastante peculiar ya que la maltosa y el almidón en concentración superior al 0.5% actúan como represores de la síntesis de glucoamilasa (Wang, 1988).

Por análisis de delección del promotor de los genes *glaA* de *A. niger* y *A. oryzae* se ha delimitado una zona que puede contener las secuencias diana de las posibles proteínas reguladoras, ya que su eliminación comporta una reducción o la pérdida de la expresión del gen indicador. (Fowler *et al.*, 1990; Hata *et al.*, 1992; Verdoes *et al.*, 1994). La comparación de las secuencias nucleotídicas de los promotores de distintos genes de glucoamilasas entre sí y con los de los genes de otras enzimas amilolíticas fúngicas revela datos interesantes. Así, al comparar el promotor del gen *glaA* de *A. niger* con los promotores de los genes *amyA* y *amyB* de *A. oryzae* se encuentran cuatro elementos con similitud de secuencia, siendo uno de ellos idéntico a una región implicada en la expresión del gen *amdS* de *A. nidulans*. Esta zona de los promotores de los genes *amdS* y *amy* interacciona con proteínas nucleares de *A. nidulans*, indicando que puede ser una secuencia diana para un

activador general de la transcripción (Verdoes *et al.*, 1994). En *A. nidulans* la represión por catabolito está mediada por la proteína CreA que reconoce secuencias SYGGGG en los promotores de los genes que regula (Dowzer y Kelly, 1991; Cubero y Scazzocchio, 1994). En el promotor del gen *glaA* de *A. niger* existen dos copias de la secuencia de reconocimiento de dicha proteína. Estas secuencias solapan con una región, también conservada en el promotor del gen *glaA* de *A. oryzae*, que está probablemente implicada en la unión de una proteína activadora específica. Por tanto en la misma región podrían encontrarse las secuencias diana de las proteínas activadoras y represoras.

Hay que destacar que la expresión heteróloga del promotor del gen *glaA* de *A. niger* en *A. nidulans* da lugar a transformantes que inducen la expresión de los genes situados bajo su control en presencia de almidón (Carrez *et al.*, 1990).

2.4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS GENES FÚNGICOS QUE CODIFICAN GLUCOAMILASAS.

Los genes fúngicos que codifican glucoamilasas tienen varias aplicaciones biotecnológicas, algunas de ellas se detallan a continuación.

2.4.1. Sobreproducción de glucoamilasa.

Los genes que codifican glucoamilasas tienen un interés biotecnológico intrínseco. Dado el mercado de ventas de esta enzima, la sobreproducción de la misma resulta relevante. En este sentido, las técnicas de modificación genética han proporcionado una estrategia racional para la mejora de la producción al permitir la introducción y expresión de copias adicionales de estos genes. Transformando la cepa silvestre de *A. niger* con vectores que portaban de una a cuatro copias del gen *glaA* se obtuvieron transformantes sobreproductores de glucoamilasa (Verdoes *et al.*, 1993). En las condiciones utilizadas algunos transformantes secretaron hasta veinte veces más glucoamilasa que la cepa silvestre. No se encontró correlación entre el número de copias integradas en cada transformante y la cantidad de proteína

secretada, sin embargo los niveles de mRNA si se correlacionaron con la cantidad de glucoamilasa producida (Verdoes *et al.*, 1993). Estos resultados indican que en los transformantes multicopia la producción de la enzima está regulada a nivel de la transcripción y como se ha indicado en el apartado anterior, existe algún factor limitante que impide obtener mayores niveles de expresión.

2.4.2. Producción de proteínas heterólogas bajo el control de promotores de genes de glucoamilasas.

Los genes que codifican glucoamilasas contienen promotores de expresión fuerte en condiciones de inducción con almidón o maltosa. Por ello se ha pensado en su empleo biotecnológico en la construcción de vectores para dirigir la expresión de proteínas de alto valor añadido. Asimismo, la secuencia señal de la glucoamilasa ha sido añadida a varios de estos vectores para construir proteínas de fusión que se secreten al medio de cultivo.

Gwynne y colaboradores (1987) utilizaron el promotor del gen *glaA* de *A. niger* para secretar en *A. nidulans* el interferon $\alpha 2$ humano. El gen de la proquimosina bovina se ha expresado en varios huéspedes bajo el control de las secuencias promotoras y terminadoras del gen *glaA*. Integrando en el locus *glaA* de *A. niger* una construcción que contenía el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger* en fusión traduccional con el cDNA de la proquimosina se secretaron 11 mg/l de quimosina activa (van Gorcom *et al.*, 1994). Ward y colaboradores (1990) aumentaron la secreción de quimosina añadiendo un sitio adicional de N-glicosilación o fusionando toda la región codificante del gen *glaA* con la proquimosina. En este último caso se secretó al medio quimosina activa por la eliminación autocatalítica de las secuencias de *glaA* y del propéptido a pH ácido. En *A. oryzae* también se ha expresado el gen de la proquimosina utilizando varias construcciones. El mayor nivel de producción se obtuvo al fusionar el cDNA de la proquimosina a la glucoamilasa desprovista del dominio de unión al almidón (Tsuchiya *et al.*, 1994).

La fusión con el promotor de la glucoamilasa también se ha utilizado para producir la interleuquina humana (hIL6). Este gen se ha expresado en *A. nidulans* bajo el control del promotor *glaA* de *A. niger* precedido por su

secuencia señal o por la de *glaA* (Carrez *et al.*, 1990). La producción se incrementó cuando se fusionó el cDNA de hIL6 con el gen completo de la glucoamilasa y se introdujo entre la glucoamilasa y la proteína madura, un péptido espaciador con una secuencia de procesamiento similar a la de la endoproteasa KEX2. Este sitio de procesamiento es reconocido y cortado eficazmente tanto en *A. nidulans* como en *A. niger* dando lugar a hIL6 madura y biológicamente activa, llegando a secretar en algunos transformantes de *A. niger* hasta 15 mg/l de proteína (Contreras *et al.*, 1991; Broekhuijsen *et al.*, 1993). También se ha expresado como fusión traduccional con la glucoamilasa de *A. niger* la fosfolipasa porcina A₂ utilizando un mutante deficiente en proteasas (Roberts *et al.*, 1992).

Utilizando estrategias similares se ha secretado en *A. niger* la lisozima de clara de huevo. Archer y colaboradores (1990) insertaron el cDNA de la lisozima entre el promotor y el terminador del gen de la glucoamilasa y consiguieron secretar 12 mg/ml de proteína procesada correctamente. El nivel de secreción aumentó hasta 1 g/l de proteína activa separada de la glucoamilasa por procesamiento tipo KEX2 al fusionar al cDNA de la lisozima un fragmento de la glucoamilasa de *A. niger* correspondiente a los primeros 498 aminoácidos (Jeenes *et al.*, 1993).

2.4.3. Expresión de genes fúngicos que codifican glucoamilasas en levaduras.

La levadura *S. cerevisiae* se utiliza habitualmente en la producción de alcohol y bebidas alcohólicas a partir de materiales que contienen almidón. Sin embargo, *S. cerevisiae* no secreta las enzimas necesarias para hidrolizarlo. En muchas industrias se obtiene glucosa a partir de almidón adicionando α -amilasa y glucoamilasa a las fermentaciones. La construcción de cepas de *S. cerevisiae* con capacidad amilolítica permite, además de abaratar los costes de producción, eliminar la separación que existe entre el proceso de sacarificación del almidón y el proceso de fermentación.

Algunas glucoamilasas fúngicas han sido expresadas en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* bajo el control de las señales promotoras y terminadoras de los genes de levadura *ADH1*, *GPD* y *ENO1* (Innis *et al.*, 1985;

Hata *et al.*, 1991; Shibuya *et al.*, 1992a; de Moraes *et al.*, 1995). Además, la glucoamilasa de *R. oryzae* se ha expresado bajo el control de su propio promotor (Ashikari *et al.*, 1986). Las glucoamilasas secretadas por las levaduras recombinantes generalmente son de mayor tamaño que la enzima original debido a la tendencia que tienen las levaduras a hiperglicosilar las proteínas que secretan. El péptido señal se procesa correctamente y permite que la mayor parte de la proteína sea secretada al medio extracelular. La glucoamilasa secretada mantiene su actividad frente a los mismos sustratos aunque puede verse afectada por el mayor grado de glicosilación (Tanaka *et al.*, 1986; Hata *et al.*, 1991; Vainio *et al.*, 1993).

También se han desarrollado cepas de *S. cerevisiae* que expresan conjuntamente las actividades α -amilasa y glucoamilasa. Con este fin se ha construido una fusión génica con los cDNAs de la α -amilasa y glucoamilasa de *Aspergillus shirousamii* y se ha expresado en *S. cerevisiae* bajo el control del promotor *ADH1* y el terminador *CYC1* de levadura (Shibuya *et al.*, 1992b). En esta proteína bifuncional las dos actividades son prácticamente iguales a las de las proteínas secretadas independientemente. Sobre almidón crudo la proteína de fusión presenta una actividad mucho mayor. El péptido señal de la α -amilasa se elimina correctamente indicando que la glucoamilasa fusionada a su extremo C-terminal no afecta al proceso, sin embargo el nivel de secreción no es muy elevado (Shibuya *et al.*, 1992b). De igual manera se han obtenido distintos transformantes de levadura que portan fusiones traduccionales de la α -amilasa de *B. subtilis* o la α -amilasa pancreática de ratón con la glucoamilasa de *A. awamori*, o que expresan independientemente combinaciones de dos de estos genes. Su expresión se ha controlado con los promotores *PGK* o *ADH1* y para la secreción se han utilizado las secuencias señal propias de los genes utilizados o la del factor α (de Moraes *et al.*, 1995).

Algunas de estas glucoamilasas se han expresado en cepas de levaduras industriales. Así, la glucoamilasa de *A. awamori* se ha expresado con un elevado rendimiento en la producción de etanol y en la utilización de almidón. Para ello el gen de la glucoamilasa, bajo el control del promotor y terminador del gen *ENO1*, se integró de manera estable en el genoma de la levadura y no

necesitó presión selectiva para mantenerse (Cole *et al.*, 1988; Inlow *et al.*, 1988). De forma similar, el cDNA de la glucoamilasa de *H. resinae* se ha expresado en cepas industriales de levadura bajo el control de las señales reguladoras del gen *ADH1* utilizando plásmidos integrativos y replicativos. Las integraciones se dirigieron al locus *LEU2* o a secuencias *ARS1*, obteniéndose una secreción eficaz de la glucoamilasa al medio de cultivo (Vainio *et al.*, 1993; Vainio *et al.*, 1994).

Un uso frecuente de las glucoamilasas se da en la industria cervecera, donde se añade glucoamilasa a la fermentación para producir cervezas con bajo contenido en calorías. Para evitar la adición de esta enzima al mosto se han construido cepas recombinantes de levadura cervecera que secretan glucoamilasas. Recientemente, el gobierno británico ha aprobado la utilización de una de estas cepas para la elaboración de este tipo de cervezas (Thorne, 1994; Hammond, 1995).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El hongo filamentoso *Aspergillus terreus* (Thom) es uno de los organismos más comunes en suelos de zonas cálidas dedicados a la agricultura, habiendo sido descrito como la especie mayoritaria en la rizosfera de plantas de piña y de variedades de algodón egipcio. Asimismo, este hongo se ha aislado de una gran variedad de materiales en descomposición como algodón, forraje, granos de cereales o paja (Raper y Fennell, 1965). Para colonizar este entorno natural, *A. terreus* secreta al medio una gran variedad de metabolitos, la mayoría de los cuales tienen relevancia industrial. Tal es el caso del ácido itacónico, un ácido dibásico insaturado usado como material de partida en la síntesis de poliésteres y plásticos, que es producido por *A. terreus* a partir de piruvato (Jaklitsch *et al.*, 1991); o del ácido mevinolínico, inhibidor de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, que rebaja los niveles de colesterol en sangre (Bilheimer *et al.*, 1983). A esta lista de compuestos de interés industrial producidos por *A. terreus* podríamos

añadir la L-3,4-dihidroxi-fenil-L-alanina (Chattopadhyay y Das, 1990), antibióticos como el ácido terrecíclico (Hirota *et al.*, 1984), o compuestos antitumorales como la quadrona (Calton *et al.*, 1978).

La distribución geográfica de *A. terreus* indica el papel esencial de esta especie en la descomposición de la materia orgánica de su nicho ecológico. Para llevar a cabo esta degradación, *A. terreus* produce distintas enzimas extracelulares como celulasas, hemicelulasas, lipasas, proteasas o amilasas. La secreción de estas actividades es tan elevada que algunos autores postularon para este hongo la mayor capacidad celulolítica dentro del género *Aspergillus* (White *et al.*, 1948). A pesar de ello, y en contraste con las especies *A. niger* y *A. oryzae*, *A. terreus* no ha sido usado industrialmente como organismo productor de enzimas. Dejando al margen la histórica relevancia industrial de las otras dos especies fúngicas, actualmente la falta de interés por *A. terreus* se debe en gran medida a la carencia de técnicas básicas de modificación genética para este microorganismo. Si se exceptúa la descripción de la construcción de una genoteca de *A. terreus* en cósmidos (Shoubochkina y Fodor, 1988), son pocas las referencias a la aplicación de técnicas moleculares en esta especie fúngica y tan sólo se ha descrito la clonación de los genes que codifican una blastocidina S desaminasa (Kimura *et al.*, 1994) y una dihidrogeodina oxidasa (Huang *et al.*, 1995).

De todas las enzimas secretadas por *A. terreus*, la glucoamilasa es la más importante desde el punto de vista industrial. Se han estudiado las condiciones óptimas de cultivo para su producción (Ali *et al.*, 1989) y se ha determinado que la síntesis de la misma está reprimida por catabolito (Ghosh *et al.*, 1990a), habiéndose aislado mutantes en su producción desreprimidos por glucosa (Ghosh *et al.*, 1991a). La enzima ha sido purificada desde varias cepas (Ali *et al.*, 1990; Ali y Hossain, 1991; Ghosh *et al.*, 1990b; 1991b). Es una glicoproteína que, dependiendo del aislado, presenta un peso molecular entre 70000 y 86000 con un contenido de carbohidratos del 7.5% (p/p). Su punto isoeléctrico es 3.4 y su pH óptimo está alrededor de 5 unidades, aunque es estable a valores de pH entre 3 y 7 unidades. Su temperatura óptima es

60°C pero es bastante activa entre 30 y 75°C y su K_m frente a almidón está entre 4 y 6 mg/ml.

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en la mejora de la producción de enzimas de interés para las industrias agroalimentarias. Como se indicó previamente, *A. terreus* produce una glucoamilasa de interés en la producción de cervezas, así como una β -glucosidasa y una ramnosidasa de uso potencial en la liberación de aromas frutales en vinos (S. Vallés, comunicación personal), y distintas xilanasas que pueden resultar útiles en el sector panadero. En este trabajo se pretende aplicar las técnicas básicas de biología molecular en esta especie fúngica para poder sobreproducir alguna de estas enzimas de interés industrial. Para ello se abordarán los siguientes objetivos:

- 1) Desarrollo de un sistema de transformación para *A. terreus* como requisito previo para poder llevar a cabo mejoras biotecnológicas en este microorganismo.
- 2) Clonación del gen que codifica la glucoamilasa de *A. terreus* y estudio de su regulación.
- 3) Sobreproducción de la glucoamilasa de *A. terreus*. Utilizando las técnicas desarrolladas en el objetivo 1 y el gen clonado en el objetivo 2, se pretende construir cepas fúngicas que sobreproduzcan y/o produzcan específicamente la glucoamilasa para facilitar su purificación a gran escala.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MICROORGANISMOS.

1.1. Bacterias.

La cepa *Escherichia coli* DH5 α (*supE44*, Δ *lacU169* [ϕ 80 *lacZ* Δ M15], *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) se utilizó rutinariamente como cepa receptora de transformación.

La cepa *E. coli* INV α F' (*endA1*, *recA1*, *hsdR17*(r_k^- , m_k^+), *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA*, *relA1*, ϕ 80 *lacZ* Δ M15 (*lacZYA-argF*) *deoR*⁺, F') se utilizó como cepa receptora de los plásmidos derivados de pCR1000.

La cepa *E. coli* LE392 (F⁻, *hsdR17*(r_k^- , m_k^-), *supE44*, *supF58*, *lacY1*, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*, λ) se utilizó como huésped en la construcción de la genoteca de *Aspergillus terreus* en el fago λ EMBL3.

1.2. Hongos filamentosos.

A lo largo del trabajo se utilizó la cepa de *A. terreus* CECT 2663. En algunos experimentos de transformación se usaron las cepas de *Aspergillus nidulans* V001 (*argB2*, *biA1*, *metG1*) y V002 (*riboB2*, *pyroA4*, *niiA4*, *yA1*) cedidas por el Dr Miguel Ángel Peñalva (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid). La cepa de *A. niger* CECT 2775 se utilizó para obtener un fragmento del gen *glaA*.

2. PLÁSMIDOS.

Los plásmidos pUC13 (Messing, 1983), pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) y pBluescriptIIISK+ (Stratagene, USA) son vectores de clonación para *E. coli* que contienen un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección y el origen de replicación del plásmido ColE1. Además poseen un fragmento del operón *lac* de *E. coli* que complementa una delección en el gen *lacZ*. Este fragmento incluye un sitio múltiple de clonación que, en las estirpes adecuadas, permite detectar los clones portadores de plásmidos con inserto por presentar un fenotipo negativo para la actividad β -galactosidasa.

Los vectores pCR1000 (Invitrogen, USA) y pT7Blue (Novagen, USA) están diseñados para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR. Como marcador de selección poseen un gen de resistencia a kanamicina (pCR1000) o a ampicilina (pT7Blue).

El plásmido pAN7-1 (figura 7A) es un vector de transformación para hongos filamentosos (Punt *et al.*, 1987) que posee como marcador de selección el gen *hph* de *E. coli* y confiere resistencia a la HmB. Este gen se encuentra bajo el control del promotor del gen *gpdA* y del terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. Esta construcción es funcional en muchas especies de hongos filamentosos (González y Ramón, 1990; van den Hondel *et al.*, 1991).

El plásmido pFB39 (Buxton *et al.*, 1987) es un vector de transformación para hongos que contiene como marcador de selección el gen *argB* de *A. nidulans* que codifica la OTCasa (figura 7B).

El plásmido pPL5 (Oakley *et al.*, 1987b) contiene un fragmento de DNA de *A. nidulans* que porta como marcador de selección el gen *riboB* y confiere prototrofia para la riboflavina (figura 7C).

3. MEDIOS DE CULTIVO.

LB.

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O destilada	hasta 1 l

pH 7 (ajustado con NaOH).

Para crecer la cepa *E. coli* LE392 este medio se suplementó con maltosa al 0.2% (p/v) y MgSO₄ 10 mM.

MCA. Medio completo de *Aspergillus* (Pontecorvo *et al.*, 1953).

Solución de sales (SSA)	20 ml
Solución de vitaminas (SVA)	10 ml
Glucosa	10 g
Peptona	2 g
Extracto de levadura	1 g
Casaminoácidos	1.5 g
H ₂ O destilada	hasta 1 l

pH 6.8 (ajustado con NaOH).

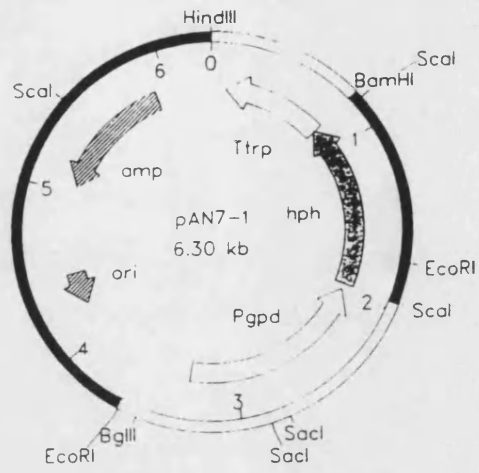
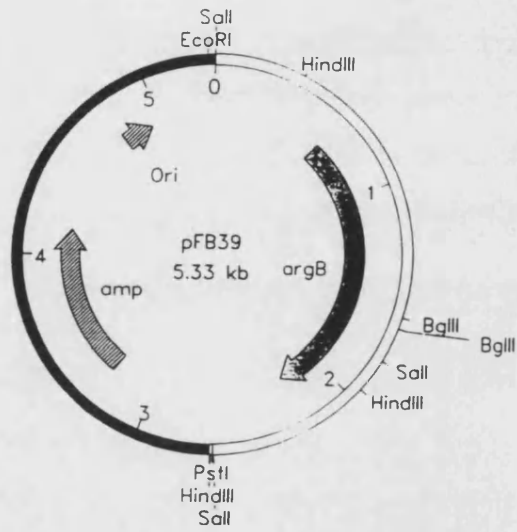
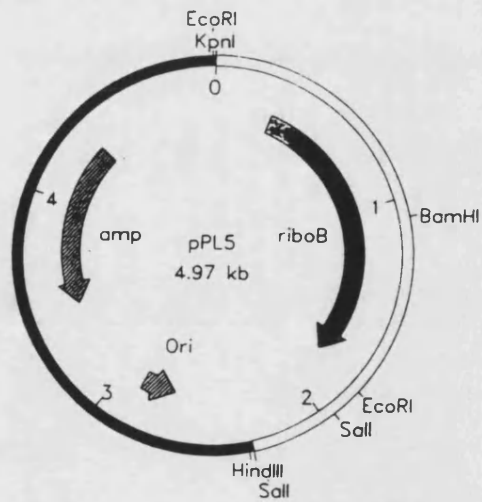
A**B****C**

FIGURA 7. Mapas de restricción de los plásmidos pAN7-1 (A), pFB39 (B) y pPL5 (C).

MM. Medio mínimo.

Medio MMA en el que la glucosa se sustituyó por la fuente de carbono que se especifica en cada caso al 1% (p/v) de concentración.

MMA. Medio mínimo de *Aspergillus* (Pontecorvo et al., 1953).

Solución de sales (SSA)	20 ml
Glucosa	10 g
Tartrato amónico	0.3 g
H ₂ O destilada	hasta 1 l
pH 6.8 (ajustado con NaOH).	

SbMMA. (Sobrecapa para protoplastos).

Medio SMMA con agar al 1% (p/v).

SET. Solución de elementos traza.

Na ₂ B ₄ O ₇	40 mg
CuSO ₄	400 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	800 mg
MnSO ₄	800 mg
Na ₂ MoO ₄	800 mg
ZnSO ₄	8 mg
Agua destilada	hasta 1 l

SMMA. (Medio para la regeneración de protoplastos).

Medio MMA con Sacarosa 1 M.

SSA. Solución de sales.

KCl	26 g
MgSO ₄	26 g
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	76 g
Solución de elementos traza (SET)	50 ml
Agua destilada	hasta 1 l

SVA. Solución de vitaminas.

Tiamina	50 mg
Biotina	10 mg
Ácido nicotínico	100 mg
Pantotenato cálcico	200 mg

Piridoxina. HCl	50 mg
Riboflavina	100 mg
Agua destilada	hasta 1 l

Esterilizada por filtración. Conservada a 4°C en oscuridad.

Los medios se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 min. Para preparar los medios sólidos se añadieron 20 g/l de agar con la excepción del medio de sobrecapa utilizado para regenerar protoplastos al que se le añadieron 10 g/l. Los distintos requerimientos nutricionales se añadieron al medio de cultivo a una concentración final de 10 ng/ml (biotina), 10 µg/ml (nicotinamida, piridoxina y riboflavina), 100 µg/ml (arginina, metionina y ornitina) o 500 µg/ml (citrulina).

4. TAMPONES Y SOLUCIONES.

BES.

Ácido Bórico	200 mM
EDTA	30 mM
SDS	1% (p/v)
pH 9.0	

Solución de Denhardt (100x).

BSA	2% (p/v)
Ficoll™	2% (p/v)
Polivinilpirrolidona	2% (p/v)

Solución de hibridación.

SSC	5x
Solución de Denhardt	5x
SDS	0.1% (p/v)
Formamida	50% (v/v)
DNA de esperma de salmón sonicado	100 µg/ml.

SSC (20x).

NaCl	3 M
Citrato trisódico	0.3M

Tampón de extracción.

Se disolvieron 1 mg/ml de Novozym 234 (Novo, Dinamarca) y 1.2 mg/ml de BSA en tampón TP. En las últimas etapas del trabajo el Novozym 234 fue sustituido por el preparado de enzimas líticos de *Trichoderma harzianum* comercializado por Sigma (USA) a la misma concentración.

Tampón PEG.

PEG 6000	60% (p/v)
Tris.HCl	10 mM pH 7.5
CaCl ₂	10 mM

Tampón ST1.

Sorbitol	0.6 M
Tris.HCl	10 mM pH 7.5

Tampón ST2.

Sorbitol	1 M
Tris.HCl	10 mM pH 7.5

Tampón STCa.

CaCl₂ 10 mM en tampón ST2.

TE.

Tris.HCl	10 mM pH 8.0
EDTA	1 mM pH 8.0

TL.

MgSO ₄	0.6 M
NaH ₂ PO ₄	10 mM pH 5.8

TNES.

Tris. HCl	200 mM pH 8
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0.5% (p/v)

TP.

MgSO ₄	1.2 M
NaH ₂ PO ₄	10 mM pH 5.8

5. OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS.

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados a lo largo de este trabajo fueron suministrados por Durviz S.A. (España) y Oligos Etc., Inc. (USA). Sus secuencias y nombres se detallan en la tabla 5.

TABLA 5. Oligonucleótidos sintéticos utilizados a lo largo del trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA
ARG1	5'-GCTTTCGAATCCGTTGC-3'
DIR	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
EGLA	5'-CGGTCGACTGCAGAAGC(T) ₁₇ -3'
EGLB	5'-CGGTCGACTGCAGAAGCTT-3'
GLA1	5'-GGTGAACCCAAGTTCAA-3'
GLA5	5'-GATTGATTGTCACCGCC-3'
GLA6	5'-CGAGATCTTCTCTGATCGGCG-3'
GLA7	5'-TATCGTGATTGCCAGTCC-3'
GLA9	5'-CAGAGAGAGAGCCATTCG-3'
GLA10	5'-CTACAATGGAAACCCGTGG-3'
GLASEC	5'-CCGCGGTGGACGTCC-3'
PGLA2	5'-GGTCAAATTGCCGAGCTG-3'
REV	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

6. PRODUCTOS.

Se utilizaron sales minerales de Panreac (España) y componentes para medios de cultivo de Pronadisa (España) y Oxoid (Reino Unido). Otros productos se adquirieron a Sigma, Merck (Alemania) o Fluka (Suiza).

7. CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

Todos los microorganismos se cultivaron a 37°C. Los cultivos en medio líquido se incubaron con agitación orbital a 200 rpm. Para los cultivos de los hongos en medio líquido se inocularon entre 10^5 y 10^6 ufc/ml. Las cepas de *E. coli* se conservaron a -70°C en el medio de crecimiento con glicerol estéril a una concentración final del 16% (v/v). Las esporas de hongos se almacenaron a -70°C en glicerol estéril al 50% (v/v). Los fagos se guardaron a -70°C en DMSO al 7% (v/v).

8. MUTAGÉNESIS DE *A. terreus*.

Los mutantes auxótrofos de *A. terreus* se obtuvieron por irradiación de las esporas con luz UV. Para la mutagénesis se preparó una suspensión de 10^8 conidios de *A. terreus* en H₂O, se filtró a través de una malla de nailon de 42 µm de poro y se lavó dos veces para eliminar cualquier resto de medio de cultivo. Estas esporas, en un volumen de 10 ml, se irradiaron con luz UV en una placa Petri con agitación constante. Se utilizó una lámpara Sylvania de luz UV de 254 nm con una potencia de $1.4 \mu\text{w}/\text{cm}^2$ a una distancia de 20 cm durante 30 o 45 seg (10 y 2.5% de viabilidad respectivamente). Una vez realizado el tratamiento, las esporas se guardaron en oscuridad durante una hora para evitar que actuaran los mecanismos de fotoreparación celular. Transcurrido este tiempo las esporas se añadieron a 50 ml de medio MMA y se incubaron a 37°C y 200 rpm. Los mutantes se aislaron a partir de este cultivo siguiendo la técnica del enriquecimiento por filtración (Picknett *et al.*, 1987) y para su identificación se sembraron en placas de medio MMA suplementadas con distintos requerimientos nutricionales (Sherman *et al.*, 1986).

9. OBTENCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS DE *A. nidulans* Y *A. terreus*.

Se utilizó un sistema basado en el protocolo publicado por Tilburn y colaboradores (1983) para *A. nidulans*. En un matraz erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio MMA se inocularon 10^5 ufc/ml de *A. terreus*. Se incubaron a 37°C y 200 rpm en un agitador orbital durante 16 a 18 horas. El micelio crecido se recogió por filtración a través de una malla de nailon de 42 μ m de diámetro de poro y se lavó con tampón TL. El micelio parcialmente escurrido se pesó y se resuspendió en 10 ml de tampón de extracción por gramo de micelio. La mezcla se incubó durante 90 min a 30°C y 100 rpm con agitación orbital. La liberación de protoplastos se siguió mediante observaciones periódicas al microscopio. Los protoplastos obtenidos se separaron de los restos de micelio por filtración a través de una malla de nailon. La suspensión de protoplastos obtenida se transfirió a un tubo de centrifuga estéril, se cubrió con un volumen de tampón ST1, y se centrifugó en un rotor basculante a 7000 x g durante 10 min a temperatura ambiente. En estas condiciones los protoplastos formaron una banda en la mitad superior del tubo mientras los restos precipitaron en el fondo. Los protoplastos se transfirieron a un tubo de centrifuga limpio, se diluyeron con 5 volúmenes de tampón ST2 y se centrifugaron en las mismas condiciones. El precipitado de protoplastos se resuspendió en 1 ml de tampón ST2 se transfirió a un tubo de microcentrifuga estéril y se centrifugó 1 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1 ml de STCa y se lavó dos veces en las mismas condiciones. Finalmente los protoplastos se resuspendieron en STCa a una concentración de 5×10^8 /ml. Para cada transformación se mezclaron 200 μ l de la suspensión de protoplastos con 50 μ l de tampón PEG y 10 μ g de plásmido transformante en un volumen no superior a 10 μ l. Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 min transcurridos los cuales se añadió 1 ml de tampón PEG y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 4 ml de tampón STCa para disminuir el efecto tóxico del PEG. Alícuotas de 0.5 ml de esta mezcla se añadieron a tubos que contenían 5 ml de SbMMA atemperados a 45°C, se vertieron sobre placas de SMMA y se incubaron a 37°C. En los experimentos

de cotransformación se utilizó una relación entre el plásmido transformante y el cotransformante 1:5 (normalmente 5 µg : 25 µg). Las placas y los tubos que se utilizaron para la selección de los transformantes se suplementaron con 0.5 mg/ml de HmB cuando el vector de transformación fue pAN7-1. En todos los experimentos se realizaron controles de reversión y viabilidad. Para ello, protoplastos sin tratar con el DNA transformante se sembraron en placas de medio selectivo (reversión) y no selectivo (viabilidad).

Los transformantes aparecieron tras incubar las placas durante tres o cuatro días a 37°C. Conidios procedentes del centro de las colonias se transfirieron a placas de medio selectivo. A partir de estas placas se preparó una pequeña suspensión de esporas, se filtró a través de una malla de nailon o de lana de vidrio apelmazada y se inocularon distintas diluciones de la misma en placas de medio selectivo. Las colonias discretas que aparecieron en estas placas se consideró que procedían de un único conidio. Para determinar la estabilidad mitótica de los transformantes se utilizaron suspensiones de esporas preparadas a partir de colonias originadas por un único conidio.

10. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*.

La preparación de células competentes de *E. coli* y su transformación se realizaron siguiendo el método de Hanahan (1983). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB con 50 µg/ml de ampicilina o kanamicina, que contenían 40 µg/ml de X-Gal al 2% (v/v) en dimetilformamida.

11. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO.

Los plásmidos de *E. coli* se purificaron siguiendo el método de lisis alcalina tal como se describe en Sambrook y colaboradores (1989).

12. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

La obtención de DNA genómico de *A. terreus* y de otros hongos filamentosos utilizados en este trabajo se realizó siguiendo el protocolo descrito en González y colaboradores (1992). Para extraer DNA de los

transformantes y cotransformantes se utilizó un método de minipreparación de DNA fúngico más rápido que el anterior. Se inocularon 30 ml de MMA con 10^6 ufc/ml de cada transformante y se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 20 h. El micelio crecido se recogió por filtración a través de una malla de nailon y se secó entre servilletas de papel. Para cada extracción se utilizaron 200 mg de micelio escurrido. El micelio se liofilizó y se trituró dentro de un tubo de microcentrífuga utilizando una punta amarilla con la punta sellada. Se añadieron 500 μ l de tampón TNES a 55°C y siguió rompiéndose con la ayuda del agitador de tubos y homogenizando con la ayuda de una pipeta. Se añadieron 350 μ l de fenol equilibrado con Tris precalentado a 55°C y 150 μ l de cloroformo y se continuó homogenizando. Se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente, se recogió la fase acuosa y se trató con 50 μ g/ml de RNasaA durante 30 min a 37°C. Posteriormente se trató con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y cloroformo-isoamílico tal como se describe en Sambrook y colaboradores (1989) y se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol. El precipitado de DNA obtenido, después de lavarse con etanol al 70% (v/v) se resuspendió en 50 μ l de tampón TE.

13. EXTRACCIÓN DE RNA DE *A. terreus*.

Para cada extracción se partió de 50 mg de micelio de *A. terreus* liofilizado y machacado con una varilla de vidrio hasta obtener un polvo muy fino. Se añadieron sucesivamente 500 μ l de solución BES calentada previamente hasta 100°C y 500 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico mientras se agitaba constantemente en un agitador de tubos. Los restos de micelio se precipitaron centrifugando a 13000 rpm durante 30 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se realizaron varias extracciones con fenol-cloroformo-isoamílico hasta que la interfase estuvo limpia. Posteriormente se llevó a cabo una extracción con cloroformo-isoamílico. La fase acuosa final se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol. Tras incubar durante dos horas a -20°C se centrifugó 30 min en las condiciones anteriores. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en 200 μ l de H₂O tratada con dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC). El RNA se precipitó con 1

volumen de LiCl 4 M incubando durante la noche en hielo. El RNA se recuperó centrifugando en las condiciones anteriores, se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en 100 µl de H₂O-DEPC.

Como alternativa a este método se utilizó el reactivo TRISOLV comercializado por Laboratorios Biotecx Inc. (USA) partiendo de 80 a 100 mg de micelio escurrido congelado en nitrógeno líquido y siguiendo el protocolo de extracción sugerido por el fabricante. Para romper el micelio se utilizó un disruptor de células Mini BeadBeater (BioSpec Products Inc., USA) con bolas de acero inoxidable de 2.3 mm de diámetro durante 40 seg a 5000 rpm.

El mRNA se purificó a partir de RNA total utilizando oligo(dT)-celulosa y los reactivos comercializados por Pharmacia (Suecia) en las condiciones sugeridas por el proveedor.

14. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA.

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron indistintamente con las enzimas comercializadas por Boehringer (Alemania), o Promega (USA) utilizando los tampones y condiciones de reacción aconsejados por los proveedores. Cuando fue necesario desfosforilar los extremos de los vectores de clonación se utilizó fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer) utilizando el tampón suministrado por el proveedor y las condiciones de reacción descritas en Sambrook y colaboradores (1989).

La conversión de extremos protuberantes en romos se realizó utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Boehringer) con el tampón y las condiciones de reacción descritas en Sambrook y colaboradores (1989). Las ligaciones entre las moléculas de DNA se realizaron con DNA ligasa del fago T4 (Boehringer) y el tampón suministrado con la enzima siguiendo las recomendaciones de Sambrook y colaboradores (1989).

15. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA.

Los fragmentos de DNA se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión SeaPlaqueTMGTG (Dinamarca). Las porciones de gel que los contenían se fundieron a 68°C, y se les añadió NaCl a una concentración final de 50 mM. El DNA se purificó por extracciones sucesivas con fenol-tris, fenol-

cloroformo y cloroformo-isoamílico y posteriormente se precipitó con acetato sódico 0.3 M y 2 volúmenes de etanol. El DNA se recogió por centrifugación y se resuspendió en un volumen adecuado de TE. Alternativamente, se purificaron utilizando los reactivos comercializados por Promega como Magic PCRpreps siguiendo las instrucciones del fabricante.

16. CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE *A. terreus*.

Se determinaron las condiciones óptimas de digestión del DNA genómico de *A. terreus* con la enzima *Sau3AI* para obtener una población de fragmentos con un tamaño medio de 15 kb. Estas condiciones fueron 0.02 U de enzima por μg de DNA durante 10 min. El DNA digerido se ajustó a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se utilizó para la construcción de la genoteca en el vector λEMBL3 utilizando los brazos del fago $\lambda 1059$ digeridos con *Bam*HI y desfosforilados comercializados por Promega. Para encapsidar los fagos recombinantes se utilizó la mezcla de proteínas y precursores comercializada por Promega como Packagene® Lambda DNA Packaging System. Asumiendo para *A. terreus* un tamaño de genoma similar al de *A. nidulans*, es decir 2.8×10^7 bp (Timberlake, 1978), y aplicando la fórmula de Clarke y Carbon (1976), en la genoteca obtenida la probabilidad de tener representada cualquier secuencia del genoma de *A. terreus* fue del 98%.

Todos los procedimientos relacionados con la obtención de la genoteca, su amplificación, mantenimiento y la obtención de DNA de los fagos recombinantes se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor.

17. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Las moléculas de DNA y RNA se separaron en geles de agarosa. La electroforesis de RNA se realizó en condiciones desnaturizantes con un 6% (v/v) de formaldehído.

18. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

La transferencia de ácidos nucleicos desde geles de agarosa o de calvas de fagos a membranas de nailon Hybond-N™ (Amersham, Reino Unido) se

realizó en condiciones neutras según se describe en Sambrook y colaboradores (1989). Las hibridaciones en condiciones homólogas se realizaron a 42°C y a 37°C en condiciones heterólogas. La composición de la solución de hibridación se detalla en el apartado 4 de esta sección.

Los fragmentos utilizados como sonda se marcaron con (α -³²P)dCTP (Amersham) mediante el método de "random primed" (Feinberg y Volgestein, 1983; 1984) utilizando los reactivos comercializados por Boehringer o Pharmacia.

En las hibridaciones de RNA, tras hibridar con el gen problema, los filtros se lavaron con SDS al 0.1% (v/v) hirviendo y, como control de carga de RNA se rehibridaron con un fragmento *SphI* de 0.9 kb del gen de expresión constitutiva *benA* de *A. nidulans* que codifica la β -tubulina (May *et al.*, 1987).

19. SECUENCIACIÓN DEL DNA.

Los fragmentos de DNA clonados en pUC13, pUC18 o pBluescriptIIISK+ se secuenciaron siguiendo el método de Sanger y colaboradores (1977) utilizando (α -³⁵S)dATP (Amersham) y los reactivos comercializados por USB (USA) como Sequenase™, o Pharmacia, utilizando la polimerasa del fago T₇. Cuando fue necesario se realizaron delecciones seriadas unidireccionales con las nucleasas exoIII y S1 siguiendo el método de Henikoff (1984) y utilizando los reactivos comerciales de Pharmacia. La mayoría de los plásmidos se secuenciaron utilizando oligonucleótidos complementarios de los extremos del sitio múltiple de clonación de los plásmidos de la serie pUC y pBluescriptIIISK+ (oligonucleótidos DIR y REV en la tabla 5). Para completar la secuencia de algunos fragmentos se utilizaron los oligonucleótidos sintéticos ARG1, PGLA1 y GLASEC como iniciadores (tabla 5).

El análisis de secuencias de ácidos nucleicos o proteínas se realizó con los programas DNASIS y PROSIS (Pharmacia) para secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivamente. La búsqueda de homologías de secuencia se realizó con los programas CLUSTAL (Higgins y Sharp, 1989) y GCG (Genetics Computer Group, 1994).

20. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La amplificación del DNA utilizando la técnica de PCR se realizó en un termociclador IHB 2024 (Cherlyn Electronics, Reino Unido) utilizando Taq DNA polimerasa (Promega) o Dinazyme (Finnzymes Oy, Finlandia). En cada reacción se utilizaron 2.5 U de enzima, dNTPs a una concentración final 0.2 mM, y los oligonucleótidos cebadores a 2 μ M en el tampón de reacción suministrado por el proveedor con la concentración de MgCl₂ ajustada a 1.5 mM. Como molde se utilizó 1 μ g de DNA genómico en cada reacción. El volumen final de reacción fue de 50 μ l y la mezcla se cubrió con 50 μ l de parafina para evitar la evaporación. Para amplificar el fragmento de 1.7 kb del gen *glaA* de *A. niger* se llevaron a cabo 35 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 50°C y 3 min a 72°C, seguidos de un ciclo final de 5 min a 72°C.

Para la técnica de amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE), la amplificación de la primera hebra de cDNA se realizó como se describe en Frohman (1990) utilizando la transcriptasa reversa AMV comercializada por Promega, el mRNA del gen *gla1* como molde y el oligonucleótido EGLA como cebador. Se tomó 1 μ l de una dilución 1/10 de esta reacción y se utilizó como molde para amplificar algunos fragmentos de cDNA en las siguientes condiciones: 40 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 55°C y 3 min a 72°C seguidos de un ciclo final de 5 min a 72°C.

21. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Para determinar la actividad glucoamilasa en placa de los cotransformantes de *A. nidulans* V002 se inocularon placas de medio MM con almidón soluble al 1% (p/v) y una vez crecidos se incubaron durante la noche a 60°C. Al día siguiente las placas se invirtieron sobre una tapa de placa Petri que contenía cristales de yodo. Los vapores de yodo tiñeron de negro las zonas de medio de cultivo donde el almidón no había sido degradado dejando halos de distinto tamaño alrededor de los cotransformantes.

La actividad glucoamilasa en medio líquido se determinó como el incremento de glucosa liberada a partir de almidón tal como se describe en Ghosh y colaboradores (1990a). La glucosa se estimó por el método de

glucosa oxidasa (Gascon y Lampen; 1968). Una unidad de actividad glucoamilasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo. La actividad xilanasa se determinó tal como describe en Fernández-Espinar *et al.*, (1992). La xilosa liberada se estimó según Spiro (1966). Una unidad de actividad xilanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo. La proteína extracelular se determinó con el método de Bradford (1976).

La actividad OTCasa de la cepa silvestre de *A. terreus* y del mutante *arg1* se determinó siguiendo el método propuesto por García-España y colaboradores (1989) utilizando L[2,3- ^3H] ornitina (New England Nuclear, USA) y partiendo de cantidades iguales de micelio crecido 16 h en medio MMA con arginina 2.5 mM y transferido a medio MMA durante 12 h. Una unidad enzimática se definió como un nmol de citrulina formada por minuto.

22. DETERMINACIÓN DE PESO SECO.

El peso seco se estimó por desecación del micelio en una estufa a 105°C hasta obtener un peso constante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN PARA *Aspergillus terreus*.

1.1. SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN POR RESISTENCIA A HmB.

Como se indicó en el apartado 1.2.2. de la Introducción, la HmB es un marcador de transformación habitual en hongos filamentosos. Por ello se decidió desarrollar un sistema de transformación para *A. terreus* basado en la selección por resistencia a esta droga.

1.1.1. Resistencia de la cepa silvestre de *A. terreus* a la HmB.

Para establecer la CMI de la HmB para *A. terreus* se prepararon suspensiones de conidios y se determinó su viabilidad en placas de medio MMA con concentraciones crecientes de HmB desde 50 a 1000 µg/ml. El crecimiento del hongo se redujo parcialmente a una concentración de HmB de 200 µg/ml y se inhibió a 500 µg/ml. Por ello, esta última concentración se utilizó en las placas de selección de los transformantes.

Para que un sistema de transformación sea eficaz la frecuencia de aparición espontánea del fenotipo que se desea seleccionar debe ser muy baja. De esta manera el crecimiento de colonias en las placas de selección sólo puede ser atribuido a la adquisición del DNA transformante. Para averiguar la frecuencia de aparición espontánea de colonias de *A. terreus* resistentes a HmB se inocularon 10^8 conidios en placas de medio MMA con 500 µg HmB/ml. Tras incubarlas durante una semana no se observó la aparición de colonias resistentes, determinándose una frecuencia de mutación espontánea al menos inferior a 10^{-8} .

1.1.2. Transformación de protoplastos.

A partir de micelio crecido en medio MMA se obtuvieron protoplastos siguiendo el protocolo descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Alícuotas de 10^9 protoplastos se transformaron con 10 µg del plásmido pAN7-1 (ver figura 7A) y se sembraron en medio SMMA con HmB. Como control

negativo se usaron protoplastos no tratados con DNA que se inocularon en placas de medio SMMA con HmB y, después de hacer las diluciones apropiadas, en placas con medio no selectivo para determinar su viabilidad después del tratamiento con PEG. Todas las placas se incubaron a 37°C y tres o cuatro días más tarde se detectó la presencia de colonias transformantes creciendo en medio selectivo. En los distintos experimentos la viabilidad fue muy variable, llegando a causar el tratamiento con PEG una mortalidad del 85%. No se detectaron revertientes. En las placas de selección de transformantes crecieron dos tipos de colonias. Las primeras eran grandes y aparecieron con una frecuencia de 100 por cada μg de plásmido pAN7-1 (3×10^5 por μg de plásmido y protoplasto viable). Estas colonias crecían vigorosamente y mantenían el fenotipo de resistencia al ser transferidas a medio fresco con 500 μg de HmB/ml pudiéndose concluir que se trataba de transformantes reales. Las segundas eran pequeñas y aparecieron con una frecuencia de 10^4 por cada μg de plásmido pAN7-1. Estas colonias al ser transferidas a medio fresco en el que se mantenía la presión selectiva fueron incapaces de crecer, considerándose transformantes abortivos (ver apartado 1.3.1. de la Introducción). Como se describe en otros sistemas, la frecuencia de transformación del método descrito en este apartado depende mucho de la calidad de los protoplastos usados en el experimento (Wnendt *et al.*, 1990). Considerando los transformantes reales, las frecuencias de transformación obtenidas con este sistema son similares a las obtenidas en otros hongos filamentosos con el plásmido pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987; Oliver *et al.*, 1987; Barret *et al.*, 1990).

1.1.3. Análisis molecular de los transformantes.

La evidencia molecular de que la transformación ha tenido lugar se obtiene al detectar secuencias del DNA transformante en el genoma receptor. Con este fin se aisló DNA genómico de la cepa receptora y de cuatro representantes de los transformantes denominados respectivamente HT₃, HT₄, HT₅ y HT₆. Estas muestras de DNA se sometieron a análisis Southern usando como sonda un fragmento *Sca*I de 1.1kb del plásmido pAN7-1 que contiene el gen *hph*.

Como se muestra en la figura 8 no se detectó señal de hibridación con el DNA genómico de la cepa sin transformar. En los cuatro transformantes analizados se observó una señal de hibridación en la zona correspondiente al DNA genómico de alto peso molecular. La presencia de estas señales confirmó que eran verdaderos transformantes. Además, este resultado nos indicó que, como en la mayoría de los hongos filamentosos, la transformación se había producido por integración del DNA transformante en el genoma receptor. La intensidad de las señales de hibridación fue distinta en cada transformante sugiriendo que en cada uno de ellos el número de copias integradas de pAN7-1 había sido diferente. La sobreexposición del filtro no mostró otras señales de hibridación, ni en la zona correspondiente a pAN7-1 ni en cualquier otra posición, descartándose la presencia de plásmido transformante replicándose autónomamente. Para confirmar este resultado se llevó a cabo una retransformación de *E. coli* con 5 µg de DNA total de cada uno de los transformantes, no obteniéndose colonias transformantes.

Para estudiar el tipo de integración del DNA transformante se digirió DNA de los cuatro transformantes citados y de la cepa sin transformar, con las enzimas de restricción *EcoRV* (no corta en pAN7-1) y *BamHI* (corta una vez en pAN7-1). Los DNAs digeridos se sometieron como en el caso anterior a análisis Southern. En el caso de la digestión con *EcoRV*, en todos los transformantes se observó una única banda de hibridación en una zona correspondiente a un peso molecular de al menos 20 kb, indicando que en los transformantes analizados la integración se había producido en un único sitio del genoma. Al digerir con *BamHI* el DNA del transformante HT₃, se detectó la presencia de una banda de hibridación intensa de 6.3 kb que corresponde a pAN7-1, indicando la integración de varias copias del plásmido en el genoma. En sobreexposiciones del filtro también se detectó la presencia de dos señales más tenues de tamaños mayor y menor que 6.3 kb que correspondían a secuencias flanqueantes. La digestión *BamHI* del transformante HT₄ mostró un patrón de hibridación compatible con la integración de una sola copia de pAN7-1 en el genoma. Los patrones de hibridación obtenidos en los transformantes HT₅ y HT₆ fueron más complicados. En el transformante HT₅ se detectó una banda intensa de tamaño mayor que pAN7-1 y una más tenue

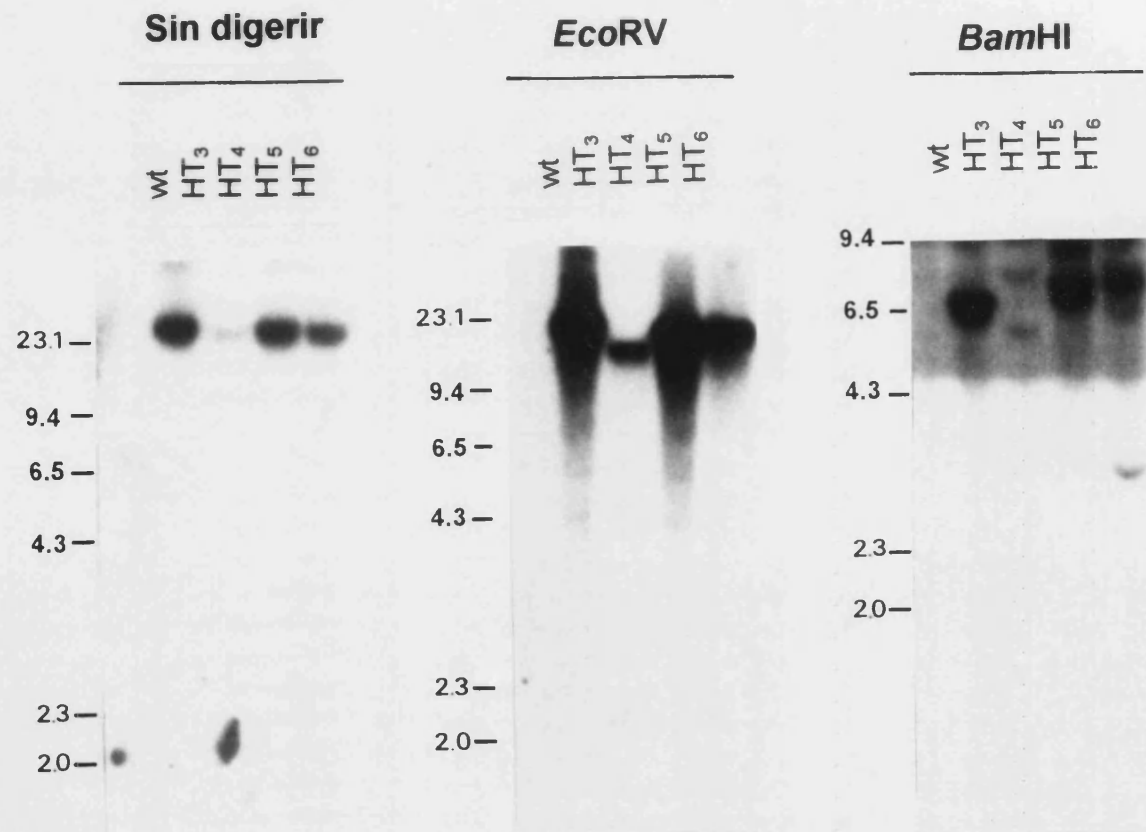


FIGURA 8. Análisis Southern del DNA de la cepa silvestre (wt) y de cuatro transformantes de *A. terreus* con el plásmido pAN7-1. Se transfirieron 5 μ g de DNA sin digerir y digerido con *Bam*HI o *Eco*RV a una membrana de nailon. Como sonda se utilizó un fragmento *Scal* de 1.1 kb procedente del plásmido pAN7-1. Los pesos moleculares en kb aparecen a la izquierda de cada autoradiografía.

de alto peso molecular. Este patrón puede justificarse por la reorganización de las copias integradas. Finalmente, en el transformante HT6 se observó una banda tenue del tamaño del plásmido, así como bandas adicionales de mayor intensidad y mayor o menor tamaño, indicando la posible integración de varias copias en tándem y la reorganización de algunas de ellas.

Por tanto, todos los transformantes se habían originado por integración de una o varias copias de pAN7-1 mediada por recombinación no homóloga. Este es un ejemplo de recombinación tipo II citado en el apartado 1.3.1. de la Introducción (ver figura 4). Esta situación es la esperada en nuestro caso ya que no existe homología entre el plásmido transformante y el genoma receptor.

1.1.4. Estabilidad mitótica de los transformantes.

En los sistemas de transformación es muy importante que los transformantes conserven el fenotipo de selección sin necesidad de mantener la presión selectiva generación tras generación. En general los transformantes de hongos filamentosos presentan un alto grado de estabilidad mitótica debido a que en la mayoría de los casos la transformación se produce por integración.

Para determinar la estabilidad mitótica de los transformantes de *A. terreus* se sembraron conidios en placas de medio MMA o MMA con 500 µg HmB/ml. Los transformantes que crecieron en medio MMA se transfirieron a placas de este medio con y sin HmB. Este proceso se repitió cinco veces después de las cuales, todos los transformantes fueron capaces de crecer en medio con presión selectiva, indicando que se mantenía el fenotipo transformante. Este resultado está de acuerdo con el modelo de transformación por integración sugerido en el apartado anterior y coincide con la elevada estabilidad obtenida en la transformación de otros ascomicetes (Fincham, 1989).

1.1.5. Nivel de resistencia de los transformantes.

La resistencia que presentan los transformantes al antibiótico depende del nivel de expresión del gen después de la transformación. Existen varios factores que pueden afectar al nivel de expresión del gen, como son la eficacia del promotor que porta el vector de transformación o la de aquel promotor bajo

cuyo control se sitúe este gen después de la integración. También influyen el sitio de integración y el número de copias del gen integradas en cada transformante, aunque hay que tener en cuenta que alguna de esas copias puede inactivarse durante el proceso de integración.

Para determinar el nivel de resistencia de los transformantes de *A. terreus* se sembraron conidios de algunos de ellos en placas de medio MMA con distintas concentraciones de HmB que variaron entre 0.5 y 1.75 mg/ml. La mayoría de los transformantes fueron capaces de crecer a la máxima concentración ensayada, incluyendo los cuatro transformantes estudiados más exhaustivamente (tabla 6).

TABLA 6. Nivel de resistencia a HmB de algunos transformantes de *A. terreus*.

TRANSFORMANTE	CMI (mg HmB/ml)
HT ₁	1
HT ₂	1
HT ₃	>1.75
HT ₄	>1.75
HT ₅	>1.75
HT ₆	>1.75
HT ₈	>1.75
HT ₉	>1.75
HT ₁₀	>1.75
HT ₁₁	>1.75
HT ₁₃	1
HT ₂₄	>1.75
HT ₄₁	0.75

Teniendo en cuenta los resultados inferidos del análisis Southern de los transformantes HT₃, HT₄, HT₅ y HT₆, este elevado nivel de resistencia no está correlacionado con el número de copias integradas en cada transformante, ya que, aunque no conocemos exactamente el número de copias integradas en los transformantes HT₃, HT₅ y HT₆, sabemos que el transformante HT₄ tiene una sola copia de pAN7-1.

1.1.6. Producción de enzimas por los transformantes.

La aplicabilidad del sistema de transformación desarrollado en este apartado depende de que la integración ectópica del DNA transformante no afecte selectivamente a genes que codifican enzimas extracelulares, la característica fenotípica que interesa a nuestro grupo de trabajo.

Para determinar si la transformación afectaba a la producción enzimática se inocularon 10⁵ conidios de la cepa silvestre de *A. terreus* y de los transformantes HT₃, HT₄, HT₅ y HT₆ en 10 ml de medio MM con almidón o xilano al 1% (p/v) como única fuente de carbono. Los cultivos se incubaron a 37°C y se tomaron muestras a las 48 h. Se hicieron ensayos para determinar las actividades glucoamilasa y xilanasa y se comprobó que la cantidad de enzima secretada era similar en los cuatro transformantes y en la cepa silvestre (1 U de actividad glucoamilasa/μg de proteína extracelular y 0.013 U de actividad xilanasa/μg proteína extracelular). Este resultado sugería que, al menos en los transformantes estudiados, pAN7-1 no se había integrado en un *locus* implicado en la síntesis de estas enzimas y que la presencia de un DNA extraño en su genoma no parecía tener influencia en la producción enzimática.

1.2. SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN POR COMPLEMENTACIÓN DE UN MUTANTE DE *A. terreus* CON EL ALELO SILVESTRE DEL GEN *argB* de *A. nidulans*.

El sistema de transformación basado en la resistencia a HmB no permitió conseguir frecuencias de transformación elevadas, por lo que se pensó en desarrollar un sistema basado en la complementación de auxotrofías. Para ello

era necesario disponer de mutantes de *A. terreus* y de genes que complementasen las auxotrofías correspondientes. En el laboratorio se disponía del plásmido pFB39 que porta el gen *argB* de *A. nidulans* y codifica una OTCasa (ver apartado 1.2.4. de la Introducción y figura 7B), por lo que se decidió aislar mutantes de *A. terreus* deficientes en dicha actividad.

1.2.1. Aislamiento y caracterización de un mutante de *A. terreus* deficiente en OTCasa.

Con el fin de obtener un mutante de *A. terreus* en la actividad OTCasa, los conidios de la cepa silvestre se sometieron a mutagénesis con luz UV y posteriormente a enriquecimiento por filtración (apartado 8 de Materiales y Métodos). Los conidios recogidos después del enriquecimiento se sembraron en medio MCA y los que crecieron se transfirieron a placas de medios MCA y MMA. Las colonias que crecieron en medio MCA y no lo hicieron en medio MMA se seleccionaron para determinar su auxotrofia. Con este procedimiento entre un 10 y un 50% de las colonias crecidas en medio MCA en los distintos experimentos correspondieron a mutantes auxótrofos. Para determinar la auxotrofia se sembraron conidios procedentes de estas colonias en placas de MMA que contenían mezclas de distintos requerimientos nutricionales en las que, según el patrón de crecimiento, es posible determinar el requerimiento específico de una cepa mutante (Sherman *et al.*, 1986). En la tabla 7 se presenta una relación de los mutantes auxótrofos obtenidos. Para aislar selectivamente mutantes auxótrofos para arginina las esporas recuperadas del enriquecimiento por filtración se sembraron en medio MMA suplementado con arginina.

De todos los mutantes obtenidos solamente uno ellos fue auxótrofo para la arginina. Para comprobar el paso de la ruta de biosíntesis bloqueado se sembraron conidios del mismo en placas de MMA suplementadas con ornitina, citrulina o arginina. Los mutantes defectivos en OTCasa crecen bien en un medio mínimo suplementado con citrulina o arginina, pero son incapaces de crecer en medio mínimo con ornitina (figura 3). El patrón de crecimiento obtenido fue el esperado para un mutante en OTCasa (figura 9). La mutación

TABLA 7. Fenotipo de los mutantes auxótrofos obtenidos. (*Frecuencia de aparición de cada fenotipo transformante; **Incluye mutantes que tienen más de un requerimiento o que no crecen en ninguno de los medios utilizados para su clasificación).

AUXOTROFÍA	FRECUENCIA (%)*
Arginina	2.3
Cisteína	4.7
Cisteína / Metionina	9.3
Lisina	2.3
Metionina	18.6
Prolina	9.3
Tirosina	2.3
Sin clasificar**	51.2

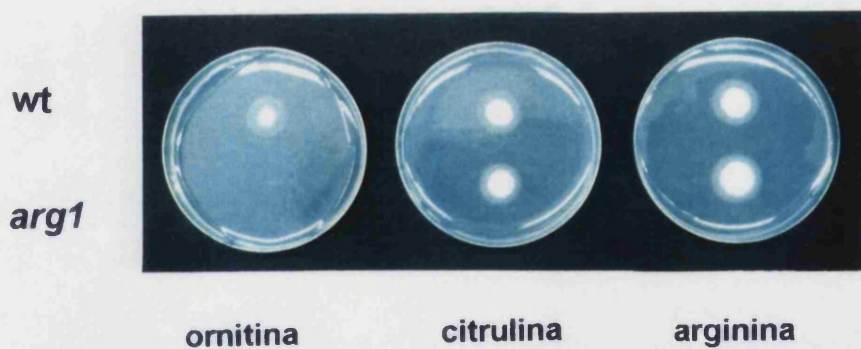


FIGURA 9. Patrón de crecimiento de la cepa silvestre de *A. terreus* (wt) y del mutante *arg1* en placas de medio MMA suplementadas con ornitina, citrulina, y arginina.

presente en esta cepa se denominó *arg1*. Este mutante ha sido depositado en la CECT con el número 20194.

Para confirmar que *arg1* era un mutante defectivo en OTCasa se determinó esta actividad enzimática en la cepa *arg1* y en la cepa silvestre de *A. terreus*. La actividad OTCasa fue 12 veces mayor en la cepa silvestre (2.02 U/ml) que en el mutante (0.165 U/ml). Se realizó un análisis Southern en condiciones heterólogas del DNA de la cepa silvestre de *A. terreus* y del mutante *arg1* sin digerir y digerido con varios enzimas de restricción. Como sonda se utilizó un fragmento *EcoRI-PstI* de 2.6 kb del plásmido pFB39 que contiene el gen *argB* de *A. nidulans* (ver figura 7B). Como puede apreciarse en la figura 10, con los enzimas utilizados, los patrones de hibridación obtenidos fueron idénticos para las dos cepas, indicando que la mutación en el gen que codifica para la OTCasa de *A. terreus arg1* no es debida a grandes deleciones, inserciones o reordenamientos en el DNA.

La frecuencia de reversión de esta mutación se calculó sembrando en medio MMA 10^8 conidios de la cepa mutante. Tras incubar las placas durante 10 días a 37°C no se observó el crecimiento de colonias protótrofas, determinándose una frecuencia de reversión inferior a 10^{-8} .

1.2.2. Transformación heteróloga del mutante *A. terreus arg1* con el gen *argB* de *A. nidulans*.

Al disponer de un mutante con baja frecuencia de reversión y de un gen para complementar la mutación, pudimos plantearnos la transformación del mutante *A. terreus arg1*. Además, la complementación de esta mutación con el gen *argB* de *A. nidulans* ratificaría que la cepa *arg1* presentaba un defecto metabólico en la OTCasa.

Los protoplastos de la cepa *arg1* de *A. terreus* se obtuvieron con el mismo método seguido para la cepa silvestre, con la excepción del medio de cultivo que fue MCA suplementado con arginina en lugar de medio MMA. Para la transformación se utilizó el plásmido pFB39. Los protoplastos transformados se sembraron en placas de medio SMMA y al cabo de 4 días crecieron los transformantes. No se detectó la presencia de transformantes abortivos. Como control se sembraron protoplastos sin tratar con pFB39 en placas de medio

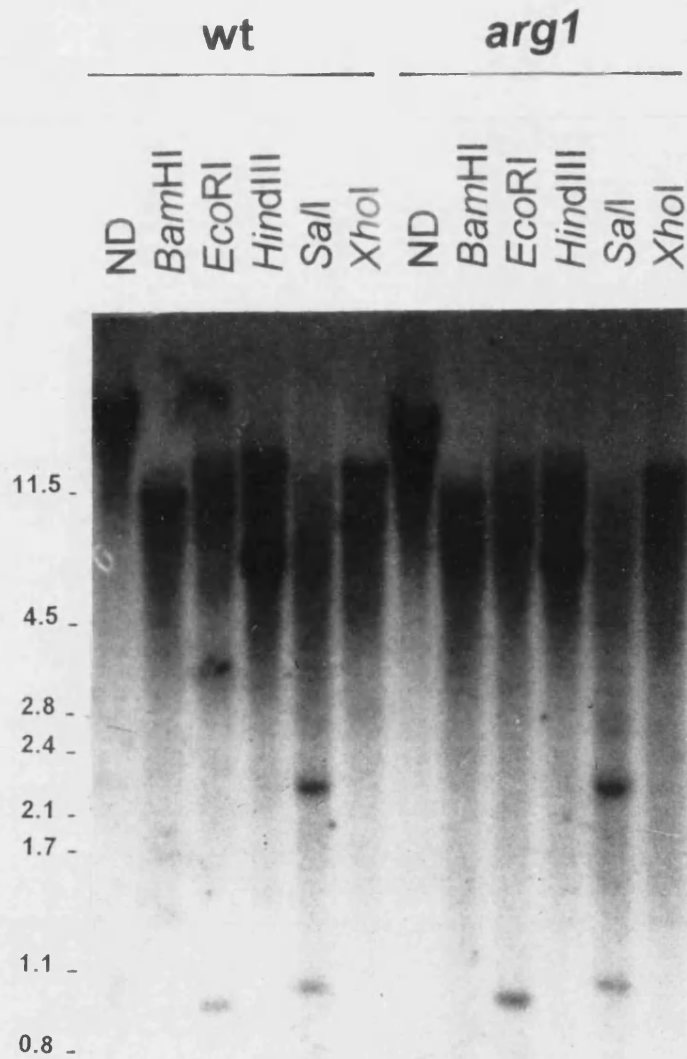


FIGURA 10. Análisis Southern de 10 μ g de DNA de la cepa silvestre (wt) de *A. terreus* y del mutante *arg1*. El DNA sin digerir o digerido con varias enzimas de restricción se hibridó con el fragmento *EcoRI-PstI* de 2.6 kb de pFB39 que contiene el gen *argB* de *A. nidulans*. Los marcadores de peso molecular aparecen a la izquierda de la figura.

SMMA y en placas del mismo medio suplementado con arginina para determinar su viabilidad. En las primeras no hubo crecimiento y en las de viabilidad se observó, al igual que en la transformación de la cepa silvestre, variabilidad entre los distintos experimentos. La frecuencia de transformación fue de 50 transformantes por cada μg de pFB39 (2×10^{-5} transformantes por μg de plásmido y protoplasto viable). Esta frecuencia de transformación es del mismo orden que la obtenida con el gen *argB* de *A. nidulans* en otros hongos filamentosos (John y Peberdy, 1984; Parsons *et al.*, 1987; Hahm y Batt, 1988) y ligeramente inferior a la obtenida con el sistema de resistencia a HmB en la cepa silvestre de *A. terreus* (ver apartado 1.1.2. de esta sección).

1.2.3. Análisis molecular de los transformantes.

Para estudiar el destino de pFB39 en el genoma de los distintos transformantes se aisló DNA de cuatro de ellos denominados AT₁, AT₂, AT₃ y AT₄ y se sometió a análisis Southern. Como sonda se utilizó el mismo fragmento del gen *argB* de *A. nidulans* que en el apartado 1.2.1 de esta sección. En la figura 11 pueden verse los patrones de hibridación obtenidos. En las carreras correspondientes al DNA de los transformantes sin digerir se observó una señal de hibridación en la zona de alto peso molecular indicando que, como ocurre en el sistema de resistencia a HmB, el DNA transformante se había integrado en el genoma receptor.

Para estudiar el tipo de integración se digirió el DNA de los transformantes con *EcoRI* (corta una vez en pFB39) y con *XhoI* (no corta en pFB39) y se realizó un análisis Southern utilizando la misma sonda. En los transformantes AT₁ y AT₄ digeridos con *EcoRI* se observó una señal intensa de un tamaño correspondiente a 5.3 kb que sugiere la integración de varias copias de pFB39 en forma de tándem. También fue posible ver señales más tenues que corresponden a secuencias flanqueantes. Los transformantes AT₂ y AT₃ presentaron patrones de hibridación más complicados, indicando integraciones en más de un sitio o reordenamientos entre las copias integradas del plásmido. En la sobreexposición de las carreras correspondientes a las digestiones *EcoRI*, se detectó una señal con un tamaño de 1 kb. Esta señal también aparece en las digestiones *EcoRI* del DNA de la



cepa silvestre y del mutante *arg1* (figura 10) y corresponde al locus *arg1*. Este hecho sugiere que la integración de pFB39 ha tenido lugar en un sitio distinto al locus *arg1* de *A. terreus*. Al digerir con *Xho*I, en todos los transformantes se observó una banda en la zona de alto peso molecular, indicando que la integración había tenido lugar en un único sitio en el genoma, con lo cual cabe concluir que los patrones de hibridación obtenidos en los transformantes AT₂ y AT₃ se deben a reordenamientos entre las copias integradas en tandem.

1.2.4. Estabilidad mitótica de los transformantes.

Del mismo modo que en el sistema de selección anterior, se estudió la estabilidad mitótica de los transformantes. Se sembraron conidios de los transformantes en placas de medio MMA con y sin arginina. Se tomaron conidios del centro de las colonias de los transformantes crecidos en MMA con arginina y se transfirieron a placas de MMA con y sin arginina. Después de cinco rondas de crecimiento en medio con arginina todos los transformantes estudiados fueron capaces de crecer en medio MMA, indicando una estabilidad mitótica del fenotipo transformante del 100%, tal como se espera para un sistema de transformación por integración.

1.2.5. Producción de enzimas por los transformantes.

De forma similar a la descrita en el sistema de resistencia a HmB se valoró la secreción de glucoamilasa y xilanasa en la cepa *arg1* y en los transformantes AT₁, AT₂, AT₃ y AT₄. Se obtuvieron los mismos niveles de producción en las cinco cepas, los cuales fueron a su vez similares a los descritos para los transformantes resistentes a HmB, es decir 1 U de actividad glucoamilasa/ μ g de proteína extracelular y 0.013 U de actividad xilanasa/ μ g de proteína extracelular (ver apartado 1.1.6. de esta sección). Estos resultados sugieren que ni la mutagénesis ni el proceso de transformación han afectado a la producción de estas dos enzimas.

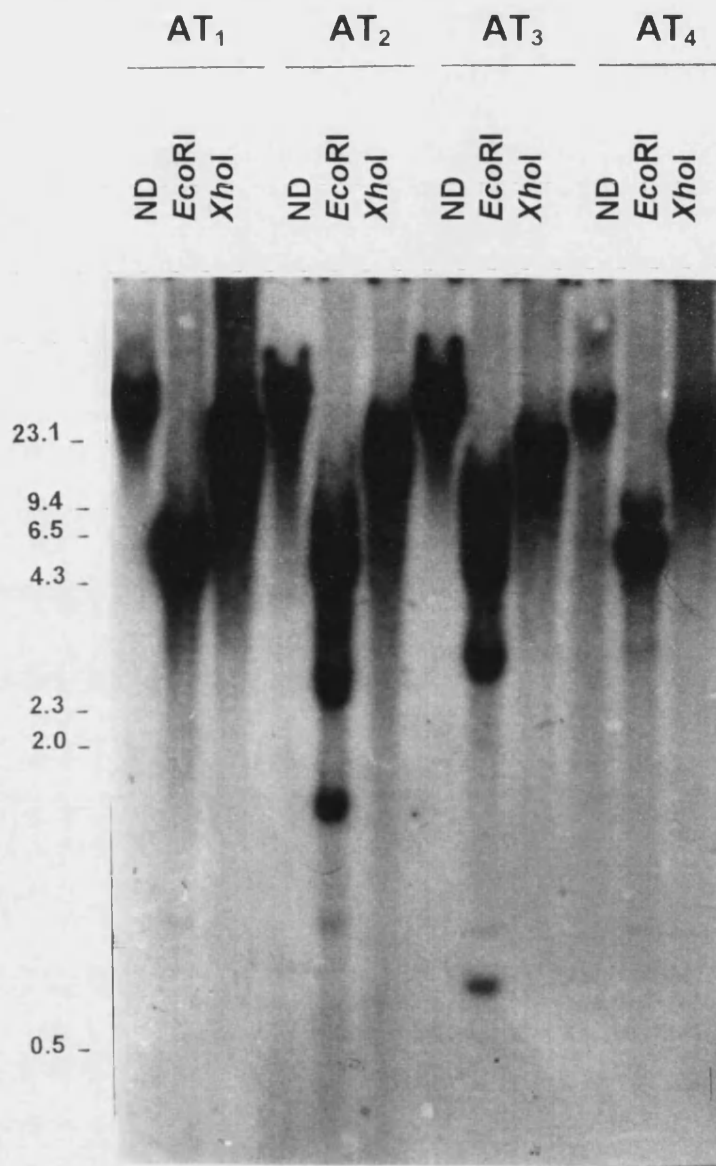


FIGURA 11. Análisis Southern de 10 μ g de DNA de los transformantes de *A. terreus* con el plásmido pFB39. El DNA sin digerir o digerido con los enzimas indicados en la figura se hibridó con el fragmento *EcoRI-PstI* de 2.6 kb de pFB39 que contiene el gen *argB* de *A. nidulans*. Los marcadores de peso molecular en kb aparecen a la izquierda de la figura.

1.3. CLONACIÓN DEL GEN *arg1* DE *A. terreus*.

Las frecuencias de transformación obtenidas con los dos sistemas desarrollados son similares y poco elevadas. Se ha descrito en otros hongos filamentosos que la utilización de un gen homólogo para complementar la auxotrofia aumenta la eficacia del sistema de transformación (Gruber *et al.*, 1990). Siguiendo esta aproximación, y dado que disponíamos de un mutante de *A. terreus* en OTCasa, se decidió clonar el gen que codifica esta enzima en *A. terreus* para usarlo en el desarrollo de un sistema de complementación homólogo.

1.3.1. Clonación del gen *arg1* de *A. terreus*.

Con el fin de localizar el gen de *A. terreus* que codifica para la OTCasa, se rastreó la genoteca cuya construcción se describe en el apartado 16 de la sección Materiales y Métodos. Por experimentos previos conocíamos que utilizando como sonda el gen *argB* de *A. nidulans* se detectaban señales de hibridación en el genoma de *A. terreus* (ver figura 10) por lo que para rastrear la genoteca se utilizó el fragmento de pFB39 descrito anteriormente que contiene este gen. Las placas que contenían las calvas de lisis se transfirieron por duplicado a filtros de nailon y se hibridaron en condiciones heterólogas. En estas condiciones, al rastrear 4000 calvas de lisis se detectó una única señal de hibridación que se denominó λF_7 .

Se aisló DNA del fago λF_7 . Para localizar dentro del inserto de 15 kb los fragmentos que hibridaban con el gen *argB*, se digirió el DNA del fago con varios enzimas de restricción y se realizó un análisis Southern hibridando con la misma sonda utilizada para rastrear la genoteca. De entre las bandas que daban una señal de hibridación intensa se eligieron los fragmentos *Pst*I de 2.5 kb y *Sac*I de 1.9 kb para un estudio más detallado, que por su tamaño podían contener el gen equivalente a *argB* completo. Estos fragmentos se subclonaron en pUC13 y pUC18 respectivamente y dieron lugar a los plásmidos pSP1 y pSP7 (figura 12).

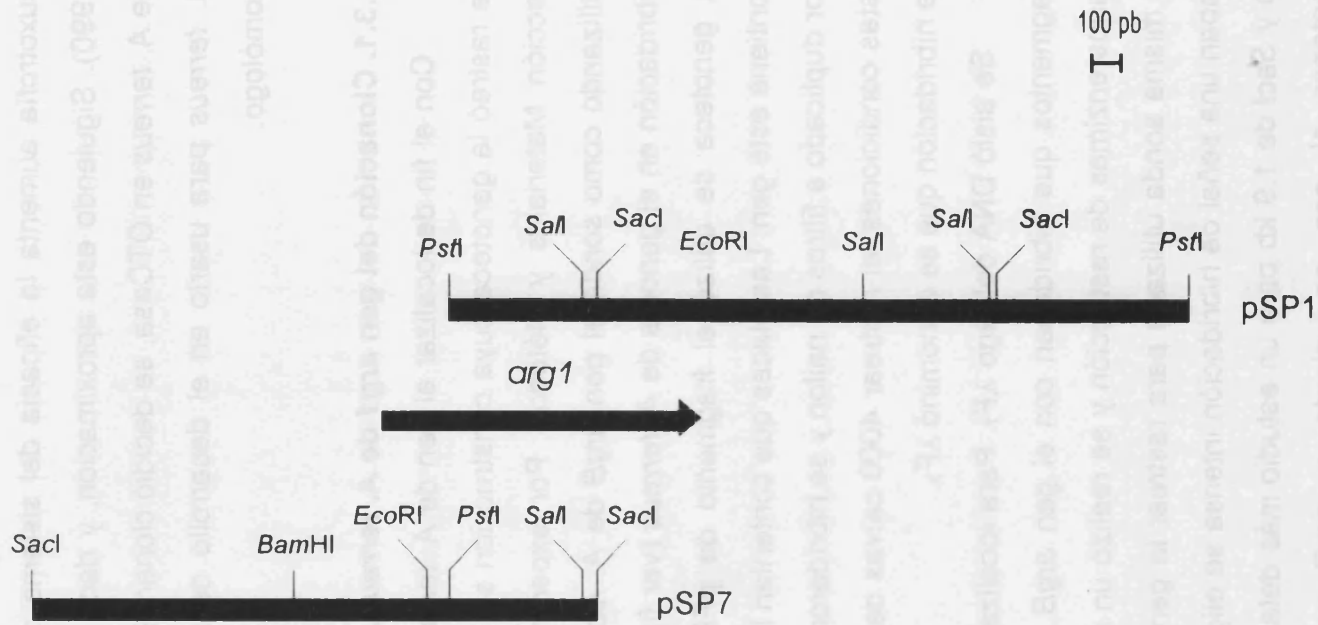


FIGURA 12. Fragmentos solapantes de DNA procedentes del fago λ F, que contienen el gen *arg1* de *A. terreus*. La clonación de estos insertos en pUC13 y pUC18 dió lugar a los plásmidos pSP1 y pSP7. La flecha indica la región codificante del gen *arg1*.

1.3.2. Secuenciación del gen *arg1*.

Se secuenciaron los extremos de los insertos contenidos en estos plásmidos, y se pudo comprobar que ambos fragmentos presentaban un alto grado de identidad de secuencia con el gen *argB* de *A. nidulans*. La identidad de secuencia, también nos permitió determinar que ninguno de ellos contenía el gen de *A. terreus* completo. Subclonando los fragmentos *SacI-PstI* de 1.4 kb y *PstI-EcoRI* de 0.9 kb procedentes de los plásmidos pSP7 y pSP1 respectivamente en pUC18 digerido con *SacI* y *EcoRI* se construyó el plásmido pATA1 que contiene el gen completo de la OTCasa de *A. terreus* (figura 13). Siguiendo la nomenclatura del mutante anteriormente descrito, este gen se denominó *arg1*. Para secuenciar el gen completo se siguió la estrategia que se muestra en la figura 14.

En total se secuenciaron 1860 pb detectándose una pauta abierta de lectura de 1083 nt a partir del ATG de inicio (figura 15). No hay evidencias que indiquen la existencia de intrones aunque no puede descartarse la presencia de pequeños intrones en fase con la pauta de lectura que no contengan codones de terminación de la traducción. La comparación entre la secuencia del gen *arg1* de *A. terreus* y la del gen *argB* de *A. nidulans* reveló una identidad del 76%, indicando que el gen clonado codificaba la OTCasa de *A. terreus*.

Respecto al uso de codones en el gen *arg1* de *A. terreus* como en el gen equivalente de *A. niger*, hay una clara preferencia por el uso de C o G en la tercera posición (45% y 32% respectivamente) y se observa un fuerte sesgo en contra de A (8%). Este patrón se mantiene en el gen *argB* de *A. nidulans* aunque no es tan acusado. Esta situación es opuesta a la observada en los genes equivalentes de *S. cerevisiae* y *Pachysolen tannophilus* donde la preferencia es por adenina (31% y 35% respectivamente) y timina (37% y 40% respectivamente) (Skrzypek *et al.*, 1990). Conviene recordar que aunque en muchos genes de *Aspergillus* no es evidente un fuerte sesgo en el uso de codones, existe preferencia en el uso de C o G en tercera posición, especialmente en genes con elevado nivel de expresión o en genes de expresión constitutiva (Gurr *et al.*, 1987).

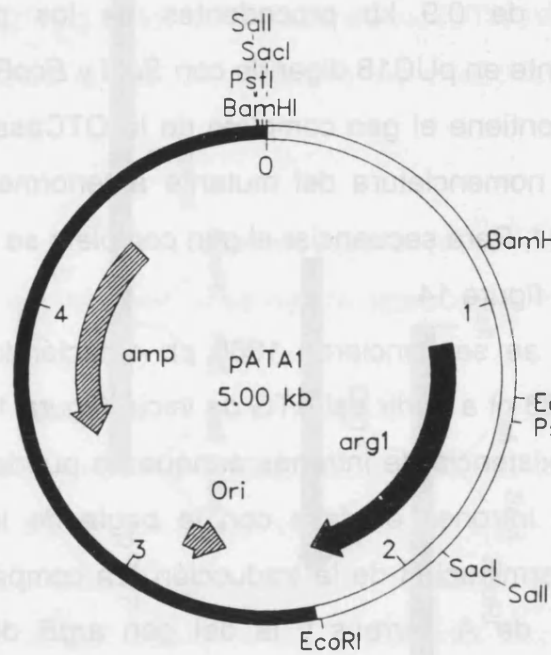
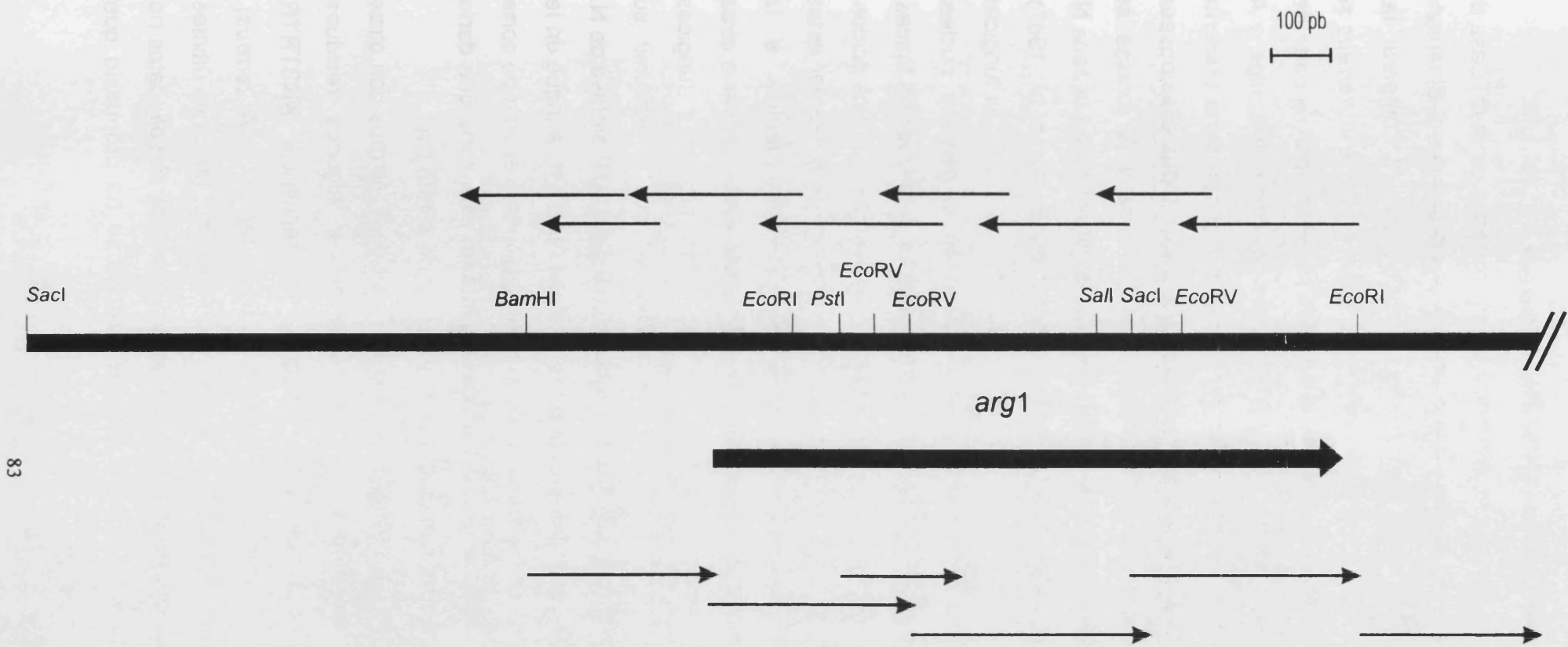


FIGURA 13. Mapa de restricción del plásmido pATA1. Los detalles de su construcción se describen en el apartado 1.3.2 de esta sección.



83

FIGURA 14. Estrategia de secuenciación del gen *arg1* de *A. terreus*. La flecha gruesa representa la región codificante del gen.

1.3.3. Estructura primaria de la OTCasa de *A. terreus*.

En la figura 15 se muestra la secuencia de aminoácidos de la OTCasa de *A. terreus* deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen. El tamaño molecular estimado para esta proteína es de 39226 Da. Al comparar las secuencias de las OTCasas de *A. nidulans* y *A. niger* con la de *A. terreus* se vió que que en la zona N-terminal la homología era muy baja, pero a partir del aminoácido 30 la similitud era del 84% y 86% con las proteínas de *A. niger* y *A. nidulans* respectivamente. Aunque la zona N-terminal de la proteína presenta baja homología con las OTCasas de *A. nidulans* y *A. niger*, todas ellas poseen las mismas características. Las OTCasas de *A. nidulans* y *N. crassa* se localizan en la mitocondria y para la de *A. niger*, por la estructura de la zona N-terminal de la proteína, se propone la misma localización (Buxton *et al.*, 1987). Como se indicó en el apartado 1.2.4. de la Introducción, las proteínas fúngicas que se localizan en la mitocondria y se codifican en el genoma nuclear presentan en su extremo N-terminal unas características de secuencia típicas, son ricas en aminoácidos básicos e hidroxilados y carecen de residuos ácidos. La región N-terminal de la OTCasa de *A. terreus* además de presentar estas características posee la secuencia Arg-Gln-Tyr-Ser-Ser, idéntica a la secuencia de procesamiento del gen *oliC* de *A. nidulans* y muy similar a otras secuencias de procesamiento encontradas en otras proteínas fúngicas localizadas en la mitocondria por lo que también se puede presumir su localización mitocondrial (tabla 8). Para la subunidad 9 de la ATP sintasa de *N. crassa*, el sitio de corte se encuentra entre los residuos Ala y Tyr, aunque en la OTCasa de *A. terreus* no se ha demostrado experimentalmente el sitio de corte del péptido señal se puede sugerir un procesamiento en esta zona que daría lugar a una proteína madura con un tamaño molecular de 36645 Da.

La comparación de las secuencias de la OTCasa de *A. terreus* con otras OTCasas secuenciadas (figura 16) permite identificar algunos residuos implicados en la función de estas enzimas. La secuencia KRSTRTR comprendida entre los los residuos Lys₈₇ y Arg₉₃ (numeración de *A. terreus*), está conservada en todas las OTCasa analizadas. Asimismo, los cinco últimos residuos de esta secuencia están presentes en la ATCasa de *E. coli* (datos no mostrados) y por estudios con análogos del sustrato se ha propuesto que

TABLA 8. Secuencias de procesamiento encontradas en proteínas translocadas a la mitocondria.

SECUENCIA	ESPECIE	PRODUCTO GÉNICO	REFERENCIA
Arg-Ala-Tyr-Ser-Ser	<i>N. crassa</i>	sub. 9ATP sintasa	Viebrock <i>et al.</i> , 1982
Arg-Gln-Tyr-Ser-Ser	<i>A. nidulans</i>	sub. 9 ATPsintasa	Ward y Turner, 1986
Arg-Ser-Tyr-Ser-Ser	<i>A. nidulans</i>	OTCasa	Upshall <i>et al.</i> , 1986
Arg-Leu-Tyr-Ser-Ser	<i>A. niger</i>	OTCasa	Buxton <i>et al.</i> , 1987
Arg-Phe-Phe-Ser-Ser	<i>P. tannophylus</i>	OTCasa	Skrzypek <i>et al.</i> , 1990
Arg-Gln-Tyr-Ser-Ser	<i>A. terreus</i>	OTCasa	Este trabajo.

AGGGAGAAGACCATCACTCGACGAAATTTAGGAAAGCGCGTCCAGACGAGATCCACGAGGTTCTCGGGT -370
 AGATCGATCGATCGGCCTCCATCAAGGCTTCCATATAATCGGGACAGGATCCGTTCATCTAACAGGGGCCG -300
 AGTAAGCTGTTGCAGCCAGCGCTTCGTATAGTGGACTGATCGGCGACGGAAGACGGGCCCGCGACTAAAC -230
 CGGAAGAGGAAAAGCGCGGTGTGGAGATTTCGACACTTTATTCTTCTTTCTTTCTTGTTGACTCGTTTG -160
 CTCTTCTCCAGACTTGACTCCATACTGACTCCAATT *CAAT*CTCCTCTCCGCGAGGCCGGG *TATAA*GTCTC -90
 TATATCGGTCTCAAGCTGGACAAAAGACCGAATTGAATTGCTTTCGAATCCGTTGCTCCATCTCCCGCAT -20
 CCCCTTATCTCTCCTCATC ATG ATT CCC ACC GCT CGT TGC CGG GCC TTG CGC CAG AAG 39
 Met Ile Pro Thr Ala Arg Cys Arg Ala Leu Arg Gln Lys 13
 ATC CCC GTC CAG GCC GTG CGC CAA TAC TCC TCG TCC ACG ACC CTC AAG ACC TCT 93
 Ile Pro Val Gln Ala Val Arg Gln Tyr Ser Ser Ser Thr Thr Leu Lys Thr Ser 31
 CCC TTC GCC CCT CGT CAC CTT CTG TCC ATT GCC GAC CTC ACG CCC ACC GAA TTC 147
 Pro Phe Ala Pro Arg His Leu Leu Ser Ile Ala Asp Leu Thr Pro Thr Glu Phe 49
 ACC ACC CTC GTC CGC AAT GCC TCC TCG CAC AAA CAC TCA ATC AAG TCC GGG TCG 201
 Thr Thr Leu Val Arg Asn Ala Ser Ser His Lys His Ser Ile Lys Ser Gly Ser 67
 ATC CCG ACC AAC CTG CAG GGC TCC CTG GCT GGA AAG ACG GTG GCC ATG ATG TTT 255
 Ile Pro Thr Asn Leu Gln Gly Ser Leu Ala Gly Lys Thr Val Ala Met Met Phe 85
 AGC AAA CGG AGT ACC CGC ACT CGG ATA TCC ACC GAA GGC GCT ACT GTC CAG TTG 309
 Ser Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Ile Ser Thr Glu Gly Ala Thr Val Gln Leu 103
 GGC GGA CAT CCC ATG TTC CTC GGC AAG GAC GAT ATC CAG CTC GGA GTG AAT GAA 363
 Gly Gly His Pro Met Phe Leu Gly Lys Asp Asp Ile Gln Leu Gly Val Asn Glu 121
 TCC CTG TAC GAC ACC GCC GTG GTG GTC TCG TCA ATG GTG TCC GCC ATT GTG GCC 417
 Ser Leu Tyr Asp Thr Ala Val Val Val Ser Ser Met Val Ser Ala Ile Val Ala 139
 CGC GTG GGC AAG CAC GCC GAA GTG GCC GAC CTT GCA AAG CAC TCG ACC GTC CCC 471
 Arg Val Gly Lys His Ala Glu Val Ala Asp Leu Ala Lys His Ser Thr Val Pro 157
 GTC ATC AAT GCC CTC TGT GAT TCG TTC CAC CCG CTC CAG GCC ATT GCC GAT TTC 525
 Val Ile Asn Ala Leu Cys Asp Ser Phe His Pro Leu Gln Ala Ile Ala Asp Phe 175
 CAG ACC ATC TAC GAG ACC TTC ACC CCC AAG GCC CAT CAT CTG TCC AGC CTG GGT 579
 Gln Thr Ile Tyr Glu Thr Phe Thr Pro Lys Ala His His Leu Ser Ser Leu Gly 193
 CTG GAG GGC CTG AAG ATT GCC TGG GTC GGC GAT GCG AAC AAC GTC TTG TTC GAC 633
 Leu Glu Gly Leu Lys Ile Ala Trp Val Gly Asp Ala Asn Asn Val Leu Phe Asp 211
 ATG GCG ATC AGC GCT GCG AAG ATG GGC GTC GAC CTG GCC GTT GCA ACC CCC AAG 687
 Met Ala Ile Ser Ala Ala Lys Met Gly Val Asp Leu Ala Val Ala Thr Pro Lys 229
 GGT TAT GAG ATC CCG GCC TCC ATG CGG GAG CTC ATC CAG GAA GCC GGC AAG GGC 741
 Gly Tyr Glu Ile Pro Ala Ser Met Arg Glu Leu Ile Gln Glu Ala Gly Lys Gly 247
 GTG GCC AAC CCC GGA AAG CTC ATC CAG ACC AAT GTC CCC GAA GAG GCG GTG AAG 795
 Val Ala Asn Pro Gly Lys Leu Ile Gln Thr Asn Val Pro Glu Glu Ala Val Lys 265
 AAG GCC GAT ATC CTG GTG ACT GAC ACC TGG GTC TCG ATG GGC CAG GAA GAG GAA 849
 Lys Ala Asp Ile Leu Val Thr Asp Thr Trp Val Ser Met Gly Gln Glu Glu Glu 283
 TCG CTC AAG CGT ATG AAG GCC TTT GAA GGC TTC CAG ATC ACG TCG GAA CTT GCC 903
 Ser Leu Lys Arg Met Lys Ala Phe Glu Gly Phe Gln Ile Thr Ser Glu Leu Ala 301
 AAG CGT GGA GGA GCC AAC GAG AAC TGG AAA TTC ATG CAC TGC CTT CCC CGG CAC 957
 Lys Arg Gly Gly Ala Asn Glu Asn Trp Lys Phe Met His Cys Leu Pro Arg His 319
 CCG GAG GAA GTG AGT GAT GAG GTC TTC TAC AGT AAC CGG TCG TTA GTC TTC CCC 1011
 Pro Glu Glu Val Ser Asp Glu Val Phe Tyr Ser Asn Arg Ser Leu Val Phe Pro 337

GAG GCG GAG AAT CGG CTG TGG GCT GCC ATC TCT GCT CTG GAG GGA TTC GTT GTC	1065
Glu Ala Glu Asn Arg Leu Trp Ala Ala Ile Ser Ala Leu Glu Gly Phe Val Val	355
AAC AAG GGA AAG ATT GCA TGAATGGATGAAGATACCAAGTGAATTCTAGTT <u>AAATCAAAATGCCTA</u>	1130
Asn Lys Gly Lys Ile Ala ***	361
<u>C.AATGAATGTTTCAGGTTTATGGCTTTTGGTGTAGTGTCTGGGG</u> <u>AAATCAAAATGCCTA</u>	1201
ATCCAGGGATATTTACATTTCGAGACGCACACTACAAAAAATAGCCTCTCTATAATATCCTAATTATGCC	1272
TCTAAAATCAAAGGGACCATAACTCCTAATCAAATGATTGTTACTGTGCAGAGTCGCAGATCAAACGTGA	1343
GGTGGTGACGATTGATGACGGTGGTGCCCGCATTACATGCTTGGATGGAGTAACCGACAACCACCTCCAA	1414
GCCCAG	1420

FIGURA 15. Secuencia de nucleótidos del gen *arg1* de *A. terreus*. En la región 5' del gen se encuentran subrayadas las secuencias consenso TGACTC implicadas en la regulación de los genes sometidos al control general de aminoácidos. Las secuencias CAAT y TATAAA, así como las posibles señales de poliadenilación aparecen en *italica*. La secuencia de aminoácidos deducida aparece en código de tres letras. La presunta secuencia de direccionamiento a la mitocondria se encuentra subrayada. Los residuos implicados en la unión del carbamil fosfato aparecen en rojo y los implicados en la unión de la ornitina en azul. (Número de acceso EMBL Z67741)

A. nidulans MASLRS-----VLKS-QSLRH-TVRSYSS----QTMPPASPFAPRHFLSI
A. niger MPSPLRTAPQPPLRAFHNPFA-LRRLYSSTSHSAATPATSPFAPRHLLSI
A. terreus MIPTARC---RALRQ-KIPVQ-AVRQYSS----STTLKTSPFAPRHLLSI
P. tannophylus MINSISNTV--LLKS----VV-SKRFFSSSAKMSSQAK-----PRHLVSM
S. cerevisiae MSTTASTPS--SL-----RHLISI
S. pombe M-----SFKKF-----PRHLLSI
H. sapiens MLFNLRIILLNNA--AFRNGHNFMVNRFRCGQPLQNKVQ---LKGRDLLTL
 * * * * *

A. nidulans ADLSPSEFATLVRNASSHKRAIKSG-SMPQNLQ-GSLLGKTVAMIFSKRS
A. niger ADLTPTEFATLVRNASSHKRAIKSG-SIPQSLH-GALSGKTVAMMFSKRS
A. terreus ADLTPTEFTTLVRNASSHKHSIKSG-SIPTNLQ-GSLAGKTVAMMFSKRS
P. tannophylus LELS IKELESLVNRAAYHKQQIRSGLVNITTOP----LSGKTVSLIFNKRS
S. cerevisiae KDLSDEEFRIIVQRAQHFKNVFKANKTNDFQSNHLKLLGRTIALIFTKRS
S. pombe RDL SRGEIVKLI DRSS EIKQAYKQNFQNRRSVQMSGLSSQNVAMIFSKRS
H. sapiens KNFTGEEIKYMLWLSADLKFRIK-----QKGEYLP LLOGKSLGMI FEKRS
 * * * * *

A. nidulans TRTRVSTEGAVVQMGGHPMFLGKDDIQLGVNESLYDTSVVISSMVCIVA
A. niger TRTRISTEGAVVQMGGHPMFLGKDDIQLGVNESLYDTAVVSSMVECIVA
A. terreus TRTRISTEGATVQLGGHPMFLGKDDIQLGVNESLYDTAVVSSMVSIVA
P. tannophylus TRTRVSSEGAAYLGGCPMFLGKDDIQLGVNESLHDTTKI ISSMTSSIFA
S. cerevisiae TRTRISTEGAATFFGAQPMFLGKEDIQLGVNESFYDTTKVSSMVCIFA
S. pombe TRTRVSVESAVSCLGGNAMFLGKDDIQLGVNESLYDTSKVISSMVGIVA
H. sapiens TRTRLSTETGLALLGGHPCFLTQDIHLGVNESLTDARVLSMADAVLA
 **** * * * * *

A. nidulans RVGKHAEVADLAKHSSVPIINALCDSFHPLQAVADFQTIYEAFTPKAH-H
A. niger RVGKHADVADLAKHSTKPIINALCDSYHPLQAIADFQTI SEHFAASGK GK
A. terreus RVGKHAEVADLAKHSTVPIINALCDSFHPLQAIADFQTIYETFTPKAH-H
P. tannophylus RVNKHSDIQEMCKYSSVPIINALCDTFHPLQAITDILTIKESF----GNT
S. cerevisiae RVNKHEDILAFCKDSSVPIINSLCDKFHPLQAI CDLLTIIENFNISLDEV
S. pombe RVNKYSDVATLAKHASCPIVINGLCDTFHPLQALADLLTIKETFKS-----
H. sapiens RVYKQSDLDTLAKEASIP I INGLSDLYHP IQILADYLTLOEHYSS-----
 * * * * *

A. nidulans LSSLGLEGLKIAWVGDANNVLFDMAIAATKMGVDIAVATPKGYEIPPHML
A. niger LEGLGLNGLKIAWVGDANNVLFDMAISARKMGVDVAVATPKGYEIPKEML
A. terreus LSSLGLEGLKIAWVGDANNVLFDMAISAAKMGVDLAVATPKGYEIPASMR
P. tannophylus TKG-----LKLAWIGDVNNVINDLCIAALKSGIDVSI AVPSGLKFEELIL
S. cerevisiae NKGIN-SKLMWIGDANNVINDMCIACLKFGISVSI STPPGIEMDSDIV
S. pombe -----FDGLKVAWVGDANNVLDLMIANAKVGIHTSVAKPKDVNRDDIL
H. sapiens -----LKGLTL SWIGDNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVT
 * * * * *

A. nidulans ELIKSAGEGVSKPGKLLQTNIP EEAVKDADILVTDTWVSMGQEEEEKQRL
A. niger EIEKAGEGVKSPGKLVQTNVPEEAVKGADVLVTDTWVSMGQEEEEKAKRL
A. terreus ELIQEAGKGVANPGKLIQTNVPEEAVKADILVTDTWVSMGQEEESLKRML
P. tannophylus SGAKEISAENGTTLKITNDPL--EAINGANVIVTDTWISMGQEDERLQKL
S. cerevisiae DEAKKVAERNGATFELTHDSL--KASTNANILVTDTFVSMGEEFAKQAKL
S. pombe SIVNEAANENGSTFEIVND--PKVAVKNADIVVTDTWISMGQEAKEQRL
H. sapiens KLAEQYAKENGT--KLLL TNDPLEAAHGGNVLI TDTWISMGQEEEEKKRL
 * * * * *

<i>A. nidulans</i>	KEFDGFQITAE L AKRGG A KEGW K FMH C LPRHP E EVSD E VFY S N-RSLV F P
<i>A. niger</i>	RDFAGFQIT S ELAKRGG A KEGW R FMH C LPRHP E EV A DEVFY G H-RSLV F P
<i>A. terreus</i>	KAF E GFQIT S ELAKRGG A N E N W KFMH C LPRHP E EVSD E VFY S N-RSLV F P
<i>P. tannophylus</i>	KQ F E G GFQIT K EM I SK G KA E N W KFMH C LPRHP E EV H DEVFY D E E RS L V F E
<i>S. cerevisiae</i>	KQ F K G FQIN Q ELV S V A DP-- N Y K FMH C LPR H Q E EV S DD V FY G E-H S I V F E
<i>S. pombe</i>	KQ F T G FQ V T G E I M K L-- A K P S C KFMH C LPRHP E EVSD E VFY G E- N S L V F Q
<i>H. sapiens</i>	Q A F Q G Y Q V T M K T A K V A A-- S D W T F L H C L P R K P E E V D DEVFY S P-R S L V F P
	. * * * * . *
<i>A. nidulans</i>	EAENRLWAA I SA L E G FV V N K G K I----- E
<i>A. niger</i>	EAENRLWAA I SA L E G FV V N K G K I----- E
<i>A. terreus</i>	EAENRLWAA I SA L E G FV V N K G K I----- A
<i>P. tannophylus</i>	E G ENRLYAA I AV L E G FV V N K G K I----- L L
<i>S. cerevisiae</i>	EAENRLYA A MS A ID I F V NN K GN F -- K D L K
<i>S. pombe</i>	EAENR K W T T V AV L E A LL V NR G E I L P P A S A
<i>H. sapiens</i>	EAENR K W T IM A VM S LL T D Y SP Q L Q K P K F
	* * * * *

FIGURA 16. Alineamiento de la secuencia de la OTCasa de *A. terreus* con otras OTCasas de distintos orígenes. En rojo se destacan los residuos implicados en la unión del carbamil fosfato y en azul los implicados en la unión de la ornitina. Los residuos idénticos se señalan con un asterisco (*), los cambios conservativos con un punto (.). (*H. sapiens*: *Homo sapiens*, *S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*).

están implicados en la unión del carbamil fosfato (Houghton *et al.*, 1984). Esta región incluye un residuo de Arg, la Arg₉₁ en *A. terreus* que en otras OTCasas se ha propuesto como el sitio de unión del grupo fosforilo del carbamil fosfato (Kraus *et al.*, 1985). En la zona C-terminal de la proteína se encuentra conservada la secuencia HCLPR comprendida entre los residuos His₃₁₅ y Arg₃₁₉ que incluye los residuos Cys₃₁₅ que probablemente forma parte del sitio de unión de la ornitina y Leu₃₁₆ para el que se propone la unión con el grupo α -carboxilo de la ornitina (Kraus, *et al.*, 1985; Huygen *et al.*, 1987).

1.3.4. Expresión del gen *arg1* de *A. terreus* en *A. nidulans*.

Para comprobar la funcionalidad biológica del gen clonado, el plásmido pATA1 se utilizó para transformar protoplastos de la cepa V001 de *A. nidulans*. Como control se utilizaron protoplastos sin tratar con el plásmido. La selección se llevó a cabo en medio MMA sin arginina. Sólo en las placas correspondientes a los protoplastos tratados con pATA1 se obtuvieron colonias con una frecuencia de 60 transformantes por μg de plásmido (5×10^{-5} transformantes por μg de DNA y protoplasto viable), indicando que el producto del gen *arg1* de *A. terreus* es funcional en *A. nidulans*.

1.3.5. Estudios previos sobre la regulación del gen *arg1*.

En la región 5' no codificante del gen aparecen varias secuencias descritas como relevantes en la expresión de genes de hongos filamentosos. A partir del nucleótido -124 se encuentra la secuencia CAAT que en genes de hongos filamentosos, cuando está presente, se localiza entre -60 y -120 pb del inicio de transcripción. En posición -100 se encuentra la secuencia TATAAA que suele situarse entre -30 y -60 del lugar de inicio de la transcripción en la mayoría de los genes de eucariotas. En posición -3 se encuentra una A que es la base óptima para el reconocimiento del sitio de inicio de la traducción por el ribosoma. En la región 3' no codificante del gen se encuentran las secuencias AATCAAAA, AATAA y AATATA (posiciones +1117, +1132 y +1175 respectivamente) que son similares a la secuencia consenso AATAAA encontrada cerca del sitio de poliadenilación de muchos genes eucariotas

(Gurr *et al.*, 1987). También en la zona 5' no codificante se encuentra repetida tres veces la secuencia TGACTC (posiciones -134, -145 y -170). Como se indicó en el apartado 1.2.4. de la Introducción, esta secuencia está implicada en la regulación de los genes de la biosíntesis de aminoácidos sometidos al control general.

Para estudiar si la expresión del gen *arg1* de *A. terreus* está controlada por este sistema general se aisló RNA de la cepa silvestre de *A. terreus* crecida en distintas condiciones de suficiencia de arginina y limitación de histidina. Esta última se consiguió añadiendo al medio de cultivo 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) que inhibe una enzima implicada en la síntesis de histidina, la imidazol glicerol-fosfato deshidratasa, dando lugar a una disminución de la concentración de histidina en la célula. En estos cultivos el micelio crecido durante 20 h en medio MMA con arginina 2mM se separó del medio de cultivo y se lavó con agua destilada estéril. Se transfirió 1 g de micelio escurrido con la ayuda de una espátula a matraces que contenían 30 ml de medio MMA, o medio MMA suplementado con ornitina 2mM, citrulina 2mM, arginina 2mM, 3AT 6mM y 3AT 6mM con arginina 2mM. Los matraces se incubaron durante 1, 2, 3 y 4 h, se recogió el micelio y se extrajo el RNA de las distintas muestras tal como se describe en el apartado 13 de Materiales y Métodos. Se hizo un análisis northern de estos RNAs utilizando como sonda el fragmento interno del gen *arg1* de 0.45 kb *Sall*-*Pst*I del plásmido pATA1 (ver figura 13). Se observó una banda de hibridación que correspondía a un transcrito de un tamaño aproximado de 1.5 kb, similar al descrito para los mRNAs de las OTCasas de *A. nidulans* y *N. crassa* (Berse *et al.*, 1983; Flint y Wilkening, 1986). La transcripción del gen *arg1* fué muy débil en las muestras correspondientes a los medios MMA y MMA suplementado con arginina, ornitina o citrulina (figura 17), indicando que en medio MMA hay un nivel basal de expresión del gen que codifica para la OTCasa y que la presencia de arginina 2 mM en el medio de cultivo, o de alguno de sus precursores en la ruta de biosíntesis, no hace que la transcripción del gen disminuya por debajo del valor mínimo requerido para el crecimiento del hongo. En las carreras correspondientes a medio MMA suplementado con 3AT y 3AT más arginina, aparece una señal del mismo tamaño pero mucho más intensa, indicando que

el nivel de mRNA de la OTCasa ha aumentado como consecuencia de la limitación de histidina en el medio de cultivo y que la adición de arginina no suprime el efecto del 3AT. Esta es la situación esperada para una regulación de tipo general en la cual la limitación de un aminoácido concreto hace que aumenten los niveles de transcripción de genes implicados en la biosíntesis de otros aminoácidos. La transcripción del gen *arg1* tiene la misma intensidad en todos los tiempos estudiados indicando que la respuesta al ayuno de histidina causada por 3AT es muy rápida.

Se realizó un experimento similar al anterior para estudiar el efecto de la presencia en el medio de cultivo de distintos aminoácidos. Para ello el micelio crecido en las mismas condiciones que en el caso anterior se transfirió a matraces que contenían medio MMA, y medio MMA suplementado con arginina 2mM, con 3AT 6mM, o con arginina, histidina, leucina o triptófano a concentraciones 2mM y 20mM en combinación con 3AT 6mM. El micelio se recogió 4 h después de la transferencia y se obtuvo su RNA. El análisis northern de estas muestras (figura 18) mostró que cuando el medio además de 3AT contenía histidina 2 o 20 mM el nivel de transcripción del mRNA bajaba drásticamente, alcanzando niveles similares a los obtenidos en condiciones de represión. La adición de arginina, leucina y triptófano a concentraciones 2 y 20 mM no suprimió el efecto del 3AT sobre el nivel de transcripción del gen *arg1*. Esta situación es la misma que se da en *A. nidulans* y *N. crassa* en los cuales la presencia de 3AT conlleva un aumento en la actividad OTCasa que sólo disminuye cuando al medio se añade histidina. La adición al medio de cultivo de arginina, incluso a concentración 50 mM es incapaz de suprimir el efecto del 3AT (Piotrowska, 1980). Esta es otra característica de este sistema de regulación, la desrepresión causada por la limitación de un aminoácido no se elimina al aumentar las concentraciones de otros aminoácidos (Flint y Kemp, 1981).

Para comprobar si este sistema de regulación también operaba en el mutante de *A. terreus arg1* se realizó un experimento similar en el cual el micelio crecido en medio MMA¹ suplementado con arginina 2 mM fue transferido al mismo medio con 3AT 6 mM y a medio MMA con arginina 20 mM

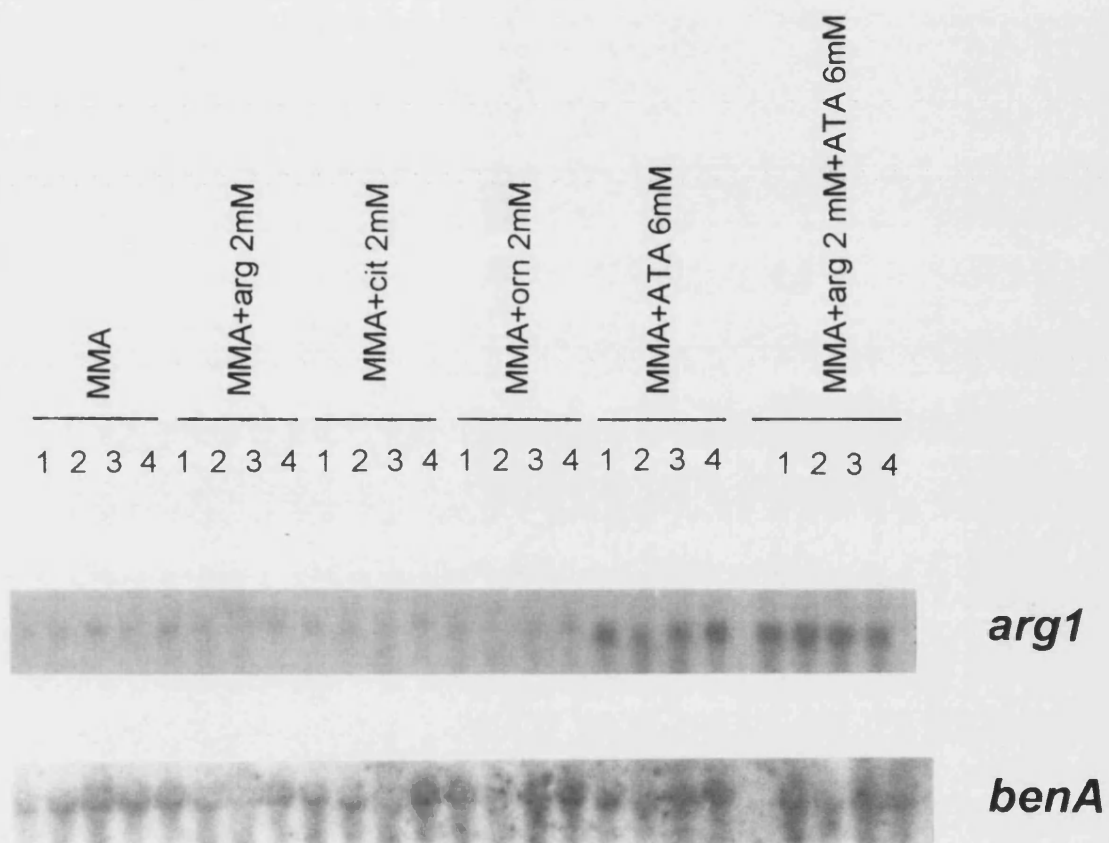


FIGURA 17. Estudio de la regulación transcripcional del gen *arg1* de *A. terreus*. Análisis northern de 25 μ g de RNA total obtenido de micelio crecido en medio MMA con arginina 2mM y transferido a los medios que se indican en la figura. Los números indican las horas transcurridas desde el reemplazamiento. Se utilizó como sonda el fragmento interno del gen *arg1* *Pst*I-*Sal*I de 0.45 kb del plásmido pATA1. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA con la sonda del gen *benA*.

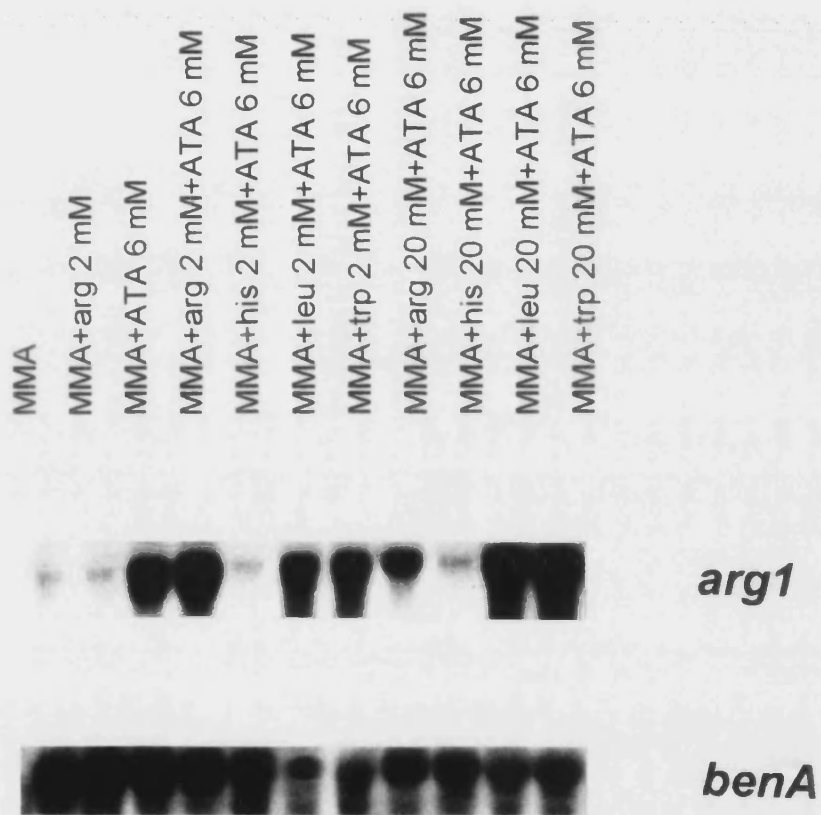


FIGURA 18. Análisis northern de 10 μ g de RNA obtenido de micelio crecido en medio MMA más arginina 2mM y transferido a los medios indicados en la figura. Como sonda se utilizó el fragmento interno del gen *arg1* *PstI-SalI* de 0.45 kb procedente del plásmido pATA1. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA con la sonda del gen *benA*.

y 3AT 6mM. El nivel de mRNA del gen *arg1* detectado en la cepa mutante fue similar al obtenido en la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones indicando que probablemente la mutagénesis no afectó a las secuencias reguladoras presentes en el promotor y que el sistema de regulación general de la biosíntesis de aminoácidos opera en este mutante (figura 19). No obstante, la regulación en este mutante debe estudiarse con mayor profundidad, ya que son muchos los factores que intervienen en la regulación de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos y alguno de ellos podría haber sido afectado.

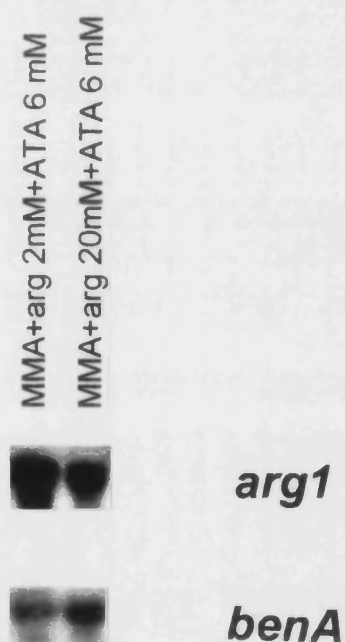


FIGURA 19. Regulación transcripcional del gen *arg1* en la cepa de *A. terreus* *arg1*. Análisis northern de 10 μ g de RNA obtenido a partir de micelio crecido en medio MMA con arg 2mM y transferido a los medios indicados en la figura. Se utilizaron las mismas sondas descritas en la figura 18.

Los resultados obtenidos del estudio de la regulación transcripcional, junto con la presencia en el promotor del gen *arg1* de tres secuencias TGACTC parecen indicar que la regulación del gen *arg1* de *A. terreus*, al igual que en los genes homólogos de *A. nidulans* y *N. crassa*, está sometida al sistema de control general.

1.4. SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN POR COMPLEMENTACIÓN HOMÓLOGA DEL MUTANTE EN OTCasa DE *A. terreus*.

Se obtuvieron protoplastos de la cepa *arg1* de *A. terreus* y se transformaron con el plásmido pATA1. Como control se usaron protoplastos a los que no se trató con el plásmido. Se llevó a cabo la selección de transformantes en medio MMA sin arginina, detectándose colonias sólo en las placas procedentes de protoplastos que habían sido tratados con pATA1. Estas colonias crecieron vigorosamente y aparecieron con una frecuencia de 50 transformantes por μg de plásmido (1×10^{-5} transformantes por μg de DNA y protoplasto viable). Este resultado es similar a los obtenidos en la transformación de *A. terreus arg1* con el gen *argB* de *A. nidulans* y en la transformación de *A. nidulans* V001 con el gen *arg1* de *A. terreus*. Un método similar a este fue desarrollado por Buxton y colaboradores (1987) que utilizando el gen *argB* de *A. niger* para complementar un mutante de *A. niger* deficiente en OTCasa, tampoco consiguieron aumentar la frecuencia de transformación respecto a la obtenida cuando utilizaron el gen *argB* de *A. nidulans*, concluyendo que la expresión de los dos genes debía ser la misma en ambas especies.

No se puede descartar que pATA1 carezca de algunas señales reguladoras necesarias para su funcionamiento, en particular aquellas correspondientes al terminador. En ese sentido, un análisis molecular preliminar de cinco transformantes indicó que todos ellos presentaban una integración tipo III sugiriendo la necesidad de integración en el *locus arg1* para la funcionalidad del DNA transformante. Aunque en algunos sistemas se han encontrado elevados porcentajes de conversión génica (Upshall, 1986; de

Ruiter-Jacobs *et al.*, 1989; Gouka *et al.*, 1991) esta situación no es habitual en hongos filamentosos por lo que en la actualidad se está procediendo a un análisis molecular más detallado.

Los métodos descritos en este apartado han permitido desarrollar dos sistemas de transformación con baja eficacia para *A. terreus*. En ambos casos la transformación es integrativa con una frecuencia similar a la descrita en otros sistemas fúngicos. Durante la redacción de este trabajo, otro grupo ha presentado una comunicación a un congreso describiendo el desarrollo de un sistema de transformación para *A. terreus* basado en la complementación de un mutante en el gen de la nitrato reductasa con el alelo silvestre del gen equivalente de *A. niger* (Ferraz *et al.*, 1996). Dicho sistema también da lugar a transformación integrativa pero con una frecuencia inferior (0.5 transformantes por μg de DNA) a la obtenida con los sistemas aquí presentados.

2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *gla1* DE *Aspergillus terreus*.

Como se comentó en el apartado 2.2. de la Introducción Itoh y colaboradores (1987) comparando las secuencias de las glucoamilasas de algunos hongos y levaduras, encontraron regiones muy conservadas. Este hecho permite pensar en la utilización de un fragmento de un gen de glucoamilasa para detectar la presencia de genes homólogos en otros organismos del mismo género. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito por nuestro grupo en la clonación de otros genes fúngicos que codifican enzimas extracelulares (González *et al.*, 1992; MacCabe *et al.*, 1996; Pérez-González *et al.*, 1996).

2.1. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE UN GEN DE *A. terreus* HOMÓLOGO AL GEN *glaA* DE *A. niger*.

Por experimentos previos conocíamos la capacidad glucoamilolítica de la cepa *A. terreus* CECT 2663 por lo que se decidió localizar el gen que la codificaba utilizando como sonda un fragmento del gen *glaA* que codifica la glucoamilasa de *A. niger*.

2.1.1. Clonación del gen *gla1* de *A. terreus*.

Tomando como base la secuencia del gen *glaA* de *A. niger* (Boel *et al.*, 1984b), se sintetizaron dos oligonucleótidos denominados GLA-1 y GLA-5 (ver tabla 5), que delimitan un fragmento de 1.7 kb en la zona codificante del gen. Utilizando como molde DNA genómico de *A. niger* y estos oligonucleótidos se llevó a cabo la amplificación de este fragmento mediante PCR. Como control se realizaron reacciones que contenían solamente uno de los dos oligonucleótidos. El fragmento amplificado en la primera reacción fue del tamaño esperado por lo que se recuperó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, y se ligó al plásmido pCR1000 dando lugar al plásmido pCR1000An2. Para confirmar que el fragmento clonado correspondía al gen

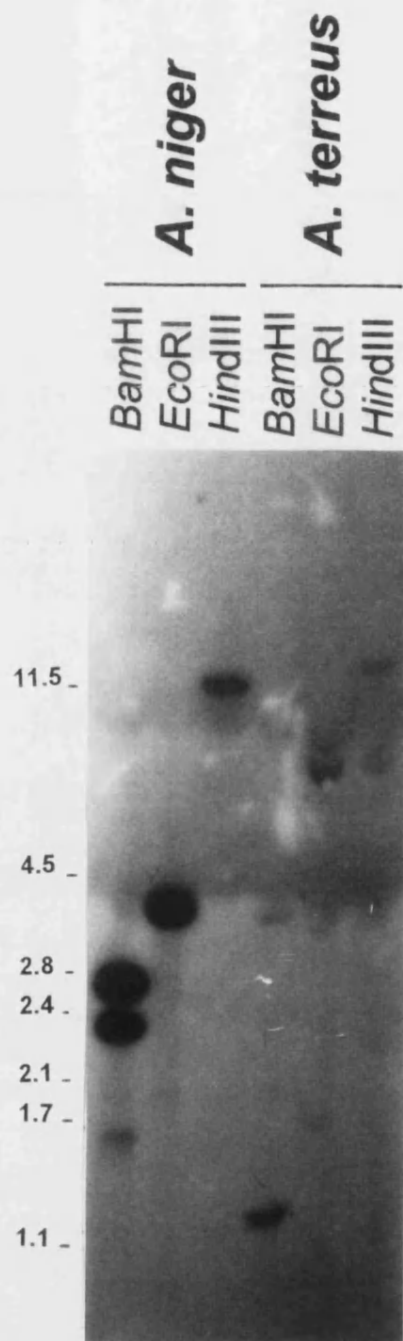


FIGURA 20. Análisis por el método de Southern de 10 μg de DNA genómico de *A. niger* y *A. terreus* digerido con varias endonucleasas de restricción. Se usó como sonda el fragmento *EcoRI-HindIII* de 1.7 kb de pCR1000An2 que contiene el gen *glaA* de *A. niger*. Los marcadores de peso molecular aparecen en kb a la izquierda de la figura.

glaA de *A. niger* se secuenciaron los extremos del inserto y se comprobó que la secuencia obtenida coincidía con la publicada por Boel y colaboradores (1984b). El fragmento *EcoRI-HindIII* de pCR1000An2 que contiene el inserto de 1.7 kb del gen *glaA* se utilizó como sonda en un experimento de hibridación heteróloga frente a muestras de DNA genómico de *A. niger* y *A. terreus* digeridas con *BamHI*, *EcoRI* y *HindIII*. El resultado de este experimento se muestra en la figura 20 en la que se pueden observar fuertes señales de hibridación en las muestras correspondientes al DNA de *A. niger* y señales muy tenues en las muestras de *A. terreus*, indicando que, si bien el grado de homología entre las glucoamilasas de estas especies no es muy elevado, es suficiente para llevar a cabo la clonación por hibridación heteróloga.

Con el fin de localizar el gen de *A. terreus* que codifica para la glucoamilasa se rastrearon 4000 calvas de la genoteca de *A. terreus* descrita en el apartado 16 de Materiales y Métodos. La hibridación se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente, detectándose 13 señales de hibridación positivas. En una segunda ronda de hibridación, solamente dos de ellas se confirmaron como positivas, denominándose los fagos de estas calvas λ G1.1 y λ G3.1.

Se aisló DNA de estos fagos y se digirió con *BamHI*, comprobándose que los insertos que contenían eran distintos. Para un estudio más detallado se eligió el fago λ G1.1, dado que dos fragmentos de restricción *BamHI* de tamaños 1.1 kb y 3.5 kb coincidían con dos señales de hibridación de la digestión *BamHI* del Southern genómico (figura 20). La digestión *BamHI* de λ G1.1 se transfirió a una membrana de nailon y se hibridó con la misma sonda. En la autoradiografía, además de las señales esperadas en los tamaños correspondientes a 1.1 kb y 3.5 kb, se iluminó una banda de 0.5 kb. El fragmento *BamHI* de 1.1 kb procedente del fago λ G1.1 se recuperó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se clonó en el plásmido pUC18 digerido con *BamHI* y desfosforilado dando lugar al plásmido pATGLA10.2. Los extremos del inserto presente en este plásmido se secuenciaron, permitiendo comprobar que el fragmento clonado tenía un alto grado de identidad de secuencia con una región interna del gen *glaA* de *A. niger*.

El DNA del fago λ G1.1 se digirió con varias enzimas de restricción para localizar dentro del inserto de 15 kb las secuencias homólogas al gen *glaA* de *A. niger*. Cinco μ g de DNA del fago se digirieron con los enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* y las combinaciones *BamHI-HindIII*, *EcoRI-HindIII* y *EcoRI-PstI*. Los DNAs digeridos se hibridaron en condiciones heterólogas con el fragmento de 1.7 kb de la glucoamilasa de *A. niger*. En la carrera correspondiente a la digestión *EcoRI-HindIII* apareció una sola señal de hibridación con un tamaño de 2.8 kb que posiblemente contenía el gen completo de la glucoamilasa de *A. terreus*. Este fragmento se clonó en el plásmido pBluescriptIIISK⁺ dando lugar al plásmido pATGLA1 (figura 21).

2.1.2. Secuenciación del gen *gla1*.

Siguiendo la estrategia de secuenciación que se muestra en la figura 22, se determinó la secuencia completa de nucleótidos de las dos hebras del fragmento *EcoRI-HindIII* de 2.8 kb (figura 23). Esta secuencia presentaba una pauta de lectura abierta de 2132 nt interrumpida por cuatro intrones de 52, 55, 59 y 55 pb cuya posición se dedujo por comparación con la secuencia del gen de *A. niger* y posteriormente se confirmó secuenciando los fragmentos correspondientes del cDNA. Para ello, se obtuvo RNA de micelio de *A. terreus* crecido durante 12 horas en MM con almidón (ver apartado 2.1.4.), a partir del cual se purificó el mRNA con una columna de oligo(dT)-celulosa. Usando como molde este mRNA se sintetizó la primera hebra de cDNA tal como se describe en el apartado 20 de Materiales y Métodos. Este cDNA se utilizó como molde en reacciones de PCR para amplificar los fragmentos que nos permitieran confirmar la posición de los intrones. Utilizando los oligonucleótidos GLA7 y GLA9 (ver tabla 5) como cebadores se amplificó un fragmento de 1090 pb. El fragmento amplificado fue clonado en el plásmido pT7Blue dando lugar al plásmido pATGLAC2. La secuenciación de este plásmido y de un subclón al que se le eliminó un fragmento *BamHI* de 660 pb, denominado pATGLAC3, confirmaron la eliminación de los intrones en las posiciones propuestas por homología con la secuencia del gen *glaA* de *A. niger*. Como se ha visto en el apartado 2.2 de la Introducción en el gen *glaA* de *A. niger* existe un quinto intrón cuyo procesamiento diferencial da lugar a dos mensajeros. Para

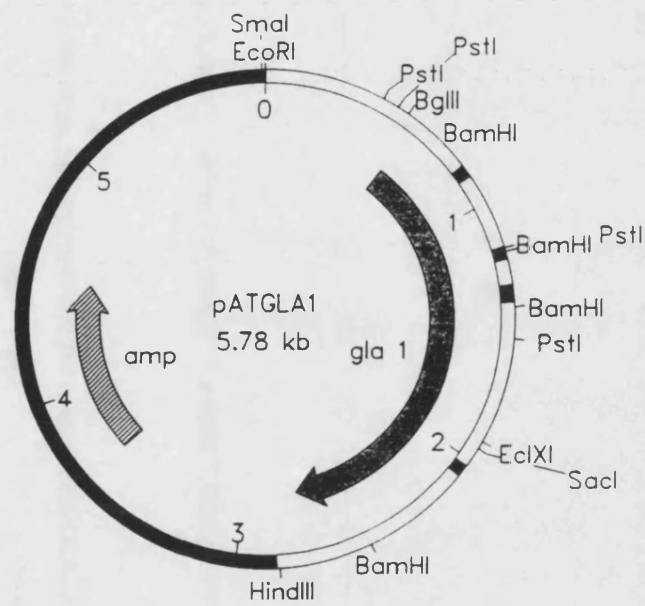


FIGURA 21. Mapa de restricción del plásmido pATGLA1. Los detalles de su construcción se describen en el apartado 2.1.1 de esta sección.

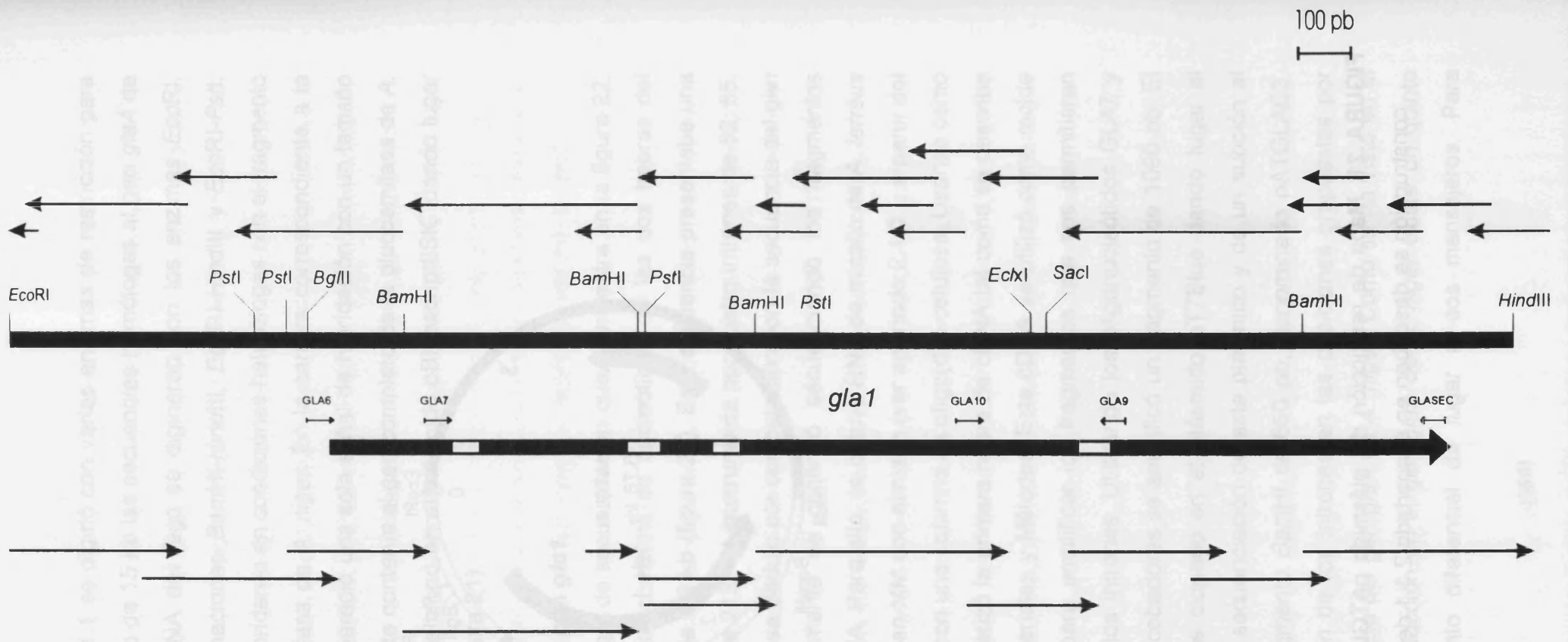


FIGURA 22. Estrategia de secuenciación del gen *gla1* de *A. terreus*. La flecha gruesa representa la región codificante del gen. Los intrones se representan como rectángulos blancos. Las flechas sobre la región codificante del gen representan los oligonucleótidos utilizados para confirmar la posición de los intrones.

comprobar si en el gen de la glucoamilasa de *A. terreus* existía un quinto intrón similar al de *A. niger* se secuenciaron 300 pb del inserto presente en un plásmido que contiene 0.9 kb del extremo 3' del cDNA del gen. Este fragmento se amplificó utilizando como molde la primera hebra del cDNA del gen *gla1* y como cebadores los oligonucleótidos GLA10 y EGLB. El producto obtenido digerido con *SacI* y *PstI* se clonó en pUC18. En la secuenciación de este inserto se utilizó como cebador el oligonucleótido GLASEC. La secuencia obtenida confirmó la ausencia de un quinto intrón en *A. terreus* en la misma posición que en *A. niger*.

Como ocurre en otras glucoamilasas secuenciadas del género *Aspergillus* la posición de los intrones del gen de *A. terreus* está conservada con respecto a la de los cuatro primeros intrones del gen *gla1* de *A. niger*. Los cuatro intrones del gen de *A. terreus* presentan las características típicas de los intrones fúngicos, en las uniones intrón-exón se sigue la regla general GT-AG y las secuencias internas necesarias para el procesamiento del intrón también se ajustan a la secuencia consenso descrita (Unkles, 1992). El grado de identidad de esta secuencia con la secuencia del gen *glaA* de *A. niger* es del 69 %. Por ello, al gen de *A. terreus* clonado se le denominó *gla1*.

En cuanto al uso de codones existe una clara preferencia en el uso de C en tercera posición (40%) y un sesgo en contra de A (10%). Una situación similar se presenta en el resto de genes de especies del género *Aspergillus* que codifican glucoamilasas.

2.1.3. Estructura primaria de la glucoamilasa de *A. terreus*.

En la figura 23 se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína GLA1 de *A. terreus* deducida a partir de la secuencia de nucleótidos. El tamaño molecular de esta proteína es 67789 Da. La similitud entre GLA1 y la proteína GLAA de *A. niger* es del 86%. La comparación de esta secuencia con la de otras glucoamilasas fúngicas (figura 24) sugiere la existencia de un péptido señal de 28 aa que rinde una proteína madura de tamaño molecular 65000 Da. Este tamaño está en concordancia con el tamaño de 70000 propuesto por Ghosh y colaboradores (1991b), pero es menor que 86000, el tamaño determinado por Ali y colaboradores (1990). Esta diferencia de

FIGURA 23. Secuencia de nucleótidos del gen *gla1* de *A. terreus*. Los intrones aparecen en minúsculas. Las presuntas secuencias CAAT, TATAAAA y de unión de CreA, así como los finales de transcripción se destacan en itálica y negrita. La secuencia de aminoácidos deducida aparece en código de tres letras. El presunto péptido señal aparece subrayado y los sitios posibles de N-glicosilación se indican en negrita. (Número de acceso EMBL L15383).

GA -596

ATTCAGATGCTGGTGGCGTGGTCGCAATTAATCGATTCCAATCGGGGCTAGATGCCCGACACTATACATGA -525

AGCCGGTAGCCCCTGACTTCGTCAGCCAGCCCTTTTGTGTCAGCCTTTTTCACATGCATGGAATCTCACGACTG -454

TCCGCTGACAGTTTTCACATTGCTCTATCTTTCTGACATTGAATGTACTCAGACGTCCTTGTGATCCAAACA -383

CTGTTGAAGGTCAAATTGCCGAGCTGTGCTCATTCTCCGCGCCGGCCACGCTAACGACGCGAGGAATAG -312

TCTCCGGCACTACCCAAGGCTTGTAACCTTAGAGCCGAGTAATTTAAGT**GCCCCAG**ACAGATGGATCATG -241

CGGGGCATTTCGTGCGTACCTCGTCAACACTGAAAGAGGCAAGTCCCACAGCTAGGCGTGCCTAAACGAAG -170

AACATTTCCGACA**ATA**AACCCGACTGCAGGCACCAGAGAGTCTATGTATGGAGTACGGAG**TATAGATAAATA** -99

GCACGATCTGCTGCTGCAGTTACTTCTTTTCGTTTCAGAGGTTGCAAGCATTCACTCTGATCTTCGAGATCTT -28

CTCTGATCGGCGTTGGCTCCATCTGCA ATG ACG CGC ATT CTC ACC CTC GCC CTT CAT GGG 33
Met Thr Arg Ile Leu Thr Leu Ala Leu His Gly 11

CTG GCT CTT GTC CAA AGT GTT GTT GGG GCT CCC CAA TTG GCC CCC AGA GCG ACA 87
Leu Ala Leu Val Gln Ser Val Val Gly Ala Pro Gln Leu Ala Pro Arg Ala Thr 29

ACC AGT CTG GAT GCA TGG TTG GCA TCG GAG ACG ACC GTT GCG CTG GAT GGG ATC 141
 Thr Ser Leu Asp Ala Trp Leu Ala Ser Glu Thr Thr Val Ala Leu Asp Gly Ile 47

CTT GAC AAC GTG GGT TCT AGT GGA GCC TAC GCT AAA AGT GCG AAG TCC GGT ATC 195
 Leu Asp Asn Val Gly Ser Ser Gly Ala Tyr Ala Lys Ser Ala Lys Ser Gly Ile 65

GTG ATT GCC AGT CCA AGC ACC AGC GAT CCA GAC Tgtaagtacatgtagtgccaattgtgt 255
 Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ser Asp Pro Asp T 76

tattgagctaataaacatcataccag AC TAC TAC ACG TGG ACT CGT GAT GCT GCG TTG 313
 yr Tyr Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ala Ala Leu 87

ACC GTC AAG GCC CTG ATC GAT CTG TTC CGC AAT GGC GAG ACA AGC CTT CAG ACC 367
 Thr Val Lys Ala Leu Ile Asp Leu Phe Arg Asn Gly Glu Thr Ser Leu Gln Thr 105

GTG ATC ATG GAG TAC ATT AGC TCT CAG GCG TAC CTC CAG ACC GTA TCC AAC CCT 421
 Val Ile Met Glu Tyr Ile Ser Ser Gln Ala Tyr Leu Gln Thr Val Ser Asn Pro 123

TCA GGG TCC TTG TCC ACC GGT GGT CTG GCA GAA CCA AAA TAT TAT GTC GAT GAG 475
 Ser Gly Ser Leu Ser Thr Gly Gly Leu Ala Glu Pro Lys Tyr Tyr Val Asp Glu 141

ACT GCC TAC ACG GGT AGC TGG GGA CGT CCC CAG CGG GAT GGT CCT GCC CTG AGA 529
 Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg 159

GCG ACG GCG ATG ATC GAC TTT GGT AAC TGG CTC ATT gtacgtctggacagggatccaat 588
 Ala Thr Ala Met Ile Asp Phe Gly Asn Trp Leu Ile 171

cctgcaggatgatcaaactaatgcaggcacagGAC AAC GGA TAT TCA ACC TAC GCC TCT AGC 650
 Asp Asn Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Ser Ser 181

ATT GTG TGG CCG ATC GTC CGC AAC GAT CTG TCG TAC GTT GCC CAA TAT TGG AAC 704
 Ile Val Trp Pro Ile Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln Tyr Trp **Asn** 199

CAG ACC GGA TAT Ggtcagtgcattccccaagacccccagacttgaaccctagctaattgctctgaatg 771
 Gln Thr Gly Tyr A 203

aacagAC CTC TGG GAA GAA GTG AAC GGA TCC TCC TTC TTC ACG ATT GCC GTG CAG 826
 sp Leu Trp Glu Glu Val **Asn** Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln 220

CAC CGG GCT CTG GTG GAA GGC AGC ACC TTC GCC TCC AAA GTT GGT GCC TCG TGC 880
 His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Thr Phe Ala Ser Lys Val Gly Ala Ser Cys 238

TCG TGG TGC GAC TCG CAG GCG CCG CAG GTG CTT TGC TTC CTG CAG CGC TTC TGG	934
Ser Trp Cys Asp Ser Gln Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu Gln Arg Phe Trp	256
ACA GGC TCG TAC ATC ATG GCC AAC TTT GGC GGC GGG CGA TCG GGC AAA GAC GCC	988
Thr Gly Ser Tyr Ile Met Ala Asn Phe Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala	274
AAC ACC GTC CTG GGA AGC ATC CAT ACC TTC GAC CCG AAT GCC GGT TGC GAC GAT	1042
Asn Thr Val Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Asn Ala Gly Cys Asp Asp	292
ACC ACG TTC CAG CCA TGC TCT CCT CGA GCA CTG GCC AAC CAC AAG GTC TAC ACT	1096
Thr Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Thr	310
GAT TCG TTC CGT TCT ATC TAC TCT ATC AAC TCG GGA ATT AGC TCA GGC AAG GCT	1150
Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Ser Ile Asn Ser Gly Ile Ser Ser Gly Lys Ala	328
GTT GCC GTG GGT CGC TAC CCT GAG GAC TCT TAC TAC AAT GGA AAC CCG TGG TTC	1204
Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro Trp Phe	346
CTT ACC ACG TTG GCT GCC GCA GAG CAG TTG TAC GAT GCC ATT TAC CAG TGG CAG	1258
Leu Thr Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Ile Tyr Gln Trp Gln	364
AAG ATT GGG TCT ATT ACC ATC ACG GAC GTC TCG CTG GCC TTC TTC AAG GAT CTT	1312
Lys Ile Gly Ser Ile Thr Ile Thr Asp Val Ser Leu Ala Phe Phe Lys Asp Leu	382
TAC AGT TCT GCG GCC GTT GGA ACG TAC GCC TCT TCG AGC TCG GCC TTC ACC TCT	1366
Tyr Ser Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Ala Ser Ser Ser Ala Phe Thr Ser	400
ATC GTG AGC GCC GTG AAG ACG TAC GCT GAT GGA TAT ATG AGT ATT GTGgtatgttc	1422
Ile Val Ser Ala Val Lys Thr Tyr Ala Asp Gly Tyr Met Ser Ile Val	416
ctgctaccgacgttatttgaaatgccagatgctaaatggctactatag CAA ACA CAC GCG ATG ACG	1487
Gln Thr His Ala Met Thr	422
AAT GGC TCT CTC TCT GAG CAG TTC GGC AAG TCC GAC GGC TTC TCG CTG TCC GCC	1541
Asn Gly Ser Leu Ser Glu Gln Phe Gly Lys Ser Asp Gly Phe Ser Leu Ser Ala	440
CGC GAT CTC ACC TGG TCG TAT GCA GCC CTC CTC ACA GCC AAC CTG AGA AGA AAC	1595
Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala Asn Leu Arg Arg Asn	458
TCG GTT GTT CCC CCA TCC TGG GGC GAG ACG ACC GCA ACC AGC GTG CCC TCC GTC	1649
Ser Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Glu Thr Thr Ala Thr Ser Val Pro Ser Val	476
TGC TCA GCT ACC TCT GCC ACC GGC ACC TAC AGT ACC GCC ACG AAC ACC GCG TGG	1703
Cys Ser Ala Thr Ser Ala Thr Gly Thr Tyr Ser Thr Ala Thr Asn Thr Ala Trp	494
CCC AGC ACT CTG ACC AGC GGG ACT GGT GCT ACA ACT ACC ACA AGC AAG GCG ACT	1757
Pro Ser Thr Leu Thr Ser Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ser Lys Ala Thr	512
TCT TCT AGT ACT ACT ACT ACC TCG TCG GCC TCG TCA ACA ACA GTT GAA TGT GTG	1811
Ser Ser Ser Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ser Ser Thr Thr Val Glu Cys Val	530
GTT CCG ACC GCG GTG GCA GTC ACC TTT GAT GAA GTT GCT ACC ACA ACC TAT GGC	1865
Val Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Glu Val Ala Thr Thr Thr Tyr Gly	548
GAG AAT GTC TAC GTG GTG GGA TCC ATC TCC CAA CTG GGC AGC TGG GAC ACG AGC	1919
Glu Asn Val Tyr Val Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Ser Trp Asp Thr Ser	566
AAG GCC GTG GCC CTG AGT GCC AGC AAA TAC ACC TCC AGC AAC AAT CTC TGG TAT	1973
Lys Ala Val Ala Leu Ser Ala Ser Lys Tyr Thr Ser Ser Asn Asn Leu Trp Tyr	584
GTC ACG GTC ACC CTT CCC GCT GGG ACG ACC TTC CAG TAC AAG TTC ATC CGG GTT	2027
Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly Thr Thr Phe Gln Tyr Lys Phe Ile Arg Val	602
TCG AGC AGC GGG TCG GTT ACT TGG GAG AGT GAC CCG AAC CGT TCA TAC ACG GTT	2081
Ser Ser Ser Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val	620
CCG TCC GCT TGT GGG ACG TCC ACC GCG GTG GTG AAC ACC ACT TGG CGC TAGATGG	2135
Pro Ser Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Val Val Asn Thr Thr Trp Arg ***	636
GTGAGTCTGGATGAGCCGGTGATGTCTTTCCGGCTTCCTGAACTGTTCCATAGCCGCTGGAGGGTGACAACA	2207
GCCGTGATGTATCGCTCGTTATTGTGGAAGCTTTTACCAACAGGACATTTACTTGTACTTATTATTTCGTTA	2278
GCATCCTTGTGGAAACGTTTCTCTCAACCTATTGCAATATTCTGCTCTTTTCTAC	2334

tamaño puede deberse a la glicosilación de la proteína, ya que estos últimos autores sugieren para la misma un contenido de un 7.5% (p/p) de carbohidratos. En este sentido es importante resaltar la presencia en las posiciones 122, 199, 210, 423, 615 y 632 de sitios potenciales de N-glicosilación que se ajustan a la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr-Y propuesta por Gavel y von Heijne (1990). La presencia de Pro en X o Y reduce la probabilidad de N-glicosilación y frecuentemente, en la zona C-terminal de las glicoproteínas los sitios probables generalmente no se glicosilan (Gavel y von Heijne, 1990). Esto reduciría la probabilidad de N-glicosilación a las posiciones 199, 210 y 423. En las glucoamilasas de *A. niger* y *A. awamori* se ha demostrado experimentalmente que los dos últimos sitios se encuentran N-glicosilados, dado que estas dos posiciones se encuentran conservadas en la glucoamilasa de *A. terreus*, estos residuos también podrían estar glicosilados en dicha proteína.

La comparación de la secuencia de la glucoamilasa de *A. terreus* con las secuencias de otras glucoamilasas fúngicas permite asignar a la proteína GLA1 los dominios descritos en el apartado 2.2. de la Introducción, un dominio catalítico en la región N-terminal, una zona de unión rica en Ser y Thr y un dominio de unión a almidón en la región C-terminal.

Siguiendo el trabajo de Coutinho y Reilly (1994a), en el dominio catalítico de la glucoamilasa de *A. terreus* se encuentran los cinco segmentos de homología S₁ a S₅ presentes en todas las glucoamilasas (ver figura 24 y apartado 2.2.1 de la Introducción). En ellos se encuentran los residuos conservados implicados en la catálisis y en la unión del sustrato propuestos por homología de secuencia con la glucoamilasa de *A. awamori* var *kawachi*. Dada la cantidad de residuos implicados en la función de la enzima, sólo se hará alusión a los más importantes. En el segmento S₂ se encuentra el Trp₁₄₈ (numeración de la proteína de *A. terreus*), equivalente al Trp₁₂₀ de *A. niger* implicado en la formación del complejo enzima-sustrato y esencial para la actividad del enzima. Este residuo también se mantiene invariable en las glucoamilasas de *S. diastaticus* y *S. fibuligera* y en la Taka-amilasa A de *A. oryzae* (Sierks et al., 1989). En los segmentos S₃ y S₅ se encuentran los residuos Glu₂₀₇ (Glu₁₇₉ en *A. niger*) y Glu₄₂₈ (Glu₄₀₀ en *A. niger*) que por

A. awamori M-SFRSLLALSGLV----CTGLANVISKR-----AT-LDSWLSNEATVA
A. kawachi M-SFRSLLALSGLV----CSGLANVISKR-----AT-LDSWLSNEATVA
A. niger M-SFRSLLALSGLV----CTGLANVISKR-----AT-LDSWLSNEATVA
A. oryzae MVSFSS--CLRALALGSSVLAVQPVL-RQ-----ATGLDTWLSTEANFS
A. shirousami M-SFRSLLALSGLV----CSGLASVISKR-----AT-LDSWLSNEATVA
A. terreus M-TRILTALHLGLALVQSVVVGAPQLAPRA-----TTSLDAWLASETTVA
H. resinae MRLLPSS-----CAGALSLLCSLAIAAPELTELKARDLSSFIASERAIA
H. grisea MHTFSKLLVLGSAV--QSALGRPHG--SSRLQE--RAAVDTF INTEKPIA
N. crassa MHLVSSLLVVGAAF--QAVLGLPDPLHEKRHSDI IKRSVDSYIQTETPIA

* . . . *

S₁

A. awamori RTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNDYFYTWTDRDGLVLTGLV
A. kawachi RTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNDYFYTWTDRDGLVIKTLV
A. niger RTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNDYFYTWTDRDGLVLTGLV
A. oryzae RQAILNNIGADGQSAQASPGVVIASPSKSDPDYFYTWTDRDGLVMKTLV
A. shirousami RTAILNNIGADGAWVSGADSGIVVASPSTDNDYFYTWTDRDGLVLTGLV
A. terreus LDGILDNVGSSGAYAKSAKSGIVIASPSTDNDYFYTWTDRDAALTVKALI
H. resinae LQALNNIGPDGSAVPGAGAFVVASPSKANPDYFYTWSRDSALTLKMI I
H. grisea WNKLLANIGPNGKAAPGAAAGVVIASPSRTDPYFYTWTDPDAALVLTGI I
N. crassa QKNLLCNIGASGCRASGAASGVVVASPSKSSPDWY-TWTRDAALVTKLIV

* * * * * . * * * * * * . * * * * * . .

A. awamori DLFRNG-DTSSLSTIENYISAQAI VQG ISNPSGD-LSSGAGLGEPKFNVD
A. kawachi DLFRNG-DTDLLSTIEHYISSQAI IQG VSNPSGD-LSSG-GLGEPKFNVD
A. niger DLFRNG-DTSSLSTIENYISAQAI VQG ISNPSGD-LSSGAGLGEPKFNVD
A. oryzae DLFRGG-DADLLPIIEEFISSQARI IQG ISNPSGA-LSSG-GLGEPKFNVD
A. shirousami DLFRNG-DTDLLSTIEHYISSQAI IQG VSNPSGD-LSSG-GLGEPKFNVD
A. terreus DLFRNG-ETSLQTVIMEYISSQAYLQTVSNPSGS-LSTG-GLAEPKYVVD
H. resinae DEFILG-NTTLQTIIEQYIHAQAVLQTVSNPSGTFLPDGVGLGEPKFMVD
H. grisea ESLGHNYNTTLQQ-----VSNPSGT-FADGSGLGAEKFNVD
N. crassa DEFTNDYNTTLQNTIQAYAAAQAKLQGVSNPSGS-LSNGAGLGEPKFMVD

. . * . . * * * * * * . * * * * * * *

S₂

A. awamori ETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVRND
A. kawachi ETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSAAATEIVWPLVRND
A. niger ETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVRND
A. oryzae ETAFTGAWGRPQRDGPALRATAMISFGEWLVENSHTSIATDLVWPVVRND
A. shirousami ETAYAGSWGRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSAAATEIVWPLVRND
A. terreus ETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIDFGNWLIDNGYSTYASSIVWPIVRND
H. resinae GTRFNQWGRPQRDGPALRAIALMTYSNWLIKNGQFAEAKTKIWPI IAND
H. grisea LTAFTGEWGRPQRDGPPLRAIALIQYAKWLIANGYKSTAKSVVWPVKND
N. crassa LQOFTGAWGRPQRDGPPLRAIALIGYKWLVSNGYADTAKSI IWPIVKND

. * * * * * * * * * * * * . * * * * * * *

S₃

A. awamori LSYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTI AVQHRALVEGSAFATAV GSSCSW
A. kawachi LSYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTI AVQHRALVEGSAFATAV GSSCSW
A. niger LSYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTI AVQHRALVEGSAFATAV GSSCSW
A. oryzae LSYVAQYWSQSGFDLWEEVQGTSFYTVAVSHRALVEGSSFAKT V GSSCPY
A. shirousami LSYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTI AVQHRALVEGSAFATAV GSSCSW
A. terreus LSYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTI AVQHRALVEGSTFASKV GASC SW
H. resinae LSYVGQYWNQSGFDLWEEYASSFFTI QNQHRA LVEGAQLAHD LGVTCTG
H. grisea LAYTAQYWNQTYGFDLWEEVPGSSFFTI ASSHRA LTEGAYLAAQLDTECPP
N. crassa LAYTAQYWNQTYGFDLWEEVNSSFFTI AASHRA LVEGSAFAKSV GSSCSA

* *

A. awamori CDSQAPEILCYLQSFWT--GSFILANFDSS--RSGKDANTLLGSIHTFDP
A. kawachi CDSQAPQILCYLQSFWT--GSYILANFDSR--RSGKDTNTLLGSIHTFDP
A. niger CDSQAPEILCYLQSFWT--GSFILANFDSS--RSGKDANTLLGSIHTFDP
A. oryzae CDSQAPQVRCYLQSFWT--GSYIQANFGGG--RSGKDINTVLGSIHTFDP
A. shirousami CDSQAPQILCYLQSFWT--GSYILANFDSS--RSGKDTNTLLGSIHTFDP
A. terreus CDSQAPQVLCFLQRFWT--GSYIMANFGGG--RSGKDANTVLGSIHTFDP
H. resiniae CD-QAPEVLCFLQSFWN--GKYIVSNINVNNGRTGLDGNSILGAISTFDI
H. grisea CTTVAPQVLCFQQAFWNSKGNVYVSTSTAGEYRSGKDANSILASIHNFDP
N. crassa CDAIAPQILCFQQSFWSNSG-YIISNFV--NYRSGKDINSVLTSIHNFDP
 * * * * *

A. awamori EAACDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAVAVGRYPE
A. kawachi EAACDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAVAVGRYPE
A. niger EAACDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAVAVGRYPE
A. oryzae QATCDDATFQPC SARALANHKVVTDSFRSIYAINSGRAENQAVAVGRYPE
A. shirousami EAACDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAVAVGRYPE
A. terreus NAGCDDTTFQPCSPRALANHKVVTDSFRSIYINSISSGKAVAVGRYPE
H. resiniae DAYCDSPTLQPCHSQSLANFKVLTDTFRNLYTINAGIPEGQGVAVGRYAE
H. grisea EAGCDNLTFQPCSERALANHKAYVDSFRNLYAINKGIAQKAVAVGRYSE
N. crassa AAGCDVNTFQPCSDRALANHKVVVDSMR-FWGVNSGRTAGKAAVAVGRYAE
 * * * * *

S₄

A. awamori DTYYNGNPWFLECTLAAAQLYDALYQWDKQGSLEVTDVSLDFFKALYSDA
A. kawachi DSYYNGNPWFQSTLAAAQLYDALYQWDKQGSLEITDVSLDFFKALYSGA
A. niger DTYYNGNPWFLECTLAAAQLYDALYQWDKQGSLEVTDVSLDFFKALYSDA
A. oryzae DSYYNGNPWFLLTTLAAAQLYDALYQWDKIGSLAITDVSLPFFKALYSSA
A. shirousami DSYYNGNPWFLECTLAAAQLYDALYQWDKQGSLEITDVSLDFFKALYSGA
A. terreus DSYYNGNPWFLLTTLAAAQLYDAIYQWQKIGSITITDVSLAFFKDLYSSA
H. resiniae DVYMGGNPWYLITTTAAAQFLYDAVAQWKARHVLTVDETSLAFKDIYPEV
H. grisea DVYYNGNPWYLANFAAAAQLYDAIYVWNKQGSITVTSVSLPFFRDLVSSV
N. crassa DVYYNGNPWYLATLAAAQLYDAVYVWKKQGSITVTSVSLAFFKDLVPSV
 * * * * *

A. awamori ATGTYSSSS--STYSSIVDAVKTFADGFVSI VETHAASNGSMSEQYDKSD
A. kawachi ATGTYSSSS--STYSSIVSAVKTFADGFVSI VETHAASNGSLSEQFDKSD
A. niger ATGTYSSSS--STYSSIVDAVKTFADGFVSI VETHAASNGSMSEQYDKSD
A. oryzae ATGTYASST--TVYKDIVSAVKAYADGYVQIVQTYAASTGSMAEQYTKTD
A. shirousami ATGTYSSSS--STYSSIVSAVKTFADGFVSI VETHAASNGSLSEQFDKSD
A. terreus AVGTYASSS--SAFTSIVSAVKTYADGYMSIVQTHAMTNGSLSEQFGKSD
H. resiniae TVREYKSGNANSPFAQIMDAVTAYADSYVAIAEKYIPSNGLSEQFNDRD
H. grisea STGTYSKSS--STFTNIVNAVKAYADGFIEVAKYTPSNGALAEQYDRNT
N. crassa STGTYSSSS--STYTAIINAVTTYADGFVDIVAQYTPSDGSLAEQFDKDS
 * * * * *

S₅

A. awamori GEQLSARDLTWSYAALLTANRRNSVVPASWGETSASS-VPGTCAATSAS
A. kawachi GDELSARDLTWSYAALLTANRRNSVPPSWGETSASS-WPGTCAATSAS
A. niger GEQLSARDLTWSYAALLTANRRNSVVPASWGETSASS-VPGTCAATSAS
A. oryzae GSQTSARDLTWSYAALLTANRRNAVVPAPWGETAATS-IPSACSTTSAS
A. shirousami GDELSARDLTWSYAALLTANRRNSVPPSWGETSASS-VPGTCAATSAS
A. terreus GFSLSARDLTWSYAALLTANLRRNSVPPSWGETTATS-VPSVCSATSAT
H. resiniae GTPLSAIDLTSYAAFITMSQRRAGQYPPSSWGSRNALPP-PTTCSASSTP
H. grisea GKPDAAADLTWSYSAFLSAIDRRAGLVPPSWRASVAKSQLPSTCSR IEVA
N. crassa GAPLSATHLTWSYASFLSAAARRAGIVPPSWGAASANS-LPGSCSASTVA
 * * * * *

A. awamori GTYSSVTVTSWPSIVATGGTTTTATPTGSGSVTSTSKTTATASKTSTSTS
A. kawachi GTYSSVTVTSWPSIVATGGTTTTATTTGSGGVTSTSKTTTTASKTSTTTS
A. niger GTYSSVTVTSWPSIVATGGTTTTATPTGSGSVTSTSKTTATASKTSTSTS
A. oryzae GTYSSVVITSWPTISGYPGA-----P
A. shirousami GTYSSVTVTSWPSIVATGGTTTTATTTGSGGVTSTSKTTTTASKTSTTTS
A. terreus GTYSTATNTAWP**ST**LTSG-----TGATTTT**SKATSS**STTTTSSASST
H. resinae GIY-----TPATAAGAPNVTS-----
H. grisea GTYVAATSTSFPS-----KQTPNPSAAPSPPY
N. crassa GSYATATATSFPA-----NLTPASTTVPPT--
 * *

A. awamori STS**CTT**PPTAVAVTFDLTATTT**Y**GENIYLVGSISQLGDWETSDGIALSADK
A. kawachi STS**CTT**PPTAVAVTFDLTATTT**Y**GENIYLVGSISQLGDWETSDGIALSADK
A. niger STS**CTT**PPTAVAVTFDLTATTT**Y**GENIYLVGSISQLGDWETSDGIALSADK
A. oryzae DSPCQVPTTVSVTF**FAV**KATT**VY**GESIKIVGSISQLGSWNPSSATALNADS
A. shirousami STS**CTT**PPTAVAVTFDLTATTT**Y**GENIYLVGSISQLGDWETSDGIALSADK
A. terreus TV**EC**VVPTAVAVTFDEVA**TT**YGENVYVVG**S**ISQLGSWDT**SKA**VALSASK
H. resinae --**SC**---QV**S**ITFNINATT**Y**GENLYVIGNSSDLGAWNIADAYPLSASA
H. grisea PTACADASEVYVTFNERV**ST**AWGETIKVVG**N**VPALGNWDT**SKAV**TL**SAS**G
N. crassa QTGCAADHEVLVTFNEK**V**TT**S**YGQ**T**VK**V**GS**I**ARLGNWAPASGL**TL**SAKQ
 * * . ** . * * . . . * . . * * * . . * . *

A. awamori YTSSDPLWYVTVTL-**P**AGES**F**EYK**F**IRIESDD**S**VEWESDPNREY**T**VPQAC
A. kawachi YTSSNPLWYVTVTL-**P**AGES**F**EYK**F**IR**V**ESDD**S**VEWESDPNREY**T**VPQAC
A. niger YTSSDPLWYVTVTL-**P**AGES**F**EYK**F**IRIESDD**S**VEWESDPNREY**T**VPQAC
A. oryzae YTTDNPLW**I**GTINL-**P**AGQ**S**F**E**YK**F**IR**V**Q-**N**GA**V**I**W**ESDPN**R**KY**T**VP**S**TC
A. shirousami YTSSNPLWYVTVTL-**P**AGES**F**EYK**F**IR**V**ESDD**S**VEWESDPNREY**T**VPQAC
A. terreus YTSSNPLWYVTVTL-**P**AG**T**TF**Q**YK**F**IR**V**SS**S**GS**V**I**W**ESDPN**R**S**Y**TV**P**SAC
H. resinae YTQDRPLW**S**AAI**P**LNA-**G**E**V**IS**Y**Q**Y**VR**Q**ED**C**D**Q**P**Y**I**Y**ET**V**N**R**TL**T**VP-**A**C
H. grisea YK**S**NDPLW**S**IT**V**PI**K**AT**G**SA**V**Q**Y**K**Y**I**K**VG**T**NG**K**IT**W**ESDPN**R**S**I**TL**Q**TAS
N. crassa YSSSNPLW**S**TTIAL-**P**Q**G**TS**F**K**Y**K**Y**V**V**NS**D**GS**V**K**W**END**P**DR**S**Y**A**VG**T**DC
 * * . . . * * . . . * . .

A. awamori GT---STATV**DTWR**-----
A. kawachi GE---STATV**DTWR**-----
A. niger GT---STATV**DTWR**-----
A. oryzae GV---K**SAVQSDVWR**-----
A. shirousami GE---STATV**DTWR**-----
A. terreus GT---STAV**VNTWR**-----
H. resinae GGA---AV**TTDDAWMGPV**GSSGNC
H. grisea SAG**KCAAQTVNDSWR**-----
N. crassa A----STATL**DDTWR**-----
 . . *

FIGURA 24. Alineamiento de la secuencia de la glucoamilasa de *A. terreus* con glucoamilasas de la subfamilia *Aspergillus*. Los aminoácidos mencionados en el texto se destacan en **negrita**. Los residuos idénticos se señalan con un asterisco (*) y los cambios conservativos con un punto (.). (*A. kawachi*: *A. awamori* var *kawachi*).

comparación con la proteína de *A. niger* podrían ser el ácido y la base catalítica respectivamente.

La zona de unión de la glucoamilasa de *A. terreus* por homología con las glucoamilasas de la subfamilia *Aspergillus* está comprendida entre los residuos Ser₄₉₆ y Glu₅₂₈ presentando un total de 10 residuos de Ser y 14 de Thr.

Finalmente, en el dominio de unión a almidón se conservan los residuos Cys₅₂₉ y Cys₆₂₄ que en las ciclodextrin glucosiltransferasas de *Bacillus* están implicadas en la formación de un puente disulfuro. También se encuentran los residuos Trp₆₁₀ y Trp₆₃₅ que en la glucoamilasa de *A. niger* (Trp₅₉₀ y Trp₆₁₅), son responsables de la unión al almidón granular y el Trp₅₈₃, para el que en *A. awamori* (Trp₅₆₂) se ha determinado una zona mínima a su alrededor necesaria para la digestión del almidón crudo.

2.1.4. Estudios previos sobre la regulación de la expresión del gen *gla1*.

En la región 5' no codificante del gen *gla1* aparecen algunas secuencias características de los promotores de eucariotas. En posición -158 se encuentra la secuencia CAAT. También, en posición -88 se encuentra una región TATAGATAAATA, rica en AT e interrumpida por una G, similar a la descrita como consenso (Gurr *et al.*, 1987). Asimismo, en posiciones -222 y -241 se detecta la presencia de dos secuencias divergentes consenso para la unión de la proteína CreA. En posición -3 respecto al ATG hay una G como en el gen de la glucoamilasa de *A. niger*. Esta situación se ajusta a la consenso (A o Pu) aunque la situación más favorable para el reconocimiento del sitio de inicio de la traducción por el ribosoma parece ser una A en posición -3.

En la región 3' no codificante del gen no se detectan secuencias similares a las descritas como consenso para la poliadenilación. Ahora bien, la secuenciación de varios clones que contenían la región 3' del cDNA del gen *gla1* amplificada utilizando los oligonucleótidos GLA10 y EGLB (ver apartado 2.1.2) permitió delimitar la presencia de tres sitios de final de la transcripción que se sitúan 182, 185 y 200 pb después del codón de terminación, siendo mayoritario el segundo de ellos.

Para estudiar el patrón de transcripción del gen *gla1* se inocularon 10⁵ ufc/ml en seis matraces que contenían 100 ml de MM con almidón al 1% (p/v) y

se incubaron 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h a 37°C y 200 rpm. Finalizado el tiempo de incubación se recogió el micelio y se obtuvo su RNA. Se realizó un análisis northern utilizando como sonda el fragmento *Bam*HI de 450 pb procedente del plásmido pATGLA1 (ver figura 21). La figura 25 muestra el resultado de la hibridación. El mRNA del gen *gla1* se detectó a las 12 h de cultivo. Después de sobreexponer el filtro no se detectó ninguna señal en tiempos posteriores, indicando que este gen se expresa en un intervalo de tiempo muy estrecho. El tamaño estimado para el transcrito fue de 2 kb.

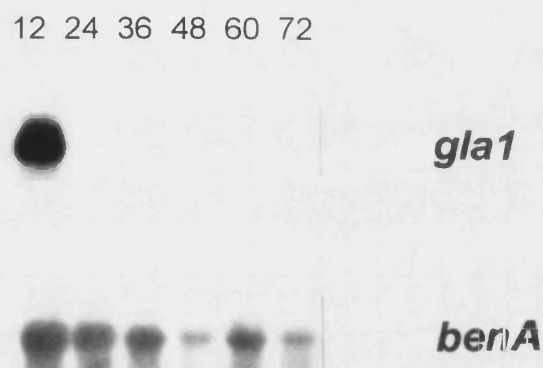


FIGURA 25. Estudio de la transcripción del gen *gla1* de *A. terreus*. Análisis northern de 10 µg de RNA obtenido a partir de micelio crecido en medio MM con almidón al 1% (p/v). Los números indican el tiempo de crecimiento en horas. Se utilizó como sonda el fragmento *Bam*HI de 0.45 kb del plásmido pATGLA1. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA con la sonda del gen *benA*.

Dado que la señal de hibridación apareció en el primer tiempo estudiado decidimos estudiar tiempos más cortos para conocer si la inducción se iniciaba antes de las 12 h. Para ello se repitió el experimento en las mismas condiciones con tiempos de cultivo de 8, 12, 16, 20 y 24 h. El resultado de este experimento indica que la transcripción del gen se inicia a las 8 h y decae a partir de las 12 h, no detectándose ninguna señal a las 20 h de crecimiento

(resultados no mostrados). A las 12 h de cultivo el micelio es prácticamente inexistente, y en tiempos más cortos sólo se observan conidios germinando, lo cual dificulta el sistema de obtención de RNA. Para evitar este problema y conseguir unas condiciones de inducción repetitivas sobre una cantidad abundante de biomasa, se realizaron cultivos de reemplazamiento. En estos cultivos el micelio crecido durante 20 h en medio MMA se separó del medio de cultivo y se transfirió a matraces con medio MM que contenían 1% (p/v) de almidón. Se incubaron durante 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h en las mismas condiciones que los cultivos directos. Se extrajo RNA de cada cultivo y se analizó siguiendo la misma metodología. La figura 26 muestra el resultado de este experimento. El mRNA del gen *gla1* se detectó 4 h después del reemplazamiento alcanzando el máximo de expresión a las 8 h y su transcripción apenas fue perceptible a las 12 h. Este resultado confirmó que la ventana de inducción del gen *gla1* es muy estrecha.

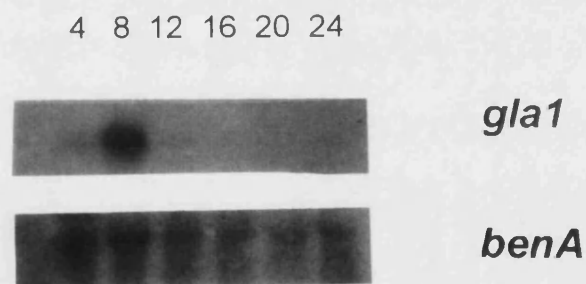


FIGURA 26. Análisis northern de 20 μ g de RNA obtenido de micelio crecido en MMA y transferido a MM con almidón al 1% (p/v). Los números indican el tiempo transcurrido en horas desde el reemplazamiento. Como sonda se utilizó el fragmento *Bam*HI de 0.45 kb procedente del plásmido pATGLA1. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA con la sonda del gen *benA*.

Como se describió en el apartado 2.3. de la Introducción, la regulación de la expresión de los genes de glucoamilasa varía de una especie fúngica a otra. Para estudiar la regulación de la expresión del gen *gla1* de *A. terreus* se obtuvo RNA a partir de micelio crecido en distintas fuentes de carbono. Se utilizaron cultivos de reemplazamiento recogiendo el micelio para la extracción de RNA 8 h después de la transferencia desde medio MMA a medio MM suplementado con almidón, glucosa, maltosa, xilosa y las combinaciones almidón con glucosa, almidón con maltosa, glucosa con maltosa, glucosa con xilosa y maltosa con xilosa, todos ellos al 1% (p/v). Como puede apreciarse en la figura 27, el almidón, y en menor grado la maltosa, inducen la expresión del gen *gla1*. Este resultado concuerda con el obtenido por Gosh y colaboradores (1990a) a partir de sobrenadantes de cultivo suplementados con distintos azúcares.

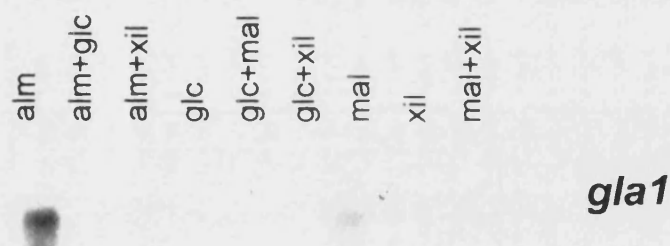


FIGURA 27. Efecto de distintos azúcares en la transcripción del gen *gla1*. El RNA se obtuvo a partir de micelio recogido 8 h después del reemplazamiento desde medio MMA a medio MM con los azúcares que se indican en la figura a una concentración del 1% (p/v). 20 µg de RNA de cada muestra se transfirieron a una membrana de nailon y se hibridaron con el fragmento *Bam*HI de 0.45 kb procedente del plásmido pATGLA1.

Como se observa en la figura 27, la glucosa y la xilosa reprimen la expresión del gen *gla1*, incluso en presencia de almidón y maltosa. La presencia en el promotor del gen de dos sitios putativos de unión al regulador negativo CreA (ver figura 23) refuerza este resultado de represión por

catabolito. Por tanto, la regulación del gen *gla1* parece distinta de la del gen *glaA* de *A. niger*, ya que en este último, según algunos autores, la glucosa actúa como inductora de la síntesis de glucoamilasa mientras que la xilosa actúa como represora (Fowler *et al.*, 1990).

2.2. SOBREPDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA GLA1 DE *A. terreus*.

La producción industrial de una enzima puede mejorarse haciendo uso de técnicas biotecnológicas (Ramón, 1996). Para ello hay que conseguir incrementar la cantidad de enzima secretada o conseguir su producción en unas condiciones de cultivo en las que su purificación sea más sencilla. Dada la disponibilidad de sistemas de transformación para *A. terreus*, así como del gen *gla1*, decidimos abordar la sobreproducción y/o producción específica de la proteína GLA1.

2.2.1. Sobreproducción de la proteína GLA1 en *A. terreus*.

Para mejorar los niveles de producción de la proteína GLA1 en *A. terreus* se decidió introducir por transformación varias copias del gen *gla1*, esperando que, como se ha descrito en el caso del gen *glaA* de *A. niger*, un aumento de la dosis génica del gen conllevara un aumento de la cantidad de proteína secretada (Finkelstein *et al.*, 1989; Verdoes *et al.*, 1993). Para ello, se cotransformó la cepa silvestre de *A. terreus* con los plásmidos pATGLA1 y pAN7-1 siguiendo el método descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos. De los presuntos cotransformantes resistentes a HmB obtenidos se eligieron los nueve que presentaron un crecimiento más vigoroso para ser estudiados más profundamente.

Se aisló DNA de cada uno de ellos y se analizó por el método de Southern usando los enzimas *SmaI* (un punto de corte en pATGLA1) y *NcoI* (no corta en pATGLA1). Como sonda se utilizó el fragmento *BamHI* de 450 pb de pATGLA1. El resultado de este experimento indicó que únicamente las cepas CHG₁₀, CHG₁₈, CHG₁₉ y CHG₂₇ eran cotransformantes reales. En todas ellas la integración de pATGLA1 se produjo en un *locus* distinto a *gla1*. Los



cotransformantes CHG₁₀, CHG₁₉ y CHG₂₇ presentaron un patrón de hibridación compatible con la introducción de varias copias en tándem y reorganizaciones entre algunas de las copias integradas. En el cotransformante CHG₁₈ se observó la integración de varias copias en tándem (resultados no mostrados).

Se inocularon conidios de la cepa silvestre de *A. terreus* y de los cotransformantes CHG₁₀, CHG₁₈ y CHG₂₇ en matraces que contenían 20 ml de medio MM con almidón al 1% (p/v). Se incubaron durante 24 y 48 h y se determinó la actividad glucoamilasa en el medio de cultivo así como el peso seco del micelio. Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 9.

TABLA 9. Actividad glucoamilasa de la cepa silvestre de *A. terreus* y de tres cotransformantes en cultivos directos 24 y 48 h después de la transferencia a medio con almidón. Los valores presentados son la media de tres experimentos.

ACTIVIDAD GLUCOAMILASA (U/g de peso seco)		
CEPA	24 h	48 h
Silvestre	296.2 ± 4.4	1074.7 ± 109.5
CHG ₁₀	603.1 ± 85.5	1509.4 ± 232.9
CHG ₁₈	288.1 ± 15.1	912.2 ± 115.6
CHG ₂₇	768.9 ± 73.7	1458.7 ± 201.9

El cotransformante CHG₁₈ produjo unos niveles de glucoamilasa similares a los de la cepa silvestre. Por el contrario, los cotransformantes CHG₁₀ y CHG₂₇ presentaron una actividad entre 2 y 2.5 veces mayor que la cepa

silvestre a las 24 h de cultivo que se redujo a las 48 h. Estos incrementos no son espectaculares y no se correlacionan con el incremento de dosis génica. Como se ha visto en el apartado 2.3. de la Introducción, la integración de copias adicionales de un gen no garantiza la obtención de un incremento en la producción de la proteína codificada por el mismo, ya que se pueden producir problemas relativos al lugar de integración y a la titulación de proteínas reguladoras específicas. En los transformantes analizados la integración se ha producido en diferentes lugares del genoma, por lo que la hipótesis de la titulación de activadores puede ser más plausible. El análisis de la transcripción del gen de la glucoamilasa de *A. terreus* en los cotransformantes nos permitirá conocer si, como en los transformantes multicopia de *A. niger*, la producción de glucoamilasa está limitada a nivel de transcripción (Verdoes *et al.*, 1993).

2.2.2. Expresión del gen *gla1* en *A. nidulans*.

Dado que se ha descrito la inducción por almidón del promotor del gen *glaA* de *A. niger* en *A. nidulans* (Gwynne *et al.*, 1987; Carrez *et al.*, 1990) y que la glucoamilasa de *A. niger* se ha secretado en *A. nidulans* (Contreras *et al.*, 1991), decidimos expresar el gen *gla1* de *A. terreus* en *A. nidulans* para sobreproducir la glucoamilasa clonada. Para ello, la cepa *A. nidulans* V002 se cotransformó con los plásmidos pATGLA1 y pPL5. Algunos de los cotransformantes obtenidos se sembraron en placas de medio MM con almidón al 1% (p/v) para determinar cuales de ellos eran cotransformantes. Como control negativo se utilizó un transformante que portaba únicamente pPL5. La capacidad amilolítica de estos transformantes se reveló tiñendo las placas con vapores de yodo, detectándose la presencia de grandes halos de degradación en varios de ellos que se denominaron CNdG₁, CNdG₃, CNdG₅, CNdG₆, CNdG₇, CNdG₁₀ y CNdG₁₄ y halos menores en el transformante control y en otros cotransformantes que se denominaron CNdG₄, CNdG₉ y CNdG₁₁.

Se obtuvo DNA de estos transformantes que se digirió con *Sma*I (corta una vez en pATGLA1) y *Nco*I (no corta en pATGLA1). Se llevó a cabo un análisis Southern usando como sonda un fragmento de 1.3 kb amplificado por PCR utilizando como molde el cDNA del gen *gla1* y los cebadores GLA6 y

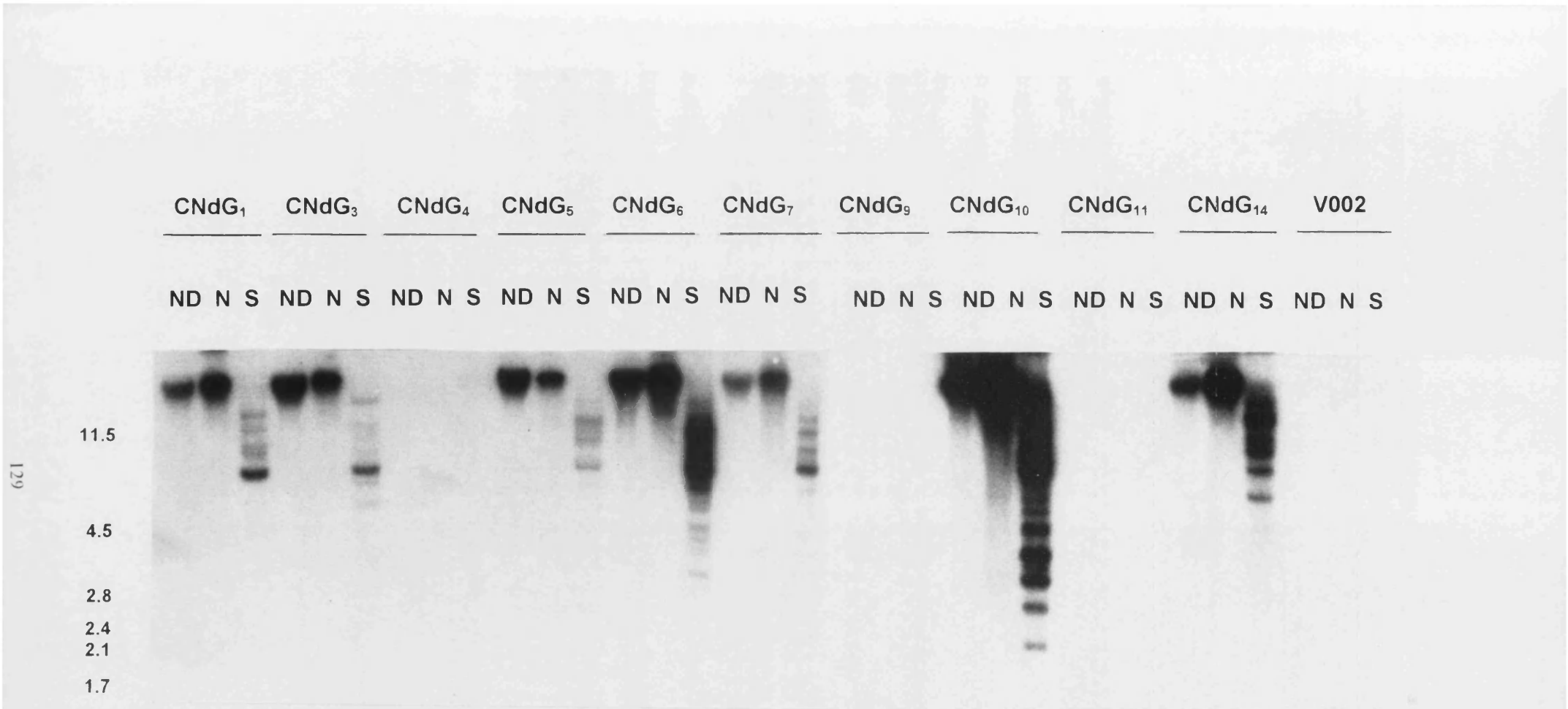


FIGURA 28. Análisis molecular de 5 μ g de DNA de los cotransformantes de *A. nidulans* V002 con pPL5 y pATGLA1. Como sonda se utilizó un fragmento de 1.3 kb del cDNA del gen *gla1* de *A. terreus* amplificado por PCR con los cebadores GLA6 y GLA9. (ND: sin digerir, N: *Nco*I, S: *Sma*I).

GLA9. El resultado de este experimento puede verse en la figura 28. Como puede apreciarse, el DNA de los cotransformantes CNdG₄, CNdG₉ y CNdG₁₁, así como el de la cepa receptora, no hibridó con la sonda. En el resto de cotransformantes estudiados aparecieron señales de hibridación con la sonda, confirmando que eran cotransformantes reales. En todos ellos parece que se ha integrado distinto número de copias del gen en tándem en un sitio único y, aparentemente en algunos pueden haberse producido reordenaciones.

Para comprobar si la introducción de copias del gen *gla1* tenía algún efecto sobre la actividad glucoamilasa liberada al medio de cultivo se eligieron los cotransformantes CNdG₆, CNdG₁₀ y CNdG₁₄. Conidios de estos transformantes se inocularon en medio MMA. El micelio crecido después de 20 h de cultivo se transfirió a matraces de medio MM con almidón al 1% (p/v) y la incubación continuó durante 24 y 48 h. Posteriormente se determinó la actividad glucoamilasa en el sobrenadante de cultivo así como el peso seco del micelio. Como control del experimento se utilizó la cepa de *A. nidulans* V002 sin transformar. El resultado de este experimento aparece reflejado en la tabla 10.

En dos de los tres cotransformantes, CNdG₆ y CNdG₁₀, se produjo un aumento considerable de la producción. En el caso de CNdG₁₀, a las 24 h de transferencia a medio con almidón este cotransformante produjo veinte veces más que la cepa receptora, y alcanzó un nivel de actividad tres veces superior al de la cepa silvestre de *A. terreus* (ver tabla 9). Estas condiciones pueden ser idóneas para llevar a cabo la purificación de la enzima.

TABLA 10. Actividad glucoamilasa de la cepa receptora *A. nidulans* V002 y de tres cotransformantes en cultivos de reemplazamiento 24 y 48 h después de la transferencia a medios con almidón o maltosa. Los valores presentados son la media de tres experimentos.

ACTIVIDAD GLUCOAMILASA (U/g de peso seco)		
CEPA	24 h	48 h
V002	43.8 ± 5.3	103.2 ± 16.2
CNdG ₆	225.1 ± 21.6	408.2 ± 34.2
CNdG ₁₀	918.9 ± 10.3	536.6 ± 68.9
CNdG ₁₄	30.6 ± 5.6	343.8 ± 45.9

Aunque el nivel de sobreproducción de glucoamilasa que se ha conseguido tanto en los cotransformantes de *A. terreus* como en los de *A. nidulans* no puede considerarse elevado, los resultados descritos en este apartado nos permiten disponer de un método para la sobreproducción de la glucoamilasa de *A. terreus*. Asimismo, es importante destacar que el promotor del gen *gla1* puede tener interés biotecnológico. En este sentido utilizando dicho promotor se ha construido un vector de expresión que ha sido utilizado con éxito en la sobreproducción de una proteína de cubierta de un rotavirus (Villanueva, comunicación personal).

CONCLUSIONES.

- 1) Se ha desarrollado un método de transformación de protoplastos de *Aspergillus terreus* basado en la adquisición de resistencia a HmB. La frecuencia de transformación de este método es 3×10^{-5} transformantes por μg de plásmido transformante y protoplasto viable. En los transformantes analizados el DNA transformante se integra en diferentes *locus* en el genoma del hongo receptor, en la mayoría de los casos en forma de tándems. Los transformantes son mitóticamente estables y la integración del vector no parece afectar a la producción de enzimas extracelulares.
- 2) Se ha obtenido un mutante de *A. terreus* en el gen que codifica la OTCasa que presenta una frecuencia de reversión inferior a 10^{-8} . La mutación presente en esta cepa se ha denominado *arg1*. Se ha realizado un análisis molecular de este mutante, determinándose la ausencia de grandes reorganizaciones, deleciones o inserciones en el *locus arg1*.
- 3) Este mutante ha sido utilizado como cepa receptora en el desarrollo de un método de transformación por complementación heteróloga de su auxotrofia con el alelo silvestre del gen *argB* de *A. nidulans*. La frecuencia de transformación de este método es 2×10^{-5} transformantes por μg de plásmido transformante y protoplasto viable. En los transformantes analizados el DNA transformante se integra ectópicamente en diferentes *locus* en el genoma del hongo receptor, en forma de tándems. Los transformantes son mitóticamente estables y la integración del vector no parece afectar a la producción de enzimas extracelulares.
- 4) Se ha clonado y secuenciado el gen *arg1* de *A. terreus*. La secuencia de aminoácidos deducida indica que la OTCasa de *A. terreus* es una proteína de tamaño molecular 39226 Da que contiene en el extremo amino terminal un péptido señal de direccionamiento a la mitocondria, así como algunos residuos conservados en todas las OTCasas implicados en la unión del carbamil fosfato y la ornitina.
- 5) La expresión del gen *arg1* está regulada a nivel transcripcional y sometida al control general de la síntesis de aminoácidos.

- 6) El alelo silvestre del gen *arg1* y el mutante en OTCasa de *A. terreus* han sido utilizados para desarrollar un método de transformación por complementación homóloga. Dicho método no incrementa las frecuencias de transformación obtenidas con los métodos previamente desarrollados. En todos los transformantes ensayados la transformación se produjo por integración del DNA transformante en el *locus arg1*.
- 7) Se ha clonado y secuenciado un gen de *A. terreus* que codifica una glucoamilasa. Dicho gen, denominado *gla1*, codifica una proteína de tamaño molecular 67789 Da que contiene un péptido señal de 28 aminoácidos. Por homología con otras glucoamilasas es posible identificar en su secuencia un dominio catalítico en el extremo amino terminal y un dominio de unión al almidón en el carboxilo terminal, así como una región intermedia rica en serina y treonina.
- 8) La expresión del gen *gla1* está regulada transcripcionalmente. El almidón y la maltosa son inductores de la transcripción del gen, mientras que la glucosa y la xilosa actúan como represoras.
- 9) Se han construido transformantes multicopia de *A. terreus* en el gen *gla1*. Algunos de ellos secretan entre 2 y 2.5 veces más glucoamilasa que la cepa silvestre, si bien esta sobreproducción puede considerarse insuficiente.
- 10) El gen *gla1* ha sido expresado en *A. nidulans*. Su expresión se induce en presencia de almidón. Algunos transformantes multicopia de *A. nidulans* para dicho gen producen veinte veces más glucoamilasa que la cepa receptora permitiendo una purificación sencilla de dicha enzima.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aleksenko, A. y Clutterbuck, A.J., (1996). The plasmid replicator AMA1 in *Aspergillus nidulans* is an inverted duplication of a low-copy-number dispersed genomic repeat. *Mol. Microbiol.* **19**: 565-574.
- Aleshin, A.E., Firsov, L.M. y Honzatko, R.B. (1994). Refined structure for the complex of acarbose with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.4-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**: 15631-15639.
- Aleshin, A.E., Golubev, A., Firsov, L. y Honzatko, R.B. (1992). Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var X100 to 2.2 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **267**: 19291-19298.
- Ali, S. y Hossain, Z. (1991). Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terreus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 144-146.
- Ali, S., Hossain, Z., Mahmood, S. y Alam, R. (1990). Purification of glucoamylase from *Aspergillus terreus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 431-433.
- Ali, S., Mahmood, S., Alam, R. y Hossain, Z. (1989). Culture conditions for production of glucoamylase from rice bran by *Aspergillus terreus*. *MIRCEN J.* **5**: 525-532.
- Archer, D.B., Jeenes, D.J., MacKenzie, D.A., Brightwell, G., Lambert, N., Lowe, G., Radford, S.E. y Dobson, C.M. (1990). Hen egg white lysozyme expressed in, and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. *Bio/technology* **8**: 741-745.
- Armaleo, D., Ye, G.N., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C. y Johnston, S.A. (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* **17**: 97-103.
- Ashikari, T., Nakamura, N., Tanaka, Y., Kiuchi, N., Shibano, Y., Tanaka, T., Amachi, T. y Yoshizumi, H. (1986). *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 957-964.
- Ballance, D.J. (1991). Transformation systems for filamentous fungi. En "Molecular industrial mycology." (Leong, S.A. y Berka, R.M., eds.) Marcel Dekker, New York. pp. 1-29.
- Ballance, D.J., Buxton, F.P. y Turner, G. (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**: 284-289.
- Ballance, D.J. y Turner, G. (1985). Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**: 321-331.
- Barrett, V., Dixon, R.K. y Lemke, P.A. (1990). Genetic transformation of a mycorrhizal fungus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 313-316.
- Barthelmess, I.B., (1982). Mutants affecting amino acid cross-pathway control in *Neurospora crassa*. *Genet. Res. Camb.* **39**: 169-185.
- Beggs, J.D. (1978). Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **275**: 104-109.
- Bej, A.K. y Perlín, M.H. (1989). A high efficiency transformation system for the basidiomycete *Ustilago violacea* employing hygromycin resistance and lithium-acetate treatment. *Gene* **80**: 171-176.
- Bernard, H.U., Krämmmer, G. y Röwekamp. (1985). Construction of a fusion gene that confers resistance against hygromycin B to mammalian cells in culture. *Exp. Cell. Res.* **158**: 237-243.
- Berse, B., Dmochowska, A., Skrzypek, M., Wegléński, P., Bates, M.A. y Weiss, R.L. (1983). Cloning and characterization of the ornithine carbamoyltransferase gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene* **25**: 109-117.
- Bertrand, H., Collins, R.A., Stohl, L.L., Goewert, R.R. y Lambowitz, A.M. (1980). Deletion mutants of *Neurospora crassa* mitochondrial DNA and their relationship to the "stop-start" growth phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **11**: 6032-6036.
- Bilheimer, D.W., Grundy, S.M., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1983). Mevinolin and colestipol stimulate receptor-

- mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4124-4128.
- Boel, E., Hansen, M.T., Hort, I., Hoegh, I. y Fiil, N.P. (1984b). Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *EMBO J.* **3**: 1581-1585.
- Boel, E., Hort, I., Svensson, B., Norris, F., Norris, K.E. y Fiil, N.P. (1984a). Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.* **3**: 1097-1102.
- Bos, C.J., Debets, A.J.M., van Heusden A.W. y Schepers H.A.T.M. (1983). Fusion of protoplasts from conidiospores of *Aspergillus nidulans*. *Experientia* **45**: 298-299.
- Bowyer, P., Osbourn, A.E. y Daniels, M.J. (1994). An "instant gene bank" method for heterologous gene cloning: complementation of two *Aspergillus nidulans* mutants with *Gaeumannomyces graminis* DNA. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 448-454.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B. y Sanford, J.C. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high-velocity microprojectiles. *Science* **240**: 1534-1538.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Broekhuijsen, M.P., Mattern, I.E., Contreras, R., Kinghorn, J.R. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1993). Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: Production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *J. Biotechnol.* **31**: 135-145.
- Buxton, F.P., Gwynne, D.I. y Davies, R.W. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **37**: 207-214.
- Buxton, F.P., Gwynne, D.I. y Davies, R.W. (1989). Cloning a new bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains. *Gene* **84**: 329-334.
- Buxton, F.P., Gwynne, D.I., Garven, S., Sibley, S. y Davis, R.W. (1987). Cloning and molecular analysis of the ornithine carbamoyl transferase gene of *Aspergillus niger*. *Gene* **60**: 255-266.
- Buxton, F.P. y Radford, A. (1983). Cloning of the structural gene for orotidine-5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 403-405.
- Buxton, F.P. y Radford, A. (1984). The transformation of mycelial spheroplasts of *Neurospora crassa* and the attempted isolation of an autonomous replicator. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 339-344.
- Cabañas, M.J., Vázquez, D. y Modolell, J. (1978). Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *Eur. J. Biochem.* **87**: 21-27.
- Calton, G.J., Ranieri, R.L. y Espenshade, M.A. (1978). Quadrone, a new antitumor substance produced by *Aspergillus terreus*. Production, isolation and properties. *J. Antibiot.* **31**: 38-42.
- Carrez, D., Janssens, W., Degrave, P., van den Hondel, C.A.M.J.J., Kinghorn, J.R., Fiers, W. y Contreras, R. (1990). Heterologous gene expression by filamentous fungi: secretion of human interleukin-6 by *Aspergillus nidulans*. *Gene* **94**: 147-154.
- Carsiotis, M. y Jones, R. F. (1974). Cross-pathway regulation: Tryptophan-mediated control of histidine and arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **119**: 889-892.
- Carsiotis, M, Jones, R. F y Wesseling, A. C. (1974). Cross-pathway regulation: Histidine-mediated control of histidine tryptophan and arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **119**: 893-898.

- Case, M.E., Schweizer, M., Kushner y Giles, N.H. (1979). Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 5259-5263.
- Clarke, L. y Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *Escherichia coli* genome. Cell **9**: 91-
- Clutterbuck, J., Gems, D. y Robertson, S. (1994). The ARp1 *Aspergillus* replicating plasmid. En "The genus *Aspergillus*. From Taxonomy and genetics to industrial application." (Powell, K.A., Renwick, A. y Peberdy, J.F. eds.). Plenum Press. New York. pp. 189-195.
- Cole, G.E., McCabe, P.C., Inlow, D., Gelfand, D.H., Ben-Bassat, A. e Innis, M.A. (1988). Stable expression of *Aspergillus awamori* glucoamylase in distiller's yeast. Bio/technology **6**: 417-421.
- Collins, R.A., Stohl, L.L., Cole, M.D. y Lambowitz, A.M. (1981). Characterization of a novel plasmid DNA found in mitochondria of *N. crassa*. Cell **24**: 443-452.
- Contreras, R., Carrez, D., Kinghorn, J.R., van den Hondel, C.A.M.J.J. y Fiers, W. (1991). Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. Bio/technology **9**: 378-381.
- Coutinho, P.M. y Reilly, P.J. (1994a). Structure-function relationships in the catalytic and starch binding domains of glucoamylase. Protein Eng. **7**: 393-400.
- Coutinho, P.M. y Reilly, P.J. (1994b). Structural similarities by hydrophobic cluster analysis. Protein Eng. **7**: 749-760.
- Cubero, B. y Scazzocchio, C. (1994). Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. EMBO J. **13**: 407-415.
- Cullen, D., Leong, S.A., Wilson, L.J. y Henner, D.J. (1987a). Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, *hph*. Gene **57**: 21-26.
- Cullen, D., Wilson, L.J., Grey, G.L., Henner, D.J., Turner, G. y Ballance, D.J. (1987b). Sequence and centromere proximal location of a transformation enhancing fragment from *Aspergillus nidulans*. Nucleic Acids Res. **15**: 9163-9175.
- Chakraborty, B.N. y Kapoor, M. (1990). Transformation of filamentous fungi by electroporation. Nucleic Acids Res. **18**: 6737.
- Chattopadhyay, S. y Das, A. (1990). Production of L-DOPA by *Aspergillus terreus*. FEMS Microbiol. Lett. **72**: 195-200.
- Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S.B., Hjortshoej, K., Thim, L. y Hansen, M.T. (1988). High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. Bio/technology **6**: 1419-1422.
- Chumley, F.G., Parsons, K.A. y Valent, B. (1985). Transformation and gene cloning in *Magnaphorthe grisea*. J.Cell. Biochem. Suppl. **9c**: 197.
- Daboussi, M.J., Djeballi, A., Gerlinger, C., Blaiseau, P.L., Bouvier, I., Cassan, M., Lebrun, M.H., Parisot, D. y Brygoo, Y. (1989). Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. Curr. Genet. **15**: 453-456.
- Daniell, H., Vivekananda, J., Nielsen, B.L., Ye, G.N., Tewari, K.K. y Sanford, J.C. (1990). Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 88-92.
- Davis, D. (1985). Factors influencing fungal protoplasts isolation. En "Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics. (Peberdy, J.F. y Ferenczy, L. eds.). Marcel Dekker, Inc. Basel. pp. 45-71.
- Davis, R.H. (1986). Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccaromyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. **50**: 280-313.

- de Moraes, L.P.M., Astolfi-filho, S. y Oliver, S.G. (1995). Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs that express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 1067-1076.
- de Ruiter-Jacobs Y.M.J.T., Broekhuijsen, M., Unkles, S.E., Campbell, E.I., Kinghorn, J.R., Contreras, R., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1989). A gene transfer system based on the homologous *pyrG* gene and efficient expression of bacterial genes in *Aspergillus oryzae*. *Curr. Genet.* **16**: 159-163.
- de Vries, H., de Jonge, J.C., van't Sant, P., Agsterribbe, E. y Amberg, A. (1981). A "stopper" mutant of *Neurospora crassa* containing two populations of aberrant mitochondrial DNA. *Curr. Genet.* **3**: 205-211.
- Dhawale, S.S., Paietta, J.V. y Marzluf, G.A. (1984). A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. *Curr. Genet.* **8**: 77-79.
- Díez, B., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L. y Martín J.F. (1987). Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **12**: 277-282.
- Dowzer, C.E.A. y Kelly, J.M. (1991). Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5701-5709.
- Durand, N., Reymond, P. y Fèvre, M. (1991). Transformation of *Penicillium roqueforti* to phleomycin- and to hygromycin B-resistance. *Curr. Genet.* **19**: 149-153.
- Dunne, P.W. y Oakley, B.R. (1988). Mitotic gene conversion, reciprocal recombination and gene replacement at the *benA*, beta-tubulin, locus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **213**: 339-345.
- Ebbole, D.J., Paluh, J.L., Plamann, M., Sachs, M.S. y Yanofsky, C. (1991). *cpc-1*, the general regulatory gene for genes of amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*, is differentially expressed during the asexual life cycle. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 928-934.
- Fagerström, R., Vainio, A., Suoranta, K., Pakula, T., Kalkkinen, N. y Torkkeli, H. (1990). Comparison of two glucoamylases from *Hormoconis resinae*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 913-920.
- Feinberg, A.P. y Volgestein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **132**: 6-13.
- Feinberg, A.P. y Volgestein, B. (1984). Addendum. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**: 266-267.
- Ferraz, E., Lima, N. y Mota, M. (1996). Mutagenesis and transformation of *Aspergillus terreus* based on the nitrate reductase pathway. Abstracts of European Conference on fungal genetics. p. 63
- Fernández-Espinar, M.T., Ramón, D., Piñaga, F. y Vallés, S. (1992). Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 91-96.
- Fiedler, S. y Wirth, R. (1988). Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.* **170**: 38-44.
- Fincham, J.R.S. (1989). Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* **53**: 148-170.
- Finkelstein, D.B., Rarnbosek, J., Crawford, M.S., Soliday, C.L., McAda, P.C. y Leach, J. (1989). Protein secretion in *Aspergillus niger*. En "Genetics and molecular biology of industrial microorganisms". (Hershberger, C.L., Queener, S.W. y Hegeman, G. H. eds) ASM Washington. pp. 295-300.
- Flint, H.J. y Kemp, B.F. (1981). General control of arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **124**: 129-140.
- Flint, H.J. y Wilkening, J. (1986). Cloning of the *arg-12* gene of *Neurospora crassa* and regulation of its transcript

- via cross-pathway amino acid control. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 110-116.
- Fowler, T., Berka, R.M. y Ward, M. (1990). Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.* **18**: 537-545.
- Fox, T.D., Sanford, J.C. y McMullin, T.W. (1988). Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7288-7292.
- Frandsen, T.B., Christensen, T., Stoffer, B., Lehmbeck, J., Dupont, C., Honzatko, R.B. y Svensson, B. (1995). Mutational analysis of the roles in catalysis and substrate recognition of arginines 54 and 305, aspartic acid 309, and tryptophan 317 located at subsites 1 and 2 in glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* **34**: 10162-10169.
- Frohman, M.A. (1990). RACE: Rapid amplification of cDNA ends. En "PCR protocols: A guide to methods and applications". Ed. Academic Press. San Diego, California. pp. 28-38.
- Fukuda, K., Teramoto, Y. y Hayashida, S. (1992). The hyperdigestion of raw starch by a carbohydrate-rich glucoamylase from a protease- and glycosidase-negative mutant of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* F-2035. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 8-12.
- Fungaro, M.H.P., Rech, E., Muhlen, G.S., Vainstein, M.H., Pascon, R.C., de Queiroz, M.V., Pizzirani-Kleiner, A.A. y de Azevedo, J.L. (1995). Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**: 293-298.
- García-España, A., Carbonell, J. y Rubio, V. (1989). Carbamoyl phosphate synthetase, ornithine transcarbamylase, and aspartate transcarbamylase activities in the pea ovary. *Plant Physiol.* **90**: 1565-1569.
- García-Pedrajas, M.D. y Roncero, M.I.G. (1996). A homologous and self-replicating system for efficient transformation of *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **29**: 191-198.
- Gascon, S. y Lampen, J.O. (1968). Purification of the internal invertase of yeast. *J. Biol. Chem.* **243**: 1573-1577.
- Gavel, Y. y von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and nonglycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**: 433-442.
- Gems, D., Aleksenko, A., Belenky, L., Robertson, S., Ramsden, M., Vinetski, Y. y Clutterbuck, A.J. (1994). An "instant gene bank" method for gene cloning by mutant complementation. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 467-471.
- Gems, D.H. y Clutterbuck, A.J. (1993). Co-transformation with autonomously-replicating plasmids facilitates gene cloning from an *Aspergillus nidulans* gene library. *Curr. Genet.* **24**: 520-524.
- Gems, D.H., Johnstone, I.L. y Clutterbuck, A.J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* **98**: 61-67.
- Genetics Computer Group. (1994). Program manual for GCG package, version 8. Madison, WI, USA.
- Ghosh, A., Chatterjee, B. y Das, A. (1990a). Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1307-1311.
- Ghosh, A., Chatterjee, B. y Das, A. (1990b). Characterization of glucoamylase from *Aspergillus terreus* 4. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 345-350.
- Ghosh, A., Chatterjee, B. y Das, A. (1991a). Production of glucoamylase by 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Aspergillus terreus* 4. *Biotechnol. Lett.* (1991). **13**: 515-520.
- Ghosh, A., Chatterjee, B. y Das, A. (1991b) Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. *J. Appl. Bacteriol.* **71**: 162-169.
- Goc, A. y Weglenski, P. (1988). Regulatory region of the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Curr. Genet.* **14**: 425-429.

- Goldman, G.H., Van Montagu, M. y Herrera-Estrella, A. (1990). Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr. Genet.* **17**: 169-174.
- Gomi, K., Iimura, Y. y Hara, S. (1987). Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2549-2555.
- González, R., Ferrer, S., Buesa, J. y Ramón, D. (1989). Transformation of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* to hygromycin B resistance. *Infect. Immun.* **57**: 2923-2925.
- González, A., Jiménez, A., Vázquez, D., Davies, J.E. y Schindler, D. (1978). Studies on the mode of action of Hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **521**: 459-469.
- González, R. y Ramón, D. (1990). La transformación genética de los hongos filamentosos. *Rev. Iberoamer. Micol.* **7**: 43-49.
- González, R., Ramón, D. y Pérez-González, J.A. (1992). Cloning, sequence analysis and yeast expression of the *egl1* gene from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 370-375.
- Gordon-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G., O'Brien, J.V., Chambers, S.A., Adams, W.R., Willetts, N.G., Rice, T.B., Mackey, C.J., Krueger, R.W., Kausch, A.P. y Lemaux, P.G. (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* **2**: 603-618.
- Goto, M., Kuwano, E., Kanlayakrit, W. y Hayashida, S. (1995). Role of the carbohydrate moiety of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* in the digestion of raw starch. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 16-20.
- Goto, M., Semimaru, T., Furukawa, K. y Hayashida, S. (1994a). Analysis of the raw starch-binding domain by mutation of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3926-3930.
- Goto, M., Tanigawa, K., Kanlayakrit, W. y Hayashida, S. (1994b). The mechanism of binding of glucoamylase I from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* to cyclodextrins and raw starch. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 49-54.
- Gouka, R.J., van Hartingsveldt, W., Bovenberg, R.A.L., van den Hondel, C.A.M.J.J. y van Gorcom, R.F.M. (1991). Cloning of the nitrate-nitrite reductase gene cluster of *Penicillium chrysogenum* and use of the *niaD* gene as a homologous selection marker. *J. Biotechnol.* **20**: 189-200.
- Grant, D.M., Lambowitz, A.M., Rambosek, J.A. y Kinsey, J.A. (1984). Transformation of *Neurospora* with recombinant plasmids containing the cloned glutamate dehydrogenase (*am*) gene. Evidence for autonomous replication. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2041-2051.
- Griffiths, A.J.F. (1995). Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiol. Rev.* **59**: 673-685.
- Gritz, L. y Davies, J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**: 179-188.
- Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C.P. y de Graaf, L.H. (1990). Cloning of the *Trichoderma reesei pyrG* gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. *Curr. Genet.* **18**: 447-451.
- Gunnarsson, A.B., Nilsson, B. y Svensson, S. (1984). Structural studies on the O-glycosidically linked carbohydrate chains of glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* **145**: 463-467.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E. y Kinghorn, J.R. (1987). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. En "Gene structure in eukaryotic microbes". (Kinghorn, J.R. ed.) IRL Press. Oxford. pp. 93-139.
- Gwynne, D.I., Buxton, F.P., Williams, S.A., Garven, S. y Davies, R. W. (1987). Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*. *Bio/technology.* **5**: 713-719.

- Haas, M.J. y Dowding, J.E. (1975). Aminoglycoside-modifying enzymes. *Meth. Enzymol.* **43**: 611-628.
- Hahn, Y.T. y Batt, C. (1988). Genetic transformation of an *argB* mutant of *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1610-1611.
- Hamlyn, P.F., Bradshaw, R.E., Mellon, F.M., Santiago, C.M., Wilson, J.M. y Peberdy, J.F. (1981). Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 321-325.
- Hammond, J.R.M. (1995). Genetically-modified brewing yeast for the 21st century. *Progres to date. Yeast* **11**: 1613-1627
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Harris, E.M.S., Aleshin, E.M., Firsov, M.F. y Honzatko, R.B. (1993). Refined structure for the complex of 1-deoxynojirimycin with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var X100 to 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **32**: 1618-1626.
- Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, Y. y Kimura, A. (1985). A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 336-339.
- Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C. y Tamura, G. (1992). Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus oryzae glaA* gene encoding glucoamylase. *Curr. Genet.* **22**: 85-91.
- Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G. y Hara, S. (1991). The glucoamylase cDNA from *Aspergillus oryzae*: its cloning, nucleotide sequence, and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 941-949.
- Hayashida, S., Kuroda, K., Ohta, K., Kuhuara, S., Fukuda, K. y Sakaki, Y. (1989). Molecular cloning of the glucoamylase I gene of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* for localizaton of the raw-starch-affinity site. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 923-929.
- Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**: 351-359.
- Hilber, U.W., Bodmer, M., Smith, F.D. y Köller, W. (1994). Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*. *Curr. Genet.* **25**: 124-127.
- Hinnebusch, A.G. (1988). Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 248-273.
- Hinnen, A. (1985). Some aspects of yeast transformation. En "Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics." (Peberdy, J.F. y Ferenczy, L. eds.). Marcel Dekker, Inc. Basel. pp. 323-335.
- Hinnen, A., Hicks, J.B. y Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast chimaeric ColE1 plasmid carrying *LEU2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1929-1933.
- Hirota, A., Nakagawa, M., Sakai, H. e Isogai, A. (1984). Terrecyclic acid A, a new antibiotic from *Aspergillus terreus*. ¹³C NMR spectrum of terrecyclic acid A. *J. Antibiot.* **37**: 475-478.
- Hornig, J.S., Chang, P.-K., Pestka, J.J. y Linz, J.E. (1990). Development of a homologous transformation system for *Aspergillus parasiticus* with the gene encoding nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 294-296.
- Houghton, J.E., Bencini, D.A., O'Donovan, G.A. y Wild, J.R. (1984). Protein differentiation: A comparison of aspartate transcarbamoylase and ornithine transcarbamoylase from *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4864-4868.
- Huang, K., Fujii, I., Ebizuka, Y., Gomi, K. y Sankawa, U. (1995). Molecular cloning and heterologous expression of the gene encoding dihydrogeodin oxidase, a multicopper blue enzyme from *Aspergillus terreus*. *J. Biol. Chem.* **270**: 21495-21502.
- Hull, E.P., Green, P.M., Arst, H.N. y Scazzochio, C. (1989). Cloning and phisical characterization of the L-proline

- catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **3**: 553-559.
- Huygen, R., Crabeel, M. y Glandsdorff, N. (1987). Nucleotide sequence of the *ARG3* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encoding ornithine carbamoyltransferase. Comparison with other carbamoyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **166**: 371-377.
- Hynes, M.J. y Davis, M.A. (1986). The *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*: control by multiple regulatory signals. *BioEssays* **5**: 123-128.
- Imura, Y., Gotoh, K., Ouchi, K. y Nishima, T. (1983). Transformation of yeast without the spheroplasting process. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 897-901.
- Inlow, D., McRae, J. y Ben-Bassat, A. (1988). Fermentation of corn starch to ethanol with genetically engineered yeast. *Biotech. Bioeng.* **32**: 227-234.
- Innis, M.A., Holland, M.J., McCabe, P.C., Cole, G.E., Wittman, V.P., Tal, R., Watt, K.W.K., Gelfand, D.H., Holland, J.P. y Meade, J.H. (1985). Expression, glycosilation, and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **228**: 21-26.
- Ito, H., Kukuda, K., Murata, K. y Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Itoh, T., Ohtsuki, I., Yamashita, I. y Fukui, S. (1987). Nucleotide sequence of the glucoamylase gene *GLU1* in the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *J. Bacteriol.* **169**: 4171-4176.
- Jaklitsch, W.M., Kubicek, C.P. y Scrutton, M.C. (1991). The subcellular organization of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 533-539.
- Jamet-Vierny, C., Begel, O. y Belc ur, L. (1980). Senescence in *Podospora anserina*: amplification of a mitochondrial DNA sequence. *Cell* **21**: 189-194.
- Jeenes, D.J., Marczinke, B., MacKenzie, D.A. y Archer, D.B. (1993). A truncated glucoamylase gene fusion for heterologous protein secretion from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**: 267-272.
- John, M.A. y Peberdy, J.F. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* using the *argB* gene. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 386-389.
- Johnston, S.A., Anziano, P.Q., Shark, K., Sanford, J.C. y Butow, R.A. (1988). Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* **240**: 1538-1541.
- Johnstone, I.L. (1985). Transformation of *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Sci.* **2**: 307-311.
- Johnstone I.L., Hughes, S.G. y Clutterbuck, A.J. (1985). Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* **4**: 1307-1311.
- Joutsjoki, V.V. y Torkkeli, T.K. (1992). Glucoamylase P gene of *Hormoconis resinae*: molecular cloning, sequencing and introduction into *Trichoderma resei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**: 237-244.
- Kanno, T. (1988). Application of amylases and related enzymes to industry. En "Handbook of amylases and related enzymes". (The amylase research society of Japan ed.). Pergamon Press. pp. 198-203.
- Karube, I., Tamiya, E. y Matusoka, H. (1985). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. *FEBS Lett.* **182**: 90-94.
- Kaster, K.R., Burgett, S.G. e Ingolia, D. (1984). Hygromycin B resistance as a dominant selectable marker in yeast. *Curr. Genet.* **8**: 353-358.
- Kaster, K.R., Burgett, S.G., Rao, R.N. e Ingolia, T.D. (1983). Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **11**: 6895-6911.
- Kelly, J.M. y Hynes, M.J. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **4**: 475-479.

- Kennedy, J., Cabalda, V.M. y White, C.A. (1988). Enzymic starch utilization and genetic engineering. *Trends Biotechnol.* **6**: 184-189.
- Kimura, M., Kamakura, T., Tao, Q.Z., Kaneko, I. y Yamaguchi, I. (1994). Cloning of the blasticidin S deaminase gene (*BSD*) from *Aspergillus terreus* and its use as selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 121-129.
- Kinsey, J.A. (1985). *Neurospora* plasmids. En "Gene manipulations in fungi." (Bennett, J.W. y Lasure, L.L. eds.). Academic Press, Inc. Orlando, Florida. pp. 245-258.
- Klein, C. y Schulz, G.E. (1991). Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217**: 737-750.
- Klein, T.M., Fromm, M.E., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. y Sanford, J.C. (1988a). Transfer of foreign genes into intact maize cells using high velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4305-4309.
- Klein, T.M., Harper, E.C., Svab, Z., Sanford, J.C., Fromm, M.E. y Maliga, P. (1988b). Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8502-8505.
- Kraus, J.P., Hodges, P.E., Williamson, C.L., Horwich, A.L., Kalousek, F., Williams, K.R. y Rosenberg, L.E. (1985). A cDNA clone for the precursor of rat mitochondrial ornithine transcarbamylase: comparison rat and human leader sequences and conservation of catalytic sites. *Nucleic Acids Res.* **13**: 943-952.
- Kuiper, M.T.R. y de Vries, H. (1985). A recombinant plasmid carrying the mitochondrial plasmid sequence of *Neurospora intermedia* LaBelle yields new plasmid derivatives in *Neurospora crassa* transformants. *Curr. Genet.* **9**: 471-477.
- Lazarus, C.M. y Küntzel, H. (1981). Anatomy of amplified mitochondrial DNA in "ragged" mutants of *Aspergillus amstelodami*: excision points within protein genes and a common 215 bp segment containing a possible origin of replication. *Curr. Genet.* **4**: 99-107.
- Leboul, J. y Davies, J. (1982). Enzymatic modification of hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.* **35**: 527-528.
- Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A. y Harman, G.E. (1993). Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr. Genet.* **24**: 349-356.
- Maas, C. y Werr, W. (1989). Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts. *Plant Cell Reports* **8**: 148-151.
- MacCabe, A.P., Fernández-Espinar, M.T., De Graaf, L.H., Visser, J. y Ramón, D. (1996). Identification, isolation and sequence of the *Aspergillus nidulans xlnC* gene encoding the 34-kDa xylanase. *Gene*. (Aceptado para su publicación).
- Malardier, L., Daboussi, M.J., Julien, J., Roussel, F., Scazzocchio, C. y Brygoo, Y. (1989). Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* **78**: 147-156.
- Malpartida, F., Zalacáin, M., Jiménez, J. y Davies, J. (1983). Molecular cloning and expression in *Streptomyces lividans* of a hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **117**: 6-12.
- Manjunath, P., Shenoy, B.C. y Rao, M.R.R. (1983). Fungal glucoamylases. *J. Appl. Biochem.* **5**: 235-260.
- Mattern, I.E., Unkless, S., Kinghorn, J.R., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1987). Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 460-461.
- May, G.S. (1987). *Aspergillus nidulans* beta-tubulin genes are unusually divergent. *Gene* **55**: 231-243.
- McCabe, D.E., Swain, W. F., Marinell, B.J. y Christou, P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycin max*) by particle bombardment. *Bio/technology* **6**: 923-926.

- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* **101**: 20-78.
- Miller, J.F., Dowder, W.J. y Tompkins, L.S. (1988). High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 856-860.
- Mishra, N.C. y Tatum, E.L. (1973). Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3875-3879.
- Mohr, G. y Esser, K. (1990). Improved transformation frequency and heterologous promoter recognition in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 63-70.
- Nargang, F.E., Bell, J.B., Stohl, L.L. y Lambowitz, A.M. (1983). A family of repetitive palindromic sequences found in *Neurospora* mitochondrial DNA is also found in a mitochondrial plasmid DNA. *J. Biol. Chem.* **258**: 4257-4260.
- Nargang, F.E., Bell, J.B., Stohl, L.L. y Lambowitz, A.M. (1984). The DNA sequence and genetic organization of a *Neurospora* mitochondrial plasmid suggest a relationship to the mitochondrial introns and mobile genetic elements. *Cell* **38**: 441-453.
- Neustroev, K.N., Golubev, A.M., Firsov, L.M., Ibatullin, F.M., Protasevich, I.I. y Makarov, A.A. (1993). Effect of modification of carbohydrate component on properties of glucoamylase. *FEBS Lett.* **316**: 157-160.
- Nigam, P. y Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 770-778.
- Nunberg, J.H., Meade, J.H., Cole, G., Lawyer, F.C., McCabe, P., Schweickart, V., Tal, R., Wittman, V.P., Flatgaard, J.E. y Innis, M.A. (1984). Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol. Cell Biol.* **4**: 2306-2315.
- Oakley, B.R., Rinehart, J.E., Mitchell, B.L., Oakley, C.E., Carmona, C., Gray, G.L. y May, G.S. (1987a). Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **61**: 385-400.
- Oakley, C.E., Weil, C.F., Kretz, P.L. y Oakley, B.R. (1987b). Cloning of the *riboB* locus of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **53**: 293-298.
- Oliver, R.P., Roberts, I.N., Harlig, R., Kenyon, L., Punt, P.J., Dingemans, M.A. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1987). Transformation of *Fulvia fulva*, a fungal pathogen of tomato, to hygromycin B resistance. *Curr. Genet.* **12**: 231-233.
- Orbach, M.J., Porro, E.B. y Yanofsky, C. (1986). Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2452-2461.
- Ozeki, K., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M. y Nunokawa, Y. (1995). A method for the re-isolation of an autonomously replicating plasmid from *Aspergillus* transformants. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**: 1133-1134.
- Ozeki, K., Kyoya, F., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M. y Nunokawa, Y. (1994). Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 2224-2227.
- Paluh, J.L. y Yanofsky, C. (1991). Characterization of *Neurospora* CPC1 a bZIP DNA-binding protein does not require aligned heptad leucines for dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 935-944.
- Paluh, J.L., Orbach, M.J., Legerton, T.L. y Yanofsky, C. (1988). The cross-pathway control gene of *Neurospora crassa*, *cpc-1*, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene *v-jun*-encoded protein. *Biochemistry* **85**: 3728-3732.
- Pardo, J.M., Malpartida, F., Rico, M. y Jiménez, A. (1985). Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygrosopicus* - the producing organism. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1289-1298.

- Parsons, K.A., Chumley, F.G. y Valent, B. (1987). Genetic transformation of the fungal pathogen responsible for rice blast disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 4161-4165.
- Peng, M., Lemke, P.A. y Singh, N.K. (1993). A nucleotide sequence involved in replicative transformation of a filamentous fungus. *Curr. Genet.* **24**: 114-121.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. y Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**: 155-164.
- Peñalva, M.A., Touriño, A., Patiño, C., Sánchez, F., Fernández, J.M. y Rubio, V. (1985). Studies on transformation of *Cephalosporium acremonium*. En "Molecular genetics of filamentous fungi." (Timberlake, W.E. ed.). Alan R. Liss. New York. pp. 59-68.
- Pérez-González, J.A., de Graaf, L.H., Visser, J. y Ramón, D. (1996). Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2179-2182.
- Picknett, T.M., Saunders, G., Ford, P. y Holt, G. (1987). Development of a gene transfer system for *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **12**: 449-455.
- Piotrowska, M. (1980). Cross-pathway regulation of ornithine carbamoyltransferase synthesis in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **116**: 335-339.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.H., Macdonald, K.D. y Bufton, A.W.J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genetics* **6**: 141-238.
- Powell, W.A. y Kistler, H.C. (1990). In vivo rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *J. Bacteriol.* **172**: 3163-3171.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**: 117-124.
- Queener, S.W., Ingolia, T.D., Skatrud, P.L., Chapman, J.L. y Kaster, K.L. (1985). A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. En "Microbiology-1985". (Schlessinger, O.C. ed.) ASM. Washington. pp. 468-472.
- Radford, A.S., Pope, S., Sazci, A., Fraser, M.J. y Parish, J.H. (1981). Liposome-mediated genetic transformation of *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 567-569.
- Rambosek, J. y Leach, J. (1987). Recombinant DNA in filamentous fungi: Progress and prospects. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **6**: 357-393.
- Ramón, D. (1996). Nuevas estrategias en la producción de enzimas fúngicas para las industrias de alimentos. *Rev. Iberoamer. Micol.* **13**: 1-2.
- Randall, T., Reddy, C.A. y Boominathan, K. (1991). A novel extrachromosomally maintained transformation vector for the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **173**: 776-782.
- Rao, R.N., Allen, N.E., Hobbs, J.N., Alborn, W.E., Kirst, H.A. y Paschal, J.W. (1983). Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Ch.* **24**: 689-695.
- Raper, K.B. y Fennell, D.I. (1965). *Aspergillus terreus* group. En "The genus *Aspergillus*". Williams and Wilkins. Baltimore, USA. pp. 567-577.
- Richey, M.G., Marek, E.T., Schardl, C.L. y Smith, D.A. (1989). Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation. *Phytopathology* **79**: 844-847.
- Riggs, C.D. y Bates, G.W. (1986). Stable transformation of tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5602-5606.
- Roberts, I.N., Jeenes, D.J., MacKenzie, D.A., Wilkinson, A.P., Sumner, I.G. y Archer, D.B. (1992). Heterologous gene expression in *Aspergillus niger*. A glucoamylase-porcine pancreatic phospholipase A₂ fusion protein is

- secreted and processed to yield mature enzyme. *Gene* **122**: 155-161.
- Roncero, M.I.G., Jepsen, L.P., Stroman, P. y van Heeswijck, R. (1989). Characterization of a *leuA* gene and an *ARS* element from *Mucor circinelloides*. **84**: 335-343.
- Sakaguchi, M., Takagi, M., Horiuchi, H. y Gomi, K. (1992). Fungal enzymes used in oriental food and beverage industries. En "Applied molecular genetics of filamentous fungi". (Kinghorn, J.R. y Turner, G. eds.). Blackie Academic & Professional. Londres. pp. 54-99.
- Samac, D.A. y Leong, S.A. (1989). Characterization of the termini of linear plasmids from *Nectria haematococca* and their use in construction of an autonomously replicating transformation vector. *Curr. Genet.* **16**: 187-194.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Fernández, R., Unkles, S.E., Cambell, E.I., Macro, J.A., Cerdá-Olmedo, E. y Kinghorn, J.R. (1991). Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 231-233.
- Sánchez-Torres, P., González, R., Pérez-González, J.A., González-Candelas, L. y Ramón, D. (1994). Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *egl1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 440-446.
- Sanford J.C. (1990). The biolistic process, an emerging tool for research and clinical applications. En "Proceedings of the Biomedical Engineering Society". (Milulecky, D.C. y Clarke, A.M. eds.). New York University Press, N.Y. pp. 89-98.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. y Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. Technol.* **5**: 27-37.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Santos, T. (1983). Recombinación genética en bacterias: transformación y transducción. En "Temas de Microbiología" (T. González y A. Chordi eds.) I.C.E. Univ. Salamanca. Salamanca.
- Saunders, G., Tuite, M.F. y Holt, G. (1986). Fungal cloning vectors. *Trends Biotechnol.* **4**: 93-98.
- Semimaru, T., Goto, M., Furukawa, K. y Hayashida, S. (1995). Functional analysis of the threonine- and serine-rich Gp-I domain of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2885-2890.
- Shark, K.B., Smith, F.D., Harpending, P.R., Rasmussen, J.L. y Sanford, J.C. (1991). Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 480-485.
- Shenoy, B.C., Rao, A.G.A. y Rao, M.R.R. (1984). Structure and stability of glucoamylase II (EC 3.2.1.3.) from *Aspergillus niger*. A circular dichroism study. *J. Biosci.* **6**: 601-612.
- Sherman, F., Flink, G.R. y Hicks, J.B. (1986). Isolation and characterization of auxotrophic, temperature-sensitive and UV-sensitive mutants. En "Laboratory course manual for methods in yeast genetics". Cold Spring Harbor Laboratory. New York. pp 9-11.
- Shibuya, I., Gomi, K., Iimura, Y., Takahashi, K., Tamura, G. y Hara, S. (1990). Molecular cloning of the glucoamylase gene of *Aspergillus shirousamii* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1905-1914.
- Shibuya, I., Tamura, G., Ishikawa, T. y Hara, S. (1992a). Cloning of the α -amylase cDNA of *Aspergillus shirousamii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 174-179.
- Shibuya, I., Tamura, G., Shima, H., Ishikawa, T. y Hara, S. (1992b). Construction of an α -amylase/glucoamylase

- fusion gene and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem. **56**: 884-889.
- Shoubochkina, E.A. y Fodor, I.I. (1988). Cosmids carrying *Aspergillus terreus* DNA can integrate into *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII via recombination between yeast and foreign DNAs. Curr. Genet. **14**: 183-189.
- Sierks, M.R., Ford, C., Reilly, P.J. y Svensson, B. (1989). Site-directed mutagenesis at the active site Trp₁₂₀ of *Aspergillus awamori* glucoamylase. Protein Eng. **2**: 621-625.
- Sierks, M.R., Ford, C., Reilly, P.J. y Svensson, B. (1990). Catalytic mechanism of fungal glucoamylase as defined by mutagenesis of Asp₁₇₆, Glu₁₇₉ y Glu₁₈₀. Protein Eng. **3**: 193-198.
- Singh, A., Ursic, D. y Davies, J. (1979). Phenotypic suppression and misreading in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature **277**: 146-148.
- Skrzypek, M., Borsuk, P. y Maleszka, R. (1990). Cloning and sequencing of ornithine carbamoyltransferase gene from *Pachysolen tannophilus*. Yeast **6**: 141-148.
- Spiro, R.G. (1966). Analysis of sugars found in glycoproteins. Meth. Enzymol. **8**: 3-26.
- Stahl, U., Lemke, P.A., Tudzynski, P., Kück, U. y Esser, K. (1978). Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospira anserina*. Mol. Gen. Genet. **162**: 341-343.
- Stinchomb, D.T., Thomas, M., Kelly, J., Selker, E. y Davis, R.W. (1980). Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 4559.
- Stoffer, B., Aleshin, A.E., Firsov, L.M., Svensson, B. y Honzatko. (1995). Refined structure for the complex of D-gluco-dihydroacarbose with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var X100 to 2.2 Å resolution: dual conformations for extended inhibitors bound to the active site of glucoamylase. FEBS Lett. **358**: 57-61.
- Stohl, L.L., Akins, R.A. y Lambowitz, A.M. (1984). Characterization of deletion derivatives of an autonomous replicating *Neurospora* plasmid. Nucleic Acids Res. **12**: 6169-6178.
- Stohl, L.L., Collins, R.A., Cole, M.D. y Lambowitz, A.M. (1982). Characterization of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild-type *Neurospora intermedia* strains. Nucleic Acids Res. **10**: 1439-1458.
- Stohl, L.L., Grant, D.M., Lambowitz, A.M., Bell, J.B. y Nargang, F.E. (1983). DNA sequence analysis of two *Neurospora* mitochondrial plasmids. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. **42**: 1972.
- Stohl, L.L. y Lambowitz, A.M. (1983). Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 1058-1062.
- Stone, P.J., Makoff, A.J., Parish, J.H. y Radford, A. (1993). Cloning and sequence analysis of the glucoamylase gene of *Neurospora crassa*. Curr. Genet. **24**: 205-211.
- Stopper, H., Zimmermann, U. y Wecker, E. (1985). High yields of DNA-transfer into mouse L-cells by electroporation. Z. Naturforsch. **40c**: 929-932.
- Svensson, B., Clarke, A.J. y Svendsen, I. (1986b) Influence of acarbose and maltose on the reactivity of individual tryptophanyl residues in glucoamylase from *Aspergillus niger*. Carlsberg Res. Commun. **51**: 61-73.
- Svensson, B., Larsen, K. y Gunnarsson, A. (1986a). Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. Eur. J. Biochem. **154**: 497-502.
- Swinkels J.J.M. (1985) Sources of starch, its chemistry and physics. En "Starch conversion technology". (van Beynum, G.M.A. y Roels J.A. eds.). Marcel Dekker Inc. N.Y. pp. 15-46.
- Tanaka, A. y Takeda, S. (1995). Random attack as the hydrolytic reaction mode of oligosaccharides by *Rhizopus* glucoamylase. Biosci. Biotech. Biochem. **59**: 1372-1373.

- Tanaka, Y., Ashikari, T., Nakamura, N., Kiuchi, N., Shibano, Y., Amachi, T y Yoshizumi, H. (1986). Glucoamylase produced by *Rhizopus* and by a recombinant yeast containing the *Rhizopus* glucoamylase gene. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1737-1742.
- Thorne, J. (1994). Yeast gets approval. *Microbiol. Eur.* **2**: 6.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G. Zabicky-Zissima, J.H., Lockington, R.A. y Davies, R.W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205-221.
- Timberlake, W.E. (1978). Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. *Science* **202**: 973-974.
- Tsuchiya, K., Nagashima, T., Yamamoto, Y., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C. y Tamura, G. (1994). High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase-prochymosin fusion gene in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 895-899.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. y Holloman, W.K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3703-3709.
- Turgeon, B.G., Garber, R.C. y Yoder, O.C. (1987). Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3297-3305.
- Unkles, S.E. (1992). Gene organization in industrial filamentous fungi. En "Applied molecular genetics of filamentous fungi". (Kinghorn, J.R. y Turner, G. eds.) Blackie Academic & Professional. pp 28-53.
- Unkles, S.E., Campbell, E.I., Carrez, D., Grieve, C., Contreras, R., Fiers, W., van den Hondel, C.A.M.J.J. y Kinghorn, J.R. (1989a). Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. *Gene* **78**: 157-166.
- Unkles, S.E., Campbell, E.I., de Ruiter-Jacobs, Y.M.J.T., Broekhuijsen, M., Macro, J.A., Carrez, D., Contreras, R., van den Hondel, C.A.M.J.J. y Kinghorn, J.R. (1989b). The development of a homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on the nitrate assimilation pathway: A convenient and general selection system for filamentous fungal transformation. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 99-104.
- Upshall, A. (1986). Genetic and molecular characterization of *argB*⁺ transformants of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **10**: 593-599.
- Upshall, A., Gilbert, T., Saari, G., O'Hara, P.J., Weglenski, P., Berse, B., Miller, K. y Timberlake, W.E. (1986). Molecular analysis of the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 349-354.
- Vainio, A.E.I., Lantto, R., Parkkinen, E.E.M. y Torkkeli, H.T. (1994). Production of *Hormoconis resinae* glucoamylase P by a stable industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 53-57.
- Vainio, A.E.I., Torkkeli, H.T., Tuusa, T., Aho, S.A., Fagerström, B.R. y Korhola, M.P. (1993). Cloning and expression of *Hormoconis resinae* glucoamylase P cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **24**: 38-44.
- van den Elzen, P.J.M., Townsend, J., Lee, K.T. y Bedbrook, J.R. (1985). A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **5**: 299-302.
- van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. y van Gorcom, R.F.M. (1991). Heterologous gene expression in filamentous fungi. En "More gene manipulations in fungi". (Bennet, J.W. y Lasure, L.L. eds). Academic Press. London. pp. 396-428.
- van Gorcom, R.F.M., Punt, P.J. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1994). Heterologous gene expression in *Aspergillus*. En "The genus *Aspergillus*". (Powell, K.A., Renwick, A. y Peberdy, J.F. eds.). Plenum Press. New York. pp. 241-250.
- van Heeswijk, R. (1986). Autonomous replication of plasmids in *Mucor* transformants. *Carlsberg Res Commun.* **51**: 433-443.

- van Heeswijk, R., Ristevski, S., Hynes, M. y Hoogenraad, N. (1990). Complementation of the *Aspergillus nidulans argB1* mutation by ornithine transcarbamylase cDNA from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 1280-1284.
- Verdoes, J.C., Punt, P.J., Schrickx, J.M., van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1993). Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*. Molecular genetic analysis of strains containing multiples copies of the *glaA* gene. *Transgenic Res.* **2**: 84-92.
- Verdoes, J.C., Punt, P.J., Stouthamer, A.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1994). The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene. *Gene* **145**: 179-187.
- Viebrock, A., Perz, A. y Sebald, W. (1982). The imported pre-protein of the proteolipid subunit of the mitochondrial ATP synthase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and sequencing of the mRNA. *EMBO J.* **1**:565-571.
- Waldron, C., Murphy, E.B., Roberts, J.L., Gustafson, G.D., Armour, S.L. y Malcom, S.K. (1985). Resistance to hygromycin B. *Plant Mol. Biol.* **5**: 103-108.
- Wang, H.L. (1988). Induction and catabolite repression of glucoamylase formation in *Rhizopus chinensis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **10**: 191-200.
- Wang, J., Holden, D.H. y Leong, S.A. (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 865-869.
- Ward, M. y Turner G. (1986). The ATP synthase subunit 9 gene of *Aspergillus nidulans*: sequence and transcription. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 331-338.
- Ward, M., Wilkinson, B. y Turner, G. (1986). Transformation of *Aspergillus nidulans* with a cloned, oligomycin-resistant ATP synthase subunit 9 gene. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 265-270.
- Ward, M., Wilson, L.J., Kodama, K.H., Rey, M.W. y Berka, R.M. (1990). Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Bio/technology.* **8**: 435-440.
- Weiss, R.L., Puetz, D. y Cybis, J. (1985) Expression of *Aspergillus* genes in *Neurospora*. En "Gene manipulations in fungi." (Bennet, J.W. y Lasure, L.L. eds.) Academic Press, Inc. Orlando, Florida. pp 279-292.
- White, W.L., Darby, R.T., Stechert, G.M. y Sanderson, K. (1948). Assays of cellulolytic activity of molds isolated from fabrics and related items exposed in the tropics. *Mycologia* **40**: 34-84.
- Whitehead, M.P., Gurr, S.J., Grieve, C., Unkles, S.E., Spence, D., Ramsden, M. y Kinghorn, J.R. (1990). Homologous transformation of *Cephalosporium acremonium* with the nitrate reductase-encoding gene (*niaD*). *Gene* **90**: 193-198.
- Whitehead, M.P., Unkles, S.E., Ramsden, M., Campbell, E.I., Gurr, S.J., Spence, D., van den Hondel, C.A.M.J.J., Contreras, R. y Kinghorn, J.R. (1989). Transformation of a nitrate reductase deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* with the corresponding *Aspergillus niger* and *A. nidulans niaD* genes. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 408-411.
- Williams, R.S., Johnston, S.A., Reidy, M., deVit, M.J., McElligot, S.G. y Sanford, J.C. (1991). Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**. 2726-2730.
- Williamson, G., Belshaw, N. y Williamson, M.P. (1992a). O-glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase. Conformation and role in binding. *Biochem J.* **282**: 423-428.
- Williamson, G., Belshaw, N., Noel, T.R., Ring, S.G. y Williamson, M.P. (1992b). O-glycosylation and stability. Unfolding of glucoamylase induced by heat and guanidine hydrochloride. *Eur. J. Biochem.* **207**: 661-670.

Wendt, S., Jacobs, M. y Stahl, U. (1990). Transformation of *Aspergillus giganteus* to hygromycin B resistance. *Curr. Genet* **17**: 21-24.

Yamashita, I. (1989). The threonine- and serine-rich tract of the secretory glucoamylase can direct β -galactosidase to the cell envelope. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 483-490.

Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B. y McCabe, D. (1990). *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9568-9572.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-110.

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

Zalacain, M., González, A., Guerrero, M.C., Mattaliano, R.J., Malpartida, F. y Jiménez, A. (1986). Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *Nucl. Acids Res.* **14**: 1565-1581.

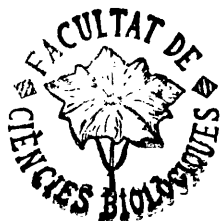
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de D. Cuixa Ventura Montoliu la calificación de Apto con laurea por unanimidad Valencia, a 19 de Julio de 1996

El Secretario,

El Presidente



A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the Tribunal.

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the Secretary of the Tribunal.

