



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 341 618**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/37 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05803795 .3**

(96) Fecha de presentación : **10.11.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1809659**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

(54)

Título: **Desactivación génica del factor de transcripción PntR y sus utilizaciones.**

(30)

Prioridad: **11.11.2004 GB 0424940**

(73)

Titular/es: **DANISCO A/S**
Langebrogade 1, P.O. Box 17
1001 Copenhagen K., DK

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.06.2010

(72)

Inventor/es: **Nikolaev, Igor y**
Madrid, Susan, Mampusti

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.06.2010

(74)

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 341 618 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Desactivación génica del factor de transcripción PntR y sus utilizaciones.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a constructos de ácido nucleico dispuestos para reducir la expresión o la función del factor de transcripción regulador de la pentosa (PntR); en los que dichos constructos de ácido nucleico comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un PntR funcionalmente alterado, y en los que dichos constructos de ácido nucleico comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica al PntR y que carece de la región que codifica a Zn_2Cys_6 .

La invención se refiere asimismo a plásmidos, vectores y células hospedadoras, que comprenden los constructos de ácido nucleico; y a los procedimientos de producción.

Además, la invención se refiere a los procedimientos que conllevan la reducción de la producción o a la función del factor de transcripción PntR y a las células hospedadoras útiles para la expresión y producción de proteínas de interés, en los que se ha reducido la producción o función del factor de transcripción PntR.

20 **Antecedentes de la técnica y técnica anterior**

Los hongos filamentosos son conocidos por su capacidad para producir una extensa gama de diferentes metabolitos y, en particular, enzimas segregadas con varias aplicaciones industriales que incluyen el abastecimiento de productos terapéuticos o para su utilización en la industria de la panificación.

Antes del desarrollo de los sistemas de transformación de hongos, la mejora de las cepas de producción se limitó en gran medida a una estrategia basada en la mutagénesis clásica seguida del cribado de un fenotipo o a la actividad enzimática deseada y la selección de la mejor cepa productora.

Comercialmente, los hongos filamentosos han llegado a utilizarse actualmente ampliamente como sistemas de células hospedadoras para la producción tanto de proteínas homólogas como heterólogas y hasta la fecha, varias estrategias moleculares y genéticas se han aplicado con éxito para optimizar hongos filamentosos, en particular los del género *Aspergilli*, como fábrica de células.

En muchos casos, estas estrategias han conducido a elevados rendimientos tanto de proteínas homólogas como heterólogas, y sustancialmente redujeron el tiempo requerido para la realización de un nuevo proceso de producción a gran escala.

Sin embargo, continúa existiendo la necesidad de procedimientos mejorados.

Los hongos filamentosos son productores de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas muy conocidos. El sistema de degradación de celulasa de estos organismos está constituido por tres clases de enzimas, endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasas. Los xilanos son polímeros heterogéneos de hemicelulosa, que requieren una serie más compleja de enzimas para su degradación. Estas enzimas, clasificadas extensamente como xilanasas, incluyendo endoxilanasas, beta-xilosidasas, acetilxilan-esterasa, α -L-arabinofuranosidasa, arabinoxilan-arabinofuranohidrolasa, beta-glucuronidasa, feruloil-esterasa y *p*-cumaroil-esterasa (figura 15).

La expresión de las enzimas degradadoras de celulosa y xilano por las especies *Aspergillus* y *Trichoderma* está regulada a nivel de transcripción. Sin embargo, los mecanismos de represión e inducción todavía no se han aclarado completamente.

El factor de transcripción *xlnR* se clonó originalmente en el hongo filamentoso *A. niger* y se identificó como un activador de transcripción de los genes que codifican la xilanasas (documento WO 97/00962). De hecho, se ha demostrado que activa la transcripción de una extensa serie de genes implicados en la degradación de la celulosa y hemicelulosas en numerosas especies de hongos. Basándose en su estructura, el *XlnR* se ha asignado a una familia de factores de transcripción de hongos, cuyo dominio de unión al ADN está compuesto por 6 residuos de cisteína conservados que quelan dos átomos de Zn, un grupo denominado binuclear de Zn.

Se han clonado homólogos de *xlnR* de varios *Aspergilli* (*A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. kawachii*, *A. tubingensis*, *A. flavus*), así como de otros hongos, como *Hepocrea jecorina* (anamorf: *T. reesei*). Además, pueden encontrarse secuencias similares en muchas bases de datos del genoma de hongos de acceso público, tales como *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Podospora anserina*, *Fusarium graminearum*. Aunque la homología global entre diferentes especies oscila en el intervalo entre 50 y 90%, presenta casi 100% de identidad en el dominio de unión del ADN que comprende un grupo de seis restos de cisteína en la parte terminal N de la proteína. En particular, un tramo de restos de aa entre la segunda y tercera cisteínas representado por la secuencia NQLRTK está sumamente conservado. En general, esta secuencia determina la especificidad de unión del ADN de una proteína del grupo binuclear Zn_2Cys_6 , que, en el caso del *XlnR*, reconoce un ADN diana afín con el núcleo de consenso 5' GGCTAR 3' (de Vries y Visser, 2001; *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* v65: 497-522). Por consiguiente, pudo predecirse que todos

estos homólogos desempeñan una función que es la regulación de la transcripción de los genes relacionados con la degradación del xilano.

Posteriormente, se han realizado varias estrategias para mejorar la producción de proteínas de interés (POI) utilizando células hospedadoras recombinantes procedentes de hongos filamentosos.

La estrategia más sencilla para mejorar el rendimiento de las proteínas homólogas y heterólogas documentada en la bibliografía consiste en introducir múltiples copias de un gen estructural de interés (véase, por ejemplo, Hessing *et al.*, 1994). Sin embargo, ésta puede que no conduzca siempre a la sobreexpresión del gen de interés. La concentración de una proteína de interés en la célula micótica ha aumentado también expresándola en un promotor potente (Mathieu y Felenbok, 1994; Nikolaev *et al.*, 2002; Rose y Van Zyl, 2002).

La transcripción del sistema xilanolítico y celulolítico y, como consecuencia, la producción enzimática total por *Aspergillus niger* podría mejorarse aumentando el número de copias de genes de *xlnR* (Gielkens *et al.*, 1999). Por el contrario, la inactivación de *xlnR* por la alteración génica conduce a la pérdida de transcripción de los genes xilanolíticos extracelulares.

Otra estrategia conlleva una modificación de la región del promotor del gen de interés mediante la mutación de puntos de fijación de un factor de transcripción. La actividad del promotor del gen *xynF1* de *Aspergillus oryzae*, controlado por la actividad de β -galactosidasa, fue regulada por incremento con éxito mutando dos zonas de fijación del XlnR no canónicas a una secuencia, que se supone que tiene una afinidad de fijación mayor (Marui *et al.*, 2003). Los transformados portadores de tres secuencias de fijación del XlnR canónicas en la región del promotor de *xynF1* produjeron 2,8 veces más enzimas que aquellas que tienen el promotor auténtico.

Muchos de los genes implicados en el metabolismo del carbono están sometidos a la represión del carbono mediada por el represor global CreA. De hecho, CreA controla la expresión génica a varios niveles y puede reprimir tanto un gen estructural como regulador. La eliminación o mutación de las zonas de fijación de CreA en los promotores correspondientes produce la desrepresión parcial de la transcripción y producción de la proteína mejorada (Orejas *et al.*, 1999). Se obtuvo una mejora adicional en un historial desreprimido de CreA (Prathumpai *et al.*, 2004).

En los *Aspergilli*, D-xilosa actúa como inductor de los genes xilanolíticos (de Vries *et al.* 1999; Gouka *et al.*, 1996). Además, la producción de xilanasa parecía mejorarse tanto en el cultivo de *T. reesei* (Xiong *et al.*, 2004) como de *Penicillium canescens* (Vavilova *et al.*, 2003) en un medio que contiene L-arabinosa.

El análisis para control metabólico y la ingeniería de la serie de reacciones metabólicas son otros medios útiles de mejora de la cepa. Se ha demostrado que el control del flujo del metabolismo de la xilosa se ejerce en las dos primeras etapas (Prathumpai *et al.*, 2003). La alteración de uno de los genes responsables de la reducción de D-xilosa produjo un aumento de la transcripción de xilanasa (Hasper *et al.*, 2000).

La mejora más espectacular de rendimientos de producción de la proteína heteróloga fue obtenida por la fusión del terminal C de una proteína de interés a una proteína micótica muy segregada (Ward *et al.*, 1990, Contreras *et al.*, 1991).

Además, la eliminación de genes con actividades indeseables, como las proteasas, parece ser sumamente útil para elevar la expresión (Van den Hombergh *et al.*, 1997).

Un objetivo de la presente descripción consiste en proporcionar procedimientos mejorados para aumentar la producción de proteínas de interés en células hospedadoras en los que se ha modificado la actividad de un factor de transcripción implicado en la regulación del metabolismo.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico dispuesto para reducir la expresión o función del factor de transcripción regulador de la pentosa (PntR); en el que dicho constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un PntR funcionalmente alterado, y en el que dicho constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica a PntR y que carece de la región que codifica a Zn₂Cys₆.

Además, la presente invención proporciona un sistema con plásmido o vector que comprende un constructo de ácido nucleico en el que dicho constructo de ácido nucleico está dispuesto para reducir la expresión o función del factor de transcripción regulador de la pentosa (PntR); en el que dicho constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un PntR funcionalmente alterado, y en el que dicho constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al PntR y que carece de la región que codifica a Zn₂Cys₆.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de alteración de la expresión del PntR en una célula que comprende la introducción de un constructo de ácido nucleico según la presente invención o de un sistema con plásmido o vector según la presente invención en dicha célula.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula hospedadora transformada o transferida con un constructo de ácido nucleico dispuesto para reducir la expresión o función del factor de transcripción PntR según la presente invención o un sistema con plásmido o vector según la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de expresión en una célula hospedadora de una POI cuya secuencia de codificación está bajo el control de transcripción de un promotor regulado por el XlnR, comprendiendo dicho procedimiento reducir la expresión o actividad del factor de transcripción PntR en dicha célula hospedadora; en el que dicho procedimiento comprende utilizar una célula hospedadora según la presente invención.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento de producción de una POI que comprende la expresión en una célula hospedadora de una POI cuya secuencia de codificación está bajo el control de transcripción de un promotor regulado por el XlnR, comprendiendo dicho procedimiento reducir la expresión o actividad del factor de transcripción PntR en dicha célula hospedadora; en el que dicha célula hospedadora es una célula hospedadora según la presente invención.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de la reducción en la expresión o la actividad del factor de transcripción PntR en la preparación de una célula hospedadora para aumentar la expresión de una proteína de interés (POI) cuya secuencia de codificación está bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR; en el que un constructo de ácido nucleico según la presente invención se utiliza en la preparación de la célula hospedadora.

La utilización de una célula hospedadora según la presente invención para la preparación de un producto alimenticio.

La presente descripción se refiere a la identificación de un factor de transcripción PntR (representado por el regulador de la pentosa), que es un miembro de la familia del grupo Zn binuclear de los reguladores micóticos.

La clonación de los genes *pntR* de *A. nidulans*, *A. tubingensis* y *A. niger* se describe en la presente memoria y se demuestra que la alteración de este gen altera la pentosa, y, en particular, L-arabinosa, metabolismo que produce la transcripción elevada de los genes regulados por el XlnR y la regulación por disminución de los genes inducibles por L-arabinosa. Como consecuencia, la producción de xilanas y β -glucanasas se ha mejorado varias veces seguido de una disminución ligera de actividad de α -arabino-furanosidasa.

Sin desear estar vinculado a ninguna teoría concreta se observó experimentalmente que en determinadas condiciones (en cepas de hongos con metabolismo reducido de L-arabinosa), la L-arabinosa o su metabolito intermedio, L-arabitol, pueden servir como inductores eficaces de la expresión del XlnR similar a la D-xilosa. Las elevadas concentraciones de XlnR producirían el aumento de expresión de los genes regulados por el XlnR.

Dichas cepas con metabolismo modulado pueden considerarse como hospedadores prometedores para la expresión heteróloga optimizada dirigida desde los promotores controlados por el XlnR.

En un aspecto amplio, la presente descripción proporciona un procedimiento de expresión en una célula hospedadora de una POI (proteína de interés) cuya secuencia de codificación está bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR, comprendiendo dicho procedimiento generar una modificación genética del factor de transcripción PntR en dicha célula hospedadora. Dicho método de expresión puede utilizarse en un procedimiento de producción para la producción de la POI.

En un aspecto amplio, la presente invención se refiere además a organismos, tales como microorganismos, y, en particular a hongos, que han sido modificados para que presenten una modificación genética del factor de transcripción PntR de modo que puedan producir grandes concentraciones de una POI cuya secuencia de codificación está bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR.

La presente invención presenta ventajas ya que proporciona un procedimiento de producción mejorado para la producción de proteínas de interés en hongos filamentosos.

El factor de transcripción "PntR" se refiere en particular a un gen *pntR* o a la proteína que se origina a partir de un hongo, y, preferentemente, de un hongo filamentoso. De este modo, en una forma de realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica el PntR que se selecciona o se destina a la modificación genética en la célula hospedadora en la presente invención es una secuencia de PntR que puede obtenerse a partir de un hongo (aunque no tenga que obtenerse realmente a partir del mismo). En una forma de realización específicamente preferida, el hongo se selecciona de entre *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus tubingensis*.

Otros genes con PntR adecuados de especies de hongos que pueden destinarse a la modificación genética incluyen los procedentes de otros *Aspergilli* (*A. oryzae*, *A. kawachii*, *A. flavus* y *A. fumigatus*), así como procedentes de otros hongos, que incluyen de manera no limitativa las cepas de *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Talaromyces*, *Thermoascus* y *Trichoderma*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una cepa y/o nuevo polipéptido de PntR purificado o a un fragmento funcional del mismo en el que dicho polipéptido de PntR puede proceder de una especie de hongo. La descripción también proporciona la secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de PntR.

5 Debe apreciarse que la presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la producción *in vivo* de proteínas que utilizan un sistema de producción de hongos. Dichos procedimientos mejorados no se han dado a conocer hasta ahora ni se han sugerido en la técnica.

10 Los aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones y en la exposición siguiente.

Para facilidad de referencia, estos y más aspectos de la presente invención se exponen a continuación en los encabezamientos del apartado apropiado. Sin embargo, lo dado a conocer en cada apartado no se limita necesariamente a cada apartado específico.

15 Tal como se utiliza en referencia a la presente invención, los términos “producir”, “produciendo”, “producido”, “que puede producir”, “producción” son sinónimos con los respectivos términos “preparar”, “preparando”, “preparado”, “preparación”, “generado”, “generación” y “que puede prepararse”.

20 Tal como se utiliza haciendo referencia a la presente invención, los términos “expresión”, “expresa”, “expresado” y “que puede expresarse” son sinónimos con respecto a los términos “transcripción”, “transcribe”, “transcrito” y “que puede transcribirse”.

25 Tal como se utiliza haciendo referencia a la presente invención los términos “transformación” y “transfección” se refieren a un procedimiento de introducción de secuencias de ácidos nucleicos en hospedadores, células hospedadoras, tejidos u órganos.

Otros aspectos que se refieren a las secuencias nucleotídicas que pueden utilizarse en la presente invención incluyen: un constructo que comprende las secuencias de los descritos en la presente memoria; un vector que comprende las secuencias para utilización en la presente invención; un plásmido que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; una célula transformada que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; un tejido transformado que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; un órgano transformado que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; un hospedador transformado que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención. La presente invención además comprende procedimientos de expresión de la secuencia nucleotídica para su utilización en la presente invención utilizando la misma, tal como la expresión en una célula hospedadora; incluyendo los procedimientos para transferir la misma. La presente descripción comprende además los procedimientos de aislamiento de la secuencia nucleotídica, tal como el aislamiento en una célula hospedadora.

40 Otros aspectos que se refieren a las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención incluyen: un constructo que codifica las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un vector que codifica las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un plásmido que codifica las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; una célula transformada que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un tejido transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un órgano transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un hospedador transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención. La presente invención comprende además procedimientos de purificación de la secuencia de aminoácidos para su utilización en la presente invención utilizando la misma, tal como la expresión en una célula hospedadora; incluyendo los procedimientos de transferencia de la misma, y a continuación purificando dicha secuencia.

Breve descripción de los dibujos

55 Figura 1. Cartografía del plásmido pSFH1.

Figura 2. Cartografía del plásmido pPntRΔ-pyrG.

60 Figura 3. Prueba de crecimiento de uno de los eliminadores típicos Δ*pntR* de *A. nidulans* (Δ*pntR*1) en comparación con la cepa *argB2* de *pyrG89* receptora (R) en MM con 1% de cada fuente de carbono tal como se indica.

Figura 4. Análisis de inmunotransferencia Southern de los ADN genómicos de los transformados Δ*pntR* de *A. nidulans* digeridos con la enzima de restricción *Cla*I. Se sondaron las transferencias con el fragmento 5' de *PntR* y se lavaron con 1x SSC, SDS al 0,1% a 60°C.

65 Figura 5. Ensayos con enzimas (parte superior) y análisis de transcripción (parte inferior) de las cepas receptora (R) y eliminadora Δ*pntR*1 (D1) tras las inducción por 10 mM de D-xilosa o L-arabitol.

Figura 6. Inmunotransferencias Southern de los ADN genómicos de las cepas de *A. nidulans* (N), *A. niger* (402) y *A. tubingensis* (1 y 10).

Figura 7. Cartografía del plásmido pAN7-ΔPntR.

Figura 8. Prueba de crecimiento de 1M-7 de *A. tubingensis* transformado con el plásmido pAN7-ΔPntR en MC y MM con 1% de L-arabinosa (a la izquierda) y una transferencia Southern eliminadora de Δ20 y cepas 1M-7 (a la derecha).

Figura 9. Las actividades de xilanasa (Xln), β-glucanasa (Egl) y α-arabinofuranosidasa (Abf) tras el crecimiento del receptor 1M-7 de *A. tubingensis* y de las cepas D5 y D20 eliminadoras de *PntR* en fructosa al 1%+ YE al 0,1%, fructosa al 1% + YE al 0,1% + L-arabinosa 10 mM y xilosa al 1% + YE al 0,1%. Se utilizaron 20 μl de muestras de cultivo para mediciones tanto de xilanasa como de β-glucanasa, mientras que se utilizaron 100 μl para α-arabinofuranosidasa. Se realizaron las reacciones durante 10 min. para xilanasa y β-glucanasa y durante 60 min para α-arabinofuranosidasa. Las actividades se expresan en D.O.

Figura 10. Actividades de xilanasa (Xln), β-glucanasa (Egl), α-arabinofuranosidasa (Abf) y β-galactosidasa (Bgal) tras el crecimiento del receptor 1M-7 de *A. tubingensis* y las cepas D2, D3, D5, D10, D12, D20, D22 eliminadoras de *pntR* en el medio complejo con pulpa de remolacha azucarera.

Figura 11. Esquema de la serie de reacciones de arabinoxilano en hongos filamentosos y efecto de una eliminación del gen que codifica el factor de transcripción PntR sobre el metabolismo y expresión génica regulada por el XlnR.

Figura 12. Alineación de los homólogos de PntR de varias especies de *Aspergillus*.

Figura 13. Cartografía del plásmido pExSlac2.

Figura 14. Actividad extracelular de β-galactosidasa medida en el medio de cultivo de las cepas de referencia de *A. nidulans* (CLac1, CLac2) y eliminadoras de *pntR*Δ1 (DpntRLac1, DpntRLac2, DpntRLac3) que llevan el plásmido de expresión pExSlac2. La cepa no transformada (C) sirvió como referencia de la actividad endógena. Todas las cepas se cultivaron durante 3 días en fructosa al 1% + YE al 0,2% + L-arabinosa 10 mM y xilosa al 1% + YE al 0,2%. Se utilizaron 50 μl de muestras de cultivo para el ensayo enzimático. Las reacciones se realizaron durante 10 min. a 30°C. Las actividades se expresan en D.O.

Figura 15. Presenta un esquema de la serie de reacciones de degradación de arabinoxilano en hongos filamentosos.

Figura 16. SEC. ID. nº 1 a nº6.

Exposición detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de expresión de una célula hospedadora de una proteína de interés (POI) cuya secuencia de codificación está bajo el control de transcripción de un promotor regulado por el XlnR, comprendiendo dicho procedimiento generar una modificación genética del factor de transcripción PntR en dicha célula hospedadora.

La expresión “factor de transcripción” significa polipéptido con actividad reguladora de la transcripción.

Convenientemente el procedimiento proporciona la expresión aumentada de la POI, es decir un nivel aumentado de expresión de la proteína de interés en comparación con el obtenido en una célula hospedadora que no ha sido modificada según la invención.

El XlnR regula la transcripción de una gama de enzimas estructurales que hidrolizan carbohidratos incluyendo las principales enzimas xilanolíticas. Por consiguiente, en una forma de realización de la invención, la proteína de interés (POI) puede estar codificada por un gen natural regulado por el XlnR. Los genes naturales regulados por el XlnR en *Aspergilli* incluyen, por ejemplo, xlnA, B, C, D, xyrA, eglA, B, C, axhA, axeA, aguA, faeA, cbhA, B y aglB (de Vries y Visser, 2001). En otra forma de realización, la POI es una proteína heteróloga.

Mediante la expresión proteína homóloga se hace referencia a una POI cuya secuencia de codificación está originalmente bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR en una célula precursora de la célula hospedadora.

Mediante la expresión proteína heteróloga se hace referencia a una POI cuya secuencia de codificación no está originalmente bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR en una célula precursora de la célula hospedadora. Los ejemplos de dichas POI incluyen las proteínas no controladas por los activadores regulados por el XlnR en la célula precursora o las proteínas procedentes de otros organismos además de la célula precursora del hospedador.

Convenientemente, la POI es una enzima xilanólítica tal como xilanasa o endoglucanasa. En una forma de realización preferida de la presente invención, la POI es una proteína heteróloga. Dichas POI de interés comprenden de manera no limitativa, amilasas, oxidorreductasas, lipasas, fitasas, enzimas pectinolíticas o modificadoras de pectina.

- 5 Los ejemplos de promotores regulados por el XlnR son los promotores de xilanasa A, xlnA, y endoglucanasa A, eglA, de *Aspergillus tubingensis*. La secuencia del promotor xlnA, por ejemplo, está descrita por Graaff *et al.*, 1994 (*Mol. Microbiol.* v12: 479-490).

- 10 El factor de transcripción PntR se identifica en la presente memoria por primera vez. PntR es un miembro de una familia del grupo Zn binuclear de reguladores micóticos. Mientras la presente solicitud describe secuencias génicas para PntR en *Aspergillus* que se exponen en las SEC. ID. n° 1, n° 3 y n° 5, el procedimiento de la invención también incorpora reducción de PntR correspondiente a u homóloga a PntR de *Aspergillus*. La expresión “correspondiente a PntR de *Aspergillus*” significa que el factor de transcripción tiene la misma secuencia que la de un PntR de *Aspergillus* o tiene una secuencia que es más del 60% idéntica a la de PntR de *Aspergillus*. El procedimiento incorpora además la
15 reducción de homólogos de PntR en otras especies de hongos y, en particular, otras especies de hongos filamentosos.

En una forma de realización preferida, el factor de transcripción PntR comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC. ID. n° 2, n° 4 o n° 6.

- 20 “Modulación del factor de transcripción PntR” o “alteración de la expresión del PntR” significa la modificación y, en particular la reducción, de la expresión del PntR o de la actividad para generar un nivel reducido o nivel cero por el factor de transcripción. En particular, la modificación, modulación, alteración o reducción del PntR se refiere a técnicas de desactivación génica (knock out) para la eliminación o reducción de la expresión de una secuencia génica específica mediante técnicas recombinantes. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia e
25 incluyen técnicas para generar pérdida de función de un gen seleccionado mediante técnicas de silenciamiento génico, tales como la recombinación homóloga, la alteración génica, técnicas de ARN complementario y ARNsi. Las técnicas apropiadas están descritas en el apartado Ejemplos.

- La modulación se refiere además a la reducción de la función por el factor de transcripción a nivel de la proteína
30 mediante técnicas tales como las metodologías de expresión de la proteína negativa dominante. Dichas técnicas resultarán conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, la función por el factor de transcripción puede estar modulada mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una PntR alterada funcionalmente tal como una secuencia de ácido nucleico que codifica a PntR y que carece de la región que codifica a Zn₂Cys₆. Las células hospedadoras adecuadas incluyen células de hongos filamentosos incluyendo *Aspergillus*, *Trichoderma* y
35 *Penicillium spp.* Otras células hospedadoras adecuadas incluyen los basidiomicetos, levaduras y bacterias.

En una forma de realización, dicho procedimiento comprende además el aislamiento/purificación de dicha POI.

- En otro aspecto de la descripción, se proporciona un factor de transcripción PntR. Propiamente dicho factor de transcripción comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente al PntR de *Aspergillus* o un equivalente funcional del mismo.
40

- “PntR de *Aspergillus*” significa el PntR de una especie de *Aspergillus*. En particular, PntR de *Aspergillus* se refiere al PntR de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus tubingensis*. Otras especies de *Aspergillus* incluyen
45 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*.

- Otros genes de PntR adecuados de especies de hongos que pueden ser dirigidos para la modificación genética incluyen los derivados de otros hongos, que comprenden de manera no limitativa las cepas de *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Talaromyces*, *Thermoascus* y
50 *Trichoderma*.

La expresión “equivalente funcional del mismo” significa que el factor de transcripción tiene las mismas características funcionales que el de PntR de *Aspergillus*.

- 55 Preferentemente el factor de transcripción de este aspecto de la presente invención tiene la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia que es por lo menos 75% idéntica (homóloga) a la del PntR de *Aspergillus*.

- Propiamente, el factor de transcripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en cualquiera de las SEC. ID. n° 2, n° 4 o n° 6 o una secuencia que tiene por lo menos el 75% de identidad (homología) a ésta o un
60 fragmento eficaz de la misma. En una forma de realización preferida, la descripción proporciona una cepa y/o un polipéptido purificado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC. ID. n° 2, n° 4, o n° 6 o una secuencia que tiene por lo menos el 75% de identidad (homología) a ésta o un fragmento eficaz de la misma.

- En otro aspecto, la descripción proporciona una cepa y/o molécula de ácido nucleico purificada, ácido nucleico o
65 secuencia nucleotídica que codifica el factor de transcripción PntR de *Aspergillus*, o un homólogo del mismo. Propiamente dicha molécula de ácido nucleico aislado y/o purificado codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. n° 2, n° 4 o n° 6 o una secuencia que tiene por lo menos el 75% de identidad (homología) con ésta o un fragmento eficaz de la misma. En otra forma de realización, la descrip-

ción proporciona una cepa y/o molécula de ácido nucleico purificado, o una secuencia que comprende una secuencia nucleotídica que es la misma, o es complementaria, o contiene algunas sustituciones de codón adecuadas para alguna de cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5 o comprende una secuencia que tiene por lo menos el 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de homología de secuencia con cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5.

Todavía en otro aspecto, la descripción se refiere a una secuencia nucleotídica y a la utilización de una secuencia nucleotídica así presentada:

- (a) la secuencia nucleotídica presentada como cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (b) una secuencia nucleotídica que es una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (c) una secuencia nucleotídica que es el complemento de la secuencia nucleotídica expuesta en cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (d) una secuencia nucleotídica que es el complemento de una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (e) una secuencia nucleotídica que puede hibridar a la secuencia nucleotídica expuesta en cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (f) una secuencia nucleotídica que puede hibridar a una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (g) una secuencia nucleotídica que es el complemento de una secuencia nucleotídica que puede hibridar a la secuencia nucleotídica expuesta en cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (h) una secuencia nucleotídica que es el complemento de una secuencia nucleotídica que puede hibridar a una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (i) una secuencia nucleotídica que puede hibridar al complemento de la secuencia nucleotídica expuesta en cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5;
- (j) una secuencia nucleotídica que puede hibridar al complemento de una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia nucleotídica presentada como cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5.

Las secuencias nucleotídicas de la presente invención pueden comprender secuencias que codifican cualquiera de las SEC. ID. nº 2, nº 4 ó nº 6 o una variante, homólogo o derivado de las mismas.

Las secuencias nucleotídicas de la presente descripción pueden ser útiles para generar las secuencias correspondientes para su utilización en la modificación genética de la expresión del PntR en una célula para su utilización según el procedimiento de la invención. En particular, las secuencias nucleotídicas de la presente descripción pueden utilizarse para identificar moléculas de ARNsi o moléculas complementarias que pueden utilizarse para reducir la expresión del PntR. Además, las secuencias nucleotídicas de la presente descripción pueden ser útiles en la identificación de las zonas adyacentes fuera del gen *pntR* que puede utilizarse para generar desactivaciones génicas del *pntR* por técnicas tales como recombinación homóloga. Estos y otros procedimientos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia.

La invención proporciona además un sistema de plásmido o vector que comprende un PntR como se describe en la presente memoria o un homólogo o derivado del mismo. Preferentemente, el sistema de plásmido o vector comprende una secuencia de ácido nucleico como la expuesta en cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5 o una secuencia que es por lo menos 75% homóloga a ésta o un fragmento eficaz de la misma. Propiamente el sistema de plásmido o vector es un vector de expresión para la expresión de cualquier factor de transcripción codificado por una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las SEC. ID. nº 1, nº 3 o nº 5 como una secuencia que es por lo menos 75% homóloga (idéntica) a ésta en un microorganismo. Los vectores de expresión adecuados se describen en la presente memoria.

En un aspecto de la invención se proporciona una célula hospedadora transformada o transfectada con un ácido nucleico según cualquier aspecto de la descripción.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada dispuesta para reducir la expresión o función del factor de transcripción PntR. Las moléculas de ácido nucleico adecuadas incluyen las que comprenden una zona de codificación del PntR alterada para su utilización en una estrategia de recombinación homóloga. Los expertos en la materia conocen los procedimientos para generar dichos constructos. Un procedimiento adecuado y un constructo se ilustran en la presente memoria. Otras moléculas de ácido nucleico adecuadas incluyen moléculas de ARNsi y constructos complementarios.

En otro aspecto de la invención se proporciona una célula hospedadora transformada o transfectada con un constructo de ácido nucleico dispuesto para reducir la expresión o función del factor de transcripción PntR. Convenientemente, el PntR es un PntR de *Aspergillus* tal como se describe en la presente memoria o un homólogo o derivado del mismo. En una forma de realización dicho constructo de ácido nucleico comprende una zona de codificación alterada del PntR para su utilización en una estrategia de recombinación homóloga.

Convenientemente, dicha célula hospedadora comprende además un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de una proteína de interés (POI) bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR.

En una forma de realización preferida, la célula hospedadora es un microorganismo que incluye hongos. Las células hospedadoras de hongos adecuadas incluyen hongos filamentosos incluyendo las seleccionadas de entre el grupo constituido por *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium*.

En una forma de realización, la célula hospedadora según este aspecto de la invención presenta un bloque en el metabolismo de L-arabinosa.

“Bloque en el metabolismo de L-arabinosa” significa que la célula hospedadora transformada o transfectada con un constructo de ácido nucleico dispuesta para reducir la expresión o función del factor de transcripción PntR tiene un nivel inferior de metabolismo de L-arabinosa comparado con una célula inalterada. Los procedimientos adecuados para detectar un bloque en el metabolismo de L-arabinosa se describen en la presente memoria.

En otra de realización, la célula hospedadora según este aspecto de la invención presenta aumento de la actividad de xilanasas.

“Aumento de actividad de xilanasas” significa que la célula hospedadora transformada o transfectada con un constructo de ácido nucleico dispuesto para reducir la expresión o función del factor de transcripción PntR tiene un nivel mayor de xilanasas comparado con una célula inalterada. Los procedimientos adecuados para medir dicha actividad se describen en la presente memoria.

En otra forma de realización, la célula hospedadora puede comprender una modificación adicional tal como, por ejemplo, la célula hospedadora puede tener un historial con proteasa insuficiente.

En un aspecto de la descripción se proporciona la utilización de la modulación del factor de transcripción PntR en la preparación de una célula hospedadora para aumentar la expresión de una proteína de interés (POI) cuya secuencia de codificación está bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR.

Aspectos preferidos

Los aspectos preferidos se presentan en las reivindicaciones adjuntas, en la descripción siguiente y en el apartado Ejemplos.

Ventajas adicionales

La presente invención presenta ventajas ya que proporciona un procedimiento microbiológico mejorado para la síntesis de una variedad de proteínas de interés y, en particular, para la síntesis de xilanasas extracelulares.

La alteración del PntR tanto en las cepas de *A. nidulans* como de *A. tubingensis* altera el metabolismo de la L-arabinosa dando como resultado la elevada transcripción de los genes regulados por el XlnR y la regulación por disminución de los genes inducibles por L-arabinosa. Como consecuencia, la producción de xilanasas y β -glucanasas se ha mejorado varias veces seguido de una ligera disminución de la actividad de α -arabinofuranosidasa. Dichas cepas con metabolismo modulado pueden considerarse hospedadores prometedores para la expresión heteróloga conducida desde los promotores controlados por el XlnR.

Las xilanasas que se producen utilizando este procedimiento microbiológico mejorado son útiles en varias aplicaciones en la industria alimentaria, tal como en los productos lácteos y bebidas, pueden utilizarse también en otras aplicaciones tales como para la producción de alimentos o incluso en la industria del papel o textil para el blanqueo de papel o tejidos.

Tal como se describe en la presente memoria, la desactivación génica (eliminación o alteración o cualquier mutación con pérdida de función) de PntR da como resultado un aumento significativo (3 a 5 veces) de los genes controlados por el XlnR incluyendo xilanasas, β -glucanasas, β -xilosidasas ya sea en un medio complejo industrialmente relevante con pulpa de remolacha azucarera o en presencia de L-arabinosa o L-arabitol.

El presente procedimiento permite la producción mejorada de xilanasas y además la expresión mejorada de la proteína heteróloga en general.

Los altos niveles de proteasas en hongos filamentosos con frecuencia limitan la expresión de proteínas homólogas y heterólogas a altos niveles. Utilizando cepas deficientes en proteasa, la producción de proteína en los *Aspergilli* puede mejorarse considerablemente. Tanto las técnicas clásicas como de alteración génica han producido cepas con un historial de proteasa reducida. Se apreciaron más mejoras de rendimientos del producto en condiciones que reprimen la expresión de varias proteasas (Van den Hombergh *et al.*, 1997). En la presente invención, las condiciones de expresión óptimas pueden ser aquellas en las que una fuente de carbono proporcionada está limitada donde, con ventaja, una desactivación génica de *pntR* puede combinarse con un historial con proteasa insuficiente.

Aislada

En un aspecto, preferentemente la secuencia está en forma aislada. El término “aislada” significa que la secuencia está por lo menos sustancialmente exenta de por lo menos otro componente con el que la secuencia está asociada de forma natural en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza.

Purificada

En un aspecto, preferentemente la secuencia está en forma purificada. El término “purificada” significa que la secuencia está en un estado relativamente puro, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 90% pura, o por lo menos aproximadamente 95% pura o por lo menos aproximadamente 98% pura.

Secuencia nucleotídica

El alcance de la presente descripción comprende las secuencias nucleotídicas que codifican los factores de transcripción que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

La expresión “secuencia nucleotídica” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia oligonucleotídica, a la secuencia de ácido nucleico u oligonucleotídica, y a la variante, los homólogos, los fragmentos y los derivados de la misma (tal como fragmentos de la misma). La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico, sintético o recombinante, la cual puede ser bicatenaria o monocatenaria ya sea representando la cadena transcrita o complementaria.

La expresión “secuencia nucleotídica” o “molécula de ácido nucleico” en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferentemente significa ADN, más preferentemente secuencia de ADNc.

En una forma de realización preferida, la secuencia de ácido nucleico cuando se refiere al alcance por sí mismo de la presente descripción y cuando está comprendida por el mismo no incluye la secuencia nucleotídica natural según la presente descripción cuando está en su medio natural y cuando está unida a su(s) secuencia(s) asociada(s) en la naturaleza que está(n) también en su(s) medio(s) natural(es). Para una mejor referencia, los investigadores denominarán a esta forma de realización preferida la “secuencia nucleotídica no natural”. A este respecto, la expresión “secuencia nucleotídica natural” significa una secuencia nucleotídica completa que está en su medio natural y cuando está unida operativamente a un promotor completo al que está asociada de manera natural, promotor que está también en su medio natural. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos comprendida por el alcance de la presente descripción puede aislarse y/o purificarse después de la expresión de una secuencia nucleotídica en su organismo natural. Preferentemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos comprendida por el alcance de la presente descripción puede ser expresada por una secuencia nucleotídica en su organismo natural pero en el que la secuencia nucleotídica no está bajo el control del promotor al que está asociada en la naturaleza dentro de este organismo.

Preparación de una secuencia nucleotídica

Por lo general, la secuencia nucleotídica comprendida en el alcance de la presente invención o las secuencias nucleotídicas para su utilización en la presente invención se preparan utilizando técnicas con ADN recombinante (es decir, ADN recombinante). Sin embargo, en una forma de realización alternativa de la invención, la secuencia nucleotídica pudo sintetizarse, en su totalidad o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers M.H. *et al.*, (1980) *Nucl. Acids. Res. Symp. Ser.* 215-23 y Horn T. *et al.*, (1980) *Nuc. Acids. Res. Symp. Ser.* 225-232).

Una secuencia nucleotídica que codifica ya sea un vector de transcripción que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o un factor de transcripción que es adecuado para la modificación puede identificarse y/o aislarse y/o purificarse a partir de cualquier célula u organismo que exprese dicho factor de transcripción. Varios procedimientos son muy conocidos en la materia para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias nucleotídicas. A título de ejemplo, pueden utilizarse técnicas de ampliación por PCR para preparar más de una secuencia una vez se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

A título de ejemplo adicional, un ADN genómico y/o un banco de ADNc puede construirse utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero procedente del organismo que produce el factor de transcripción. Si se conoce la secuencia de aminoácidos por el factor de transcripción o una parte de la secuencia de aminoácidos por el factor de transcripción, las sondas de oligonucleótidos marcadas pueden sintetizarse y utilizarse para identificar clones que codifican el factor

de transcripción procedentes del banco genómico preparado a partir del organismo. Alternativamente, se pudo utilizar una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas a otros genes por el factor de transcripción conocido para identificar clones que codifican el factor de transcripción. En el último caso, se utilizan condiciones de hibridación y lavado de severidad menor.

Alternativamente además, la secuencia nucleotídica que codifica el factor de transcripción o la secuencia nucleotídica para su utilización en el procedimiento de la invención puede prepararse por síntesis por procedimientos normalizados demostrados, por ejemplo, el procedimiento de la fosforoamidita descrito por Beaucage S.L. *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters* 22, páginas 1859-1869, o el procedimiento descrito por Matthes *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3, páginas 801-805. En el procedimiento de la fosforoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico mixto y sintético, sintético mixto y de origen de ADNc, o genómico mixto y origen de ADNc, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según proceda) según técnicas normalizadas. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia nucleotídica completa. La secuencia de ADN puede prepararse también por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en la patente US nº 4.683.202 o en Saiki R. K. *et al.*, (*Science* (1988) 239, páginas 487-491).

Debido a la degeneración en el código genético, pueden producirse fácilmente secuencias nucleotídicas en las que la utilización del codón de triplete, para algunos o todos los aminoácidos codificados por la secuencia nucleotídica original, se ha cambiado produciendo así una secuencia nucleotídica con baja homología con la secuencia nucleotídica original pero que codifica la misma, o una variante, secuencia de aminoácidos como la codificada por la secuencia nucleotídica original. Por ejemplo, para la mayoría de los aminoácidos la degeneración del código genético está en la tercera posición en el codón de triplete (posición oscilante) (ver como referencia Stryer, Lubert, *Biochemistry*, tercera edición, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7) por consiguiente, una secuencia nucleotídica en la que todos los codones de triplete han "oscilado" en la tercera posición sería aproximadamente 66% idéntica a la secuencia nucleotídica original sin embargo, la secuencia nucleotídica corregida codificaría la misma, o una variante, secuencia primaria de aminoácidos como la secuencia nucleotídica original.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere además a cualquier secuencia nucleotídica que tenga utilización alternativa del codón de triplete para por lo menos un codón de triplete que codifica aminoácidos, pero que codifica la misma, o una variante, la secuencia polipeptídica como la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia nucleotídica original.

Además, los organismos específicos por lo general presentan un sesgo en la medida en que se utilizan codones de triplete para codificar aminoácidos. Las tablas de utilización de codón preferidas están generalmente disponibles, y pueden utilizarse para preparar genes optimizados en el codón. Dichas técnicas de optimización del codón se utilizan de forma rutinaria para optimizar la expresión de transgenes en un hospedador heterólogo.

Evolución molecular

Una vez se ha aislado y/o purificado una secuencia nucleotídica que codifica al factor de transcripción, o se ha identificado una supuesta secuencia nucleotídica que codifica al factor de transcripción, la secuencia nucleotídica seleccionada puede modificarse para generar una alteración génica o la pérdida de la función mutante. Por ejemplo, puede ser deseable mutar la secuencia con el fin de preparar un factor de transcripción negativo dominante o la pérdida alternativa de la función mutante.

Pueden introducirse mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias nucleotídicas que flanquean las zonas de mutación deseadas.

Un procedimiento adecuado se expone en Morinaga *et al.*, (*Biotechnology* (1984) 2, páginas 646-649). Otro procedimiento para introducir mutaciones en las secuencias nucleotídicas que codifican al factor de transcripción se describen en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, páginas 147-151).

En lugar de la mutagénesis dirigida al sitio, tal como se describió anteriormente, se pueden introducir mutaciones al azar, por ejemplo utilizando un kit comercial tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de Stratagene, o el kit Diversify PCR random mutagénesis de Clontech.

Un tercer procedimiento para obtener nuevas secuencias consiste en fragmentar secuencias nucleotídicas diferentes, ya sea utilizando cualquier número de enzimas de restricción o una enzima tal como la ADNasa I, y reensamblando todas las secuencias nucleotídicas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente se puede utilizar una o múltiples secuencias nucleotídicas diferentes e introducir mutaciones durante el reensamblaje de toda la secuencia nucleotídica.

Es posible así producir numerosas mutaciones dirigidas al sitio o alternativas en una secuencia nucleotídica, ya sea *in vivo* o *in vitro*, e identificar posteriormente la funcionalidad deseada del polipéptido codificado por varios medios.

Secuencias de aminoácidos

El alcance de la presente descripción comprende asimismo las secuencias de aminoácidos de factores de transcripción que tienen las propiedades específicas definidas en la presente memoria. Se proporcionan también secuencias de aminoácidos basadas en los factores de transcripción identificados en la presente memoria pero generados o modificados con el fin de proporcionar una modificación genética del PntR expresada por procedimientos tales como una estrategia negativa dominante.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónima del término “polipéptido” y/o del término “proteína”. En algunos casos, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónima del término “péptido”. En algunos casos, la expresión “secuencias de aminoácidos” es sinónima del término “enzimas” o “factor de transcripción”.

La secuencia de aminoácidos puede prepararse o aislarse de una fuente adecuada, o puede construirse por síntesis o puede prepararse mediante la utilización de técnicas de ADN recombinante.

Preferentemente la secuencia de aminoácidos cuando se refiere al alcance por sí mismo de la presente descripción y cuando está comprendida por el mismo no es un factor de transcripción natural. A este respecto, la expresión “factor de transcripción natural” significa un factor de transcripción completo que está en su medio natural y cuando ha sido expresado por su secuencia nucleotídica natural.

Variantes/homólogos/derivados

La presente descripción comprende asimismo la utilización de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de un factor de transcripción o de cualquier secuencia nucleotídica que codifica dicho factor de transcripción.

En la presente memoria, el término “homólogo” significa una entidad que presenta una determinada homología con las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos. En la presente memoria, el término “homología” puede identificarse a “identidad”.

En el presente contexto, una secuencia de aminoácidos homóloga se considera que incluye una secuencia de aminoácidos que pueden ser por lo menos 75, 80, 81, 85 ó 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95, 96, 97, 98 ó 99% idéntica a la secuencia. Por lo general, los homólogos comprenderán las mismas zonas funcionales, etc., por ejemplo, como la secuencia de aminoácidos del asunto. En particular, resulta preferido que los homólogos comprendan los dominios funcionales que son necesarios para la actividad por el factor de transcripción, incluyendo, por ejemplo, los dominios necesarios para el reconocimiento del ADN y la interacción con el sistema de transcripción. Aunque la homología puede considerarse desde el punto de vista de similitud (es decir, restos de aminoácidos que tienen similares propiedades/funciones químicas), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología desde el punto de vista de identidad de secuencia.

“Fragmento funcional” significa un fragmento del polipéptido que conserva las propiedades características de este polipéptido. En el contexto de la presente invención, un fragmento funcional de un factor de transcripción PntR es un fragmento que conserva la capacidad activadora de la proteína completa.

En el presente contexto, una secuencia nucleotídica homóloga se considera que incluye una secuencia nucleotídica que puede ser por lo menos 60, 65, 75, 80, 81, 85 ó 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95, 96, 97, 98 ó 99% idéntica a una secuencia nucleotídica que codifica un factor de transcripción de la presente descripción (la secuencia del asunto). Por lo general, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican las zonas funcionales, etc. como la secuencia del asunto. Aunque la homología puede considerarse también desde el punto de vista de similitud (es decir restos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología desde el punto de vista de identidad de secuencia.

Para las secuencias de aminoácidos y las secuencias nucleotídicas, pueden realizarse comparaciones de homología a simple vista, o más habitualmente con ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse en secuencias contiguas, es decir, una secuencia está alineada con otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un resto cada vez. Esto se denomina alineación “sin huecos”. Por lo general, dichas alineaciones sin huecos se realizan solamente en un número relativamente pequeño de restos.

Aunque éste es un procedimiento muy simple y consistente, no puede tener en consideración que, por ejemplo, en un par por lo demás idéntico de secuencias, una inserción o eliminación provocará que los restos de aminoácidos siguientes se coloquen fuera de la alineación, resultando de este modo potencialmente una gran reducción en el % de

homología cuando se realiza una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que tengan en consideración posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar indebidamente la puntuación total de la homología. Esto se consigue insertando “huecos” en la alineación de la secuencia para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan “penalizaciones por hueco” a cada hueco que se produce en la alineación de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de la secuencia con tan pocos huecos como sea posible (reflejando mayor relatividad entre las dos secuencias comparadas) conseguirá una puntuación mayor que otra con muchos huecos. Se utilizan por lo general “costes de hueco afines” que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña para cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más frecuentemente utilizado. Las penalizaciones altas por hueco producirán desde luego alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten que se modifiquen las penalizaciones por hueco. Sin embargo se prefiere utilizar los valores por defecto al utilizar dicho programa informático para comparaciones de secuencias. Por ejemplo cuando se utiliza el paquete GCG Wisconsin Bestfit la penalización por hueco por defecto para la secuencia de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada ampliación.

El cálculo del % máximo de homología por consiguiente requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en consideración las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Devereux *et al.* 1984 *Nuc. Acids Research* 12 pág. 387). Los ejemplos de otro programa informático que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª Ed. - Capítulo 18), FASTA (Altschul *et al.*, 1990 *J. Mol. Biol.* 403-410) y el GENWORKS continuación de herramientas para comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para investigación autónoma y en línea (véase Ausubel *et al.*, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, páginas 7-58 a 7-60).

Sin embargo, para las mismas aplicaciones, se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta, denominada secuencias BLAST 2 está también disponible para comparar la proteína y la secuencia nucleotídica (véase *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett.* 1999 177(1): 187-8ytatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque el % de homología final puede medirse desde el punto de vista de identidad, el propio proceso de alineación no se basa por lo general en una comparación del par todo o nada. En su lugar, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por pares basándose en la similitud química o en la distancia filogenética. Un ejemplo de dicha matriz utilizada normalmente es la matriz BLOSUM62, matriz por defecto para la continuación de los programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin utilizan generalmente ya sea valores públicos por defecto o una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra (para más detalles véase el manual del usuario). Para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar los valores públicos por defecto para el paquete GCG, o en caso de otro programa informático, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, puede calcularse el porcentaje de homologías utilizando la propiedad de alineación múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basándose en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* 73(1), 237-244).

Una vez el programa informático ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferentemente % de identidad de secuencia. El programa informático por lo general realiza esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden presentar también eliminaciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio imperceptible y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones deliberadas de aminoácidos basándose en la similitud en las propiedades de los aminoácidos (tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos) y por consiguiente es útil para el grupo de aminoácidos agrupados en grupos funcionales. Los aminoácidos pueden agruparse basándose en las propiedades de su cadena lateral sola. Sin embargo es más útil incluir también los datos de la mutación. Los conjuntos de aminoácidos así obtenidos es probable que se conserven por razones estructurales. Estos conjuntos pueden describirse en forma de diagrama de Venn (Livingstone C. D. y Barton G. J. (1993) “Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation” *Comput. Appl. Biosci.* 9: 745-756) (Taylor W. R. (1986) “The classification of amino acid conservation” *J. Theor. Biol.* 119: 205-218). Pueden realizarse sustituciones conservadoras; por ejemplo según la tabla a continuación que describe una agrupación de aminoácidos en el diagrama de Venn generalmente aceptados.

CONJUNTO		SUBCONJUNTO	
Hidrófobo	F W Y H K M I L V A G C	Aromático	F W Y H
		Alifático	I L V
Polar	W Y H K R E D C S T N Q	Cargado	H K R E D
		Cargado positivamente	H K R
		Cargado negativamente	E D
Pequeño	V C A G S P T N D	Diminuto	A G S

La presente descripción comprende asimismo la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento se utilizan ambos en la presente memoria para hacer referencia al intercambio de un resto de aminoácidos existente, por un resto alternativo) que puede producirse es decir sustitución similar por similar tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga puede producirse también, es decir de una clase de resto por otro o alternativamente que conlleva la inclusión de aminoácidos sintéticos tales como ornitina (denominado en adelante Z), ácido diaminobutírico ornitina (denominado en adelante B), norleucina ornitina (denominado en adelante O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Pueden realizarse reemplazamientos también por aminoácidos sintéticos.

Las secuencias de aminoácido de la variante pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden estar insertados entre algunos restos de dos aminoácidos de la secuencia incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos tales como restos de glicina o β -alanina. Una forma más de variación, implica la presencia de uno o más restos de aminoácidos en forma peptóide, será bien comprendida por los expertos en la materia. Para evitar dudas, "la forma peptóide" se utiliza para referirse a restos de aminoácidos de la variante en los que el grupo carbono α sustituyente está en el átomo de nitrógeno del resto en lugar del carbono α . Los procedimientos para preparar péptidos en forma peptóide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simón RJ. *et al.*, PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13(4), 132-134.

Las secuencias nucleotídicas para su utilización en la presente invención pueden incluir dentro de ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Numerosos tipos diferentes de modificación para oligonucleótidos son conocidos en la técnica. Éstos incluyen ejes centrales de fosfonato de metilo y de fosforotioato y/o la adición de acridina o cadenas de polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. En el contexto de la presente invención, debe apreciarse que las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria pueden modificarse por cualquier procedimiento disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo con objeto de aumentar la actividad *in vivo* o la vida de las secuencias nucleotídicas mencionadas en la presente memoria.

La presente invención comprende asimismo la utilización de secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria con un fragmento de la misma entonces la secuencia puede utilizarse como sonda para identificar secuencias de codificación similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero están comprendidos dentro del alcance de la invención pueden obtenerse de numerosas maneras. Pueden obtenerse otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria por ejemplo sondado bancos de ADN preparados a partir de una serie de personas, por ejemplo personas de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos y dichos homólogos y fragmentos de los mismos en general serán capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias formadas en el listado de secuencias de la presente memoria. Dichas secuencias pueden obtenerse sondado bancos de ADNc preparados a partir de bancos de ADN genómicos de otras especies y sondado dichos bancos con sondas que comprenden todas o parte de algunas de las secuencias en los listados de secuencias adjuntos en condiciones de media a alta severidad. Se aplican consideraciones similares para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias polipeptídicas o nucleotídicas mencionadas en la presente memoria.

Las variantes y homólogos de cepas/especies pueden obtenerse también utilizando la PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para secuencias diana dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservados dentro de las secuencias mencionadas en la presente memoria. Pueden predecirse secuencias conservadas, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Dichas alineaciones de secuencias pueden realizarse utilizando programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se utiliza generalmente el programa GCG Wisconsin PileUp.

Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de severidad menores a las utilizadas para las secuencias de clonación con cebadores de secuencia individuales frente a las secuencias conocidas.

Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida al sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios imperceptibles de la secuencia del codón para utilizar referencias de codón para una célula hospedadora concreta en la que las secuencias de polinucleótidos están siendo expresadas. Otros cambios de secuencia pueden desearse con el fin de introducir zonas de reconocimiento de la enzima de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos alterados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias nucleotídicas) descritos en la presente memoria pueden utilizarse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de ampliación alternativa, una sonda por ejemplo, marcada con un marcador de revelado por medios convencionales utilizando marcadores radioactivos o no radioactivos, o los polinucleótidos pueden estar contenidos dentro de vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán por lo menos de 15, preferentemente de 20, por ejemplo por lo menos de 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y estarán comprendidos en el término polinucleótidos tal como se utiliza en la presente memoria.

Los polinucleótidos tales como los polinucleótidos de ADN y las sondas descritas en la presente memoria pueden producirse de manera recombinante, por síntesis, o por cualquiera de los medios disponibles para los expertos en la materia. Pueden clonarse también por técnicas convencionales.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, lo que implica una preparación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada de un nucleótido cada vez. Las técnicas para realizar estas técnicas automatizadas de utilización están fácilmente disponibles en la materia.

Los polinucleótidos mayores se producirán generalmente utilizando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Pueden concebirse cebadores que contengan puntos de reconocimientos de la enzima de restricción adecuados de modo que el ADN ampliado puede ampliarse en un vector de clonación adecuado.

Biológicamente activas

Preferentemente, las secuencias de la variante, etc. son por lo menos tan biológicamente activas como las secuencias presentadas en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria "biólogicamente activa" se refiere a una secuencia que tiene un función estructural similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o una función reguladora similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o función bioquímica similar (pero no necesariamente en el mismo grado) de la secuencia natural.

Hibridación

La presente descripción comprende también secuencias que son complementarias de las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria o secuencias pueden hibridar ya sea a las secuencias descritas en la presente memoria, o a las secuencias que son complementarias a éstas.

El término "hibridación" tal como se utiliza en la presente memoria incluirá (el procedimiento mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria por emparejamiento de bases) así como el procedimiento de ampliación realizado en tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La presente invención también comprende la utilización de secuencias nucleotídicas pueden hibridarse con secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

El término "variante" comprende también secuencias que son complementarias con las secuencias pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

Preferentemente, el término "variante" comprende secuencias que son complementarias a las secuencias pueden hibridarse en condiciones severas (por ejemplo, 50°C y 0,2 x SSC {1 x SSC = NaCl 0,15 M, citrato Na₃ 0,015 M pH 7,0}) para las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

Más preferentemente, el término "variante" comprende secuencias que son complementarias a las secuencias pueden hibridarse en condiciones muy severas (por ejemplo, 65°C y 0,1 x SSC {1 x SSC = NaCl 0,15 M, citrato Na₃ 0,015 M pH 7,0}) para las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

La presente invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas que pueden hibridar a las secuencias descritas en la presente memoria (incluyendo las secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

La presente invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias pueden hibridar a las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria (incluyendo las secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

También están incluidas en el alcance de la presente invención las secuencias nucleotídicas pueden hibridar a las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria en condiciones de severidad intermedia a máxima.

En un aspecto preferido, la presente descripción, comprende las secuencias nucleotídicas que pueden hibridar a la secuencia nucleotídica descrita en la presente memoria, o al complemento de la misma, en condiciones severas (por ejemplo 50°C y 0,2xSSC).

En un aspecto más preferido, la presente descripción comprende las secuencias nucleotídicas que pueden hibridar a la secuencia nucleotídica descrita en la presente memoria, o al complemento de la misma, en condiciones muy severas (por ejemplo 65°C y 0,1xSSC).

Procedimientos para modular la expresión o función de proteínas

La actividad funcional de un factor de transcripción PntR puede ser modificada por moléculas/agentes adecuados que se unen ya sea directa o indirectamente a la proteína del PntR, o al ácido nucleico que la codifica. Los agentes pueden ser moléculas naturales tales como péptidos y proteínas, por ejemplo proteína cinasas de activación específica, o pueden ser metabolitos, como azúcares o polioles o sus derivados o pueden ser moléculas sintéticas.

Los procedimientos de modulación del nivel de expresión de una proteína del factor de transcripción PntR incluyen, por ejemplo, la utilización de técnicas de cadena complementaria.

Los constructos con cadena complementaria, es decir, ácido nucleico, preferentemente ARN, constructos complementarios al ácido nucleico transcrito o ARNm, están descritos con detalle en el documento US nº 6.100.090 (Monia *et al.*, 1992, *Crit. Rev. Oncog.* 3(1-2): 175-231. Otros procedimientos de modulación de la expresión génica son conocidos por los expertos en la materia e incluyen estrategias negativas dominantes así como la introducción de péptidos o moléculas pequeñas que inhiben la expresión génica o la actividad funcional.

La interferencia del ARN (ARNi) es un procedimiento de silenciamiento del gen después de la transcripción (PTGS) inducida por la introducción directa de ARN bicatenario (ARNds) y ha surgido como herramienta útil para la desactivación génica de la expresión de genes específicos en una variedad de organismos. El ARNi está descrito por Fire *et al.*, *Nature* 391: 806-811 (1998). Otros procedimientos de PTGS se conocen e incluyen, por ejemplo, la introducción de un transgén o virus. Generalmente, en PTGS el transcrito del gen silenciado se sintetiza pero no se acumula porque se degrada rápidamente. Los procedimientos para el PTGS incluyendo el ARNi se describen, por ejemplo, en la página de internet Ambion.com, en el directorio "/hottopics/", en el "rnaï" archivo.

Los procedimientos adecuados para ARNi *in vitro* son conocidos por los expertos en la materia. Dichos procedimiento implican la introducción de ARNsi (ARN con pequeña interferencia). Los modelos actuales indican que estos 21 a 23 nucleótidos de ARNds pueden provocar PTGS. Los procedimientos para diseñar ARNsi eficaces se describen, por ejemplo, en la página de Ambion descrita anteriormente.

Mutagénesis dirigida al sitio

Una vez se ha aislado y/o purificado una secuencia nucleotídica que codifica al factor de transcripción PntR, o se ha identificado una supuesta secuencia nucleotídica que codifica al factor de transcripción, puede ser deseable mutar la secuencia. Por ejemplo, una secuencia alterada de PntR puede introducirse en la célula para alterar el gen PntR endógeno por recombinación homóloga. En la presente memoria se describen los constructos adecuados. Alternativamente, la secuencia de PntR puede mutarse con objeto de preparar una proteína negativa dominante que interrumpe la función o expresión de PntR expresada de manera natural.

Pueden introducirse mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias nucleotídicas que flanquean los sitios de mutación deseados.

Un procedimiento adecuado se expone en Morinaga *et al.*, (*Biotechnology* (1984) 2, páginas 646-649). Otro procedimiento que puede ser aplicable para introducir mutaciones en las secuencias nucleotídicas que codifican al factor de transcripción se describe en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, páginas 147-151). Otro procedimiento se describe en Sarkar y Sommer (*Biotechniques* (1990), 8 páginas 404-407 - "The megaprimer method of site directed mutagenesis").

Recombinante

En un aspecto la secuencia para su utilización en la presente invención es una secuencia recombinante, es decir una secuencia que ha sido preparada utilizando técnicas de ADN recombinante.

Estas técnicas de ADN recombinante resultarán evidentes para el experto en la materia. Dichas técnicas se explican en la bibliografía, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, tomos, 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

5

Sintética

En un aspecto la secuencia para su utilización en la presente invención es una secuencia sintética, es decir un secuencia que se ha preparado por síntesis química *in vitro* o enzimática. Comprende de manera no limitativa las secuencias preparadas con utilización óptima del codón para el organismo hospedador.

10

Expresión de proteínas

La secuencia nucleotídica para su utilización en la presente invención puede incorporarse en un vector recombinante replicable. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia nucleotídica en forma enzimática, en y/o procedente de una célula hospedadora compatible.

15

La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control por ejemplo, secuencias reguladoras.

20

Vector de expresión

La terminología "plásmido", "sistema vectorial" o "vector de expresión" hace referencia a un constructo capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*. En el contexto de la presente invención, estos constructos pueden utilizarse para introducir genes que codifican factores de transcripción en células hospedadoras. Convenientemente, los genes cuya expresión se introduce pueden denominarse "transgenes expresables".

25

En otra forma de realización, estos constructos pueden utilizarse para introducir un gen que codifica una proteína de interés bajo el control de una secuencia de promotor del XlnR en células hospedadoras.

30

Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma de un organismo hospedador adecuado. El término "incorporado" comprende preferentemente la incorporación estable en el genoma.

Las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria pueden estar presentes en un vector en el que la secuencia nucleotídica está operativamente unida a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica por un organismo hospedador adecuado.

35

Los vectores para su utilización en la presente invención pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada tal como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido descrito en la presente memoria.

40

La selección del vector por ejemplo, un plásmido, cósmido o vector de fago con frecuencia dependerá de la célula hospedadora en la que ha de introducirse.

45

Los vectores para su utilización en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores seleccionares, tal como un gen, que proporciona resistencia a los antibióticos por ejemplo, resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede realizarse por transformación conjunta (tal como se describe en el documento WO 91/17243).

Pueden utilizarse vectores *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o utilizarse para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.

50

Por lo tanto, en una forma de realización adicional, se proporciona un procedimiento de preparación de secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria introduciendo una secuencia nucleotídica descrita en la presente memoria en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible y cultivando la célula hospedadora en condiciones que den lugar a la replicación del vector.

55

El vector puede comprender además una secuencia nucleotídica que permita al vector replicarse en la célula hospedadora en cuestión. Ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

60

Secuencias reguladoras

En algunas aplicaciones, para su utilización en la presente invención la secuencia nucleotídica está operativamente unida a una secuencia reguladora que puede proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica, tal como mediante la célula hospedadora seleccionada. A título de ejemplo, la presente invención comprende un vector que comprende la secuencia nucleotídica operativamente unida a dicha secuencia reguladora, es decir el vector es un vector de expresión.

65

Convenientemente, para la expresión de una POI el gen que codifica la POI está operativamente unido a una secuencia de promotor que permite que la secuencia esté bajo el control de transcripción de un promotor regulado por el XlnR. Dicha secuencia de promotor adecuada podía ser la secuencia de promotor xlnA o eglA.

La expresión “operativamente unida” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia reguladora “operativamente unida” a una secuencia de codificación está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de referencia.

La expresión “secuencias reguladoras” incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

El término “promotores” se utiliza en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de fijación de ARN polimerasa.

El aumento de expresión de la secuencia nucleotídica que codifica la POI según la presente descripción puede conseguirse también mediante la selección de zonas reguladoras heterólogas adicionales, por ejemplo, zonas promotoras, principales de secreción y terminadoras.

Preferentemente, la secuencia nucleotídica descrita en la presente invención está operativamente unida por lo menos a un promotor.

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia nucleotídica en un hospedador bacteriano, micótico o de levadura son bien conocidos en la técnica.

Constructos

El término “constructo” (que es sinónimo de términos tales como “conjugado”, “cásete” e “híbrido”) incluye una secuencia nucleotídica para su utilización según la presente invención. Dicho constructo puede estar unido directa o indirectamente a un promotor.

Un ejemplo de una unión indirecta consiste en proporcionar un grupo espaciador adecuado tal como una secuencia de intrón tal como el Shl-intrón o el intrón de ADH, intermedia el promotor y la secuencia nucleotídica en la presente memoria. Lo mismo es verdad para el término “fusionado” en relación con la presente invención que incluye la unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no comprenden la combinación natural de la secuencia nucleotídica que codifica la proteína normalmente asociada al promotor génico natural y cuando están ambos en su medio natural.

El constructo puede incluso contener o expresar un marcador, lo que permite la selección del constructo genético.

Para algunas aplicaciones, preferentemente el constructo de la presente invención comprende por lo menos la secuencia nucleotídica descrita en la presente memoria, operativamente ligada a un promotor.

Células hospedadoras

La expresión “célula hospedadora”, en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprenda ya sea la secuencia nucleotídica o un vector de expresión como se describió anteriormente y que se utiliza en la producción recombinante de un factor de transcripción que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o en los procedimientos de la presente invención.

De este modo, otra forma de realización de la presente invención proporciona células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia nucleotídica que expresa los factores de transcripción descritos en la presente memoria. Se seleccionarán las células que sean compatibles con dicho vector y pueden ser por ejemplo procarióticas (por ejemplo bacterianas), células micóticas, de levaduras o vegetales. Preferentemente, las células hospedadoras no son células humanas.

En otra forma de realización, la invención proporciona una célula hospedadora generada por el procedimiento de la invención, es decir, que comprende un gen que codifica una POI operativamente unida bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR en la que dicha célula hospedadora comprende además una modificación genética en la expresión o actividad del PntR.

Los ejemplos de organismos hospedadores adecuados son las células micóticas que incluyen hongos filamentosos.

La célula hospedadora puede ser una cepa insuficiente en proteasa o con menos proteasa, tal como las cepas insuficientes en *pep-* o *pvt-* proteasa en los *Aspergilli* (van den Hombergh, 1997, *Curr. Genet. Jul.*; 32(1):73-81).

El genotipo de la célula hospedadora puede estar modificado para mejorar la expresión.

Los ejemplos de modificaciones de células hospedadoras incluyen la deficiencia en proteasa, la desrepresión del catabolito de carbono, la complementación de los ANRt raros y la modificación del potencial reductor en el citoplasma para mejorar la formación del enlace disulfuro.

Organismo

El término “organismo” en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pudiera comprender la codificación de la secuencia nucleotídica para los factores de transcripción descritos en la presente memoria y/o los productos obtenidos de la misma, y/o en el que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica descrita en la presente memoria cuando está presente en el organismo. Además el término organismo se extiende a un organismo generado según el procedimiento de la invención, es decir, modificado para expresar una POI a concentraciones aumentadas.

Los organismos adecuados pueden incluir un hongo. Otros organismos adecuados pueden incluir células de levadura o vegetales.

La expresión “organismo transgénico” en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprenda la secuencia nucleotídica que codifica los factores de transcripción descritos en la presente memoria y/o los productos obtenidos a partir de los mismos, y/o en el que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica descrita en la presente memoria en el organismo. Preferentemente la secuencia nucleotídica está incorporada en el genoma del organismo.

La expresión “organismo transgénico” no comprende las secuencias de codificación del nucleótido natural en su medio natural cuando están bajo el control de su promotor natural que está también en su medio natural.

Por consiguiente el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende cualquiera de las secuencias nucleotídicas o las combinaciones de las mismas, que codifica los factores de transcripción descritos en la presente memoria, constructos según la presente invención, vectores según la presente invención, plásmidos según la presente invención, células según la presente invención, tejidos según la presente invención o los productos de los mismos.

Por ejemplo el organismo transgénico puede comprender además la secuencia nucleotídica que codifica el factor de transcripción (mencionado en la presente memoria) bajo el control de un promotor heterólogo.

Transformación de células hospedadoras/organismo

Como se indicó al principio, el organismo hospedador puede ser un organismo eucariótico y, en particular un hongo. Son particularmente preferidos los hongos filamentosos. Los ejemplos de tales hospedadores adecuados incluyen cualquier miembro que pertenezca a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y similares.

Las células de hongos filamentosos pueden transformarse utilizando varios procedimientos conocidos en la materia, tales como los procedimientos que conllevan formación de protoplasto y transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular de manera conocida. La utilización de *Aspergillus* como microorganismo hospedador se describe en el documento EP 0 238 023. Lo dado a conocer sobre la transformación de hongos filamentosos se revisa también en el documento US-A-5.741.665 que expone que las técnicas convencionales para la transformación de hongos filamentosos y el cultivo de los hongos son bien conocidos en la técnica. Un estudio extenso de técnicas aplicadas a *N. crassa* se encuentra por ejemplo en Davis y de Serres, *Methods Enzymol.* (1971) 17A:79-143. Además lo dado a conocer sobre la transformación de hongos filamentosos se revisa en el documento US-A-5.674.707.

En un aspecto, el organismo hospedador puede ser del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

Los marcadores adecuados para la transformación incluyen pero no se limitan a los genes con resistencia que codifican la ornitina carbamoiltransferasa, argB y orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa pyrG.

Un *Aspergillus* transgénico según la presente invención puede prepararse también siguiendo, por ejemplo, lo dado a conocer por Turner G. 1994 (Vectors for genetic manipulation. En: Martinelli S.D.; Kinghorn J.R.(Editores) *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology* vol. 29. Elsevier Amsterdam 1994. páginas 641-666). Los hongos filamentosos pueden transformarse también utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Gouka et al., 1999, *Nat. Biotech*) La expresión génica en hongos filamentosos ha sido estudiada en Punt et al. (2002) *Trends Biotechnol.* mayo 2002; 20(5):200-6, Archer y Peberdy *Crit. Rev. Biotechnol.* (1997) 17(4):273-306.

Cultivo y producción

Las células hospedadoras transformadas con la secuencia nucleotídica, descrita en la presente invención pueden cultivarse en condiciones conducentes a la producción de una POI y que facilitan la recuperación de la POI de las células y/o del medio de cultivo.

Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento de expresión de una POI que puede formar parte de un procedimiento de producción de dicha POI y además comprenden el aislamiento y/o la purificación de dicha POI.

El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de la célula hospedadora en cuestión y obtener la expresión de la enzima.

La proteína producida por una célula recombinante puede presentarse sobre la superficie de la célula.

La POI puede segregarse en las células hospedadoras y puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo utilizando procedimientos muy conocidos.

Secreción

Puede ser deseable para la POI que va a ser segregada del hospedador de expresión en el medio de cultivo desde donde la POI puede recuperarse más fácilmente. Según la presente invención, la secuencia principal de secreción puede seleccionarse basándose en el hospedador con la expresión deseada. Pueden utilizarse también secuencias de señal híbridas en el contexto de la presente invención.

Los ejemplos típicos de secuencias principales de secreción heterólogas son las que se originan a partir del gen de amiloglucosidasa (AG) de hongos (*claA* - ambas versiones de los aminoácidos 18 y 24 por ejemplo de *Aspergillus*), el gen del factor a (levaduras por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de α -amilasa (*Bacillus*).

A título de ejemplo, la secreción de proteínas heterólogas en *E. coli* se estudia en *Methods Enzymol.* (1990) 182:132-43.

Detección

Varios protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácidos son conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen el ensayo inmunsorbente con enzima ligada (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA) y clasificación de células fluorescentes activadas (FACS).

Una extensa variedad de marcadores y de técnicas de conjugación son conocidas por expertos en la materia y pueden utilizarse en varios análisis de ácidos nucleicos y aminoácidos.

Numerosas compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran kits comerciales y protocolos para estos procedimientos.

Las moléculas o marcadores indicadores adecuados incluyen los radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromógenos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que dan a conocer la utilización de dichos marcadores incluyen US-A-3.817.837; US-A-3.850.752; US-A-3.939.350; US-A-3.996.345; US-A-4.277.437; US-A-4.275.149 y US-A-4.366.241.

Además, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes como se muestra en el documento US-A-4.816.517.

Proteínas de fusión

Las secuencias de aminoácidos para su utilización según la presente invención así como la POI producida según la invención pueden producirse como proteínas de fusión, por ejemplo, para ayudar a la extracción y purificación. Los ejemplos de acompañantes de la proteína de fusión incluyen la glutathion-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión del ADN y de activación de la transcripción) y (β -galactosidasa). Puede ser conveniente incluir una zona de fusión proteolítica entre el acompañante de la proteína de fusión y la secuencia de proteínas de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión.

Preferentemente, la proteína de fusión no impedirá la actividad de la secuencia de proteínas aunque en una forma de realización resulta preferida una estrategia del factor de transcripción negativo dominante.

Se han estudiado sistemas de expresión de fusión génica de *E. coli* en *Curr. Opin. Biotechnol.* (1995) 6(5):501-6.

En otra forma de realización de la invención, la frecuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para el cribado de bancos de péptidos para agentes capaces de afectar la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia híbrida que expresa un epítipo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo comercializado.

En una forma de realización de la presente invención el terminal C de una POI está fusionado, por ejemplo a una proteína muy segregada, tal como una glucoaminasa, xilanasas o endoglucanasa o a partes de las mismas para mejorar el rendimiento de la producción de la proteína heteróloga.

El PntT puede modificarse también en una estrategia negativa dominante utilizando un banco de péptidos, por ejemplo.

Secuencias adicionales

Las secuencias para su utilización según la presente invención pueden utilizarse también junto con una o más proteínas de interés (POI) o secuencias nucleotídicas de interés (NOI) adicionales.

Los ejemplos no limitativos de POI incluyen: proteínas o enzimas implicadas en el metabolismo del xilano o la celulosa o combinaciones de las mismas. Otras POI adecuadas incluyen pero no se limitan a fitasa, lipasa, amilasa, o proteínas de interés de mamíferos, tales como anticuerpos humanos, el activador del plasminógeno tisular e interleucinas. La NOI puede ser incluso una secuencia complementaria para cualquiera de las secuencias.

Otras secuencias pueden facilitar también la secreción o aumentar el rendimiento de la POI segregada. Dichas frecuencias codificarían las proteínas de chaperona como por ejemplo el producto del gen *cyp B* de *Aspergillus niger* descrito en la solicitud de patente UK 9821198.0.

La codificación de NOI para POI puede modificarse genéticamente para alterar su actividad por numerosas razones, incluyendo pero sin limitarse a, alteraciones, que modifican el tratamiento y/o la expresión del producto de expresión de los mismos. A título de ejemplo adicional, la NOI puede modificarse también para optimizar la expresión en una célula hospedadora específica. Otros cambios de secuencia pueden ser deseados con objeto de introducir las zonas de reconocimiento de la enzima de restricción.

La NOI que codifica la POI puede incluir en ella nucleótidos sintéticos modificados, tal como los ejes centrales de fosfonato de metilo y fosforotioato.

La NOI que codifica la POI puede modificarse para aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias de flanqueamiento de los extremos 5' y/o 3' de la molécula o la utilización de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de los enlaces de fosforodiéster en el eje central de la molécula.

Anticuerpos

En la presente memoria se han mencionado aminoácidos que son inmunológicamente reactivos con el aminoácido de algunas de la SEC. ID. n° 2, n° 4 o n° 6.

Los anticuerpos pueden producirse por técnicas convencionales, tal como inmunización con las sustancias mencionadas en la presente memoria o utilizando un banco de presentación de fagos.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique lo contrario, incluye pero no se limita a, la cadena policlonal, monoclonal, híbrida, individual, fragmentos de Fab producidos por un banco de expresión de Fab, así como miméticos de los mismos. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión para una sustancia diana, Fv, F(ab') y F(ab')₂ así como anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas de síntesis que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de la sustancia, son especialmente preferidos para diagnósticos y productos terapéuticos.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc.), con la frecuencia descrita en la presente memoria (o una secuencia que comprende un epítipo inmunológico de la misma). Dependiendo de las especies de hospedador, pueden utilizarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica.

Se extrae suero del animal inmunizado y se trata según los procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales para la secuencia descrita en la presente memoria (o una secuencia que comprende un epítipo inmunológico de la misma) contiene anticuerpos para otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar antisueros policlonales son conocidas en la

técnica. Para que dichos anticuerpos puedan prepararse, la invención proporciona también polipéptidos descritos en la presente memoria o fragmentos de los mismos haptenizados a otro polipéptido para su utilización como inmunógenos en animales o seres humanos.

5 Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la secuencia descrita en la presente memoria (o una secuencia que comprende un epítipo inmunológico de la misma) pueden también ser producidos fácilmente por un experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma de Koehler y Milstein (1975 *Nature* 256:495-497), la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor *et al.*, (1983) *Immunol. Today* 4:72; Cote *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030) y la técnica de hibridoma con EBV (Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Rickman Liss Inc., páginas 77-96).

10 Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos híbridos”, el corte y empalme de genes de anticuerpo de ratón a genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con especificidad del antígeno apropiado y actividad biológica (Morrison *et al.*, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:6851-6855; Neuberger *et al.*, (1984) *Nature* 31:604-608; Takeda *et al.* (1985) *Nature* 314:452-454).

Alternativamente, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de US nº 4.946.779) para producir los anticuerpos monocatenarios específicos de la sustancia.

20 Pueden generarse también fragmentos de anticuerpo que contienen puntos de fijación específicos para la sustancia. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos de $F(ab')_2$ que pueden producirse por digestión de la pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse disolviendo los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, pueden construirse bancos de expresión Fab para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonal con la especificidad deseada (Huse W.D. *et al.*, (1989) *Science* 256:1275-1281).

Pueden utilizarse anticuerpos para modificar la función de PntR mediante la introducción de anticuerpos específicos para PntR en el hongo para -enmascarar su función.

30 *Aplicación a gran escala*

En una forma de realización preferida de la presente invención, se utilizan los procedimientos de la presente invención para aplicaciones a gran escala. En particular, los procedimientos de la presente invención pueden utilizarse para la producción a gran escala de enzimas tales como xilanasas para utilización industrial. Las POI de interés pueden ser anticuerpos humanos (Ward *et al.* 2004 *Appl. Environ. Microbiol.* v 70:2567-2576), lactoferrina (Ward *et al.* 1991 *Gene*, v 122:219-223), hormona del crecimiento, interleucina 6, superóxido-dismutasa (Davies R.W. en “Molecular Industrial Mycology systems and applications for filamentous fungi” (S.A. Leong y R.M. Berka, eds, páginas 45-58. Morris Bekker, Nueva York-Basilea-Hong Kong, 1991).

40 *Utilización de secuencias de PntR*

Como se indicó anteriormente, la identificación del represor de transcripción del PntR en diferentes especies permite que se generen células modificadas en las que la expresión del PntR es transgénica de modo que aumenta la expresión de los genes bajo el control de un promotor del XlnR. Por consiguiente, las secuencias del PntR pueden utilizarse en la identificación de medios adecuados de expresión transgénica.

De este modo, la presente invención se refiere además a la utilización de las secuencias nucleotídicas que codifican al PntR en la generación de vectores o sistemas para reducir o desactivar génicamente la transcripción de la expresión del PntR. Se describen vectores adecuados, por ejemplo, en el apartado Ejemplos en la presente memoria e incluyen sistemas para la recombinación homóloga para la alteración génica. Preferentemente, dichos constructos pueden introducir una variante del PntR que carece del grupo binuclear Zn_2Cys_6 .

55 Además, la presente descripción se refiere a la utilización de dichos vectores o sistemas de expresión en la generación de células hospedadoras que tienen niveles inferiores a los naturales de expresión del PntR y comprenden además genes que codifican una POI bajo el control del promotor del XlnR. Dichas células hospedadoras son útiles en la producción de proteínas.

60 Por consiguiente, la invención proporciona además una célula hospedadora que expresa una POI bajo la regulación del XlnR para producir una POI para su utilización en la preparación de un producto alimenticio.

65 *Alimento*

Los compuestos pueden utilizarse como alimento o en la preparación del mismo. En la presente memoria, el término “alimento” se utiliza en sentido amplio y comprende alimento y productos alimenticios para seres humanos así como alimento para animales (es decir, un pienso). En un aspecto preferido, el alimento es para el consumo humano.

El alimento puede estar en forma de solución o en forma sólida dependiendo de la utilización y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

5 *Ingredientes y complementos alimenticios*

Las POI pueden utilizarse como ingredientes alimenticios.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “ingrediente alimenticio” incluye una formulación, que es o puede añadirse a alimentos funcionales o comestibles e incluyen formulaciones que pueden utilizarse a bajas concentraciones en una amplia variedad de productos que requieren, por ejemplo, acidificación o emulsión.

El ingrediente alimenticio puede estar en forma de solución o en forma sólida, dependiendo de la utilización y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

15 Los compuestos pueden ser complementos alimenticios o pueden añadirse a los mismos.

20 *Alimentos funcionales y nutraceuticos*

Las POI pueden ser alimentos funcionales o pueden añadirse a los mismos.

25 Tal como se utiliza de la presente memoria, el término “alimento funcional” significa el alimento que puede proporcionar no solamente un elemento nutritivo y/o una satisfacción de sabor, sino que también puede proporcionar un efecto beneficioso adicional al consumidor.

Aunque no existe ninguna definición legal de alimento funcional, la mayoría de las partes interesadas en esta área están de acuerdo en que son los alimentos comercializados que presentan efectos saludables específicos.

30 *Productos alimenticios*

Las enzimas o POI producidas por el procedimiento mejorado de la presente invención pueden utilizarse en la preparación de productos alimenticios tal como uno o más de los siguientes: productos de confitería, productos lácteos, 35 productos cárnicos, productos de ave de corral, productos de pescadería y productos de panadería.

Para determinados aspectos, preferentemente el comestible es un producto de panadería, tal como pan, pastel danés, bizcochos o dulces.

40 La presente descripción proporciona también un procedimiento de preparación de un alimento o un ingrediente alimenticio, comprendiendo el procedimiento mezclar la POI producida por el procedimiento de la presente invención con otro ingrediente alimenticio. El procedimiento para preparar un ingrediente alimenticio es también un aspecto de la presente descripción.

45 *Industria papelera*

La xilanasas, incluyendo aquellas que están bajo el control del XlnR, pueden utilizarse para el blanqueo del papel. Además, pueden utilizarse otras POI tal como endoglucanasa en aplicaciones textiles.

50 *Productos farmacéuticos*

Pueden utilizarse las POI tales como antibióticos, por ejemplo, en productos farmacéuticos. Véase, por ejemplo, 55 Ward *et al.* 2004.

Técnicas generales de metodología de ADN recombinante

60 La presente invención utiliza, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, conocidas por cualquier experto en la materia. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Segunda edición, Tomos 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, caps. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Cabtree, y A. Khan, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M.J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y D.M.J. Lilley y J.E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

Ejemplos

La invención se ilustra a continuación con mayor detalle en los ejemplos no limitativos siguientes.

- 5 1. *Cepas de hongos y condiciones de crecimiento.* La cepa *pyr89 argB2* de *A. nidulans* se consiguió del Prof. C. Scazzocchio (Institut de Génétique et Microbiologie, Orsay, Francia). La cepa N402 de *A. niger* (*cspAI*) se adquirió en el TNO Nutrition and Food Research Institute (Países Bajos). Las cepas 1M-7, 4M-147 y 10M-61 de *A. tubingensis* eran de la colección Danisco de cultivos. Se mantuvieron las cepas en medio mínimo o completo.

- 10 El medio mínimo (MM) contenía (por cada 1 l) 1 g de NaNO_3 , 1,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de KCl , 0,5 g de MgSO_4 y 50 ml de oligoelementos según Vishniac y Santer, 1957 (10 g de EDTA, 4,4 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,32 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,22 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Se utilizó fructosa al 1% como fuente de carbono, a menos que se indique de otro modo. Para las cepas auxotrófas se añadieron los complementos necesarios requeridos: 10 mM de uridina y 2,5 mM de arginina. Para medio completo (MC), el medio
- 15 mínimo se enriqueció con 10 g de fructosa, 2 g de peptona, 1,5 g de casaminoácidos, 1 g de extracto de levadura y 10 ml de 100 x solución de vitaminas (50 mg de tiamina HCl, 10 mg de biotina, 100 mg de ácido nicotínico, 200 mg de pantotenato, 50 mg de piridoxina HCl, 100 mg de riboflavina, 500 mg de ácido para-aminobenzoico) esterilizado en filtro (Cove, 1966). Antes de la esterilización en autoclave, se ajustó el pH del medio a 5,5 para *A. tubingensis*, 6,0 para *A. niger*, 6,5 para *A. nidulans*. Para un medio sólido se añadió agar-agar al 3%. Se inocularon cultivos líquidos con 10^6 esporas/ml y se incubaron en un agitador rotatorio a 180-220 rpm. Se cultivó *A. nidulans* a 37°C, en tanto que las cepas de *A. tubingensis* y *A. niger* a 32°C. Todas las fermentaciones se realizaron en matraces.

Para las preparaciones de ADN se cultivaron cepas de hongos durante la noche en MC y se recogieron muestras de micelios en un embudo y se congelaron en nitrógeno líquido.

- 25 2. *Clonación de un gen pntR de *A. nidulans* y construcción del vector pPntRA-pyrG.* La zona que contiene un supuesto XlnR homólogo del contig 1.7 de *A. nidulans* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/index.html> posición 23984 a 26497 pb del contig) se amplió por PCR en el ADN genómico de *A. nidulans*. Para extraer el ADN de las muestras de micelios se molieron hasta polvo 0,2 g de biomasa congelada en nitrógeno líquido y se volvieron a poner en suspensión en 0,8 ml de tampón de extracción: Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, SDS al 1%, EDTA 1 mM. Después de 10 a 20 min. de incubación en hielo, se aisló ADN por un procedimiento de extracción convencional con fenol-cloroformo y, tras la precipitación con etanol, se volvió a poner en suspensión en 100-200 μl de H_2O seguido de tratamiento con 50 μg de ARNasa A (Qiagen) durante 15 min. a 37°C. Aproximadamente 50 a 100 mg del ADN genómico se utilizaron más adelante para ampliaciones por PCR. Todas las ampliaciones de PCR se realizaron con un
- 30 Expand High Fidelity PCR Amplification System (Roche) en un volumen total de 50 μl . La reacción contenía 5 μl de 10 x tampón Expand, 3,5 unidades de Taq y mezcla de Pfu ADN polimerasa, 200 μM de mezcla de dNTP, 50 ng de una plantilla de ADN y 40 pmoles de cada cebador de la secuencia siguiente:

- 40 R1.7 T40 5' GCGGGGAGCATAATATATACAGGTCCAGTT 3' y
R1.7 B3795 5' TGAATCTCGTCTTGGGAAGGATTCAAGATG 3'.

- 45 La ampliación se realizó utilizando el siguiente programa: 94°C durante 3 min., 30 ciclos de 94°C durante 45 s., 56°C durante 1 min. y 72°C durante 3 min. Se aplicó un ciclo de extensión adicional de 10 min. a 72°C. El producto de la PCR de 3,75 kb se purificó en un gel y se clonó en el vector pCR-Blunt II (Invitrogen) dando como resultado el plásmido pSFH1 (figura 1). Este fragmento comprende el supuesto ORF con las zonas adyacentes 5' y 3' de 0,75 y 0,5 kb, respectivamente (véase la SEC. ID. n° 1). La zona de codificación puede traducirse como un solo ORF sin codones de terminación. Sin embargo, en la base de datos de *A. nidulans* se anota que esta secuencia contiene un intrón, que no interrumpe el ORF. Este supuesto intrón puede predecirse por análisis informático, ya que ningún dato experimental en el ADNc del *pntR* ha estado disponible anteriormente.

Figura 1. Cartografía del plásmido pSFH1.

- 55 Los cebadores M13 directo (5' GTAAAACGGCCAG 3') e inverso (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') se utilizaron para comprobar la autenticidad de la secuencia y la orientación de la inserción clonada. El secuenciado del ADN se realizó en un analizador de secuencia ABI 3100 (Applied Biosystems) utilizando un kit de secuenciado de ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y 500 ng de una plantilla de 3,2 pmoles de cebadores.

- 60 En la segunda etapa, un fragmento genómico corriente arriba de 3,4 kb que solapa parcialmente la secuencia *pntR* se amplió por PCR en condiciones similares utilizando una combinación de los cebadores presentes a continuación:

- 65 R1.7 T Spe 603 5' GGACTAGTGCAGGATGATCGCATCGACAATTATATAAG 3' R1.7 B Nde
4008 5' AAAGTCTGGAAGGAATCAGGGAAAAGCAAG 3'.

El producto de PCR purificado se cortó con las enzimas de restricción *SpeI* y *NdeI*. Obsérvese que se introdujo la secuencia *SpeI* durante la ampliación. Se digirieron 2 a 3 μg del plásmido pSFH1 mencionado anteriormente con las mismas enzimas, se eluyó el vector de un gel de agarosa utilizando el kit para extracción en gel (Qiagen) y se ligó con el producto de la PCR utilizando un kit de ligadura rápido (Roche). La mezcla de ligadura se utilizó para transformar células competitivas TOP10 de *E. coli* (Invitrogen). Se seleccionaron transformados en placas LB con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina. Se cortaron 2 μg de vector resultante con las enzimas de restricción *NdeI* y *BstZ171* y se rellenaron con fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa I para generar extremos truncados. Se utilizó a continuación para insertar el fragmento de 1,9 kb que comprende el gen *pyrG* de *A. fumigatus*, que se aisló del plásmido pCDA21 (Chaverche *et al.*, 2000) mediante corte con *EcoRV*. Se comprobó la orientación de la inserción mediante las digestiones con *EcoRI* y *KpnI*. Una representación esquemática pPntR- Δ pyrG utilizada para eliminar la copia endógena del gen *pntR* en el genoma de *A. nidulans* está presente en la figura 2. En el constructo de eliminación el gen *pyrG* reemplaza 214 bp de la secuencia adyacente 5' corriente arriba del codón ATG y 301 pb de la parte de codificación incluyendo el grupo binuclear Zn_2Cys_6 , inactivando así el resto de la frecuencia, si alguna se expresa.

La figura 2 presenta una cartografía pPntR- Δ pyrG.

3. *Desactivación génica de pntR en A. nidulans*. Para eliminar el gen *pntR* endógeno, la cepa receptora *pyrG89 argB2* de *A. nidulans* se transformó por prototrofia para uridina con un fragmento lineal de 7,7 kb de longitud aislado tras la digestión de 10 μg del plásmido de pPntR- Δ pyrG con la enzima de restricción *EcoRV*. Alrededor de 1 a 3 μg del fragmento purificado en un gel de agarosa con un kit de extracción en gel (Qiagen) se consideró transformación. Se aplicó un procedimiento convencional de transformación de hongos (Tilburn *et al.*, 1983). En resumen, la cepa receptora se cultivó durante la noche en 400 ml de MM con 1% de glucosa y complementos a 25°C. Se recogió el micelio, se lavó con agua y 1 g se volvió a suspender en 10 ml de solución 1,2 M de MgSO_4 tamponada con fosfato-Na 10 mM, pH 5,8. El micelio se trató con 40-50 mg/ml de Glucanex (Laffort, Francia) sin purificar a 30°C con agitación suave. Después de 2-3 h de incubación, cuando pudo controlarse suficiente número de protoplastos después de un examen al microscopio, el micelio digerido se diluyó con el mismo tampón y se separaron los protoplastos durante la centrifugación con una capa de D-sorbitol 0,6 M tamponada con Tris-100 mM, pH 7,5. Los protoplastos recogidos de la interfase se lavaron con dos veces con solución 1,2 M de sorbitol que contenía Tris 10 mM, pH 7,5 y CaCl_2 10 mM (STC) y se volvieron a poner en suspensión en STC a la concentración de 10^7 - 10^8 /ml. Se incubaron en hielo 200 μl de la solución de protoplasto durante 20 min. con 1-3 μg del fragmento de ADN y 50 μl de solución al 60% de PEG 6000 que contenía Tris 10 mM pH 7,5 y CaCl_2 10 mM. Después de añadir 0,5 ml más de la misma solución de PEG, la mezcla se dejó a T ambiente durante 5 min. y se colocó en placas en MM con sacarosa 1 M y arginina como complemento. Se seleccionaron transformados para prototrofia para uridina. Después de 3 días de incubación a 37°C se obtuvieron alrededor de 100 a 150 transformados y se analizaron. El cribado inicial para un eliminador *pntR* se realizó en placas de ensayo con MM con 1% de cada fuente de carbono tal como se indica (figura 3). De cada 62 candidatos ensayados, 10 tenían alterado gravemente el crecimiento en L-arabinosa y retardaron ligeramente el crecimiento en D-galactosa (figura 3). Se analizó más la mejora de la actividad de β -xilosidasa en MM que contenía fructosa al 0,1% con L-arabinosa 10 mM y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 4-metil-umbeliferil- β -D-xilósido como sustrato. Todos presentaban fuerte fluorescencia a 254 nm, mientras que la cepa del receptor no.

La figura 3 presenta los resultados de un ensayo de crecimiento de uno de los eliminadores típicos de Δ pntR de *A. nidulans* (Δ pntR1) en comparación con la cepa receptora *pyrG89 argB2* (R) en MM con 1% de cada fuente de carbono como se indica.

Para comprobar, si el locus de *pntR* natural estaba alterado, se analizaron unos pocos transformados por análisis de inmunotransferencia Southern (Sambrook *et al.*, 1989J). Se cortaron 5-10 μg de ADN genómico aislado de diferentes transformados como se describió anteriormente con 50 U de la enzima de restricción *C/*al (Biolabs) durante 3 h y se separaron en un gel de agarosa al 0,7% en el tampón TBE. Se transfirieron las muestras digeridas a una membrana en nilón (Amersham) y se hibridaron con fragmentos de ADN marcado radiactivamente con P^{32} del gen *pntR*. Este fragmento se aisló cortando el plásmido pSFH1 con *EcoRI* y eluyendo el fragmento de 0,94 kb de longitud. Se marcaron 50 ng del fragmento con 50 μCi de P^{32} -dCTP utilizando un kit de cebado al azar (Stratagen). Como se observa en la figura 4 los transformados Δ pntR1, Δ pntR2, Δ pntR3, Δ pntR4 contenían solamente una banda del gen *pntR* de tamaño diferente, mientras que Δ pntR11 contenía además, la copia natural. El tamaño de la banda superior corresponde al esperado tras la inserción del gen *pyrG*. La cepa de desactivación génica Δ pntR1 se seleccionó para estudios adicionales.

La figura 4 muestra el análisis de transferencia Southern de los ADN genómicos de los transformados Δ pntR de *A. nidulans* digeridos con la enzima de restricción *C/*al. Las inmunotransferencias se soldaron con el fragmento 5' de *pntR* y se lavaron una vez con SSC, SDS al 0,1% a 60°C.

4. *Efecto de la eliminación de pntR sobre el nivel de expresión de carbohidrolasas extracelulares producidas por A. nidulans*. Para probar si el supuesto XlnR homólogo, PntR, afecta a la xilanasa y a la expresión de α -L-arabinofuranosidasa en *A. nidulans* se comprobó en el eliminador Δ pntR1 las correspondientes actividades en la inducción por D-xilosa o L-arabitol. Con este propósito, los cultivos de *A. nidulans* se precultivaron en primer lugar durante 16 h en MC, se lavó con H_2O y se transfirió 1 g de micelio húmedo en 100 ml de MM que contenía fructosa al 0,1% junto con el azúcar inductor (D-xilosa o L-arabinosa) o poliol (L-arabitol) a 10 mM de la concentración final, como se indica. Los cultivos sin inductor se utilizaron para controlar el nivel de referencia de la expresión. Se midieron las actividades extracelulares 9 y 24 h después de la transferencia. Se midieron las actividades de xilanasa y β -glucanasa

a 40°C mientras que las de α -arabino-furanosidasa y β -galactosidasa a 30°C. En todos los ensayos, se añadió una alícuota de las muestras de cultivo (20-200 μ l) a tampón acetato-Na 30 mM, pH 5,0 junto con un sustrato para dar 1 ml de un volumen final. Un comprimido de xilazima T-XYZ1000 (Megazyme) un comprimido de beta-glucanasa (Megazyme), 0,2 mg de p-nitrofenil- α -L-arabinofuranósido y 1 mg de o-nitrofenil- β -D-galactósido (Sigma) se utilizaron como sustratos para xilanasas, β -glucanasa, α -L-arabinofuranosidasa y β -galactosidasa, respectivamente. Se incubaron las reacciones enzimáticas durante varios períodos y se interrumpieron añadiendo 9 ml de Tris-Base 0,2 M (para xilanasas y β -glucanasa) o 0,5 ml de Na₂CO₃ 1 M (para α -L-arabinofuranosidasa y β -galactosidasa). Se midió la densidad óptica de las mezclas de reacción a 590, 405 ó 420 nm, respectivamente. Se expresaron las actividades en unidades de D.O. relativas, a menos que se especifique de otro modo.

Como se observa en la figura 5, la actividad absoluta de xilanasas fue 20 veces mayor en el eliminador Δ pntR1 en la inducción por L-arabitol que en la cepa receptora en D-xilosa. En esta última cepa la concentración de xilanasas fue insignificante en L-arabitol. Un efecto similar, pero menos pronunciado se observó sobre L-arabinosa (no representado pero realizado). En paralelo, la sobreexpresión de xilanasas fue seguida por una disminución ligera de actividad de α -arabinofuranosidasa. Se puede especular que el fenómeno observado puede explicarse por cambios en el metabolismo de L-arabinosa (supuestamente, dando como resultado concentraciones intracelulares elevadas de metabolito intermedio, L-arabitol, o del mismo). Esto conduce a capacidades de activación mayores del XlnR y, en consecuencia, activación de transcripción más eficaz de los genes bajo su control, tales como las xilanasas, evaluadas por análisis de transferencia Northern. El PntR afecta aparentemente de manera positiva a las α -arabinofuranosidasas así como a las enzimas responsables del metabolismo de la L-arabinosa.

La figura 5 muestra ensayos enzimáticos (parte superior) y análisis de la transcripción (parte inferior) del receptor (R) y de cepas (D1) eliminadoras de Δ pntR1 tras la inducción por 10 mM de D-xilosa o L-arabitol. Se tomaron muestras para análisis de xilanasas y aislamiento del ARN 9 h después de la transferencia, mientras que las mediciones de α -arabinofuranosidasa se realizaron 24 h después de la transferencia. Para el análisis de la xilanasas, se utilizaron 100 μ l de medio de cultivo en la reacción, que se incubó durante 10 min. Para la α -arabinofuranosidasa, se añadieron 200 μ l para dar un volumen final de 1 ml y la reacción se incubó durante 60 min. Aproximadamente 10 μ g del ARN total se cargaron por banda en una inmunotransferencia Northern y se hibridaron con tres sondas derivadas de xilanasas. La sonda *acnA* (γ -actina) se utilizó como referencia interna para normalizar la cantidad de ARN cargado. Se aislaron los ARN totales de muestras de los micelios utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor, desnaturizado con glioxal y se separaron en gel de agarosa al 1% tal como describe Sambrook *et al.* (1989). Se ampliaron las sondas de xilanasas por PCR procedentes del ADN genómico, como se describió anteriormente, utilizando cebadores específicos del gen:

XlnA T675 5' AATCTCTCCTAGTTCTCTGTTGCGCTGC 3' y
XlnA B1380 5' TACTCTGGTACCCCTCCGTTGCAACAAT 3';
XlnB T651 5' ATGGTCTCCTTCTCATCCCTTCTCCT 3' y
XlnB B1354 5' CGGTAATAGAAGCAGATCCACTGCTC 3';
XlnC T1053 5' TGATCTTTTGTGCGCGGCCGCAAAAT 3' y
XlnC B 1876 5' TGGCGTAGCTCGCAGAGTCCAGGCTAAT 3'.

La sonda de *acnA* se preparó a partir del fragmento *Bam*HI-*Kpn*I de 2,5 kb del plásmido pSF5 (Fidel *et al.* 1988). Se lavaron las transferencias con 1x SSC, SDS al 1,0% a 55°C.

Además, se midieron las actividades de L-arabinosa intracelular y D-xilosa reductasas, así como las de L-arabitol y D-xilitol deshidrogenasas, y se controló su transcripción.

5. *Clonación del homólogo de pntR procedente de A. niger.* La secuencia homóloga de *pntR* se clonó por ampliación por PCR del ADN genómico de *A. niger* 402 utilizando cebadores diseñados tras la alineación de las partes estructurales del gen *pntR* de *A. nidulans* y la secuencia equivalente de la base de datos *A. fumigatus*. Se aplicaron los cebadores siguientes:

PntR1.7 T104 5' GTGACTCTTGTCATGCTCGCCGCGTTTCGATGCGAC 3' y
PntR1.7 B6593 5' AGAGCCAACCCGGTTCCTTCCTTGTCAC 3'.

Las condiciones de la PCR fueron las mismas que las descritas anteriormente, excepto para la temperatura de hibridación de 54°C y 2 min. para el tiempo de ampliación. El producto de la PCR obtenido se clonó en el vector pCR4 TOPO según las instrucciones del suministrador (Invitrogen). Las células TOPIO de *E. coli* competitivas (Invitrogen) utilizadas para la transformación se colocaron en placas LB con 100 mg/ml de ampicilina para la selección del constructo apropiado. El plásmido final pPntR-AN14 se utilizó como plantilla para secuenciar la inserción genómica. La secuencia parcial del supuesto gen *pntR* de *A. niger* de 2,3 kb se creó a partir de los cebadores inverso y directo así como de los cebadores genéticos específicos:

PntR 1201 5' TGGAGTCGAGCTTGCCTCGAAAGC 3' y
PntR B 1500 5' CAGGAAGAAGCCGAAGATAGAG 3'.

ES 2 341 618 T3

La secuencia se presenta en la SEC. ID. n° 3. Obsérvese que faltan las partes que codifican el dominio de unión del ADN N-terminal y del terminal COOH. A diferencia de *A. nidulans*, el ORF del homólogo *pntR* de *A. niger* está interrumpido por un supuesto intrón desde la posición 1063 hasta 1115 pb, cuya posición fue pronosticada en virtud de las secuencias conservadoras encontradas en sus extremos 5' y 3'. Aunque la alineación de la secuencia presentaba 69% de identidad entre los dos genes, éstos no proporcionaron una señal obvia en las inmunotransferencias Southern durante la hibridación cruzada (figura 6). Sin embargo, el genoma de *A. tubingensis* contiene una secuencia relacionada con *pntR* muy similar a la de *A. niger*.

La figura 6 presenta inmunotransferencias Southern de los ADN genómicos de las cepas de *A. nidulans* (N), *A. niger* (402) y *A. tubingensis* (1 y 10). Se digirieron 5 a 10 µg de los ADN hasta la terminación con enzimas de restricción diferentes, como se indica, se separaron en un gel de agarosa al 0,7%, se transfirieron a una membrana de nilón (Amersham) y se hibridaron con la sonda *pntR* de *A. nidulans* o *A. niger*. El fragmento *SpeI-PstI* de 3 kb de longitud del plásmido pSFH1 sirvió como sonda de *A. nidulans* mientras que el fragmento *EcoRI* de 2,3 kb del plásmido pPntR-AN14 se utilizó como sonda de *A. niger*. Ambas sondas comprenden principalmente la parte estructural de los correspondientes genes *pntR*. Las inmunotransferencias se lavaron con 2x SSC y SDS al 0,1% a 55°C.

6. Clonación del gen *pntR* de *A. tubingensis*. La secuencia homóloga *pntR* de la cepa 4M-147 de *A. tubingensis* se clonó en el correspondiente banco genómico. Para construir dicho banco, se aisló el ADN genómico 4M-147 de *A. niger*, como se describió al principio, y se digirieron parcialmente 10 µg de ADN con *Tsp509I* (New England BioLabs). Los fragmentos de un tamaño comprendidos entre aproximadamente 5 y 10 kb se purificaron en un gel de agarosa al 0,7% utilizando el Gel Extraction Kit (Qiagen). Se ligaron 100 ng de los fragmentos en 1 µg del vector ZAP II digerido con *EcoRI* y desfosforilado (Stratagene) en un volumen total de 5 µl utilizando 2 unidades Weiss de T4 ADN ligasa (Roche). Se encapsularon 2 µl de la mezcla de ligadura en extracto de encapsulación Gigapack II (Stratagene) siguiendo las recomendaciones del proveedor. En total, se obtuvieron aproximadamente $6,5 \times 10^5$ pfu independientes en un banco primario utilizando la cepa XL1-Blue de *E. coli* como hospedador. Se ampliaron $2,5 \times 10^5$ pfu tal como se indica en el manual (Stratagene) para dar un valor de 3×10^8 pfu/ml con aproximadamente 6% sin inserciones.

De cada $3-5 \times 10^{-4}$ pfu probadas en un cribado primario, 20-25 dieron una señal positiva en la hibridación en filtro con el fragmento *EcoRI* de 2,3 kb marcado con P^{32} del plásmido pPntR-AN14, que contiene el gen *pntR* de *A. niger*. Cinco de ellos se purificaron en placas individuales y los ADN fagómidos correspondientes se aislaron utilizando un Rapid Excisión Kit (Stratagene). La secuencia de las inserciones se creó utilizando los cebadores inverso y directo así como el cebador específico para el gen *pntR*.

PntR1.7 B178: 5' AGAGCCATTTGGAAGTGGGCCAGACCCTGC 3'.

Por último, uno de los clones pPntR-AT12, que lleva el gen *pntR* de *A. tubingensis* con las zonas flanqueantes 5' y 3' mayores se secuenció parcialmente utilizando los oligonucleótidos siguientes:

PntR At T1: 5' GGCTAAGGACCGGTTCTTTTCGC 3';
PntR At B1: 5' GCCGATGGCCTGCGGATGCG 3';

La secuencia de los oligos PntR 1201 y PntR B1500 se presentó en el apartado anterior.

En total, se determinó una secuencia de 3.914 pb, que comprende la parte estructural completa del gen *pntR* flanqueada por 485 pb corriente arriba y 878 pb corriente abajo (vease la SEC. ID. n° 5). Como en *A. niger* la zona de codificación del gen *pntR* de *A. tubingensis* está interrumpida por un intrón, cuya posición relativa se conserva en el gen. Para comprobar, si la eliminación de *pntR* en *A. tubingensis* tiene un efecto beneficioso similar sobre la producción de xilanas como en *A. nidulans*, se alteró el gen correspondiente.

7. Alteración del gen *pntR* en la cepa 1M-7 de *A. tubingensis*. A diferencia de *A. nidulans*, donde se eliminó una parte de *pntR*, la copia endógena del gen *pntR* en *A. tubingensis* se interrumpió mediante la inserción del gen *hph* procedente de *E. Coli* que proporciona la resistencia de la célula micótica a la higromicina B. Un constructo para alteración se construyó clonando una parte de la zona de codificación *pntR* de *A. tubingensis*, que carece tanto del terminal N como del terminal C, en el plásmido pAN7-1. Este vector alberga el gen con resistencia a la higromicina B bajo el control del promotor *gpdA* (Punt y van den Hondel, 1992). En este caso, la recombinación homóloga en el fragmento *pntR* dio como resultado dos copias alteradas de *pntR*. Una estará truncada en el extremo 3', la otra en el extremo 5'.

Con este fin, el fragmento *pntR* desde 631 pb hasta 2.803 pb se amplió por PCR con ayuda de cebadores:

PntR T631 5' ATCGAGCCTTTCCCAGATCTCGCTGCCTTCGCAG 3' y
PntR BSa1 5' CGCTTGTCGACGCGCCGCTCTACAATCAGCAAGAGAAG 3'.

La reacción PCR se efectuó con 20 ng de plásmido pPntR-AT12 como plantilla y a 56°C como temperatura de hibridación durante 2 min. de tiempo de ampliación. El producto de la PCR (0,5 µg) se digirió con las enzimas de restricción *SaI* y *BglII* (10 unidades de cada una), las cuales se introdujeron en ambos terminales durante la ampliación. Se clonó a continuación en el vector pAN7-1 cortado por *XhoI* *BglII*. Estas digestiones eliminaron una parte del promotor *gpdA*, que continúa siendo, sin embargo, funcional. Se ligaron 0,2 µg del vector eluido y 0,3 µg de la inserción con 3 unidades Weiss de T4 ADN ligasa en un volumen total de 20 µl que contenía 10 µl de 2 x tampón de ligadura (Roche). La reacción de ligadura se transformó en células competitivas TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) colocadas en placas LB con 100 µg/ml de ampicilina. Una representación esquemática de constructo pAN7-ΔPntR para alteración se presenta a continuación (figura 7).

La figura 7 presenta una cartografía del plásmido pAN7-ΔPntR.

Este plásmido se utilizó para transformar la cepa 1M-7 de *A. tubingensis*. Las condiciones de transformación fueron similares a las utilizadas para *A. nidulans* con modificaciones menores como se indica a continuación. Las cepas 1M-7 se cultivaron durante la noche en MC y tras el tratamiento del micelio con 50 mg/ml de Glucanex (Laffort), los protoplastos recogidos se transformaron con 5 a 10 µg de plásmido pAN7-ΔPntR. Los transformados se seleccionaron en MM con 1 M de sacarosa y 100 µg/ml de higromicina B. En total, se obtuvieron 300-400 colonias resistentes, y entre 70 transformados analizados 25 eran positivos, según se interpreta por un ensayo de crecimiento en placa en L-arabinosa al 1% (figura 8). Los transformados sin crecimiento (15 probados) presentaban también una fluorescencia fuerte en placas con MM que contenían fructosa al 0,1% con L-arabinosa 10 mM y 10 µg/ml de 4-metil-umbeliferil-β-D-xilósido que indica regulación por incremento de β-xilosidasa. Se analizaron varios transformados por análisis de inmunotransferencia Southern para la alteración del locus de *pntR* natural en el genoma 1M-7 de *A. tubingensis*. En la figura 8 se presenta un modelo típico de hibridación. Se cortaron 5 µg de los ADN del receptor y los transformados Δ2 y Δ20 hasta la terminación con 50 unidades de *NcoI* y se sondaron con el fragmento de la PCR marcado con P³² del gen *pntR* desde 631 pb hasta 2.803 pb. Como cabía esperar, en inmunotransferencia Southern se observaron dos bandas resultantes de la integración del plásmido pAN7-ΔPntR en el locus de *pntR* de *A. tubingensis* a diferencia de una sola banda procedente de la muestra del receptor.

La figura 8 presenta los resultados de la prueba de crecimiento de 1M-7 de *A. tubingensis* transformado con el plásmido pAN7-ΔPntR en MC y MM con 1% de L-arabinosa (a la izquierda) y una inmunotransferencia Southern de las cepas eliminadoras Δ20 y 1M-7 (a la derecha). Se digirieron los ADN con *NcoI* y se sondaron con el fragmento *pntR* como se indica. Se presenta un esquema de integración homóloga del plásmido de alteración pAN7-ΔPntR.

8. *Producción mejorada de xilanasa y β-glucanasa en las cepas eliminadoras de ΔpntR de A. tubingensis.* Para comprobar el efecto de la alteración de *pntR* sobre la producción de proteínas, se cultivó *A. tubingensis* en diferentes condiciones de crecimiento y las actividades enzimáticas de numerosas proteínas extracelulares se midieron en líquidos de cultivo. En la primera serie de experimentos, se cultivaron cepas de *A. tubingensis* durante 40 h en MM con fructosa al 1% y extracto de levadura al 0,1% con o sin L-arabinosa 10 mM. En paralelo, se cultivaron o xilosa al 1% y extracto de levadura al 0,1%. Se consideró el medio que contenía fructosa pura como neutro, condiciones no provocadas, mientras que L-arabinosa o D-xilosa provocaron actividades extracelulares. La biomasa acumulada durante el cultivo era casi igual en todas las cepas. Se midieron las actividades como en el caso de *A. nidulans*, excepto para la xilanasa que se ensayó en fosfato-Na 0,2 M, tampón de ácido cítrico 0,1 M, pH 3,5.

Como se observa en la figura 9, las actividades tanto de xilanasa como de β-glucanasa aumentaron en el medio que contenía L-arabinosa. De hecho, el valor absoluto de la actividad de xilanasa fue 5 veces mayor en comparación con las condiciones de inducción de la xilosa. En paralelo, la actividad de la α-arabinofuranosidasa disminuyó casi 3 veces. Considerados en conjunto, estos resultados demuestran que desactivando génicamente el gen *pntR* tanto en *A. tubingensis* como en *A. nidulans* produce fenotipos exactamente idénticos y niveles de expresión mejorados de xilanasas y otros genes regulados por el XlnR, como β-xilosidasa y β-glucanasa, en condiciones de inducción de L-arabinosa. Además, las actividades del complejo degradador de L-arabinano son menos pronunciadas lo que puede ser beneficioso para las preparaciones de xilanasa utilizadas en aplicaciones industriales.

La figura 9 presenta las actividades de xilanasa (Xnl), β-glucanasa (Egl) y α-arabino furanosidasa (Abf) tras el cultivo del receptor 1M-7 de *A. tubingensis* y de las cepas D5 y D20 eliminadoras de *pntR* en fructosa al 1% + YE al 0,1%, fructosa al 1% + YE al 0,1% + L-arabinosa 10 mM y xilosa al 1% + YE al 0,1%. Se utilizaron 20 µl de muestras de cultivo para las mediciones tanto de xilanasa como β-glucanasa, mientras que para la α-arabinofuranosidasa se utilizaron 100 µl. Las reacciones se efectuaron durante 10 min. para la xilanasa y para la β-glucanasa α-arabinofuranosidasa. Las reacciones se prolongaron durante 10 min. para la xilanasa y la β-glucanasa y durante 60 min. para la α-arabinofuranosidasa. Las actividades se expresan en D.O.

En otro experimento, las cepas de *A. tubingensis* se fermentaron durante 4 a 6 días en un medio complejo utilizado en la industria con pulpa de remolacha azucarera al 3%, salvado de trigo al 3% y (NH₄)₂SO₄ al 0,17%, pH 3,5. Tras la fermentación, se midieron las actividades en muestras de fluido de cultivo (figura 10) de nuevo, las actividades de xilanasa y de β-glucanasa aumentaron 2 a 3 veces, mientras que α-arabinofuranosidasa y β-galactosidasa disminuyeron ligeramente. Estas condiciones son relevantes para la producción industrial de xilanasa o de proteínas heterólogas de la xilanasa o de cualquier otro promotor potente regulado por el XlnR en medio económico.

La figura 10 presenta las actividades de xilanasa (Xnl), β -glucanasa (Egl), α -arabinofuranosidasa (Abf) y β -galactosidasa (Bgal) tras el cultivo del receptor 1M-7 de *A. tubingensis* y de las cepas D2, D3, D5, D10, D12, D20, D22 eliminadoras de *pntR* en medio complejo con pulpa de remolacha azucarera. Se utilizaron 0,5 μ l de muestras de cultivo para las mediciones tanto de xilanasa como de β -glucanasa, mientras que para α -arabinofuranosidasa y β -galactosidasa se utilizaron 25 μ l. Las reacciones se efectuaron durante 10 m para todos los ensayos enzimáticos. Las actividades se expresan en D.O.

9. Efecto de una eliminación del gen que codifica el factor de transcripción PntR sobre el metabolismo y la expresión génica regulada por el XlnR

La figura 11 presenta un esquema de la serie de reacciones de arabinoxilano en hongos filamentosos y el efecto de una eliminación del gen que codifica el factor de transcripción PntR sobre el metabolismo y la expresión génica regulada por el XlnR.

AcE indica todas las enzimas accesorias necesarias para hidrolizar varios grupos con cadena lateral en arabinaxilano. XDC y ADC indican complejos degradadores de xilano y L-arabinano de enzimas extracelulares producidas por hongos filamentosos. Entre ellas se especifican las xilanasas (xlnA, xlnB y xlnC) y las L-arabino-furanosidasas (abfA y abfB). Los códigos XlnD para la beta-D-xilosidasa y Mst indican un transportador de monosacáridos. Esta etapa de reducción de la xilosa debe ser ejercida probablemente por más una reductasa conocida, XyrA. Una segunda supuesta reductasa inducida por xilosa, XyrB o una arabinosa-reductasa (ArrA) todavía desconocida podría estar implicada. El xilitol puede convertirse en al menos *T. reesei*, tanto por la xilitol-deshidrogenasa (XdhA) como por la L-arabitol-deshidrogenasa (LadA). Sin embargo, L-arabitol es oxidado exclusivamente por LadA.

La alteración de *pntR* (presentada con cruces) conduce al nivel de referencia de la transcripción de sus genes diana, incluyendo *ladA* dando como resultado una disminución de la actividad enzimática de LadA (mostrada por flechas hacia abajo), cesando de este modo el flujo metabólico corriente abajo. Esto da como resultado la mezcla elevada del L-arabitol intracelular, que activa directa o indirectamente XlnR que media la transcripción de *xlnA* y de otros genes.

10. Análisis de una estructura primaria del gen *pntR* y su secuencia de aa deducida procedente de diferentes *Aspergilli*

El análisis de las bases de datos de hongos disponibles hasta ahora demostraba que el *pntR* se encuentra principalmente en las especies de *Aspergillus*. La comparación del nucleótido de las zonas de codificación de *pntR* procedentes de cuatro especies de *Aspergillus* presentaba 58% de identidad. Excepto para *A. nidulans*, el *pntR* de las demás especies contiene un intrón. A nivel de proteínas, la homología es incluso mayor (70%) (véase la figura 12). La alineación demostró que las proteínas de *A. nidulans* y *A. fumigatus* están filogenéticamente más próximas entre sí que a *A. niger* y *A. tubingensis*. La homología dentro del dominio de unión del ADN y especialmente en la parte C-terminal es casi del 100%. El dominio de fijación del ADN determina la especificidad de su factor de transcripción. Basándose en la comparación con el motivo de fijación del ADN de XlnR, puede predecirse que PntR reconoce otras dianas de ADN. La función de la zona del terminal C conservadora no se conoce pero esta parte es la más similar al XlnR. Podría especularse que está implicada en una función similar, como por ejemplo, en la interacción con el inductor o en las interacciones intramoleculares en respuesta a la presencia del inductor, ya que ambos factores se forman para ser activados por L-arabitol. Otra zona conservadora típica para reguladores de hongos de una familia de proteínas con Zn₂Cys₆ que comprende el tramo EEHREERRRTWW se cartografió desde la posición de los aa 492 a 503. Los análisis del ADN completo y de las proteínas y las comparaciones se llevaron a cabo utilizando el paquete del programa Vector NTI9.

12. Expresión heteróloga de LacA de *b*-galactosidasa segregada bajo el control del promotor *xlnA* de *A. tubingensis* en *A. nidulans*

Para demostrar, si una eliminación de *pntR* proporciona un fondo apropiado para la expresión elevada de proteínas heterólogas, los autores utilizaron el gen *lacA* de *A. niger* que codifica una β -galactosidasa segregada como marcador indicador. Con esta finalidad, se construyó un vector de expresión en el que la expresión de *lacA* estaba controlada por el promotor *xlnA* de 1M-7 de *A. tubingensis* y las regiones del terminador. Para una secreción eficaz, la secuencia señal de *xlnA* se fusionó en el marco con la zona de codificación de *lacA*. A saber, el gen *lacA* de 3 kb fue ampliado por PCR en el ADN genómico de *A. niger* 402 utilizando los cebadores correspondientes:

LacA T131 5' CTAGTCTAGAGCCCTGTTGCAGAAATACGTCACTTGGGATG 3';
LacA B3031 5' TCCGCTCGAGCTAGTATGCACCCTTCCGCTTCTTGTACTT 3'.

El programa de ampliación por PCR fue idéntico al descrito en el Ejemplo 2. El producto purificado de la PCR se cortó en las enzimas de restricción XbaI y XhoI introducidas en ambos terminales durante la ampliación y se clonó utilizando procedimientos convencionales en los lugares correspondientes del vector de expresión pExpressS1. Este vector contiene la región de promotor de 1,1 kb, la secuencia que codifica el péptido señal y la zona terminadora de 0,78 kb del gen *xlnA* de *A. tubingensis* 1M-7 separado por un polienlazador. Una representación esquemática del plásmido de expresión pExSlac2 final se muestra en la figura 13.

Se transformaron 10 a 15 mkg de pExSlac2 conjuntamente con 0,5-2 mkg de pILJ 16 (Johnstone *et al.*, 1985) portador del gen *argB* de *A. nidulans* en la cepa de referencia de *A. nidulans* (*pyrG89 argB2 pPyrG*) y la cepa Δ pntR1 eliminadora (*pyrG89 argB2 pntRΔ::pyrG*). La transformación se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 3, pero se seleccionaron transformados en las placas con MM para prototrofia para arginina. Se identificó en transformados seleccionados al azar la actividad de b-galactosidasa en placas MM con D-xilosa 20 mM y Xgal al 0,005%. Las que formaron un color intenso, se ensayaron más en cultivos líquidos. Transformados de *A. nidulans* que integraban la cásete pExSlac2 se cultivaron durante 72 h en MM que contenía fructosa al 1% con L-arabinosa 10 mM y extracto de levadura al 0,2% o xilosa al 1% y extracto de levadura al 0,2%. La biomasa acumulada durante el cultivo era aproximadamente igual para todas las cepas. La actividad de β -galactosidasa en el medio de cultivo se midió con o-nitrofenil- β -D-galactósido como sustrato tal como se describe en el Ejemplo 4.

Como se observa en la figura 14, el nivel endógeno de b-galactosidasa continúa siendo despreciable en la cepa de *A. nidulans* de referencia en ambas condiciones de cultivo. Como cabía esperar, *lacA* fue inducida solamente por la D-xilosa en la cepa de referencia, mientras que la eliminación de *pntR* dio como resultado, además, la inducción pronunciada también por L-arabinosa. La variación en el nivel de actividad entre los transformados podría explicarse por un número de copias diferentes del vector de expresión o los puntos de su integración. Este ejemplo demuestra que *pntR* desactivado génicamente de forma significativa (3 a 5 veces) mejora la expresión específica para L-arabinosa de la b-galactosidasa de *A. niger* conducida por el promotor heterólogo *xlnA* de *A. tubingensis* 1M-7 en hospedador heterólogo *A. nidulans*.

La figura 14 representa la actividad extracelular de b-galactosidasa medida en el medio de cultivo de las cepas de referencia (Clac1, Clac2) de *A. nidulans* y eliminadora de *pntRΔ1* (DpntRLac1, DpntRLac2, DpntRLac3) que llevan el plásmido de expresión pExSlac2. La cepa no transformada (C) sirvió como referencia de la actividad endógena. Todas las cepas se cultivaron durante 3 días en fructosa al 1% + YE al 0,2% + L-arabinosa 10 mM y xilosa al 1% + YE 0,2%. 50 μ l de muestras de cultivo se utilizaron para análisis enzimático. Las reacciones se efectuaron durante 10 min. a 30°C. Las actividades se expresan en D.O.

La figura 15 presenta un esquema de la serie de reacciones de degradación de arabinoxilano en hongos filamentosos.

La figura 16 expone las SEC. ID nº 1 a nº 6.

Referencias

Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, y Davies RW. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus-nidulans*. *Gene*, v. 26:205-221

Punt P.J. y van den Hondel C.A.M.J.J. (1992). Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. *Meth. Enzymol.*, v. 216: 447-457.

Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*, N.Y.

Vishniac W, Santer M. (1957) The thiobacilli. *Bacteriol. Rev.*, v. 21: 195-213.

Contreras, R., Carrez, D., Kinghorn, J. R. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1991). Efficient kex2-like processing of a glucoamylase-interleukin 6 fusión protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin 6. *Bio/Technology*. v. 9: 378-381.

Cove D. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 113: 51-56.

Chaveroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. (2000). A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.*, v. 28 (22):E97.

Davies, R.W. (1994). Heterologous gene expression and protein secretion in *Aspergillus*. In *Aspergillus: 50 years on*. Edited by S.D. Martinelli y J.R. Kinghorn. v. 29:527-560.

Fidel S, Doonan JH, Morris NR. (1988). *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a gamma-actin. *Gene*, v. 70: 283-93.

Gouka RJ, Hessing JG, Punt PJ, Stam H, Musters W, Van den Hondel CA. (1996). An expression system based on the promoter región of the *Aspergillus awamori* 1,4-beta-endoxylanase A gene. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 46: 28-35.

Marui J, Kato M, Kobayashi T, Tsukagoshi N. (2003). Upregulation of promoter activity of the *Aspergillus oryzae* xylanase gene by site-directed mutagenesis. *Biotechnol Lett*. v. 25: 371-4.

de **Graaff LH**, van den **Broeck HC**, van **Ooijen AJ**, **Visser J**. (1994). Regulation of the xylanase-encoding xlnA gene of *Aspergillus tubigensis*. *Mol Microbiol.* v. 12: 479-90.

Van den **Hombergh**, JPTW., van de **Vondervoort**, PJ., **Fraissinet-Tachet**, L y **Visser J**. (1997). *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *TIBTECH.* v. 15: 256-263.

Hessing JG, van **Rotterdam C**, **Verbakel JM**, **Roza M**, **Maat J**, van **Gorcom RF**, van den **Hondel CA**. (1994). Isolation and characterization of a 1,4-beta-endoxylanase gene of *A. awamori*. *Curr Genet.* v. 26: 228-32.

Prathumpai W, **McIntyre M**, **Nielsen J**. (2004). The effect of CreA in glucose and xylose catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 63: 748-53.

Orejas M, **MacCabe AP**, **Perez-Gonzalez JA**, **Kumar S**, **Ramón D**. (2001). The wide-domain carbon catabolite repressor CreA indirectly controls expression of the *Aspergillus nidulans* xlnB gene, encoding the acidic endobeta-(1,4)-xylanase X(24). *J Bacteriol.* v. 183: 1517-23.

Gouka RJ, **Stam H**, **Fellinger AJ**, **Muijsenberg RJ**, van de **Wijngaard A**, **Punt PJ**, **Musters W**, van den **Hondel CA**. (1996). Kinetics of mRNA and protein synthesis of genes controlled by the 1,4-beta-endoxylanase A promoter in controlled fermentations of *Aspergillus awamori*. *Appl Environ Microbiol.* v. 62: 3646-9.

Gielkens MM, **Dekkers E**, **Visser J**, de **Graaff LH**. (1999). Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl Environ Microbiol.* v. 65: 4340-5.

Hasper AA, **Visser J**, de **Graaff LH**. (2000). The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Mol Microbiol.* v. 36: 193-200.

Hasper AA, **Trindade LM**, van der **Veen D**, van **Ooyen AJ**, de **Graaff LH**. (2004). Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from *Aspergillus niger*. *Microbiology.* v. 150: 1367-75.

Johnstone, I.L., **Hughes, S.G.**, y **Ciutterbuck, A.J.** (1985). Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* v. 4:1307-11.

Nikolaev I, **Mathieu M**, van de **Vondervoort P**, **Visser J**, **Felenbok B**. (2002). Heterologous expression of the *Aspergillus nidulans* alcR-alcA system in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol.* v. 37: 89-97.

Mathieu M, **Felenbok B**. (1994). The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator. *EMBO J.* v. 13: 4022-7.

Orejas M, **MacCabe AP**, **Perez González JA**, **Kumar S**, **Ramón D**. (1999). Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *Mol Microbiol.* v. 31: 77-84.

de **Vries RP**, **Visser J**, de **Graaff LH**. (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res Microbiol.* v. 150: 281-5.

Xiong H, **Turunen O**, **Pastinen O**, **Leisola M**, von **Weymarn N**. (2004). Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 64: 353-8.

MacCabe AP, **Orejas M**, **Perez-Gonzalez JA**, **Ramón D**. (1998). Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *J Bacteriol.* v. 180: 1331-3.

Prathumpai W, **Gabelgaard JB**, **Wanchanthuek P**, van de **Vondervoort PJ**, de **Groot MJ**, **McIntyre M**, **Nielsen J**. (2003). Metabolic control analysis of xylose catabolism in *Aspergillus*. *Biotechnol Prog.* v. 19: 1136-41.

Rose SH, y van **Zyl WH**. (2002). Constitutive expression of the *Trichoderma reesei* beta-1,4-xylanase gene (xyn2) and the beta-1,4-endoglucanase (egl) in *Aspergillus niger* in molasses and defined glucose media. *Appl. Microbiol Biotechnol.* v. 58: 461-8.

Vavilova EA, **Antonova SV**, **Barsukov ED**, **Vinetskii IuP**. (2003). Mechanism of overproduction of secreted enzymes in the mycelial fungus *Penicillium canescens*. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* v. 39: 284-92 (russ).

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 fusión. *Bio/Technology.* v. 8: 435-438.

5 Varias modificaciones y variaciones de los procedimientos descritos y del sistema de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia sin apartarse del alcance de la presente invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con formas de realización específicas preferidas, debe sobreentenderse que la invención tal como se reivindica no se debería limitar indebidamente a dichas formas de realización específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en biología molecular o en campos relacionados se pretende que estén comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Constructo de ácido nucleico dispuesto para reducir la expresión o función del factor de transcripción regulador de la pentosa (PntR); en el que dicho constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un PntR funcionalmente alterado, y en el que dicho constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al PntR y que carece de la región que codifica a Zn₂Cys₆.

2. Constructo de ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende la totalidad o un fragmento eficaz de una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las siguientes:

- a) una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica un factor de transcripción PntR que comprende una secuencia nucleotídica que es la misma que, o es complementaria de, o contiene cualesquiera sustituciones en el codón adecuadas para cualquiera de las de SEC. ID. n° 1, n° 3 o n° 5 o comprende una secuencia que presenta por lo menos 60% de homología de secuencia con cualquiera de las SEC ID n° 1, n° 3 o n° 5;
- b) una secuencia aislada de ácido nucleico según a) que codifica un polipéptido del factor de transcripción PntR que comprende la secuencia de aminoácidos representada en cualquiera de las SEC. ID. n° 2, n° 4 o n° 6 o una secuencia que presenta por lo menos 75% de identidad a éstas;
- c) una secuencia aislada de ácido nucleico según b) que se obtiene a partir de una célula de *Aspergillus*, *Trichoderma* o *Penicillium*-, y
- d) una secuencia aislada de ácido nucleico según c) que se obtiene a partir de una célula de *Aspergillus*.

3. Plásmido o sistema de vector que comprende un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2.

4. Procedimiento de alteración de la expresión de PntR en una célula que comprende introducir un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2 o un plásmido o sistema de vector según la reivindicación 3 en dicha célula.

5. Célula hospedadora transformada o transfectada con un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2 o un plásmido o sistema de vector según la reivindicación 3.

6. Célula hospedadora según la reivindicación 5, que comprende además un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de una proteína de interés (POI) bajo el control de la transcripción de un promotor regulado por el XlnR.

7. Célula hospedadora según la reivindicación 5 ó 6, en la que dicha célula hospedadora se selecciona de entre el grupo constituido por *Aspergillus sp.*, *Trichoderma* y *Penicillium sp.*

8. Célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que puede producir una xilanasa extracelular.

9. Célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que dicha célula es deficiente en proteasa.

10. Célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que dicha célula presenta un bloque en el metabolismo de L-arabinosa.

11. Célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en la que dicha célula presenta una actividad de xilanasa aumentada.

12. Célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en la que dicha célula resulta útil para la producción de una POI.

13. Procedimiento de expresión en una célula hospedadora de una POI cuya secuencia de codificación está bajo el control de transcripción de un promotor regulado por el XlnR, comprendiendo dicho procedimiento reducir la expresión o actividad del factor de transcripción PntR en dicha célula hospedadora; en el que dicho procedimiento comprende utilizar una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende las etapas que consisten en proporcionar una célula hospedadora deficiente en PntR que comprende el gen que codifica la POI bajo control transcripcional del XlnR y cultivar la célula hospedadora en condiciones apropiadas.

15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, en el que el PntR presenta una secuencia de ácido nucleico como se expone en cualquiera de las SEC. ID. n° 1, n° 3 o n° 5 o una secuencia que presenta más de 60% de identidad a éstas.

ES 2 341 618 T3

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la POI es una POI cuya secuencia de codificación está naturalmente bajo control transcripcional de un promotor regulado por el XlnR en una célula madre de la célula hospedadora.

5 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la POI es una POI cuya secuencia de codificación no está naturalmente bajo control transcripcional de un promotor regulado por el XlnR en una célula madre de la célula hospedadora.

10 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que la célula hospedadora es una célula fúngica filamentosa.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicha célula hospedadora es una célula hospedadora de *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium spp.*

15 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, en el que dicho procedimiento de expresión de POI forma parte de un procedimiento de producción de dicha POI y comprende además aislar/purificar dicha POI.

20 21. Procedimiento de producción de una POI, que comprende la expresión en una célula hospedadora de una POI cuya secuencia de codificación está bajo el control transcripcional de un promotor regulado por el XlnR, comprendiendo dicho procedimiento reducir la expresión o la actividad del factor de transcripción PntR en dicha célula hospedadora; en el que dicha célula hospedadora es una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12.

25 22. Utilización de la reducción en la expresión o la actividad del factor de transcripción PntR en la preparación de una célula hospedadora para aumentar la expresión de una proteína de interés (POI) cuya secuencia de codificación está bajo el control transcripcional de un promotor regulado por el XlnR; en la que se utiliza un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2 en la preparación de la célula hospedadora.

30 23. Utilización de una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 para la preparación de un producto alimenticio.

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

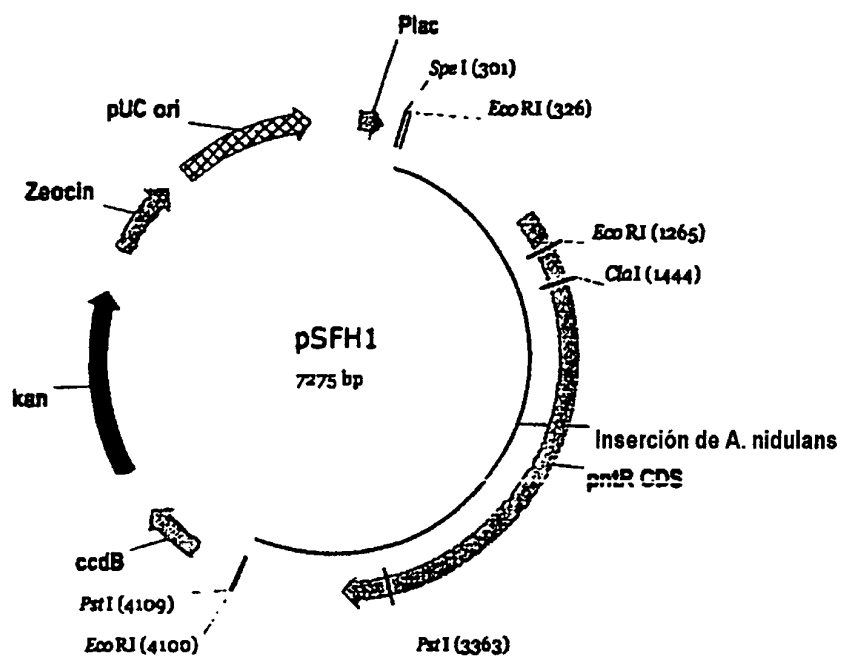


FIGURA 2

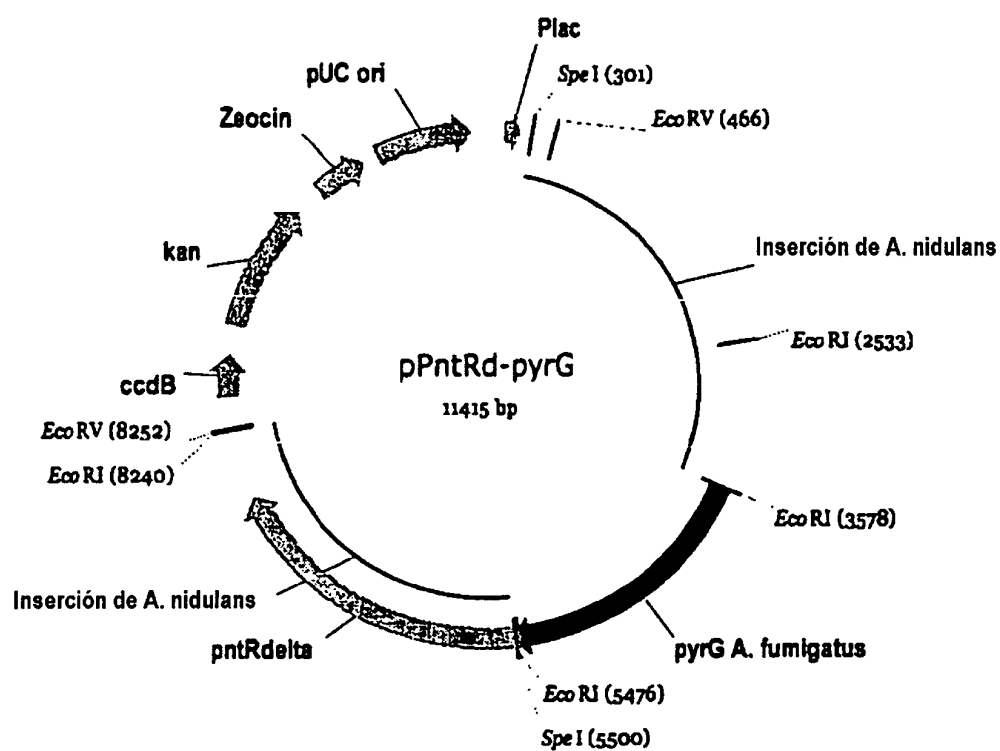


FIGURA 3

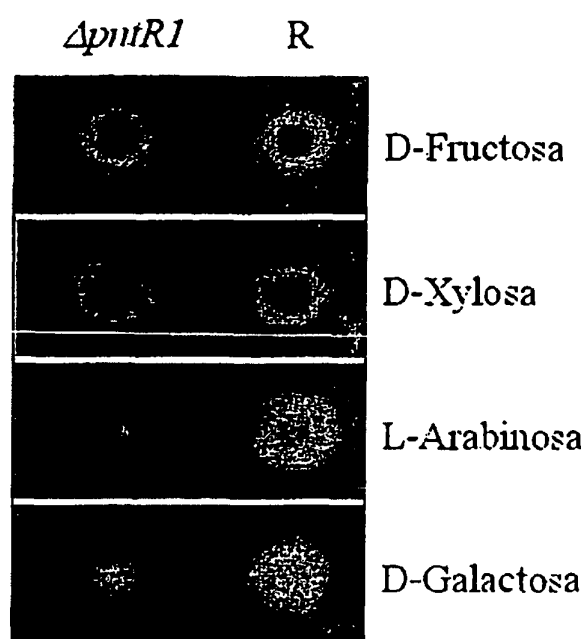


FIGURA 4

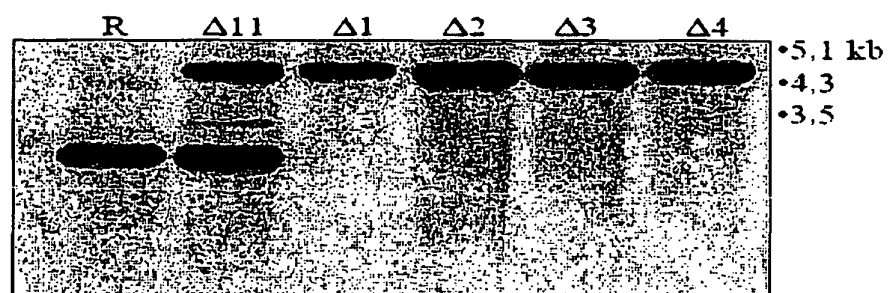


FIGURA 5

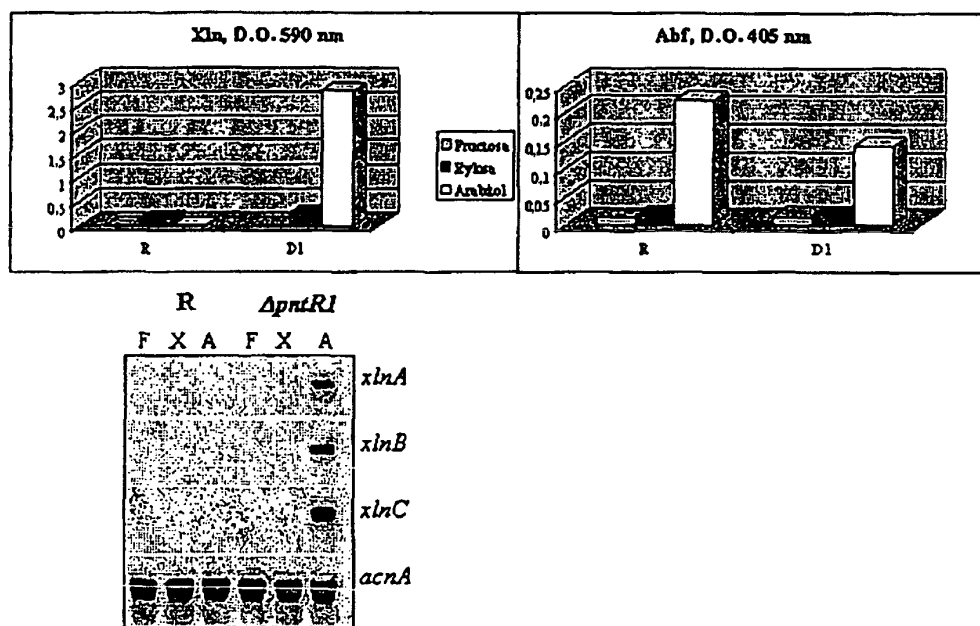


FIGURA 6

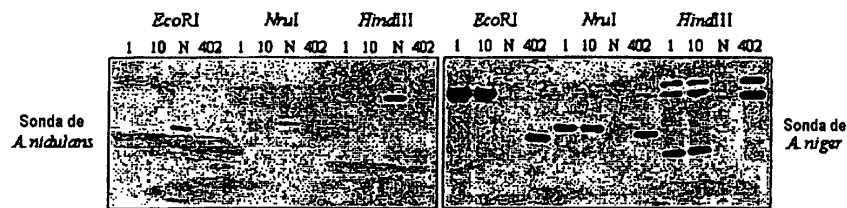


FIGURA 7

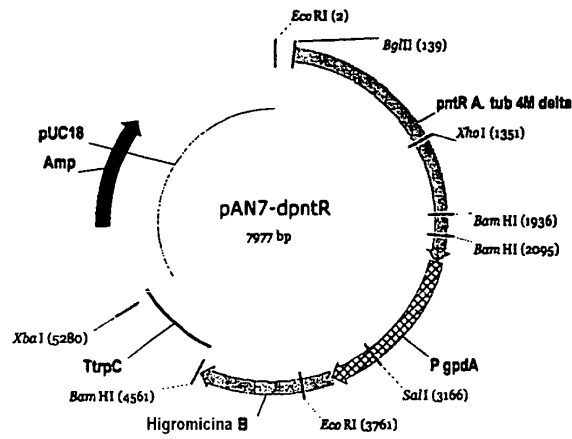


FIGURA 8

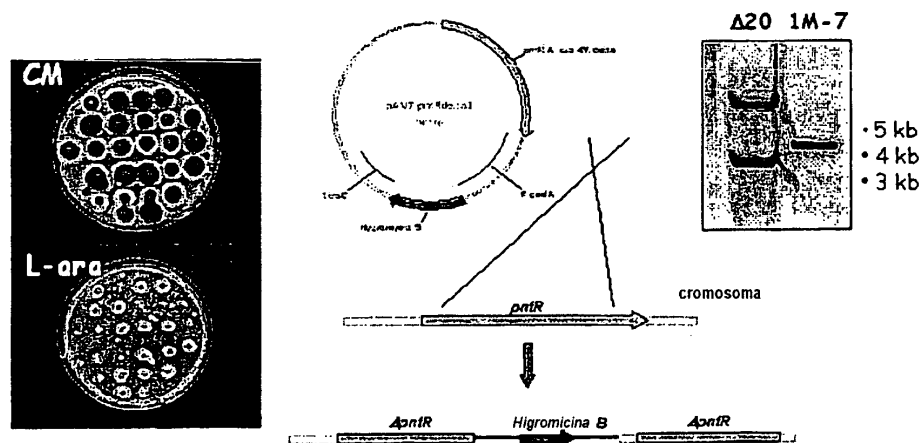


FIGURA 9

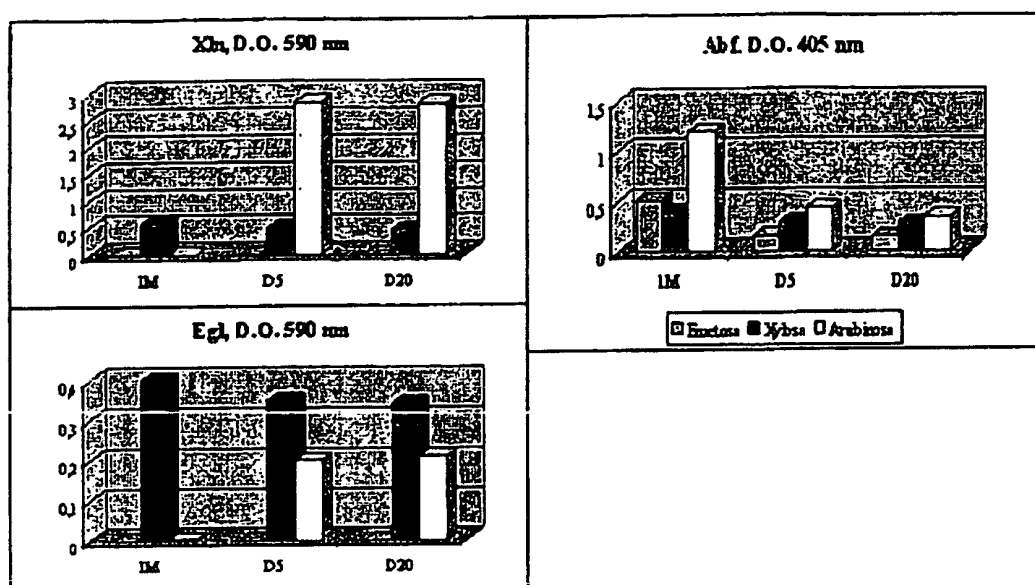


FIGURA 10

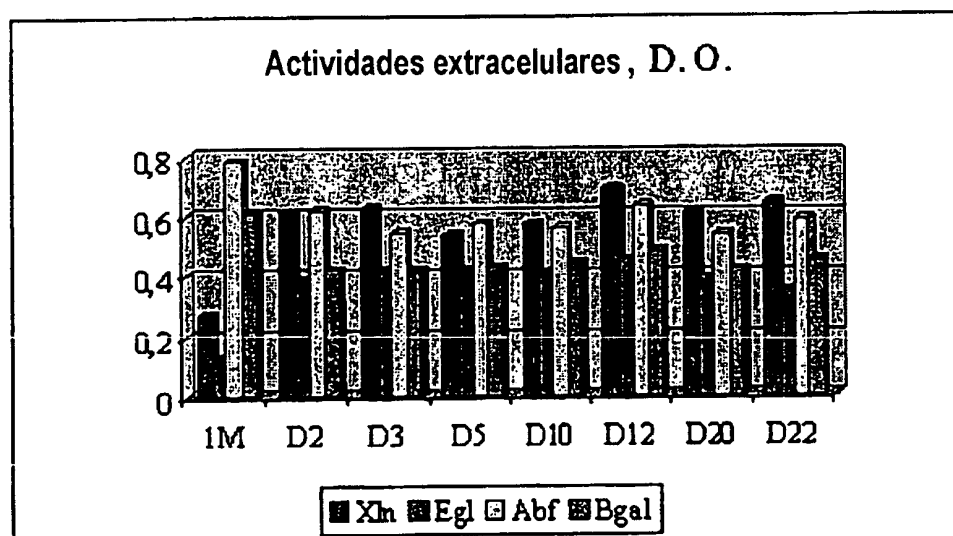


FIGURA 11

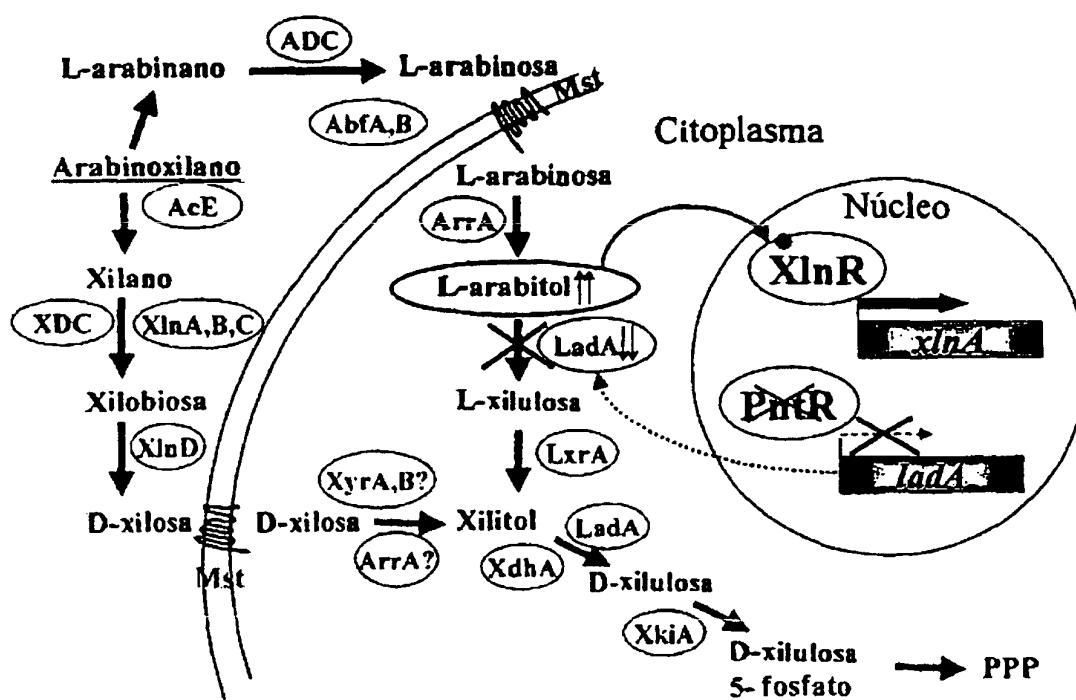


FIGURA 12

	(1)	1	10	20	30	40	50	60
PntR A. fumigatus	(1)	MDFAQPEDAPP	STNTAGT	LEDSSSLAKRRWRNRRTAGDSCHSRVRCDRAFP	CSRGLRS			
PntR A. nidulans	(1)	MASHQGN	---	LVENSQINAPPD	STKRRWRNRRTAGDSCHARRVRCD	QFLCSRGLRS		
PntR A. niger	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LR
PntR A. tub 4M	(1)	MDTAQSCDAQASSV	PAATE	PTGCA	STKRRWRNRRTAGDSCHSRVRCDRAFP	CSRGLRS		
	(61)	61	70	80	90	100	110	120
PntR A. fumigatus	(61)	EIRCEFTRE	RRKRGRIARS	Q	TATV	PNGSSMEKLPKAPNV	QPPVPA	AVPADAPT
PntR A. nidulans	(58)	EITCEFTRE	RRKRGRIARS	ILAP	IAKNMET	SETAPAKIMNGI	PAPAGTE	IPGHVS
PntR A. niger	(4)	EIRCEFTRE	RRKRGRIARS	---	---	---	---	---
PntR A. tub 4M	(61)	EIRCEFTRE	RRKRGRIARS	---	---	---	---	---
	(121)	121	130	140	150	160	170	180
PntR A. fumigatus	(121)	ASPT	ISFQHRSPATN	ENTVSAHS	SDRRSQADPS	LPARR	PEPTIGN	TEEWLSAHVSPDS
PntR A. nidulans	(115)	---	PASTFHHRSP	PANAPT	VSAS	MDGRRSQ	TDLPVRE	PEIGGNTEEWLAGTHVSPGS
PntR A. niger	(58)	GSPS	IFHHRSPATND	VTGSAES	SDRRSQADV	SLPERK	SGHTV	NATEEWLAGTHVSPGS
PntR A. tub 4M	(115)	GSPS	IFHHRSPATND	VTGSAES	SDRRSQADV	SLPERK	SGHTV	NATEEWLAGTHVSPGS
	(181)	181	190	200	210	220	230	240
PntR A. fumigatus	(181)	YEVL	GGAWG	---	GPLPR	LDI	WNGADLAGYS	AFIVQSSKPAGAA
PntR A. nidulans	(173)	YEF	LNGP	AFG	GLGPH	PHED	WNGADLAGYS	AFIVQSSKPAGAA
PntR A. niger	(118)	YEF	LNGP	AFG	GLGPH	PHED	WNGADLAGYS	AFIVQSSKPAGAA
PntR A. tub 4M	(175)	YEF	LNGP	AFG	GLGPH	PHED	WNGADLAGYS	AFIVQSSKPAGAA
	(241)	241	250	260	270	280	290	300
PntR A. fumigatus	(239)	QPTMP	TEENLPR	LV	DL	LYFTSAF	STHMPVCHHI	HCYVLRK
PntR A. nidulans	(230)	QPTMP	TEENLPR	LV	DL	LYFTSAF	STHMPVCHHI	HCYVLRK
PntR A. niger	(176)	QPTMP	TEENLPR	LV	DL	LYFTSAF	STHMPVCHHI	HCYVLRK
PntR A. tub 4M	(233)	QPTMP	TEENLPR	LV	DL	LYFTSAF	STHMPVCHHI	HCYVLRK
	(301)	301	310	320	330	340	350	360
PntR A. fumigatus	(299)	ALLASMLW	VAAALDDRA	FAL	SI	SPORKK	ICQFLCALT	IRLLRPL
PntR A. nidulans	(290)	ALLASMLW	VAAALDDRA	FAL	SI	SPORKK	ICQFLCALT	IRLLRPL
PntR A. niger	(236)	ALLASMLW	VAAALDDRA	FAL	SI	SPORKK	ICQFLCALT	IRLLRPL
PntR A. tub 4M	(293)	ALLASMLW	VAAALDDRA	FAL	SI	SPORKK	ICQFLCALT	IRLLRPL
	(361)	361	370	380	390	400	410	420
PntR A. fumigatus	(351)	---	AGSNASD	PTFT	EVAP	CPPT	TVHHP	FEVSGDDRGLVGPAGSLDDVITYIHVASIISS
PntR A. nidulans	(350)	---	AGSNASD	PTFT	EVAP	CPPT	TVHHP	FEVSGDDRGLVGPAGSLDDVITYIHVASIISS
PntR A. niger	(288)	---	AGSNASD	PTFT	EVAP	CPPT	TVHHP	FEVSGDDRGLVGPAGSLDDVITYIHVASIISS
PntR A. tub 4M	(345)	---	AGSNASD	PTFT	EVAP	CPPT	TVHHP	FEVSGDDRGLVGPAGSLDDVITYIHVASIISS

(421) 421 430 440 450 460 470 480
 PntR A. fumigatus (409) EOKAASMRWWHAFTLARELKLNOEIEVMPNAGGTEGSSPFDYSLGWSGVDTGAFD
 PntR A. nidulans (410) EOKAASMRWWHAFTLARELKLNOEIEVMPNGSSVEGSSPPFGYSLGWDGADPGVFN
 PntR A. niger (346) EOKAASMRWWHAFTLARELKLNOEIEVMPSEENHTEGSSPFDYSLAGWSGVDTGPFED
 PntR A. tub 4M (403) EOKAASMRWWHAFTLARELKLNOEIEVMPSEENHTEGSSPFDYSLAGWSGVDTGPFED

(481) 481 490 500 510 520 530 540
 PntR A. fumigatus (469) YSNPARRSSINVCVDHSGHEIRGAIITEEHREERRRTWWLLYIMDRHLALCYNRPLALLDAES
 PntR A. nidulans (470) YSNPARRSSINVCVDHSGHEIRGAIITEEHREERRRTWWLLYIMDRHLALCYNRPLALLDAES
 PntR A. niger (406) YSNPARRSSINVCVDHSGHEIRGAIITEEHREERRRTWWLLYIMDRHLALCYNRPLALLDAES
 PntR A. tub 4M (463) YSNPARRSSINVCVDHSGHEIRGAIITEEHREERRRTWWLLYIMDRHLALCYNRPLALLDAES

(541) 541 550 560 570 580 590 600
 PntR A. fumigatus (529) EDLLLPLDEGSSWAGNMHSNSPKEDGPHCPISGGEKNKRRVFPDFICHDSIFGFFLPLMT
 PntR A. nidulans (528) EDLLLPLDEGSSWAGNMHSNSPKEDGPHCPISGGEKNKRRVFPDFICHDSIFGFFLPLMT
 PntR A. niger (466) EDLLLPLDEGSSWAGNMHSNSPKEDGPHCPISGGEKNKRRVFPDFICHDSIFGFFLPLMT
 PntR A. tub 4M (523) EDLLLPLDEGSSWAGNMHSNSPKEDGPHCPISGGEKNKRRVFPDFICHDSIFGFFLPLMT

(601) 601 610 620 630 640 650 660
 PntR A. fumigatus (589) ITGELIDLNOARNHEMLGSRLLHGKDWDAHGEVLRQLEFYKASLTTFATASDPAPLS
 PntR A. nidulans (588) ITGELIDLNOARNHEMLGMRLLHGKDAWNVHGEVLRQLEFYKASLTTFATASDPAPLS
 PntR A. niger (526) ITGELIDLNOARNHEMLGARLLHGKDPDAHGEVLRQLEFYKASLTTFATASDPAPLS
 PntR A. tub 4M (583) ITGELIDLNOARNHEMLGARLLHGKDAWDAHGEVLRQLEFYKASLTTFATASDPAPLS

(661) 661 670 680 690 700 710 720
 PntR A. fumigatus (649) ITYRPPGPDPPVEPSLSQAQSWHTQTVISYASYLVHVLHILLVGKWDVPSLIEDKDFWTS
 PntR A. nidulans (648) ITYHAQSEHLPAEPSLSQAQSWHTQTVISYASYLVHVLHILLVGKWDVPSLIEDKDFWTS
 PntR A. niger (586) SAYPPKPDQOPVEPSLSQAQSWHTQTVISYASYLVHVLHILLVGKWDVPSLIEDKDFWTS
 PntR A. tub 4M (643) SAYPPKPDQOPVEPSLSQAQSWHTQTVISYASYLVHVLHILLVGKWDVPSLIEDKDFWTS

(721) 721 730 740 750 760 770 780
 PntR A. fumigatus (709) SPFAFTISHALDAADSVHGIILRYDPDISFMPYFFGIQLLOGSFLLLLIVERLQKEAGEG
 PntR A. nidulans (708) SPFAFTISHALDAADSVHGIILRYDPDISFMPYFFGIQLLOGSFLLLLIVERLQKEAGEG
 PntR A. niger (646) SPFAFTISHALDAADSVHGIILRYDPDISFMPYFFGIQLLOGSFLLLLIVERLQKEAGEG
 PntR A. tub 4M (703) SPFAFTISHALDAADSVHGIILRYDPDISFMPYFFGIQLLOGSFLLLLIVERLQKEAGEG

(781) 781 790 800 810 820 830 840
 PntR A. fumigatus (769) ILNACEVMIRATESCVVTLNTEYQRNFRQVMRSABAQARGRPVNHSEIRHRKAVILALYR
 PntR A. nidulans (768) ILNACEVMIRATESCVVTLNTEYQRNFRQVMRSABAQARGRPVNHSEIRHRKAVILALYR
 PntR A. niger (706) ILNACEVMIRATESCVVTLNTEYQRNFRQVMRSABAQARGRPVNHSEIRHRKAVILALYR
 PntR A. tub 4M (763) ILNACEVMIRATESCVVTLNTEYQRNFRQVMRSABAQARGRPVNHSEIRHRKAVILALYR

(841) 841 851
 PntR A. fumigatus (829) WTRKGTGLAI-
 PntR A. nidulans (828) WTRKGTGLAI-
 PntR A. niger (761) -----
 PntR A. tub 4M (823) WTRKGTGLAI-

FIGURA 13

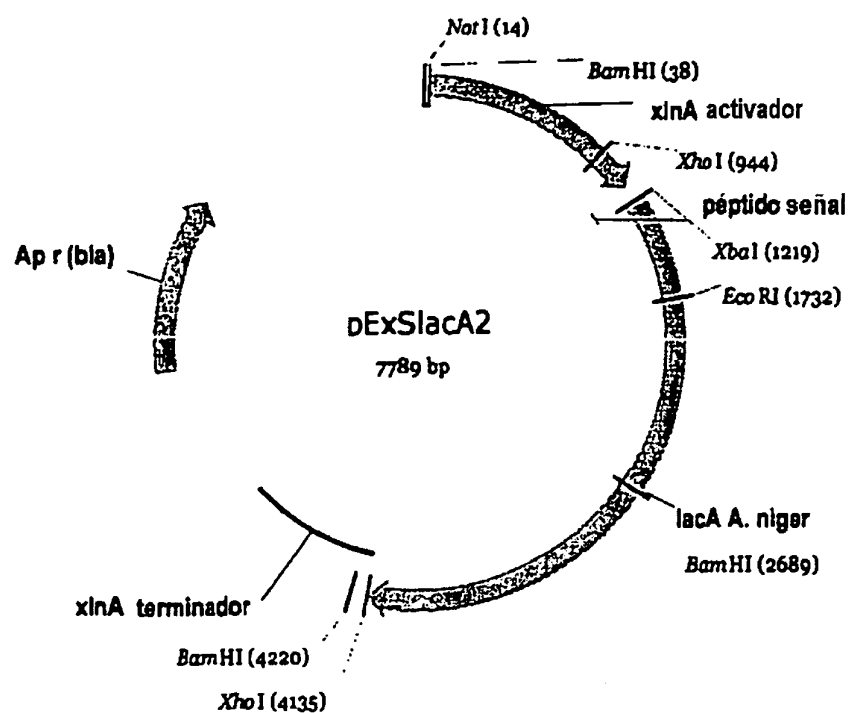


FIGURA 14

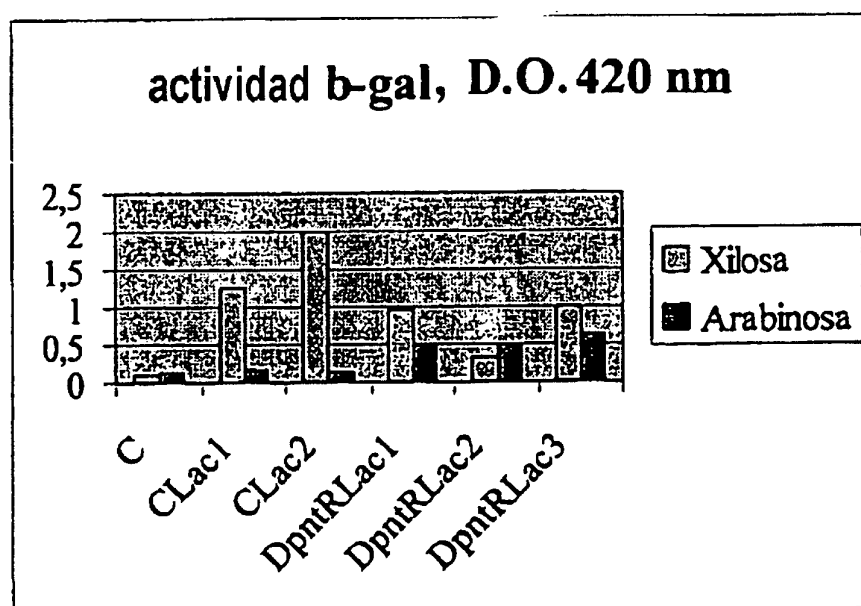


FIGURA 15

Degradación de arabinoxilano en hongos filamentosos

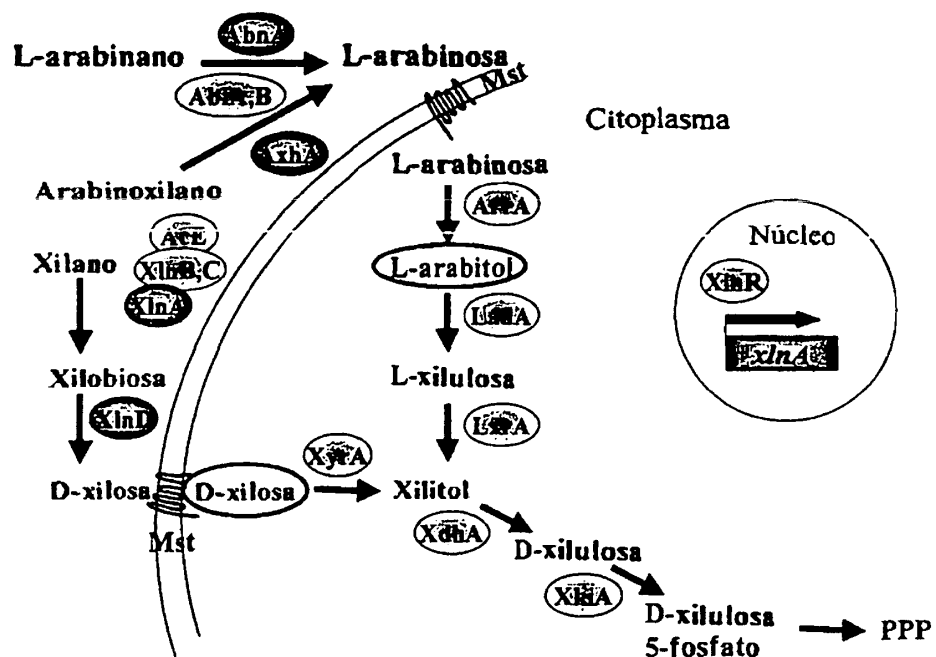


FIGURA 16

SEC ID NO: 1 (Secuencia de codificación del gen *pntR* a partir de *A. nidulans*).

```

1 atggcatcct cccaccaggg gaacgggaca gtccccaact ctcagaccga cgcacccccg
61 gattcctcca caaagcgccg atggaggcgc aaccgtatag cttgtgactc ttgtcatgct
121 cgccgcgttc gatgcgaccg ccagtttccg tgctcgcgct gcctccgtag cgagatcacc
181 tgcgaattca cgcgcgagcg tcgtaagcga ggccgtatcg cacgatccaa gctggccgaa
241 atggcaaaga acaaaatgga gaccagttag acgccggctc cggctaagac catgaatggt
301 ataccggcgc ccgctggtac agagatccca gggcatgtct ccccgcatc gactttccac
361 catcgatcgc cgcgggcaaa tgcctctact gtttctgctc caaqtgttga tggccgacgg
421 tctcagactg acccacaact tcccgctccg agaccagaaa tcggcgggaa tgttactgag
481 gaatggctcg ccgggacgca tgtatcacca ggatcatagc agttcttgaa tggaccagct
541 tttggagaag gactaggacc gtttctcac atgttcgatg tatggaacgg tgtcgacctg
601 gccgcctaca gcgctgggac ttcgcaaggg tcgaaagcga ccaacgcgcc gtcaacctct
661 acagcaccgt tgaagtaccc ggttctacag cccttgatgc cgttcgtgga ggcgactctg
721 cctcgaaaac tggctcttga cctgcttgat ctatatttca ccagcgctt ttcaactcac
781 atgcaccccg tatgccatca tattcattgc tatgtgctgc ggaaggtttc cttcctcagc
841 aaagatgcgc cagcaccagc cagtcgggca ctgctttcga gtatgctctg ggtagctgct
901 ctggatgata gggcggtttc gttgccgatt tcgcctccgc agcggaaaag gatctgccaa
961 tttctctgcg ctctcactat ccgcttggtg cgaccgttga ttcattgttc cttcaaagat
1021 cagggcgggc cgcgagcagc gggtgcagca gcggccgagg cggccaccaa taaccagcgc
1081 ttcgccggcg tcggccagga tctaccgcc actactgtgc accatccgtt tgaaggagga
1141 ggagacgata gaggcctggt agggccggca ggctcgcttg acgatgtgat tacctacatc
1201 catgtagctt ctatcatctc gtccagttag cagaaggcag ccagtatgcg atggtggcat
1261 gcggccttca ccctagcgcg agagctcaag ctaaatacaag agatcgaggt gatgccgaat
1321 ggcgactccc aagtggaaag gtcaagtccg ccgttcggat actctctacc cggctgggat
1381 ggggctgacc cgggccccgt ctttaattac tcaaacccaa ctcggtccag tctcaattgc
1441 gtctgtgatc gccaggacca gaacaccatc accgaagagc accgcgaaga acggcggcgg
1501 acatggtggc ttctgtacat catggaccgc catctcgcac tgtgctacaa ccggccgttg
1561 gccttgctgg atgccgaaag cgaagactta ctactaccgc tggacgaggc atcctggcag
1621 tcagggatca tacacagtaa cagcccgaag tcggatgggc cgcaatgcct actctctgcc
1681 gacaagaaca agcgtcgcct gtttccgaac ttcactctgc atgatcatte tgtgtttggc
1741 tttttccttc ccctcatgac gatcaccggc gaactcattg acctgaacca agcaggaac
1801 catccgatgc ttggcatgcg actaaacggc aaggacgcgt ggaatgtcca tgaagcgaa
1861 gttctacgcc agctcgagat ctacaaggct agcttaacca cgctcgccgc tactacatcc
1921 gatccggaag cgccgctgtc cgcttatgcg cagcccaat ccgaacatct accagccgag
1981 ccatccctct cgcaagcata cgcattggac acgcaaaactg tcatatcgta tgcatacatc
2041 ctgggtccacg tgctccacat cctgttggtg ggcaaatggg atcccgatc cctgatcgag
2101 gacaaagatt tctggacctc ctccccgca ttcgcatcga ccatctcgca tgcgctggac
2161 gcagccgact cggctgatca gattctccga tacgaccag acattagttt catgccttat
2221 ttctttggca ttcagttgct gcaaggcagt tttcttctcc tgctgatcgt tgagaggctg

```

ES 2 341 618 T3

```

2281 cagaaggaag cgggcgaagg aatccttaat gcatgagagg tgatgatccg agctacggaa
2341 tcttgtgtgg tgactctgaa caccgaatac cagcgaaatt tccggcaggt catgagcagt
2401 gccgttgccc aagcacgagg gaggccagtc aatcacagcg agattcgcca ccggcgcaag
2461 gctgtgctag cgctgtaccg gtggacaagg aagggaaccg ggttggtctc ctag

```

SEC ID NO:2 (Estructura primaria deducida a partir del gen *pntR* de *A. nidulans*)

```

1  MASSHQNGT VPNSQTDAPP DSSTKRRWRR NRIACDSCHA RRVRCDRQFP
51  CSRCLRSEIT CEFTREERRR GRIARSKLAE MAKNMETSE TPAPAKTMNG
101 IPAPAGTEIP GHVSPASTFH HRSPPANAPT VSAPSVDGRR SQTDPQLPVR
151 RPEIGGNVTE EWLAGTHVSP GSYEFLNGPA FGEGLGPFPH MFDVWNGVDL
201 AAYSAGTSQG SKATNAPSTS TAPLKYPVLQ PLMPFVEATL PRKLVFDLLD
251 LYFTSAFSTH MHPVCHHIHC YVLRKVSFLS KDAPRPSSPA LLSSMLWVAA
301 LDDRAFSLPI SPPQRKRICQ FLCALTIRLL RPLIHVSFKD QGGAAAAVAA
351 AAAAATNNA FAGVGQDLPP TTVHHPFEGG GDDRGLVGPA GSLDDVITYI
401 HVASIISSSE QKAASMRWWH AAFTLARELK LNQEIEVMPN GDSQVEGSSP
451 PFGYSLPGWD GADPGPVFNY SNPTRSSLNC VCDRQDQNTI TEEHREERRR
501 TWWLLYIMDR HLALCYNRPL ALLDAESEDL LLPLDEASWQ SGIHSNSPK
551 SDGPQCLLSA DKNKRRLFPN FICHDHSVFG FFLPLMTITG ELIDLNQARN
601 HPMGLMRLNG KDAWNHVHSE VLRQLEIYKA SLTTFAATTS DPEAPLSAYA
651 HAQSEHLP AE PSLSQAYAWH TQTVISYASY LVHVLHILLV GKWDVSLIE
701 DKDFWTSSPA FASTISHALD AADSVDQILR YDPDISFMPY FFGIQLLQGS
751 FLLLLIVERL QKEAGEGILN ACEVMIRATE SCVVTLNTEY QRNFRQVMRS
801 AVAQARGRPV NHSEIRHRRK AVLALYRWTR KGTGLAL*

```

Las cisteínas implicadas en una estructura de grupo Zn2Cys6 están marcadas en negrita. La secuencia subrayada está incluida en un intrón en la base de datos anotada de *A. nidulans* y, por lo tanto, no está presente en la proteína anotada.

SEC ID NO:3 (Secuencia de nucleótidos parcial del gen *pntR* de *A. niger*)

```

1  tcttcgcagt gatataccggt gtgaattcac tcgcgaacga cgaaagagag gacgcattgc
61  gcgatcccga ctggtagaga ccaagactgc ttagagagaag gcgagccagc ctgtggagac
121 tcgagattca gcaccggcac ctgcagaagc aggggtctggc ccagttccaa atggctctcc
181 ttcctcaaca ttccaccata gatcgccggc gacaaatgat gtgacggggg cggccccaag
241 tatcgacgag cggcgctctc aagcgatgt atcacttcct ccagaaaagt cagggc1acac
301 tgttaatgcg acagaggaat ggctagcagg cacgcatgtc tctccaggat cctatgagcc
361 cttggcaggc atcgggcccc gagaaggccc ttccctcga atctttgata tctggaatgg
421 ggtcgacttg gccggttata gcgaccagc atctcaaggc tccaagataa caggccttgg
481 tcagacacca gcaccatctg caacgatcct aaagtatccg gtcctccagc cagtaatgcc

```

ES 2 341 618 T3

541 ctatctggaa tcgagcttgc ctcgaaagct agtatacgac cttctcgacc tgtactttac
 601 aagcgcgttt tccacacata tgcacacctgt gtgccatcac attcattgct atgtcctacg
 661 aaaggcgtct tttctaagcc gagaggtccc tcgacctagc agcccgccac ttctggccag
 721 tatgctttgg gtggcagcgt tagatgatcg tgcgtttgct ttgccgatat ctccacccca
 781 gagaaagaaa atatgtcagt tcttgtgtgc tctaacatta cgacttttgc gaccgttgat
 841 tcacgtgtca ttcaaagagc aagaaggcgc cgccgcgagt gaccacttc atgctgcggt
 901 cggtcaggat ggccctccta caaccgtgca ccaccgttt gaggtcgggt gtgatgatcg
 961 ggggttagtt ggccctgcag gatcattgga cgatgttatt acatacatcc atgtggcacc
 1021 catcatctcc tcaagcgagc aaaaggccgc cagcatgcga tggttcgttt ttgttcaagt
 1081 aacttgaggc gagcacggaa gctaaccaat cttaggtggc atgcccgtt tactcttga
 1141 cgagaattga agctgaatca ggagatcgag gtgatgccca gtgaggagaa tcaccagag
 1201 ggttcgagcc cgtcatttga ttattcactt gcgggatgga gtggcgtgga caccggcccc
 1261 ttttttgatt attcaaacc tgcggcgcca agcttgaatt gcgtatgcga ccgtggccac
 1321 gaactgcgtg gcgtatcac cgaagagcat cgtgaagagc gtcgtcggac atggtggctc
 1381 ctctacatta tggaccgtca cctcgtcttc tgctacaatc gccccttgc tctactgat
 1441 gctgaaagcg aggatctctt attgctctg gacgaagggt catggcagtc aggtaatatc
 1501 cacagcaata gtcccaacc ggacggacca cagtgccac tgtcaggcga gaagaacaag
 1561 cgccgcgttt tccctaattt catctgccat gatcattcta tcttcggctt cttctccct
 1621 ctgatgacca ttactggtga attaatcgac ctgaaccaag ctcggaacca tccaatgctt
 1681 ggagcacgct tgaacggaaa ggacccctgg gatgcgcacg ttggtgaagt actacgccag
 1741 cttgagcttt acaaggctag tctcactacg tttgcagcca ctgcgtcgga tcccgatgcg
 1801 cccttgctca gtgccttccc ccctaaacc gatcaacaac cagttgaacc ctactcgcc
 1861 caggcttatt catggcatac tcaaacggtc atctcgtatg catcctacct cgtgcagtg
 1921 ctgcatattc ttcttggttg caaatgggat cctgtgtcgt tgatcgagga taaggacttc
 1981 tggacttcat cgctgcatt cgctccacc atctctcag ctcttgatgc ggcagactca
 2041 gtggaccata tcttacgcta cgaccccgat attagtttta tgccgtattt cttcggcatt
 2101 caattgctcc aaggcagctt tcttctctg ctgattgtgg agcggctgca gaaagaagcg
 2161 ggggagggta ttctaaatgc ctgcgaggtg atgattcgag cgaccgagtc ctgcgtggtg
 2221 acgttgaaca ctgaatatca acggaacttc cgacaggtca tgcggagcgc cgttgcgcag
 2281 gcgcgtgggc gccctgtcaa tcacagttag atccggcatc gtngcaaggc cgtct

SEC ID NO: 4 (Estructura primaria del factor de transcripción codificado PntR).

1 LRSDIRCEFT RERRKRGRGA RSRLVETKTA VEKASQPVET RDSAPAPAEA
 51 GSGPVPNGSP SSTFHHRSPA TNDVTGSAPS IDERRSQADV SLPPRKSQHT
 101 VNATEEWLAG THVSPGSYEP LAGIGPGEFP FPRIFDIWNG VDLAGYSDPA
 151 SQGSKITGLG QTPAPSATIL KYPVLQPVMP YLESSLPRKL VYDLLDLYFT
 201 SAFSTHMPV CHHHCYVLR KASFLSREAP RPSSPALLAS MLWVAALDDR
 251 AFALPISPPQ RKKICQFLCA LTLRLRLPLI HVSFKEQEGA AASDPLHAAV
 301 GQDGPPTTVH HPFEVGGDDR GLVGPAGSLD DVITYIHVAS IISSEQKAA

ES 2 341 618 T3

```

351   SMRWWHAAFT LARELKLNQE IEVMPSEENH PEGSSPSFDY SLAGWSGVDI
401   GPFFDYSNPA RPSLNCVCDR GHELGAITE EHREERRRTW WLLYIMDRHL
451   ALCYNRPLAL LDAESEDLLL PLDEGSWQSG NIHSNSPNPD GPQCPLSGEK
501   NKRRVFPNFI CHDHSIFGFF LPLMTITGEL IDLNQARNHP MLGARLNGKD
551   PWDADVGEVL RQLELYKASL TTFAATASDP DAPLSSAFPP KPDQQPVEPS
601   LAQAYSWHTQ TVISYASYLV HVLHILLVGK WDPVSLIEDK DFWTSSPAFA
651   STISHALDAA DSDVHILRYD PDISFMPYFF GIQLLQGSFL LLLIVERLQK
701   EAGEGILNAC EVMIRATESC VVTLNTEYQR NFRQVMRSV AQARGRPVNH
751   SEIRHRXKAV

```

SEC ID NO: 5 (Una secuencia de nucleótidos del gen *pntR* a partir de *A. tubingen* 4M-147) y su estructura primaria deducida.

```

 1 gcggcctatt agtgacaaac cagagtttgc caccaggcca gtgaaccctg gagagctccc
61 catgtgtggc ccggctctgg attagggccc ttttttagcg cgtgaggagt ccagccccga
121 cggtttcccc gcgatggatc gcttctgctc tgcccgccct gttttgcgct ctgccactca
181 gctcccttct tctccatgg aaaagtctc tctctgctc tacgggtttt tatccgattt
241 gcgtcttggt aacggcgcat cctagaaggc ttagcggtcg tcgtgggtac gtatgtcaag
301 ccagttactc atcaacaact gcctcggtct ctttccccgc ttgtaattgc ctggtaaggg
361 ctaaggaccg gttctttcgc tctttcgtc ttggccggtt gctgacttct caacccattt
421 tttttcagac tgcgattctt ttgcataccc tcatatacct ctggaatcgc caatgtcggc
481 ctgaaatgga tactgcccag tcgggggagc cccaggcatc cagcgttcca gcagccaccg
541 aagaaccaac cggcgagacc tcaacaaaac gtcgttgag aaggaatcgg atagcttgcg
601 actcctgcca ttgcgctcgc gtgcggtgcg atcgagcctt tccctgctcg cgctgccttc
661 gcagtgaat ccgatgcgag ttactcggg aacgacgaa gcgaggacgc attgcgcgat
721 cccgactggt agagccaat gctgccactg aaaagccgac caaacctgtg gagtcccaag
781 ccgcagcacc ggcacctgcg gaagcaggat ctggtccggt tccaaatggc tctccctcta
841 cgacttttgc ccatagatcg ccagcgacaa atgatgtgac ggtgtcagcc ccaagtattg
901 acgagcggcg ctctcaggcg gatgtgtcac ttctcccag gaagtcaggg catacagtta
961 atgcgacaga ggaatggcta gcaggcacgc atgtctctcc aggttcctat gagcccttgg
1021 caggcatcgg ccctggggaa ggcccttttc ctcggtattt tgatatctgg aatggggttg
1081 acctggccgg ttacagtgat ccagcatctc agggttccaa gataaccggc cttggacaga
1141 caccagcacc gtctgcaaca atcctaaaat atccagtact ccagccagta atgccatatt
1201 tggagtcgag cttgcctcga aagctagtat acgatcttct cgacctgtac ttcacaagcg
1261 cattctccac gcatatgcat cccgtgtgtc atcacatcca ctgctatgtt ctacgaaagg
1321 catcatttct gagccgggaa gccctcggc ctagcagccc tgcacttctg gccagcatgc
1381 tttgggtggc agcgttagat gaccgtgcgt ttgctttgcc gatattctct cccagagga
1441 agaagatatg tcaattttta tgtgtcttaa cgttacggct cttgcgaccg ttgggtcacg

```

ES 2 341 618 T3

1501 tgtcattcaa agagcaagag ggcgccgcgg cgagcgaccc acttcattgct gcgatcggtc
 1561 aggacgggtcc ccctacaacg gtgcaccacc catttgaagc cgggtggtgat gatcgggggc
 1621 tggtcggccc tgcaggatca ttggacgatg tcatcacata catccatgta gcatccatta
 1681 tctcttcaag cgaacaaaag gccgccagca tgcgatggtt cgttttattc aagttaccgc
 1741 aagcgagcaa ggaagctaac caatcttagg tggcatgccg cttttactct tgcacgggaa
 1801 ctgaagctca atcaggagat cgaggatgat cctagttagg agaatcaccg agagggtcgc
 1861 agcccgctcat ttgattattc acttgcggga tggagtggcg ttgacacggg cccctttttc
 1921 gattattcaa accctgctcg gccaaagctt aattgcgtat gcgaccgtgg ccacgaattg
 1981 cgtggcgcta ttaccgaaga gcaccgtgaa gagegtcgtc ggacatggtg gcttctctac
 2041 atcatggacc gtcacctcgc tctctgctac aatcgccccc ttgctctact cgtatgctgaa
 2101 agcgaggatc ttttattgcc gctggacgaa gggatcatggc agtctgggaa catccacagc
 2161 aatagtccca aaccggatgg accacagtgc ccgctgtcag gcgagaagaa caaacgccgc
 2221 gttttcccca atttcatttg ccatgaccac tctatcttcg gcttcttcct gcctctcatg
 2281 accattactg gcgaattaat cgacttaaac caagctcgtc accatccgat gcttggagca
 2341 cgcttgaatg gaaaggacgc ctgggatgcg cacgtcggcg aagtgtcgcg ccagcttgag
 2401 ctttacaagg ctagtctcac aacgtttgct gccactgcgt cggatcccga tgcgccctta
 2461 tccagtgcct tccccctaa acccgatcag caaccagtcg agccctcact cgcgccggct
 2521 tattcatggc atactcaaac ggtcatctcg tatgcatcct atcttgtgca tgtgtacat
 2581 attcttcttg tcgggaaatg ggatcctgtg tcgttgatcg aagataagga ctctctggact
 2641 tcatcgcccg cgttcgcctc caccatctct cacgcccttg atgcggcaga ctcggtggac
 2701 catatcctac gttacgacct cgatatcagt tttatgccgt atttcttcgg catccaatta
 2761 cttcaaggca gctttcttct cttgctgatt gtagagcggc tgcagaaaga agcgggggag
 2821 ggtattctga atgcgtgcga ggtgatgatc cgagcgaccg agtcctgtgt ggtgacgttg
 2881 aacactgaat accaacgaaa ctttcgacag gtcatgcgga gcgctgttgc gcaggcgcgt
 2941 gggcgccctg tcaatcacag cgagatccgg catcgtcgca aggcctctt agcactctac
 3001 cgggtggacc ggaagggcac tgggttggcc ctttagattt agagtctctc acagcgccga
 3061 tgccatttcc agcgcacggt tgcacgggt ccgcatccgc aggccatcgg ctggagagag
 3121 cttaaatcat ctcccgccag ggcattgctt gttctaggcc agtcgcagag actggcatat
 3181 gcaggcacag tatccctcc ctctcgggtt attacctgc ctgaacgggc tcgctccagc
 3241 tcgctcttat ggctcattgc ccggtgcctg catctgccgg accttacccc ggcattggca
 3301 attgatcgca acggctgctg ctattagccc aaagtatctc gtagtattta ttattttttt
 3361 ttggatactg ctctccgatg ttaccctgta catatacgag catttatgct gtttttgggtg
 3421 tctctggctt gtttgttctg actcgcgggt ttaaatctac caaacgggtt tttcttcttc
 3481 tggacaccac ctcccgaatg ccatgccctt ttctcctaa caaagcaaac atcgcttcta
 3541 ggcatagacc gtcgctaaag tcgggcatcg catgattctg cacttgggtg aaggaccggg
 3601 gttgttgggc ggccccttcc ccttacccca gatttaacga acgggccgtg ctgcctcggg
 3661 ccgaacctgg gtctttcggg taaattctta aaaaaccgaa gccgttgcgg ggagaaaagc
 3721 cattgcattg ggaatcgaac caacaggcgc tcagctttaa cagcctttaa ttcccgtagt
 3781 tcggcaggcc ggggagggtg ctcggttaat tgccacacca gaatatgggg tatgcaagggt
 3841 tcagcgacac cacatggncc ccgtgaagat cagatggttc ctggtccgtc aaatcactga

3901 gcttcctcg aggg

SEC ID NO: 6 (La estructura primaria deducida del gen *pntR* a partir de *A. tubingen* 4M-147).

```

1  MDTAQSGDAQ ASSVPAATEE PTGGASTKRR WRRNRIACDS CHSRRVRCDR
51  AFPCSRCLRS EIRCEFTRE RKRGRRIARS LVEPNAAATEK PTKPVESQAA
101 APAPAEAGSG PVPNGSPSTT FRHRSPATND VTVSAPSIDE RRSQADVSLP
151 PRKSGHTVNA TEEWLAGTHV SPGSYEPLAG IGPGEFFPR IFDIWNGVDL
201 AGYSDPASQG SKITGLGQTP APSATILKYP VLQPVMPLYE SSLPRKLVYD
251 LLDLYFTSAF STHMHPVCHH IHCYVLRKAS FLSREAPRPS SPALLASMLW
301 VAALDDRAFA LPISPPQRKK ICQFLCALTLL RLLRPLVHVS FKEQEGAAAS
351 DPLHAAIGQD GPPTTVHHPF EAGGDDRGLV GPAGSLDDVI TYIHVASIIS
401 SSEQKAASMR WWHAAFTLAR ELKLNQEIEV MPSEENHPEG SSPSFDYSLA
451 GWSGVDTGPF FDYSNPAPRS LNCVCDRGHE LRGAITEEHR EERRRTWWLL
501 YIMDRHLALC YNRPLALLDA ESEDLLLPLD EGSWQSGNIH SNSPKPDGPQ
551 CPLSGEKNKR RVFPNFICH D HSIFGFFLPL MTITGELIDL NQARNHPMLG
601 ARLNGKDAWD AHVGEVLRQL ELYKASLTTF AATASDPDAP LSSAFPPKPD
651 QQPVEPSLAQ AYSWHTQTVI SYASYLVHVL HILLVGKWDV VSLIEDKDFW
701 TSSPAFASTI SHALDAADSV DHILRYDPDI SFMPYFFGIQ LLQGSFLLLL
751 IVERLQKEAG EGILNACEVM IRATESCVVT LNTEYQRNFR QVMRSABAQA
801 RGRPVNHSEI RHRRKAVLAL YRWTRKGTGL AL

```

Las cisteínas implicadas en la estructura de grupo Zn2Cys6 están marcadas en **negrita**