



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 287 989**

⑯ Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/80** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **98966868 .6**

⑯ Fecha de presentación : **22.12.1998**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1042461**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2000**

④ Título: **Clonación de expresión en hongos filamentosos.**

⑩ Prioridad: **22.12.1997 EP 97204079**

⑬ Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

⑦ Inventor/es: **Van den Brink, Johannes, Maarten;**  
**Selten, Gerard, Cornelis, Maria y**  
**Van den Hombergh, Johannes Petrus T. W.**

⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

⑧ Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 287 989 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

Clonación de expresión en hongos filamentosos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con los métodos de identificación de las secuencias de ADN que codifican proteínas de interés para la clonación de expresión usando hongos filamentosos como hospederos.

10 **Antecedentes de la invención**

Un número creciente de componentes de proteínas con propiedades interesantes es producido por medio de la tecnología del ADN recombinante. La tecnología de producción del ADN recombinante requiere la disponibilidad de una secuencia de ADN que codifique para el componente de proteína de interés. Los métodos convencionales para la 15 clonación de secuencias de ADN que codifican proteínas de interés tienen la desventaja de que cada componente de proteína tiene que ser purificado de manera que permita la determinación de su secuencia de aminoácidos (parcial) o, alternativamente, permita la generación de anticuerpos específicos. Las secuencias de aminoácidos (parciales) pueden entonces ser usadas para diseñar sondas de oligonucleótidos para la detección de la hibridación. Alternativamente, 20 los anticuerpos específicos son usados para la inmunodetección de bibliotecas de expresión en *E. coli* tal como por ejemplo lambda-gt11. Ambos métodos requieren la purificación y la caracterización de la proteína de interés lo cual es un proceso consumidor de tiempo. La clonación de los componentes de proteínas novedosas pudiera por lo tanto ser considerablemente agilizada usando un método de detección que involucra seleccionar clones que expresan una actividad de la proteína deseada.

25 Tales métodos de detección basados en la clonación de expresión han sido previamente usados de manera exitosa para la identificación de productos genéticos procarióticos en por ejemplo *Bacillus* (ver US 4,469,791) y *E. coli* (por ejemplo WO 95/18219 y WO 95/34662). En algunos casos, los productos genéticos eucarióticos han sido identificados usando la clonación de expresión en una bacteria como *E. coli* (por ejemplo WO 97/13853). Sin embargo, los procariotas en general son hospederos menos apropiados para la clonación de expresión que los genes eucarióticos 30 debido a que muchos de estos genes no son correctamente expresados en bacterias. Por ejemplo, los genes eucarióticos frecuentemente contienen intrones que no son empalmados en las bacterias. Aunque este problema del empalme puede ser evitado usando ADNc de genes eucarióticos para la clonación de expresión en bacterias, muchos productos de los genes eucarióticos no son producidos en forma activa en las bacterias ya que las proteínas eucarióticas no son correctamente plegadas en las bacterias o estas proteínas son degradadas rápidamente por las proteasas bacterianas. 35 Además, las bacterias son generalmente incapaces de segregar de manera eficiente proteínas eucarióticas segregadas en forma activa y en contraste con los eucariotas, no tienen la capacidad de glicosilar las proteínas.

40 Más recientemente un número de estos problemas han sido superados usando levaduras como hospederos para la clonación de expresión de los genes eucarióticos. Strasser y otros (Eur. J. Biochem. (1989) **184**: 699-706) han reportado la identificación de una  $\alpha$ -amilasa fúngica mediante clonación de expresión del ADN genómico fúngico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. De manera similar, WO 93/11249 reporta la identificación de una celulasa fúngica mediante clonación de expresión de ADNc fúngicos en *S. cerevisiae*. Las levaduras son, sin embargo, conocidas por su pobre capacidad secretora, particularmente cuando se comparan con los hongos filamentosos. Un número de 45 proteínas heterólogas secretoras son solamente pobremente segregadas a partir de levaduras, si es que son segregadas (ver por ejemplo Kingsman y otros, 1987, Trends Biotechnol. **5**: 53-57). Además las levaduras son conocidas por hiperglicosilar proteínas heterólogas (Innis, 1989, In: Yeast genetic Engineering, Barr, Brake & Valenzuela (eds), Butterworth, Boston, pp 233-246). Tanto la pobre secreción como la hiperglicosilación es probable que interfieran en la clonación de expresión en la levadura ya que puede reducir significativamente las posibilidades de detectar una secuencia de ADN dada que codifique una proteína con propiedades de interés. Esto se aplicará en particular a las 50 secuencias de ADN que codifican las muchas útiles enzimas que son producidas que son producidas por los eucariotas tales como los hongos filamentosos y las cuales son frecuentemente segregadas y glicosiladas. Existe de esta forma una necesidad de un sistema de clonación de expresión que optimizaría la posibilidad de detectar secuencias de ADN que codifican proteínas segregadas y posiblemente glicosiladas, y eso es apropiado para la identificación de las secuencias de ADN que codifican las proteínas y las enzimas producidas por eucariotas, de los cuales en particular los hongos filamentosos. Alternativamente, el sistema de clonación de expresión debe también ser aplicable a la identificación de 55 secuencias de ADN que codifican las proteínas de hongos filamentosos y eucarióticas que no son segregadas.

**Breve descripción de las figuras**

60 Figura 1: Construcción de un vector de expresión intermedio, pGBTOP8. Detalles de la ruta de esta construcción están presentes en el texto.

Figura 2: Construcción de los vectores de expresión pGBFin2 y pGBFin5. Detalles de la ruta de esta construcción están presentes en el texto.

65 Figura 3: Mapa físico del pGBFin12.

Figura 4: Mapa físico del pGBFin11.

Figura 5: Mapa físico del pGBFin13.

Figura 6: Mapa físico del pGBFin17.

5 Figura 7: Mapa físico del pGBFin18.

Figura 8: Mapa físico del pGBFin22.

10 Figura 9: Mapa físico del pGBFin19.

Figura 10: Mapa físico del pGBFin23.

Figura 11: Mapa físico del pGBFin6.

15 Figura 12: Mapa físico del pAN8-1.

Figura 13: Mapa físico del pGBFin14.

20 Figura 14: Mapa físico del pGBFin15.

## Descripción de la invención

La presente invención se relaciona con un método para aislar las secuencias de ADN que codifican para una o más proteínas con propiedades de interés. El método preferiblemente comprende los pasos de: (a) preparar, en un vector de clonación apropiado, una biblioteca de ADN a partir de un organismo sospechoso de ser capaz de producir una o más proteínas con propiedades de interés; (b) transformar células hospederas de hongos filamentosos con la biblioteca de ADN; (c) cultivar las células hospederas transformadas obtenidas en (b) bajo condiciones que conducen a la expresión de las secuencias de ADN que codifican para las proteínas con propiedades de interés presentes en la biblioteca de ADN; y (d) detectar los clones de las células hospederas transformadas que expresan una proteína con propiedades de interés mediante el análisis de las proteínas producidas en (c).

Cualquier vector de clonación capaz de transformar una célula hospedera de hongo filamentoso y capaz de aceptar fragmentos de ADN a partir de una biblioteca de ADN es apropiado para ser usado en el método de la presente invención. Los vectores de clonación a usarse en la presente invención comprenden de esta forma vectores de clonación integrativos los cuales se integran en un locus diana predeterminado o aleatorio en los cromosomas de la célula hospedera del hongo filamentoso, así como vectores de clonación mantenidos de manera autónoma tales como los vectores basados en la secuencia de AMA1. En un aspecto preferido de la invención, el vector de clonación integrativo comprende un fragmento de ADN que es homólogo a una secuencia de ADN en un locus diana predeterminado en el genoma de la célula hospedera del hongo filamentoso para dirigir la integración del vector de clonación a este locus predeterminado. Para promover la integración dirigida, el vector de clonación es preferiblemente linealizado antes de la transformación de la célula hospedera. La linealización es preferiblemente realizada de manera tal que al menos uno pero preferiblemente cualquiera de los extremos del vector de clonación sea flanqueado por secuencias homólogas al locus diana. La longitud de las secuencias homologas que flanquean el locus diana es preferiblemente de al menos 0,5 kb, más preferiblemente de al menos 1 kb, lo más preferido de al menos 2 kb. La integración del vector de clonación en un locus predeterminado promoverá la uniformidad de los niveles de expresión de los clones individuales en la biblioteca, incrementando de esta forma la posibilidad de que cada clon en la biblioteca sea expresado a un nivel detectable.

En un aspecto más preferido de la invención, la secuencia de ADN en el vector de clonación que es homóloga al locus diana es derivada a partir de un gen que es capaz de una expresión de alto nivel en la célula hospedera del hongo filamentoso. Un gen capaz de una expresión de alto nivel, es decir un gen altamente expresado, es aquí definido como un gen cuyo ARNm puede conformar al menos el 0,5% (peso/peso) del ARNm celular total, por ejemplo bajo condiciones inducidas, o alternativamente, un gen cuyo producto génico puede conformar al menos 1% (peso/peso) de la proteína celular total, o, en caso de un producto génico segregado, puede ser segregado hasta un nivel de al menos 0,1 g/l.

55 En aún otro aspecto preferido de la invención el vector de clonación comprende un promotor para la expresión de las secuencias de ADN que codifican para la proteína con propiedades de interés en la biblioteca, donde este promotor es preferiblemente derivado a partir de un gen de hongo filamentoso altamente expresado. La persona experta apreciará la posibilidad de que la secuencia de ADN homóloga para el direccionamiento y la secuencia del promotor coinciden en un fragmento de ADN.

60 Un número de genes fúngicos altamente expresados preferidos son dados a modo de ejemplo: genes de la cellobiohidrolasa, la gliceraldehído fosfato dehidrogenasa, la amilasa, la glucoamilasa, la alcohol dehidrogenasa o la xilanasa de *Aspergilli* o *Trichoderma*. Los genes altamente expresados más preferidos para estos propósitos son un gen de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, un gen de la TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*, un gen *gpdA* de *Aspergillus nidulans* o un gen de la cellobiohidrolasa de *Trichoderma reesei*. Estos genes altamente expresados son apropiados como loci dianas para la integración de los vectores de clonación y como fuente de promotores altamente expresados a partir de los cuales los fragmentos de la biblioteca son expresados.

# ES 2 287 989 T3

- En otra realización preferida la uniformidad de los niveles de expresión de los clones individuales de la biblioteca es proporcionada por el uso de un vector de clonación que es mantenido de manera autónoma en un hongo filamentoso. Un ejemplo de tal vector de clonación mantenido de manera autónoma es descrito en el Ejemplo 8 el cual describe la construcción y el uso de un vector de clonación que contiene la secuencia de AMA-1. AMA-1 es un fragmento de ADN genómico de 6.0-kb aislado a partir de *Aspergillus nidulans* es cual es capaz del Mantenimiento Autónomo en *Aspergillus* (ver por ejemplo Aleksenko y Clutterbuck (1997), *Fungal Genet. Biol.* **21**: 373-397). Los vectores de clonación basados en AMA-1 para su uso en el método de la presente invención proporcionan la ventaja de frecuencias de transformación superiores en comparación con los vectores de clonación integrativos. Los vectores de clonación basados en AMA-1 también proporcionan la expresión uniforme de los clones individuales de la biblioteca a niveles razonables que permiten la detección fácil de las proteínas con propiedades de interés en la biblioteca. Sin embargo, los vectores de clonación basados en AMA-1 si requieren el mantenimiento de la presión de selección durante el crecimiento de los transformantes para evitar la pérdida del vector de clonación basado en AMA-1 debido a su pobre segregación.
- El vector de clonación puede comprender adicionalmente de manera opcional una secuencia señal enlazada de manera operativa al promotor y aguas arriba del sitio de clonación, de manera que permita la secreción de las proteínas codificadas por los fragmentos de ADN en la biblioteca los cuales están insertados en el sitio de clonación. La secreción puede facilitar la detección de las proteínas. En otra realización de la invención el vector de clonación contiene un gen que codifica una proteína altamente segregada, tal como por ejemplo el gen de la glucoamilasa de *A. niger*. El gen altamente segregado en el vector de clonación contiene un sitio de clonación para la inserción de los fragmentos de la biblioteca el cual esta posicionado de manera tal que las proteínas codificadas por los fragmentos de la biblioteca son producidas como proteínas-fusión con la proteína altamente segregada. Esto mejorará su secreción de acuerdo con EP-A-0 429 628.
- El gen marcador de selección en el vector de clonación puede ser seleccionado a partir de un número de genes marcadores que son útiles para la transformación de hongos filamentosos. A modo de ejemplo estos marcadores incluyen pero no están limitados a los genes *amdS* (acetamidasa), los genes marcadores auxotróficos tales como *argB*, *trpC*, o *pyrG* y genes resistentes a los antibióticos que proporcionan resistencia contra por ejemplo la pleomicina, la higromicina B o el G418. En un aspecto preferido de la invención el vector de clonación comprende un gen marcador de selección el cual es expresado por la célula hospedera fúngica a niveles suficientes durante la selección de los transformantes de manera que evite una propensión hacia los transformantes con múltiples copias del vector de clonación integrado en el genoma de la célula hospedera. Un gen marcador de selección preferido para este propósito es el *amdS* de *A. nidulans* que codifica la secuencia fusionada con el promotor del *gpdA* de *A. nidulans*.
- La célula hospedera de la presente invención es un hongo filamentoso que es capaz de ser transformado con un vector de clonación. Para la mayoría de los hongos filamentosos analizados hasta ahora fue encontrado que ellos podían ser transformados usando protocolos de transformación desarrollados por *Aspergillus* (derivados de *inter alia* Tilburn y otros 1983, *Gene* **26** :205-221). La persona experta reconocerá que la transformación exitosa de la especie hospedera de hongo filamentoso no está limitada al uso de los vectores, los sistemas de marcadores de selección, los promotores y los protocolos de transformación específicamente ejemplificados aquí.
- Un hongo filamentoso es aquí definido como un microorganismo eucariótico de la subdivisión Eumycotina en forma filamentosa, es decir cuyo crecimiento vegetativo ocurre por elongación hifal. Las células hospederas de hongos filamentosos preferidas son seleccionadas del grupo que consiste de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, y *Acremonium*. En otra realización preferida, por ejemplo cuando la proteína de interés es una proteína termofílica, las células hospederas preferidas de los hongos filamentosos son seleccionadas del grupo de hongos termofílicos que consisten de los géneros *Talaromyces*, *Thielavia*, *Mycelophtora*, *Thermoascus*, *Sporotrichum*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, y *Scytalidium*.
- En una realización más preferida de la invención la célula hospedera del hongo filamentoso es seleccionada del grupo que consiste de *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *Aspergilli* del Grupo *A. niger* y *Trichoderma reesei*. El Grupo *A. niger* es aquí definido de acuerdo a Raper y Fennell (1965, En: *The Genus Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp 293-344) y comprende todos los *Aspergilli* (negros) allí incluidos por estos autores.
- En aún un aspecto adicional preferido de la invención la célula hospedera del hongo filamentoso, al menos cuando es usada en el método de la invención en combinación con un vector de clonación integrativo que comprende un fragmento de ADN el cual es homólogo a una secuencia de ADN en un locus diana predeterminado, comprende múltiples copias del locus diana predeterminado. Más preferiblemente la célula hospedera comprende múltiples copias de un locus diana que comprende un gen altamente expresado, tal como los genes fúngicos altamente expresados ejemplificados anteriormente. La ventaja de las células hospederas con múltiples copias del locus diana es que el uso de estas células hospederas incrementa la frecuencia de la transformación integrativa dirigida, incrementando de esta manera la posibilidad de obtener transformantes que se expresan de manera eficiente para cada clon individual en la biblioteca.
- El organismo sospechoso de producir una o más proteínas con propiedades de interés usualmente es un eucariota, preferiblemente un hongo, de los cuales el más preferido es un hongo filamentoso. Estos organismos son conocidos que producen una gran variedad de proteínas que son útiles para aplicaciones industriales.

En el método de acuerdo a la invención, la biblioteca de los fragmentos de ADN a partir de un organismo sospechoso de producir una o más proteínas con propiedades de interés puede ser una biblioteca genómica o una biblioteca de ADNc. Sin embargo, preferiblemente se usa una biblioteca de ADNc de manera que se eviten los problemas con el reconocimiento de las señales de empalme o los promotores en el organismo hospedero. La biblioteca de ADNc es preferiblemente preparada a partir de ARNm aislado a partir del organismo fuente cuando es cultivado bajo condiciones que conducen a la expresión de las proteínas con propiedades de interés.

El método de acuerdo a la invención puede ser aplicado para el aislamiento de secuencias de ADN que codifican para cualquier proteína con propiedades de interés si existiera un ensayo disponible para la detección de la proteína cuando es expresada por la célula hospedera fúngica. Preferiblemente la proteína con propiedades de interés es una enzima. Ejemplos de enzimas las cuales pueden ser identificadas por el método de la invención son las carbohidrasas, por ejemplo las celulas tales como las endoglucanasas, las  $\beta$ -glucanasas, las cellobiohidrolasas o las  $\beta$ -glucosidasas, las hemicelulas o las enzimas pectinolíticas tales como las xilanases, las xilosidasas, las mananasas, las galactanasas, las galactosidasas, las ramnogalacturonasas, las arabanasas, las galacturonasas, las liasas, o las enzimas amilolíticas; las fosfatas tales como las fitas, las esterasas tales como las upasas, las enzimas proteolíticas, las oxidoreductas tales como las oxidasas, las transferasas, o las isomerasas.

Después de la transformación de las células hospederas de los hongos filamentosos con la biblioteca de ADN los clones transformados son examinados para detectar la expresión de la proteína con propiedades de interés. Dependiendo del ensayo requerido para la detección de la proteína con propiedades de interés los clones transformados son propagados y almacenados como colonias sobre medios sólidos tales como placas de agar o en medios líquidos, donde los clones individuales de la biblioteca son cultivados, almacenados y/o ensayados en las cavidades de las placas microtiter.

Una gran variedad de sistemas para la detección de las proteínas con propiedades de interés son conocidos para la persona experta. Debido a que los clones de la biblioteca pueden ser cultivados sobre medios tanto líquidos como sólidos, los sistemas de detección incluyen cualquier posible ensayo para la detección de proteínas o actividad enzimática. A manera de ejemplo estos sistemas de ensayo incluyen pero no están limitados a ensayos basados en zonas claras alrededor de las colonias en los medios sólidos, así como ensayos colorimétricos, fotométricos, turbidimétricos, viscosimétricos, inmunológicos, biológicos, cromatográficos, y otros ensayos disponibles.

La persona experta entenderá que las adaptaciones usuales a los métodos de clonación conocidos en el arte pueden ser igualmente aplicadas a los métodos de la presente invención. Las adaptaciones incluyen pero no están limitadas a por ejemplo al examen de los pools de clones de la biblioteca, examen de la misma biblioteca para detectar un número de proteínas diferentes con propiedades de interés, así como volver a examinar, volver a aislar y volver a clonar los clones positivos para asegurar resultados más precisos.

Una variedad de métodos están disponibles para la persona experta para el aislamiento de la secuencia de ADN que codifica la proteína con propiedades de interés a partir de la célula hospedera transformada identificada en el método de detección, y para la subsiguiente caracterización de la secuencia de ADN aislada.

Las secuencias de ADN aisladas por el método de detección de la invención descrito anteriormente son usadas para producir, o para mejorar la producción de, una proteína con propiedades de interés codificada por la secuencia de ADN. De manera ventajosa, la célula hospedera del hongo filamento transformada aislada en el método de detección descrito anteriormente es usada directamente en un proceso para la producción de la proteína con propiedades de interés cultivando la célula hospedera transformada bajo condiciones que conducen a la expresión de la proteína de interés y, opcionalmente, recuperando la proteína. Sin embargo, con frecuencia la célula hospedera transformada inicial aislada en el método de detección de la invención tendrá un nivel de expresión que es satisfactorio para los propósitos de la detección pero que puede ser mejorado de manera significativa para los propósitos de una producción económica. Con este fin la secuencia de ADN es insertada en un vector de expresión el cual es subsiguientemente usado para transformar una célula hospedera apropiada. En el vector de expresión la secuencia de ADN esta enlazada de manera operativa a las señales de expresión apropiadas, tal como un promotor, opcionalmente una secuencia señal y un terminador, los cuales son capaces de dirigir la expresión de la proteína en el organismo hospedero. Una célula hospedera apropiada para la producción de la proteína es preferiblemente una levadura o un hongo filamento. Las células hospederas de levadura preferidas son seleccionadas del grupo que consiste de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Pichia*, y *Hansenula*. Las células hospederas de hongos filamentosos preferidas son seleccionadas de los mismos géneros listados anteriormente como células hospederas preferidas para el método de detección. Las células hospederas de hongos filamentosos más preferidas son seleccionadas del grupo que consiste de *Aspergilli* del Grupo *A. niger*, *A. oryzae*, y *Trichoderma reesei*. La célula hospedera apropiada es transformada por el vector de expresión mediante cualquiera de los varios protocolos disponibles para la persona experta. La célula hospedera transformada es subsiguientemente usada en un proceso para producir la proteína de interés cultivando la célula hospedera transformada bajo condiciones que conducen a la expresión de la secuencia de ADN que codifica la proteína, y recuperando la proteína.

La presente invención es adicionalmente ilustrada por los siguientes ejemplos.

**Ejemplos***Nomenclatura*

5	<i>phyA</i>	gen <i>phyA</i> de <i>A. ficuum</i> , que codifica la fitasa.
	<i>xylA</i>	gen <i>xylA</i> de <i>A. tubigensis</i> , que codifica la xilanasa.
10	<i>amdS</i>	gen <i>amdS</i> de <i>A. nidulans</i> , que codifica la acetamidasa (Corrick y otros, 1987 Gene 53:63-71)
	<i>glaA</i>	gen <i>glaA</i> de <i>A. niger</i> , que codifica la glucoamilasa
15	<i>gpdA</i>	gen <i>gpdA</i> de <i>A. nidulans</i> , que codifica la gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (Punt y otros, 1988 Gene 69:49-57)
	$P_{gpdA}$	promotor del <i>gpdA</i>
	$P_{glaA}$	promotor del <i>glaA</i>
20	$T_{amdS}$	terminador del <i>amdS</i>
	$T_{glaA}$	terminador del <i>glaA</i>
25	GLA	proteína glucoamilasa de <i>A. niger</i>

*Abreviaturas*

30	kb	kilo base
	bp	par base
	oligo	oligonucleótido
35	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
	PDA	Papa Dextrosa Agar

40 *Oligonucleótidos usados*

Los oligonucleótidos usados en los ejemplos 1-3 son listados en el Listado de secuencias.

45 **Materiales y métodos***Procedimientos generales*

Las técnicas de clonación molecular estándares tales como el aislamiento de ADN, la electroforesis en gel, las 50 modificaciones de restricción enzimática de los ácidos nucleicos, los análisis Southern, la transformación de *E. coli*, etc., fueron realizadas como es descrito por Sambrook y otros (1989) "Molecular Cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nueva York e Innis y otros (1990) "PCR protocols, a guide to methods and applications" Academic Press, San Diego. Los oligo deoxinucleótidos sintéticos fueron obtenidos de ISOGEN Bioscience (Maarsen, Holanda). Los análisis de la secuencia de ADN fueron realizados en un secuenciador 55 de ADN 373A de Applied Biosystems, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

*Hibridaciones y marcado del ADN*

Las hibridaciones y marcado del ADN se realizaron de acuerdo a los sistemas de detección y marcado de ácidos 60 nucleicos directos ECL™ (Amersham LIFE SCIENCE, Little Chalfont, Inglaterra o de acuerdo a las técnicas de marcado radioactivo estándares descritas en Sambrook y otros 1989).

*Transformación de Aspergillus niger*

65 La transformación de *A. niger* fue realizada de acuerdo al método descrito por Tilburn, J. y otros (1983) Gene 26, 205-221 y Kelly, J. & Hynes, M. (1985) EMBO J., 4, 475-479 con las siguientes modificaciones:

## ES 2 287 989 T3

Las esporas fueron cultivadas durante 16 horas a 30°C en un agitador rotatorio a 300 rpm en un medio mínimo de *Aspergillus*. El medio mínimo de *Aspergillus* contienen por litro: 6 g de NaNO<sub>3</sub>, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,12 ml de KOH 4 M, 0,52 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 g de glucosa, 1 g de casaminoácidos, 22 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,7 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,6 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5 mg de MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 50 mg de EDTA, 2 mg de riboflavina, 2 mg de tiamina-HCl, 2 mg de nicotinamida, 1 mg de piridoxina-HCl, 0,2 mg de ácido pantoténico, 4 g de biotina, 10 ml de solución de Penicilina (5000 IU/ml) Estreptomicina (5000 UG/ml) (Gibco).

- Novozym 234<sup>TM</sup> (Novo Industries) en lugar de helicasa fue usado para la preparación de los protoplastos;
- después de la formación de los protoplastos (60-90 minutos), fue añadido buffer KC (KCl 0,8 M, ácido cítrico 9,5 mM, pH 6,2) para un volumen final de 45 ml, la suspensión de los protoplastos fue centrifugada durante 10 minutos a 3000 rpm a 4°C en un rotor oscilante. Los protoplastos fueron resuspendidos en 20 ml de buffer KC y subsiguentemente 25 ml de buffer STC (sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 50 mM) fueron añadidos. La suspensión de protoplastos fue centrifugada durante 10 minutos a 3000 rpm a 4°C en un rotor oscilante, lavada en buffer STC y resuspendida en buffer STC a una concentración de 10<sup>8</sup> protoplastos/ml;
- a 200 l de la suspensión de protoplastos, se le añadió el fragmento de ADN, disuelto en 10 l de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM) y 100 l de una solución de PEG (PEG 4000 (Merck) al 20%, sorbitol 0,8 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 50 mM);
- después de la incubación de la suspensión de protoplastos-ADN durante 10 minutos a temperatura ambiente, 1,5 ml de la solución de PEG (PEG 4000 (Merck) al 60%, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 50 mM) fueron añadidos lentamente, con un mezclado repetido de los tubos. Después de la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, las suspensiones fueron diluidas con 5 ml de sorbitol 1,2 M, mezcladas por inversión y centrifugadas durante 10 minutes a 4000 rpm a temperatura ambiente. Los protoplastos fueron resuspendidos suavemente en 1 ml de sorbitol 1,2 M y cultivados en placas sobre un medio de regeneración selectivo que consiste de un medio mínimo de *Aspergillus* sin riboflavina, tiamina-HCl, nicotinamida, piridoxina, ácido pantoténico, biotina, casaminoácidos y glucosa, en el caso de la selección de acetamida suplementada con acetamida 10 mM como la única fuente de nitrógeno y sucrosa 1 M como fuente de C y osmótico, o, sobre PDA suplementado con 1-30 µg/ml de pleomicina y sucrosa 1 M como osmótico en el caso de la selección de pleomicina. Las placas de regeneración fueron solidificadas usando agar Oxoid No 1 al 2%. Después de la incubación durante 6-10 días a 30°C, las conidiosporas de los transformantes fueron transferidas a placas que consisten de un medio selectivo de *Aspergillus* (medio mínimo que contiene acetamida como la única fuente de nitrógeno en el caso de la selección de acetamida o suplementado con PDA con 1-30 µg/ml de pleomicina en el caso de la selección de pleomicina) con 2% de glucosa en lugar de sucrosa y 1,5% de agarosa en lugar de agar e incubadas durante 5-10 días a 30°C. Los transformantes simples fueron aislados y este paso de purificación selectiva fue repetido una vez más después de lo cual los transformantes purificados fueron almacenados.

### PCR directa en el micelio fúngico

Los transformantes fueron incubados en placas que contienen PDA durante dos días a 30°C. Aproximadamente un tercio de una colonia fue incubado durante 2 h a 37°C en 50 l de buffer KC (60 g/l de KCl, 2 g/l de ácido cítrico, pH 6,2), suplementado con 5 mg/ml de Novozym<sup>TM</sup> 234. Subsiguentemente 100 l (Tris 10 mM, EDTA 50 mM, NaCl 150 mM, SDS al 1%, pH 8) y 400 l de buffer PB QIAquick<sup>TM</sup> (Qiagen Inc., Chatsworth, USA) fueron añadidos. Los extractos fueron suavemente resuspendidos y cargados en una columna QIAquick<sup>TM</sup> spin. Las columnas fueron centrifugadas durante 1 min. a 13000 rpm en una microfuge y lavadas una vez con 500 l de buffer PE QIAquick<sup>TM</sup>. Los restos de etanol fueron removidos por un efecto de pivote rápido final. El ADN cromosómico (PCR plantilla) fue eluído de la columna mediante la adición de 50 l de H<sub>2</sub>O y la subsiguiente centrifugación durante 1 min. a 13000 rpm. Las reacciones PCR contenían 10 l de buffer B eLONGGase<sup>TM</sup> (Life Technologies, Breda, Holanda), 14 l de dNTP (1,25 mM cada uno), 1 l de eLONGGase<sup>TM</sup> Enzyme Mix, 1 l de plantilla, y 10-30 pmol de cada oligo, en un volumen final de 50 l. La cantidad óptima de oligo fue determinada de manera experimental para cada lote comprado. Como promedio, de 10 a 30 pmol fueron usados. Las reacciones fueron realizadas con las siguientes condiciones de ciclo: 1x (2 min) 94°C, 10x (15 seg 94°C, 30 seg 55°C, 4 min 68°C), 20x (15 seg 94°C, 30 seg, 55°C 4 min, comienzo con tendencia de 20 seg por ciclo, 68°C), 1x (10 min 68°C). Las muestras fueron cargadas en geles de agarosa para los análisis de los productos de PCR.

### 60 Fermentaciones en frasco de agitación del *Aspergillus niger*

De las cepas de *A. niger* recombinante y de control fue generado un gran lote de esporas cultivando las esporas o el micelio en placas de un medio selectivo o placas de PDA (Papa Dextrosa Agar, Oxoid), preparadas de acuerdo a las instrucciones del suministrador. Después del cultivo durante 3-7 días a 30°C las esporas fueron recogidas después de añadir Triton X-100 al 0,01% a las placas. Después de lavar con agua desmineralizada estéril alrededor de 10<sup>7</sup> de las esporas de los transformantes seleccionados y las cepas de control fueron inoculadas en los frascos de agitación, que contiene 20 ml de medio de precultivo líquido que contiene por litro: 30 g de maltosa.H<sub>2</sub>O, 5 g de extracto de levadura, 10 g de caseina hidrolizada, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,03 g de ZnCl<sub>2</sub>, 0,02 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,01

g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 g de Tween 80, 10 ml de penicilina (5000 IU/ml)/Estreptomicina (5000 UG/ml), pH 5,5 y 1-30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de pleomicina en el caso de la selección de la pleomicina. Estos cultivos fueron cultivados a 34°C durante 20-24 horas. 10 ml de este cultivo fue inoculado en 100 ml de un medio de fermentación de *A. niger* que contiene por litro: 70 g de glucosa, 25 g caseina hidrolizada, 12,5 g de extracto de levadura, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g de  $\text{ZnCl}_2$ , 0,02 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0,01 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 ml de penicilina (5000 IU/ml)/Estreptomicina (5000 UG/ml), ajustado a un pH 5,6 con 4 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y 1-30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de pleomicina en el caso de la selección de la pleomicina. Estos cultivos fueron cultivados a 34°C durante 6 días. Las muestras tomadas del caldo de fermentación fueron centrifugadas (10', 5.000 rpm en una centrifuga oscilante) y los sobrenadantes recogidos. Los ensayos de la actividad de la xilanasa o la fitasa (ver a continuación) fueron realizados en estos sobrenadantes.

#### Ensayo de la actividad de la fitasa

20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante (diluido cuando es necesario) de las fermentaciones en frasco de agitación de *Aspergillus niger* (como referencia 20 l de agua desmineralizada) son añadidos a 30 l de substrate mix, que contiene buffer de acetato de sodio 0,25 M pH 5,5, ácido fítico 1 mM (sal de sodio, Sigma P-3168), en un plato microtiter de 96 cavidades, e incubados durante 25 minutos a temperatura ambiente. La reacción es detenida por la adición de 150 l de stop mix (14,6 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 300 ml de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  al 0,67%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2%, ácido Tricloroacético al 3,3%). Despues de la incubación a temperatura ambiente por 5 minutos la absorbencia del color azul es medida de manera 20 espectrofotométrica a 690 nm en una Anthosreader (Proton y Wilton). Las mediciones son indicativas de la actividad de la fitasa en el rango de 0-175 U/ml. La actividad de la fitasa fue medida como es descrito en EPO 0 420 358 A.

#### Ensayos de la actividad de la xilanasa

25 El sobrenadante (pre-diluido cuando es necesario) es diluido 5 veces en buffer de acetato de sodio 0,25 M, pH 4,5. 20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante diluido son transferidos a platos microtiter y 50  $\mu\text{l}$  de substrato (4% p/v de Azul Brillante de Remazol RBB-Xylan disueltos a 70°C en agua desmineralizada) son añadidos y mezclados minuciosamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo. La reacción es incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción es detenida por la adición de 200 l de etanol al 96% e incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Despues que 30 la reacción ha sido terminada las placas microtiter son centrifugadas durante 10 minutos a 2500 rpm en una centrifuga GPK Beckman a temperatura ambiente. 100 l del sobrenadante son transferidos a un nuevo plato microtiter y la absorbencia del color azul es medida de manera espectrofotométrica a 620 nm en una Anthosreader (Proton y Wilton). La actividad específica es calculada a partir de una curva de calibración que usa una xilanasa estándar disuelta en buffer de acetato de sodio 0,25 M pH 4,5. Las mediciones son indicativas de la actividad de la xilanasa en el rango de 0 - 150 35 EXU/ml. Las unidades de la actividad de la xilanasa son definidas como en EP 0 463 706.

#### Aislamiento del ARN

40 La cepa de *A. tubigensis* DS116813 (CBS323.90) fue cultivada en un medio mínimo de *Aspergillus* (por litro 6 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0,52 g de  $\text{KCl}$ , 1,52 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,12 ml de  $\text{KOH}$  4 M, 0,52 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 22 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 11 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,7 de mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de EDTA, 10 g de glucosa) suplementado con extracto de levadura al 0,1% y xilano de cascarilla de avena (Serva) al 3%. 100 ml del medio fueron inoculados con  $2 \cdot 10^8$  de esporas y cultivados en una incubadora de agitación rotatoria a 30°C y 300 rpm durante 48 horas. El micelio fue recolectado mediante filtración 45 usando papel de filtro Miracloth, lavado extensivamente con agua desmineralizada y exprimido entre toallas de papel para remover el exceso de agua. El micelio fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y molido hasta lograr un polvo fino usando mano y mortero. El polvo resultante fue transferido a un tubo estéril de 50 ml y pesado después de lo cual por cada 1-1,2 g de micelio molido 10 ml de reactivo TRIzol (Gibco/BRL) fueron añadidos (max. 25 ml por tubo). El polvo del micelio fue inmediatamente solubilizado mediante mezclado vigoroso (girando en forma de 50 torbellino, 1 min.), seguido por incubación durante 5 min a temperatura ambiente con mezclado ocasional. 0,2 del volumen (TRIzol original) de cloroformo (o sea 2 ml por cada 10 ml de TRIzol usado originalmente) fueron añadidos, girados en forma de torbellino y dejado a temperatura ambiente durante 10 min. Subsiguientemente, la mezcla fue centrifugada a 4°C, 6000 g durante 30 minutos. La fase acuosa superior fue transferida a un tubo nuevo y el ARN total fue precipitado mediante la adición de 0,5 del volumen (TRIzol original) de alcohol isopropilo (o sea 5 ml de alcohol 55 isopropilo por cada 10 ml de TRIzol usado originalmente). Despues de la precipitación de 10 minutos a temperatura ambiente, el ARN fue recuperado mediante centrifugación durante 30 minutos a 6000 g. Despues de remover el sobrenadante el pellet de ARN fue enjuagado con un volumen de etanol al 70%. Despues de la remoción del etanol, el pellet de ARN fue secado al aire. El pellet de ARN secado fue disuelto en 3 ml de buffer GTS (Tris-Cl 100 mM, pH 7,5, tiocianato de guanidio 4 M, lauril sarcosinato de sodio al 0,5%). 10  $\mu\text{l}$  de la solución de ARN fueron usados para 60 determinar la calidad y la concentración de los ácidos nucleicos.

#### Purificación del ARN mediante la centrifugación en solución de CsCl

El ARN aislado fue adicionalmente purificado mediante una modificación del método descrito por Sambrook y otros (Molecular cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Una solución de CsCl/EDTA fue preparada disolviendo 96 g de CsCl en 70 ml de EDTA 10 mM, pH 7,5. DEPC fue añadido para una concentración final de 0,1%. La solución fue dejada durante 30 min a temperatura ambiente y

subsiguientemente puesta en una autoclave durante 20 min a 15 libras por pulgada cuadrada (psi) en ciclo líquido. Después de enfriar la solución el volumen fue ajustado a 100 ml con agua tratada con DEPC. 1,5 ml de esta solución de CsCl/EDTA fueron añadidos a cada tubo de ultracentrífuga Polyallomer (2" x 0,5", 5 ml de capacidad). 3 ml de muestras de ARN (en GTS) fueron puestas en capas sobre 1,5 ml del cojín de CsCl/EDTA. Los tubos de ultracentrífuga fueron llenados hasta dentro de 5 mm desde la parte superior con GTS. Los tubos de ultracentrífuga llenos fueron balanceados de manera precisa con GTS y colocados en tolvas de ultracentrífuga equilibradas. Los tubos de ultracentrífuga fueron centrifugados a 35.000 rpm durante 18 h a 20°C con una lenta aceleración y un freno de desconexión para la desaceleración. Después de la centrifugación la capa superior encima del cojín de CsCl, y parte del cojín fueron removidos con pipetas pasteur limpias, respectivamente (0,5 cm del cojín de CsCl se deja en el tubo). El fondo del tubo fue cortado con una cuchilla caliente con lo cual el fluido remanente fue removido. El fondo del tubo fue llenado con etanol al 70% a temperatura ambiente. El fondo del tubo fue invertido y el pellet de ARN fue secado al aire. El pellet de ARN fue disuelto en 1 ml de TE (buffer de elución del kit de purificación de ARNm de PHARMACIA; ver el aislamiento de ARNm). Nuevamente 10  $\mu$ l fueron tomados para verificar la calidad y la cantidad.

15 *Aislamiento del ARNm*

Para el aislamiento del ARNm un protocolo modificado (usando flujo por gravedad en lugar de la centrifugación) del kit de purificación de PHARMACIA (Cat#27-9258-02) fue usado. La columna de PHARMACIA fue completamente resuspendida por inversión repetida después de lo cual la columna fue rellenada por medio de flujo por gravedad. 20 La columna fue colocada a una temperatura de 50°C y lavada con 1 ml de Buffer de Alta Concentración de Sal. La solución de ARN (en TE) fue calentada hasta 65°C durante 5 min después de lo cual 200  $\mu$ l de buffer muestra fueron añadidos y la solución de ARN fue cargada en la columna. El flujo continuo fue recogido y recargado en la columna. La columna fue lavada 3 veces con 0,5 ml de Buffer de Alta Concentración de Sal y subsiguientemente varias veces con 0,5 ml de Buffer de Baja Concentración de Sal hasta que no sea eluido ningún material que absorba luz UV de la 25 columna. El ARN poli(A)<sup>+</sup> fue eluido con Buffer de Elución precalentado (65°C) del cual 4-5 fracciones de 0,25 ml fueron recogidas. Las concentraciones de las varias fracciones fueron determinadas de manera espectrofotométrica y las fracciones con relación O.D. 260/280 de al menos 1,5 fueron mezcladas. 0,1 del volumen del Buffer Muestra y 2 volúmenes de etanol absoluto fueron añadidos y la solución fue incubada durante toda la noche a -20°C.

30 *ANÁLISIS NORTHERN*

El ARN fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% que contiene formaldehído al 6% y usando 1 x MOPS (MOPS 20 mM/pH 7,0, EDTA 1 mM) como buffer de la electroforesis. Las muestras (aproximadamente 10 g de ARN total o 1 g de ARNm) fueron disueltas en un volumen total de 20 l de buffer de carga (concentraciones 35 finales: MOPS 20 mM/pH 7,0, EDTA 1 mM, formaldehído al 6%, formamida al 50%, 0,05 g de etidiobromuro) y desnaturizadas calentándolas a 68°C durante 10 minutos. Después de la electroforesis durante 3-4 horas a 100 Voltios, el ARN fue visualizado usando un iluminador de luz UV. Para el análisis Northern el gel fue lavado durante 20 minutos en agua desmineralizada y transferido a la membrana de nylon Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham) mediante transferencia capilar. El ARN fue fijado a la membrana mediante horneado a 80°C durante 2 horas. Los transcriptos específicos fueron 40 detectados usando el sistema ECL<sup>TM</sup> o las técnicas de marcado radioactivo estándares como es descrito en Sambrook y otros 1989.

*ANÁLISIS DEL ADNc MEDIANTE ELECTROFORESIS EN UN GEL DE AGAROSA ALCALINO*

45 Este paso de análisis de control reveló el tamaño del ADNc sintetizado y fue usado como una verificación para la detección de la presencia potencial de la estructura de horquilla. Debido a que la actividad específica de la síntesis de la segunda hebra fue mucho menor que aquella de la síntesis de la primera hebra, el volumen usado de la síntesis de la segunda hebra fue 10 veces aquel de la síntesis de la primera hebra.

50 Un gel de agarosa al 1% diluido fue preparado derritiendo 0,6 g de agarosa en 54 ml de agua, enfriando hasta 55°C, añadiendo 6 ml de buffer alcalino 10X (NaOH 0,3 M, EDTA 20 mM), mezclando y moldeando. Las muestras fueron mezcladas (1:1) con buffer de carga de gel alcalino 2X (NaOH 30 mM, glicerol al 20%, 1/10 en volumen de azul de bromofenol saturado). Las muestras fueron corridas (conjuntamente con marcadores de peso molecular marcado <sup>32</sup>P) en buffer alcalino 1 X. El gel fue fijado durante 30 min en ácido acético al 7% y transferido a papel Whatman 3 MM 55 y secado. El gel seco fue expuesto a una película de rayos X la cual fue desarrollada en un procesador de películas automático.

*SÍNTESIS DEL ADNc*

60 Para la síntesis del ADNc tanto el sistema de selección Superscript<sup>TM</sup>(Gibco-BRL) como el Kit de Síntesis del ADNc STRATAGENE han sido usados.

Cuando el ADNc fue sintetizado con el sistema de selección Superscript<sup>TM</sup> 5  $\mu$ g de ARNm fueron usados de acuerdo 65 a las instrucciones del fabricante excepto que el oligonucleótido 6967 fue usado para la síntesis de la primera hebra y que los oligonucleótidos 7676 (5'-fosforilado) y 7677 (no-fosforilado) fueron usados como adaptadores. La hibridación de los oligonucleótidos 7676 y 7677 fue lograda mezclando cantidades equimolares de ambos oligonucleótidos en Tris-HCl 10 mM/pH 7,5, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM. La mezcla fue incubada en un baño de agua de 80°C durante 10 minutos después de lo cual el agua se dejó enfriar lentamente hasta la temperatura ambiente.

## ES 2 287 989 T3

Para la síntesis del ADNc con el Kit de Síntesis del ADNc Strategene se ha optimizado el protocolo para la clonación de los vectores pGBFIN descritos. Los mayores cambios fueron: 1) La cantidad del ADNc sintetizado fue cuantificado mediante precipitación con TCA. 2) La fosforilación de los extremos de los ADNc fue omitida y los ADNc fueron ligados al ADN del vector con extremos fosforilados. 3) El ADNc es extraído con fenol/cloroformo 5 después de la digestión con *Xba*I en lugar de después del fraccionamiento del tamaño. 4) El uso tanto de MMLV-RT (STRATAGENE) y THERMOSCRIPT (Gibco/BRL) en la síntesis de la primera hebra resulta de manera consistente en ADNc con longitudes más grandes que el uso de cualquiera de las enzimas solas. 5.) reacciones de control rastreadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (800 Ci/mmol para prevenir la interferencia con la síntesis) fueron realizadas conjuntamente para el control de la calidad;

10 los componentes de la primera hebra fueron combinados con ARN poli(A)<sup>+</sup> y mezclados de acuerdo con el protocolo y dejados por 10 min. a temperatura ambiente para permitir la hibridación cebador-plantilla.

15 1,5 ul de MMLV-RT (50 U/ul) y 1 ul de THERMOSCRIPT (15 U/ul, GibcoBRL) fueron añadidos a la reacción de la primera hebra para obtener un volumen de la reacción final de 50 ul. Después del mezclado 5 ul de la mezcla de reacción fueron tomados y añadidos a 0,5 ul de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (800 Ci/mmol) para obtener una reacción de control de la primera hebra radiactiva. Las reacciones de la síntesis de la primera hebra fueron incubadas a 37°C durante 0,5 horas seguido de 55°C durante 0,5 horas.

20 La reacción de la síntesis de la primera hebra no radioactiva fue colocada sobre hielo y 20 ul de buffer de la segunda hebra 10X, 6 ul de mezcla de dNTP de la segunda hebra, 114 ul de agua destilada estéril, 2 ul de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (800 Ci/mmol), 2 ul de Rnase H (1,5 U/ul) y 11 ul de ADN polimerasa I (9,0 U/ul) fueron añadidos.

25 Después del mezclado la mezcla de reacción fue incubada a 16°C durante 2,5 horas. Después de la incubación, 10 ul fueron removidos y congelados.

### *Estimación de la cantidad de ADNc sintetizado mediante precipitación con TCA*

30 1 ul de la reacción (control) radioactiva de la primera hebra fue mezclado con 20 ul de agua. De manera similar, 2 ul de la reacción de síntesis de la segunda hebra fueron mezclados con 20 ul de agua. 5 ul de las soluciones así obtenidas fueron moteados (4X para cada solución de control) en filtros Whatmann de fibra de vidrio (GF/C o GF/A, 23 mm de diámetro) y secadas al aire. Los filtros fueron transferidos a 200 ml de pirofosfato de sodio 20 mM y ácido tricloroacético (TCA) helado al 5%. La solución de pirofosfato de sodio/TCA helado fue cambiada 3-4 veces cada 2 min. Los filtros fueron enjuagados con etanol al 70% a temperatura ambiente durante 2 min. Cada filtro fue insertado 35 en un frasco de centelleo, 10 ml de material centellante fueron adicionados y el material radioactivo fue contado después de lo cual la actividad específica del ADNc fue calculada.

### *Enromar el extremo del ADNc y ligadura de los adaptadores*

40 A la reacción de síntesis de la segunda hebra 23 ul mezcla de dNTP para enromar y 2 ul de *Pfu* ADN polimerasa (2,5 U/ul) fueron añadidos después de lo cual la mezcla de reacción fue incubada a 72°C durante 30 min. La mezcla de reacción fue extraída con fenol/cloroformo [200 ul de solución 1:1 (v/v), pH 7-8], extraída con cloroformo [200 ul] y el ADNc fue precipitado añadiendo 20 ul de acetato de sodio 3 M y 400 ul de etanol absoluto seguido por la incubación durante toda la noche a -20°C. El ADNc fue recogido por medio de centrifugación, lavado con etanol al 70% y el pellet de ADNc obtenido fue secado al aire y resuspendido en 8 ul de la solución del adaptador. 1 ul de buffer de ligasa 10X, 1 ul de rATP and 1 ul de T4 ADN ligasa fueron añadidos y la mezcla de ligadura fue incubada a 8°C durante toda la noche o a 4°C durante 2 días. A continuación, la ligasa fue inactivada mediante incubación a 70°C durante 30 min.

### *Digestión de la enzima de restricción de los ADNc y fraccionamiento del tamaño*

50 10 ul de agua estéril (para compensar el volumen en el paso de fosforilación omitido), 28 ul de buffer de enzima de restricción y 3 ul de enzima de restricción (40 U/ul) fueron añadidos al ADNc. La reacción fue incubada a 37°C durante 1,5 horas. Después de añadir 30 ul de agua estéril y 10 ul de STE 10X la mezcla de reacción fue extraída 55 con 100 ul de fenol/cloroformo seguido por una extracción de 100 ul de cloroformo. Los ADNc fueron recogidos por medio de centrifugación después de añadir 200 ul de etanol absoluto (y precipitación durante toda la noche a -20°C), secados y resuspendidos en 14 ul de STE 1X a los cuales 3,5 ul de colorante de carga de la columna fueron añadidos.

60 La matriz SEPHAROSE CL-2B y el buffer STE fueron equilibrados a temperatura ambiente, resuspendidos y usados para moldear una columna en una pipeta de cristal de 1 ml.

65 Despues de ajustar la matriz SEPHAROSE, la columna fue lavada con 10-15 ml de STE. La muestra fue cargada después de lo cual 3 ml de STE fueron añadidos y 0,3 ml de fracciones fueron recogidas (monitoreando el proceso completo con el contador de Geiger). La radioactividad en cada fracción fue estimada mediante mediciones en un contador de centelleo.

# ES 2 287 989 T3

## Análisis de electroforesis en gel de no desnaturalización

3 ml de TBE 10X, 5 ml de acrilamida al 30% [(p/v), 29:1 de acrilamida:bis-acrilamida] y 22 ml de agua fueron mezclados, desgasificados, después de lo cual 150 ul de persulfato de amonio al 10% hecho recientemente y 20 ul de 5 TEMED fueron añadidos. La solución fue aplicada a los moldes de gel ensamblados y se dejó asentar, 8 ul de cada fracción (recogida de la columna) que contenía radioactividad fueron tomados y mezclados con 2 u de buffer de carga 5X. Las muestras fueron cargadas conjuntamente con un marcador de peso molecular radioactivo y sometidas a electroforesis. Después de la electroforesis, los geles fueron fijados en 100 ml de ácido acético al 7% durante 20-30 min, secados sobre papel Whatmann 3MM y expuestos a la película de rayos X.

## 10 Procesamiento de las fracciones de ADNc

En base a los resultados de la electroforesis en gel de no desnaturalización, las fracciones que contienen la distribución deseada de tamaño fueron mezcladas. (Normalmente, las fracciones con ADNc por encima de 0,5 kb son 15 recogidas. Si se desea, sub bibliotecas pueden ser construidas por ligadura de las fracciones de tamaño diferente seleccionadas con el vector).

20 2 ul de las fracciones mezcladas fueron removidas y moteadas en un filtro GF/C de Whatman. El filtro fue lavado 3 veces con 10 ml de solución de pirofosfato/TCA helado, enjuagado con 10 ml de etanol al 70%, secado y contado con líquido de centelleo para estimar la cantidad de ADNc presente. Las fracciones mezcladas fueron precipitadas durante toda la noche a -20°C añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto y recogidas por medio de la centrifugación. La precipitación fue asistida añadiendo ARNt purificados a 10 ug/ml como portadores. Después de lavado, el pellet 25 fue secado al aire y resuspendido en agua o TE estéril hasta 10-20 ng/ul. Los ADNc fueron ligados al ADN del vector con un exceso a una relación molar de 5:1. Subsiguientemente, la mezcla de ligadura fue transformada a células bacterianas XL10-Gold (STRATAGENE) de acuerdo con el protocolo (correspondiente).

## Ejemplo 1

### 1.1 Descripción y construcción del vector de expresión *pGBFin2*

#### 30 1.1.a Fundamentos

La detección de la expresión en *A. niger* puede ser mejorado por un número de factores los cuales cuando son usados en combinación son capaces de producir el resultado más óptimo. Un sistema de transformación efectivo es 35 preferido para obtener un número suficiente de transformantes fúngicos. Debe tenerse el cuidado de mantener intactos los ADNc en la biblioteca durante el procedimiento de clonación. Además, la detección será más exitosa cuando los niveles de expresión del producto génico del ADNc deban ser suficientemente altos. Por lo tanto, en las construcciones de la clonación de expresión las funcionalidades usadas para activar la expresión de los ADNc fueron derivadas de un 40 gen el cual está altamente expresado. En el sistema integrativo el casete de expresión está preferiblemente dirigido a un locus el cual está altamente expresado y el cual, aún más preferiblemente, ha sido amplificado en el genoma. En este ejemplo el locus del *glaA* fue seleccionado el cual está presente en 3 copias en el genoma de la cepa de *A. niger* DS2978 (depositada el 8 de Abril de 1997 en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda bajo el número de acceso CBS 646.97). Varios vectores de expresión, diseñados tanto para el direccionamiento eficiente hacia este locus 45 como permitir las diferentes estrategias de clonación del ADNc fueron construidos y analizados (ver ejemplos 1 - 7).

#### 45 1.1.b Diseño básico de los vectores de expresión integrativos

Moléculas lineales de ADN son preferidas para la integración dirigida dentro del genoma de los hongos filamentosos. Además, tanto el extremo 5' como el 3' (flancos) preferiblemente consisten de ADN homólogo al sitio de 50 integración deseado. Los fragmentos de la transformación, por lo tanto, comprenden el casete de expresión (el gen de interés regulado por un promotor y un terminador apropiado) así como un marcador de selección flanqueado por los dominios seleccionados 5' y 3'. Estos fragmentos son clonados en un vector de *E. coli* para la propagación del plásmido. Los vectores de expresión resultantes son diseñados de manera tal que las secuencias de *E. coli* sean removidas 55 durante la linearización y el aislamiento del fragmento de la transformación.

Para la selección de los transformantes el marcador de selección *amdS*, cuya expresión es controlada por el promotor del *gpdA* de *A. nidulans*, es usado. Usar el promotor del *gpdA* fuerte resultará predominantemente en transformantes de una copia. Para lograr niveles alto de expresión el ADNc es fusionado con el promotor del *glaA*. Un número de combinaciones de los sitios de restricción únicos para las enzimas (de corte raro) (por ejemplo *PacI* y *AscI* [Ejemplo 1], *EcoRI* y *XhoI* [Ejemplos 4 y 6] o *HindIII* y *XhoI* [Ejemplo 7]) son introducidas en un conjunto de vectores de expresión integrativos en el punto de inicio de la transcripción propuesta del promotor del *glaA*.

60 Debido a que la inserción dirigida (selección) de las moléculas de ADNc en el genoma ocurre a través de la recombinación homóloga, los casetes de ADNc son preferiblemente flanqueados por fragmentos de ADN homólogos al sitio diana en el genoma. Por lo tanto el casete de integración es flanqueado tanto en el extremo 5'- como en el 3'- por aproximadamente 2 kb de la secuencia de ADN homólogo al locus del *glaA*. Para facilitar la remoción del ADN de *E. coli* de la construcción, sitios *NotI* únicos fueron introducidos (los sitios de restricción *NotI* son raros, minimizando de esta forma el riesgo de la digestión no deseada del ADNc introducido).

# ES 2 287 989 T3

## 1.1.c Construcción de un vector de expresión intermedio, pGBTOP8

Los oligonucleótidos AB5358 y A35359 fueron hibridados en cantidades equimolares y ligados en los sitios de restricción *Eco*RI e *Hind*III de pTZ18R, introduciendo de esta forma un polienlazador *Not*I-*Xho*I-*Eco*RI-*Sna*BI-*Hind*III (el sitio *Eco*RI no fue restaurado). El plásmido resultante fue llamado pGBTOP1. Un fragmento *Xho*I-*Eco*RI de 1,8 kb, que comprende la región promotora del gen *glaA*, fue aislado del plásmido pAB6-1 (contiene el locus del *glaA* entero de *A. niger* en un fragmento *Hind*III de 15,5 kb, clonado en pUC19 como es descrito en una de nuestras patentes anteriores, EP-A-0 635 574) y clonado en los sitios *Xho*I - *Eco*RI del plásmido pGBTOP1, que produce el plásmido pGBTOP2.

10 Para intervenir en el direccionamiento de las construcciones hacia la región que no codificadora 3' del *glaA* dos partes diferentes de esta región fueron clonadas en cualquiera de los lados del casete de expresión. Estas partes fueron designadas 3' *glaA* y 3" *glaA*, esta última siendo la parte más aguas abajo de la región.

15 El fragmento de 3" *glaA* fue generado mediante PCR usando los oligonucleótidos AB5291 y AB5292 (el oligo AB5291 fue diseñado para romper un sitio *Eco*RI no deseado). El fragmento PCR generado fue usado como una plantilla en una segunda reacción PCR usando los oligonucleótidos AB5361 y AB5292, generando de esta forma un sitio *Not*I en el fragmento. El fragmento PCR fue digerido con *Not*I y *Xho*I y clonado en los sitios de restricción correspondientes del plásmido pGBTOP2, produciendo el pGBTOP5.

20 Los sitios *Eco*RI no deseados en la región 3' no codificadora del *glaA* fueron rotos usando un enfoque PCR. Una reacción PCR de fusión fue llevada a cabo usando los oligos AB5288 (5'), AB5293 (3' inverso), AB5290 (interno, inverso) y AB5289 (interno, codificador). Los oligos AB5290 y 5289 eran oligos complementarios diseñados para la ruptura del sitio *Eco*RI en esa posición mientras el oligo AB5293 fue diseñado para romper un segundo sitio *Eco*RI. 25 El producto PCR de fusión resultante fue digerido con *Sna*BI y *Hind*III y clonado en los sitios correspondientes del pGBTOP2, resultando el pGBTOP6. El pGBTOP6 fue usado como plantilla en una segunda reacción PCR usando los oligonucleótidos AB5363 y AB5567. El producto de PCR resultante fue digerido con *Sna*BI y *Hind*III y clonado en los sitios correspondientes del pGBTOP5, resultando el plásmido pGBTOP8 (ver la Figura 1).

## 30 1.1.d Construcción del pGBFin2

Usando los oligonucleótidos 6963 y 7266, y 10 ng del vector pAB6-1 (EP-A-0 635 574) como una plantilla, un fragmento PCR específico para  $P_{glaA}$  fue generado. Este fragmento fue digerido con *Eco*RI y *Sma*I e introducido en el vector digerido con *Eco*RI y *Sna*BI pGBTOP-8, resultando el vector pGBFin1. La secuencia del fragmento PCR introducido fue confirmada mediante análisis de secuencias.

Los sitios *Xho*I fueron introducidos al fragmento  $P_{gpdA}$ -*amdS* mediante PCR. Usando los oligonucleótidos 7423 y 7424 y el plásmido pGBAAS1 (EP-A-0 635 574) como una plantilla, un fragmento de 3,1 kb fue generado. Este fragmento fue digerido con *Eco*RI e introducido en el sitio *Eco*RI de pTZ19R, resultando el plásmido pTZamdsX-1. 40 El *Xho*I-*Cla*I de 2,6 Kb del pTZamdsX-1 fue reemplazado por el fragmento correspondiente del plásmido pGBAAS-1 para evitar las mutaciones provocadas por el proceso PCR. El *Kpn*I-*Cla*I de 0,5 kb del pTZamdsX-1 fue reemplazado por el fragmento correspondiente del plásmido pTZamdsX-1 para evitar las mutaciones provocadas por el proceso PCR. El análisis de secuencia del fragmento de 0,5 kb remanente del plásmido resultante pTZamdsX-2, reveló una mutación simple en el fragmento  $P_{gpdA}$ .

45 El fragmento *Xho*I de 3,1 kb, que comprende el casete de selección  $P_{gpdA}$ -*amdS*, fue aislado a partir del vector pTZamdsX-2 e introducido en el sitio *Xho*I único del pGBFin1, resultando el vector pGBFin2 (ver la Figura 2).

## 50 1.2 Expresión de la fitasa usando el vector de expresión pGBFin2

### 50 1.2.a Fundamentos

Tanto el direccionamiento eficiente de la construcción de expresión hacia los loci del *glaA* de *A. niger* DS2978 como un nivel de expresión suficientemente alto del ADNc de interés son preferidos para la aplicación óptima de la 55 detección de la expresión en *A. niger*. Por lo tanto las propiedades de la construcción de expresión fueron analizadas usando un gen modelo, *phyA*, para el cual la producción de proteína esperada por copia del gen integrada a un locus del *glaA* ha sido establecida previamente.

### 60 1.2.b Construcción del vector de expresión de la fitasa, pGBFin5

Un fragmento *phyA* fue generado mediante PCR usando los oligonucleótidos 6964 y 6965 y el plásmido pAF2-2S (descrito en EP-A-0 420 358) como una plantilla. El fragmento PCR fue clonado en el sitio *Sma*I del vector pTZ18R, resultando el pTZFyt1. El análisis de secuencia de la inserción del pTZFyt1 reveló que no existían desviaciones a partir de la secuencia presente en el pAF2-2S. Un fragmento *Ascl*-*Pac*I de 1,7 kb que comprende la secuencia del *phyA* completa, fue aislado a partir de pTZFyt1 y clonado en el pGBFin2 digerido con *Ascl* - *Pac*I, resultando el vector pGBFin5 (ver la Figura 2).

1.2.c *Transformación del DS2978 de Aspergillus niger con pGBFin5*

El plásmido pGBFin5 (100 g) fue digerido con *NotI* (150 Unidades, 4 horas a 37°C). La proteína fue removida por extracción con un volumen igual de Fenol-Cloroformo-Isoamilalcohol (24:23:1). El ADN fue concentrado por precipitación con alcohol y usado para la transformación de la DS2978 de *A. niger* como fue descrito. Los transformantes fueron purificados en placas de medio mínimo selectivo y subsiguientemente almacenados.

1.2.d *Ánalisis de los transformantes del pGBFin5*

10 El direccionamiento del casete de integración hacia el locus del *glaA* fue analizado para 24 transformantes independientes, usando los oligonucleótidos 5454 y 5456, y para la detección de la presencia del gen *phyA* usando los oligonucleótidos 6964 y 6965 específicos para el *phyA*.

15 Un producto de PCR indicativo del direccionamiento correcto del casete de integración del pGBFin5 hacia un locus del *glaA* fue encontrado en un número alto de transformantes (12 de 24 = 50%), mientras todos los transformantes mostraron un producto de PCR indicativo de la presencia de una copia del *phyA* en su genoma.

20 Seis transformantes positivos fueron analizados en relación con la producción de fitasa en un experimento de fermentación en un frasco de agitación. La actividad de la fitasa para todos los transformantes fue de 140-180 U/ml. Tal nivel de producción es indicativo de la integración de una copia del pGBFin5 en cada transformante.

25 Se concluyó que tanto los niveles de expresión y frecuencia seleccionados eran suficientes para el uso del sistema de expresión diseñado en los experimentos de la clonación de expresión.

26 Ejemplo 2

2.1 *Construcción y análisis de una biblioteca de ADNc*

30 2.1.a *Fundamentos*

Las bibliotecas de expresión son construidas a partir de un pool de ARNm el cual se espera que comprenda los transcriptos de interés. Por esta razón es preferible, aunque usualmente no necesario, aislar el ARNm del micelio aislado de un cultivo cultivado bajo condiciones inductoras. Este ARNm aislado es analizado para detectar la presencia 35 de transcriptos de interés y para determinar la calidad del ARNm. Si el ARNm está intacto y comprende el transcripto de interés este puede ser usado para la síntesis del ADNc. La clonación del ADNc en el vector de expresión pGBFin2 requiere la presencia de un sitio *PacI* en el extremo 5'- y de un sitio *AscI* en el extremo 3'- del ADNc. Por lo tanto el oligonucleótido cebador de la primera hebra y las secuencias adaptadoras usadas fueron diseñadas para satisfacer estos 40 pre-requisitos. El adaptador fue diseñado de manera tal que sea compatible con el sitio *PacI* en el pGBFin2 mientras el sitio *PacI* no es restaurado después de la ligadura del ADNc en el vector. Esto hace posible la discriminación entre las moléculas del vector que comprenden una inserción del ADNc y las moléculas del vector sin la inserción.

2.2 *Preparación de una biblioteca de ADNc a partir de A. tubigensis. ARNm inducido para la actividad de la xilanasa*

45 La DS116813 de *A. tubigensis* (CBS323.90) fue cultivado bajo condiciones inductoras. Las muestras del medio fueron tomadas en diferentes puntos de tiempo y analizadas en relación con la actividad de la xilanasa. La actividad máxima fue alcanzada después de 66 hr de cultivo, mientras los niveles de la actividad de la xilanasa se mantuvieron constantes hasta 7 días después del comienzo del experimento. Las muestras del micelio fueron tomadas a diferentes puntos de tiempo y el ARN total fue aislado a partir de estas muestras. La presencia de los transcriptos específicos 50 para el *xylA* fue analizada en un experimento Northern blot usando una sonda específica para la xilanasa. Los niveles máximos de ARNm del *xylA* fueron determinados después de 48 horas de condiciones inductoras mientras el ARNm del *xylA* aún era detectable después de 66 horas. Después de la incubación prolongada del micelio en un medio inductor no se detectó ARNm del *xylA*. En todos los casos el transcripto específico para el *xylA* estaba aparentemente intacto. A partir del ARN aislado después de 48 hr bajo condiciones inductoras el ARNm fue aislado. Después del 55 análisis Northern, que muestra que el ARNm del *xylA* estaba intacto, este ARNm fue usado para la síntesis del ADNc (de acuerdo al sistema de selección Superscript™ [Gibco-BRL]) usando el oligonucleótido 6967 como un cebador para la síntesis de la primera hebra. Después de la hibridación de un enlazador específico para *PacI*, el ADNc fue digerido con *AscI* y separado por tamaño usando las columnas de Sephadryl suministradas con el kit de síntesis del ADNc (sistema de selección Superscript™ [Gibco-BRL]). Tanto el ARNm como el ADNc fueron analizados para 60 detectar la presencia del *xylA* intacto en las muestras usando el análisis Northern blot y Southern blot respectivamente y mediante el análisis por PCR. El ADNc resultante fue ligado en el pGBFin2 digerido con *Ascl-PacI* e introducido mediante electroporación en *E. coli* resultando una biblioteca primaria de aproximadamente 17000 transformantes. El análisis de 24 colonias aleatorias reveló 5 plásmidos sin inserción, mientras los restantes plásmidos tenían tamaños de inserciones entre 0,5 y 2 kb. La biblioteca de *E. coli* fue reunida por medio del raspado de las placas en un volumen 65 total de 25 ml de medio 2xTY. 10 ml del medio fueron usados para preparar caldos glicerol mientras 2xTY fue añadido a la suspensión remanente de *E. coli* hasta un volumen final de 100 ml. El ADN plasmídico fue aislado de su cultivo después de 2 horas de cultivo a 37°C.

## Ejemplo 3

3.1 *Construcción y análisis de una biblioteca de expresión en A. niger*5 3.1.a *Fundamentos*

La DS2978 de *A. niger* es transformada usando el ADN aislado a partir de la biblioteca de ADNc en *E. coli*, como es descrito en el Ejemplo 2.2 anterior. Los transformantes son seleccionados por la presencia del marcador de selección *amdS* mediante el cultivo en acetamida como la única fuente de N. Debido a que tanto el marcador de selección *amdS* como el casete de expresión del ADNc están presentes en el fragmento de integración cultivado en acetamida esto es indicativo de la presencia de un casete de expresión del ADNc. Las conidioesporas de los transformantes positivos del *amdS* son transferidas a placas de medio selectivo para evitar el aislamiento de falsos positivos y son subsiguientemente transferidas a placas microtiter que comprenden tubos inclinados de PDA solidificado. Esta biblioteca madre es usada para detectar la producción de enzimas de interés, por ejemplo la xilanasa. Debido a que sería útil si los transformantes que producen enzimas pudieran ser usados directamente para la producción de enzimas a una escala superior es de interés determinar los niveles de producción de enzimas en las fermentaciones en frascos de agitación.

3.2 *Transformación de la DS2978 de A. niger*

20 El ADN fue aislado de la biblioteca de ADNc de *E. coli* amplificada como fue descrito. El ADN total del plásmido (100 g) fue digerido por 4 horas a 37°C con *NotI* (150 U) para remover la *E. coli* derivada de las secuencias del plásmido y con *PacI* (30 U). Después de la purificación del ADN mediante extracción con un volumen igual de Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol (24:23:1) el ADN fue recuperado por precipitación con alcohol y disuelto en 100 l de agua estéril desmineralizada. Las transformaciones múltiples de la DS2978 de *A. niger* fueron realizadas usando 2·10<sup>7</sup> 25 de protoplastos y 10 g de ADN plasmídico. Después de aproximadamente 10 días de incubación a 30°C, 1900 transformantes fueron recogidos y las conidioesporas fueron transferidas a placas que contenían un medio selectivo. Después de 3 días de incubación a 30°C las conidioesporas de cada transformante fueron transferidas a cavidades individuales en un plato microtiter de 96 cavidades, cada cavidad conteniendo aproximadamente 100 l de PDA solidificado.

30 3.3 *Ánalisis de la biblioteca de expresión de A. niger*

35 Las conidioesporas de los transformantes individuales fueron transferidas a placas de detección de xilanasa hechas de medio mínimo de *Aspergillus* (por litro 6 g de NaNO<sub>3</sub>, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,12 ml de KOH 4 M, 0,52 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 22 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,7 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,6 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5 mg de MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,5 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 50 mg de EDTA, 10 g de glucosa) suplementado con xilano de cascarilla de avena al 2% y agar bacteriológico #1 al 2% (Oxoid, Inglaterra), que tienen una apariencia turbia debido a la presencia de xilano no disuelto. Después de 2 días de incubación a 30°C una formación de un halo pudiera ser observada para 10 colonias, que indica la degradación del xilano por medio de las xilanosas. Las conidioesporas de los transformantes positivos fueron aisladas y usadas para inocular las placas de PDA. El ADN fue aislado a partir 40 de colonias simples y analizado mediante PCR en relación con la integración del plásmido de expresión en el locus del *glaA* (“direcciónamiento”) usando los oligonucleótidos 5454 y 5456.

Se mostraron 8 de 17 colonias que fueron dirigidas hacia uno de los loci del *glaA* (47%).

45 3.4 *Ánalisis de los niveles de producción de xilanasa en los transformantes*

50 Los transformantes que producen xilanasa, identificados en el ensayo de la placa de xilanasa, fueron cultivados en fermentación en frasco de agitación. Las muestras del medio fueron tomadas después de 5 días de fermentación y analizadas en relación con la actividad de la xilanasa. Los resultados son presentados en la Tabla 1.

5. 3.5 *Ánalisis genético de las cepas que producen xilanasa*3.5.a *Fundamentos*

55 Múltiples genes que codifican la xilanasa han sido encontrados en los hongos. Por lo tanto era de interés determinar si cada cepa que produce xilanasa identificada en el experimento de la clonación de expresión contiene un ADNc idéntico. Además, fueron encontradas claras diferencias entre las cepas individuales que producen xilanasa. Estas diferencias pudieron ser provocadas tanto por la presencia de genes diferentes que codifican xilanasa como por las diferencias en la región no codificadora 5' del ADNc. Lo último pudiera ser debido a la degradación parcial del ARNm durante el procedimiento de aislamiento del ARN o el ARNm o debido a una síntesis incompleta del ADNc. 60 Para investigar esto las secuencias del 5' de los ADNc introducidos fueron determinadas.

3.5.b *Ánalisis de los clones que producen xilanasa*

65 Las plantillas PCR fueron preparadas para cada transformante que produce xilanasa como fue descrito. Los transformantes fueron analizados para detectar la presencia de una construcción de expresión que comprende el ADNc del *xylA* en un experimento PCR usando los oligonucleótidos 6856 (*xylA* interno) y 6963 (P<sub>glaA</sub>). Los transformantes #5C2 y #7A8 mostraron que comprendían un casete de expresión con el gen *xylA* fusionado con el P<sub>glaA</sub>.

# ES 2 287 989 T3

Usando los oligonucleótidos 6963 ( $P_{glaA}$  específico) y 6967 (ADNc del extremo 3' específico) fragmentos PCR fueron generados los cuales se esperaba comprendieran el ADNc completo así como 200 bp de  $P_{glaA}$ . Una secuencia de ADN parcial de los fragmentos PCR fue determinada usando el oligonucleótido 6963 para seis transformantes. Secuencias indicativas de la presencia de tanto el gen *xylA* (2 clones) como el *xylB* (4 clones) fueron detectadas (secuencias de ADN del *xylA* y *xylB* son descritas en nuestras solicitudes de patentes anteriores EP-A-0 463 706 y WO 94/14965, respectivamente). Diferentes longitudes de la región no traducida 5'- fueron encontradas. Sin embargo, no se observó ninguna relación entre la longitud de la región no traducida 5'- del ADNc y los niveles de producción de xilanasa de los diferentes transformantes del *xylB*. En contraste, la región corta no traducida 5'- encontrada en el transformante positivo del *xylA* #5C2 resultó en una reducción significativa de la actividad de XYLA. Sin embargo, está claro que los niveles de producción eran todavía suficientes para identificar este transformante en un ensayo de placa.

Tabla 1

15 Análisis de los transformantes que producen xilanasa. Los transformantes positivos fueron analizados en relación con los niveles de producción de xilanasa en un experimento de fermentación. La identidad de los genes que codifican la xilanasa fue determinada por secuenciación parcial de la inserción del ADNc. Los detalles están descritos en el texto.

20

TABLA 1

25	Trans-formante	EXU/ml	Gen	Secuencia	Observa-ciones
	DS2978	3	-		Cepa madre
30	#2G1	64	<u><i>xylB</i></u>	<b>cctcaagccaaagtctctttcaacATG</b>	
35	#3A11	290	<u><i>xylB</i></u>	<b>gtctctttcaacATG</b>	
40	#3A12	27	nd		
45	#4C10	401	<u><i>xylB</i></u>	<b>tcctcaagccaaagtctctttcaacATG</b>	
50	#5C2	37	<u><i>xylA</i></u>	<b>atcatcATG</b>	
55	#5C12	2	-		Negativo en el ensayo de placa
60	#7A8	505	<u><i>xylA</i></u>	<b>aaaagcccttactacttatacatcaatcatcATG</b>	
	#7B4	51	nd		
	#11E3	272	<u><i>xylB</i></u>	<b>ctcaagccaaagtctctttcaacATG</b>	
	#14B1	43	nd		
	#14B5	52	nd		

nd = no determinado

65

## Ejemplo 4

4.1 *Construcción y análisis de un vector de expresión integrativo aplicable para la clonación de ADNc mediada con EcoRI-XhoI (pGBFIN11)*5 4.1.a *Fundamentos*

Las bibliotecas de expresión son construidas a partir de los pools de ADNc. El ADNc que codifica la actividad deseada es examinado (detectado) a través de un formato de detección descrito previamente. Debido a que las características exactas del ADNc (por ejemplo los sitios de las enzimas de restricción presentes dentro del ADNc) en la mayoría de los casos no son conocidas antes de la identificación real de la ausencia de los sitios de restricción en el ADNc. Por lo tanto, existe la posibilidad de que en la construcción como es descrito en el ejemplo 2 el ADNc deseado aún contenga un sitio *AscI* interno y de esta forma será clonado como un clon inactivo de longitud no completa el cual no puede ser detectado.

15 Como consecuencia el plásmido pGBFIN11 ha sido construido que permite la clonación de los ADNc con extremos cohesivos *EcoRI-XhoI* sin evitar el peligro de los sitios de restricción internos. El cebador 3' usado para la síntesis del ADNc de la primera hebra contiene un sitio *XhoI* (no metilado) mientras durante la síntesis del ADNc son usados dCTP metilados. Como consecuencia los ADNc pueden ser digeridos con *XhoI* evitando la fragmentación de los 20 ADNc debido a los sitios *XhoI* internos (estos sitios *XhoI* son metilados y de esta forma, no digeridos). El pGBFIN11 es un vector derivado del pGBFIN2 en el cual los sitios *XhoI* y *EcoRI* existentes han sido removidos después de lo cual el sitio de clonación del ADNc ha sido cambiado de *PacI-AscI* a *EcoRI-XhoI*. De esta forma, todas las características y funcionalidades en el vector de expresión son idénticas excepto las de los sitios de restricción usadas para la clonación de los ADNc.

25 4.1.b *Construcción del vector pGBFIN11*

En una primera etapa los *XhoI*, *HindIII*, *ScalI* y *EcoRI* existente presenten en el extremo 5' del promotor del *gpdA* fueron removidos mediante PCR y un sitio cortador (raro) *SnaBI* fue introducido, resultando en una construcción 30 intermedia del pGBFIN12. En un segundo paso de la PCR el promotor del *glaA* existente y el ciclo de clonación del ADNc fueron ajustados de tal manera que I) el sitio de clonación de ADNc *PacI-AscI* existente fue cambiado a un sitio de clonación *EcoRI-XhoI*, II) al mismo tiempo el sitio *EcoRI* en el promotor fue inactivado, III) al mismo tiempo el promotor fue acortado (comenzando desde el sitio *Sall* en la posición 6084 en el pGBFIN2 en lugar de comenzar desde el sitio *XhoI* en la posición 5289 en el pGBFIN2) y IV) al mismo tiempo el sitio *XhoI* presente en la posición 5289 fue 35 inactivado y una enzima de restricción cortadora rara (segunda) fue introducida. El plásmido resultante (pGBFIN11) está representado en la Figura 3.

4.2 *Expresión de la fitasa usando el vector pGBFIN11*40 4.2.a *Fundamentos*

En el vector pGBFIN11 un gen de prueba ha sido insertado (por ejemplo fitasa) de una forma similar a como ha sido descrito en el ejemplo 1.2 para el vector pGBFIN2. El vector resultante, pGBFIN13, ha sido analizado conjuntamente con el vector pGBFIN5 para demostrar la funcionalidad de este vector tipo pGBFIN11.

45 4.2.b *Construcción de un vector de expresión de la fitasa, pGBFIN13*

Similar a la situación descrita para el vector pGBFIN2 (ejemplo 1; 1.2.b), también la funcionalidad del vector pGBFIN11 fue analizada a través del uso de un gen modelo, el *phyA*.

50 4.2.c *Transformación del *Aspergillus niger* con pGBFIN13*

Similar a la situación descrita para el vector pGBFIN2 (ejemplo 1; 1.2.c) el vector pGBFIN13 fue digerido con *NotI* para generar el fragmento lineal el cual pudiera ser usado para el direccionamiento durante la transformación. 55 Después de la transformación, los transformantes seleccionados de manera aleatoria fueron purificados para permitir el análisis subsiguiente.

4.2.d *Ánalisis de los transformantes del pGBFIN13*

60 Nuevamente, similar a la situación descrita para el vector pGBFIN2 (ejemplo 1; 1.2.d) los transformantes del pGBFIN13 purificados fueron analizados en relación con el direccionamiento de las construcciones en el locus correcto y la expresión de la fitasa. Tanto la expresión de la fitasa como las frecuencias de direccionamiento estuvieron en el rango de lo que ha sido descrito previamente para los transformantes del pGBFIN2. De esta forma, se concluyó que para el vector pGBFIN11 tanto las frecuencias de direccionamiento como los niveles de expresión fueron suficientes para el uso del sistema de expresión diseñado en la clonación de expresión de los ADNc con los extremos cohesivos *EcoRI-XhoI*.

## Ejemplo 5

5.1.a *Fundamentos*

5      Despues de la demostración de la funcionalidad del vector pGBFin11 el sistema de clonación de expresión completo basado en este tipo de vector (extremos cohesivos *EcoRI-XhoI*) fue analizado. Debido a que la introducción de un sitio de clonación del ADNc *EcoRI-XhoI* permitió el uso del kit de clonación del ADNc STRATEGENE, la aplicabilidad de este sistema (el cual tiene el beneficio de evitar la digestión de los ADNc intactos durante la digestión de restricción para generar el sitio de clonación cohesivo 3') en combinación con el nuevo vector pGBFin11 fue analizada. Similar a lo que ha sido descrito en los ejemplos 2 y 3, un pool de ARN derivado de *A. niger* fue usado para generar, con el protocolo STRATEGENE optimizado para la clonación en los vectores pGBFin como ha sido detallado en materiales y métodos, un pool de ADNc (con los extremos cohesivos *EcoRI-XhoI*). Este pool de ADNc fue clonado en el vector pGBFin11 para generar una biblioteca de *E. coli*. Subsiguentemente, las eficiencias de la clonación fueron comparadas con la construcción de la biblioteca anterior en el vector pGBFin2.

15     *5.1.b. Preparación de una biblioteca de ADNc a partir de un cultivo de *Aspergillus* inducido por xilanasa*

El micelio a partir del cual (como ha sido descrito previamente) fue conocido que las xilananas eran expresadas en el momento de la cosecha fue usado para sustraer el ARN total como ha sido detallado en Materiales y Métodos. 20    Subsiguentemente, el pool de ARN total fue adicionalmente purificado mediante centrifugación a través de un cojín de CsCl. Despues de verificar la calidad del ARN, el ARNm fue aislado a través de un protocolo modificado con el Kit de purificación de Pharmacia. Para la síntesis del ADNc el Kit de Síntesis de ADNc Strategene fue usado. El protocolo de la síntesis del ADNc correspondiente fue adaptado hacia la optimización de la clonación en los vectores pGBFin. 25    Las principales adaptaciones incluyen; 1) Las cantidades de ADNc fueron cuantificadas a través de la precipitación mediante TCA; 2) La fosforilación de los extremos de los ADNc fue omitida y los ADNc fueron ligados al ADN del vector el cual no fue desfosforilado. Esto evitó la ligadura de múltiples inserciones en un vector (lo que evitaría la expresión de varios sino todas las inserciones presentes en ese vector). 3) El ADNc fue extraido con fenol/cloroformo despues de la digestión con *XhoI* en lugar de despues del fraccionamiento en tamaños. 4) Tanto MMLV-RT como Thermoscript fueron usados en la síntesis de la primera hebra la cual resultó en ADNc con longitudes más grandes 30    que con el uso de cualquiera de las enzimas por separado. 5) Las reacciones de control fueron rastreadas con [ $\alpha$ <sup>32</sup>P] dATP (800 Ci/mmol, para evitar la interferencia con la síntesis) para el control de la calidad. Un pool de ADNc fue construido de acuerdo con el protocolo así modificado. Para el pGBFin11, un pool del vector pGBFin11 bien digerido doblemente (*EcoRI-XhoI*) (ligadura de bases < 1%) fue preparado. El pool de ADNc generado fue ligado en el vector pGBFin11 y transformado a células bacterianas XL10-Gold de *E. coli* para generar una biblioteca.

35     *5.1.c. Análisis de la biblioteca de ADNc de *E. coli* (en el vector pGBFin11)*

El procedimiento descrito hasta ahora en este ejemplo resultó en un incremento significativo de la eficiencia de la ligadura y la transformación. Con el pool del ADNc aislado de acuerdo con el procedimiento optimizado fue posible 40    obtener en combinación con el pool-vector pGBFin11 bien digerido doblemente obtener una biblioteca de *E. coli* de un tamaño de  $10^6$ - $10^7$  comenzando desde 1 ug de pGBFin11.

A continuación a través de experimentos de hibridación la frecuencia de los ADNc del *gpdA* y *xyI/B* en la biblioteca de ADNc de *E. coli* fueron establecidos. Debido a que el gen *gpdA* representa un gen relativamente largo y el gen *xyI/B* es relativamente corto, la comparación de porcentajes de los clones de longitudes completa pudiera aclarar la calidad de los ADNc generados e identificar si hubo diferencias en la eficiencia de generar ADNc de longitud completa entre los ARNm más largos y cortos.

Despues de la identificación de los clones positivos *xyI/B* y *gpdA*, un número selecto fue secuenciado para determinar el porcentaje de los clones de longitud completa dentro de la población de ADNc que se origina a partir de estos genes particulares. Tanto para los ADNc del *gpdA* como del *xyI/B* se mostró que el porcentaje de los clones de longitud completa estuvo por encima de 85%. Adicionalmente, la secuenciación mostró que ninguno de los clones contenía inserciones múltiples.

55     De esta forma, se concluyó que el protocolo de la clonación, la purificación del ARN optimizado y la síntesis del ADNc resultaron en un mejoramiento considerable de la eficiencia y la calidad de la construcción de la biblioteca de ADNc (en términos de tamaño y frecuencias de las bibliotecas, en términos de porcentajes de longitud completa y en términos de clonar solamente una inserción de ADNc en el vector de expresión)

60     *5.1.d. Transformación de las construcciones de pGBFin11 que contienen el *xyI/B* de *A. niger* y detección de la actividad de la xilanasa*

Un número de clones de *xyI/B* identificados (y analizados en 5.1.c) fueron transformados para *A. niger* (similar a como ha sido descrito para los vectores pGBFin5 y pGBFin13). Despues de la purificación de un número selecto de transformantes, estos transformantes fueron examinados en placas para la actividad de la xilanasa. Todos los transformantes analizados fueron positivos en el ensayo de placa de xilanasa demostrando la aplicabilidad del vector pGBFin11 para los propósitos de la clonación de expresión en *A. niger*.

## Ejemplo 6

6.1 *Construcción de un segundo vector de expresión integrativo aplicable para la clonación del ADNc mediada con EcoRI-XhoI (pGBFin22)*5 6.1.a *Fundamentos*

Durante la construcción del vector pGBFin11 el segundo fragmento PCR (usado para inactivar el sitio *EcoRI* en el promotor de la glucoamilasa, entre otras modificaciones listadas en el ejemplo 4) fue secuenciado para probar la modificación correcta. Esto demostró la modificación correcta de los sitios de restricción indicados pero también mostró un número de pequeños errores PCR en la parte más aguas arriba del promotor de la glucoamilasa. Por lo tanto basado en la región del promotor de la glicoamilasa que no cambió en el pGBFin12 un nuevo vector fue construido en el cual los errores PCR introducidos estaban ausentes y el cual era apropiado para la clonación de los ADNc con los extremos cohesivos *EcoRI-XhoI*.

15 6.1.b *Construcción del vector de expresión pGBFin22*

En el pGBFin12 (Figura 3) el sitio *XhoI* remanente fue inactivado después de la digestión con *XhoI* a través del relleno de extremos con *T<sub>4</sub>* ADN polimerasa y ligadura hacia atrás lo que resultó en el pGBFin17 (ver la Figura 6). En el pGBFin17 el sitio *EcoRI* remanente fue removido de manera similar (digestión con *EcoRI* seguido por relleno de extremos con *T<sub>4</sub>* ADN polimerasa y ligadura hacia atrás) lo que resultó en el plásmido pGBFin18 (ver la Figura 7). Dos cebadores que contienen unos sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* y (después de hibridarlos juntos) que contienen los extremos cohesivos para *PacI* y *Ascl* fueron hibridados. Los cebadores fueron construidos de tal manera que con la clonación los cebadores hibridados en el pGBFin18 digerido con *PacI*- y *Ascl*- no fue generado ningún ATG (extra) en el sitio de clonación de los ADNc. De esta forma, clonando los cebadores hibridados descritos en el pGBFin18 digerido con *PacI*- y *Ascl*- un sitio de clonación para los ADNc con extremos cohesivos *EcoRI-XhoI* fue generado. El plásmido así obtenido fue llamado pGBFin22 (ver la Figura 8).

30 6.2 *Expresión de la fitasa usando el vector pGBFin22*6.2.a *Fundamentos*

En el vector pGBFin22 un gen de prueba ha sido insertado (por ejemplo fitasa) de una forma similar a como ha sido descrito en el ejemplo 4 para el vector pGBFin11. El vector resultante, el pGBFin25, ha sido analizado en relación con la producción de fitasa y su funcionalidad.

6.2.b *Construcción de un vector de expresión de la fitasa, pGBFin25*

El pGBFin13 fue digerido con *EcoRI* para liberar el gen de la fitasa. Este fragmento del gen *EcoRI* que codifica la fitasa fue clonado en el pGBFin22. Después de la identificación de un clon con la orientación correcta del gen de la fitasa, este clon fue designado pGBFin25.

6.2.c *Transformación de *A. niger* con el pGBFin25 y análisis de los transformantes de pGBFin25*

El pGBFin25 fue usado para la transformación de *A. niger* y el análisis subsiguiente de los transformantes como ha sido detallado en los ejemplos 1 y 4 para los transformantes de pGBFin5 y pGBFin13 respectivamente. Los resultados fueron similares a como ha sido indicado para los transformantes de pGBFin13 lo que demostró la aplicabilidad del vector pGBFin22 para los propósitos de la clonación de expresión.

## 50 Ejemplo 7

7.1 *Construcción del vector de expresión integrativo aplicable para la clonación del ADNc mediada con HindIII-XhoI, pGBFin23*55 7.1.a *Fundamentos*

Después de obtener el conjunto de vectores de clonación de expresión integrativos descritos hasta ahora fue reconocido que la disponibilidad de un vector de clonación de expresión el cual pudiera ser usado para la clonación de ADNc con extremos cohesivos 5' *HindIII* pudiera ser útil. Tanto en términos de ser capaz de usar los pools de ADNc los cuales fueron ya construidos para otros propósitos con los extremos cohesivos *HindIII-XhoI* como debido al hecho de que en este enfoque no se tuvieron que hacer cambios para el promotor de la glucoamilasa.

65 7.1.b *Construcción de un vector de expresión de la fitasa aplicable para la clonación de ADNc mediada con HindIII-XhoI, pGBFin23*

En el pGBFin17 el sitio *HindIII* remanente fue removido (digestión con *HindIII* seguido por el relleno de extremos con *T<sub>4</sub>* ADN polimerasa y ligadura hacia atrás) lo que resultó en el plásmido pGBFin19 (ver la Figura 9). Dos cebadores que contienen unos sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* y (después de la hibridación conjunta) que contienen

# ES 2 287 989 T3

extremos cohesivos para *PacI* y *AscI* fueron hibridados. Los cebadores fueron construidos de tal manera que después de la clonación de los cebadores hibridados en pGBFin19 digerido con *PacI*- y *AscI*- no fue generado ningún ATG (extra) en el sitio de clonación de los ADNc. De esta forma, clonando los cebadores hibridados descritos en el pGBFin19 digerido con *PacI*- y *AscI*- fue generado un sitio de clonación para los ADNc con extremos cohesivos *HindIII-XhoI*.

5 El plásmido así obtenido fue nombrado pGBFin23 (ver la Figura 10).

## 7.2 Expresión de la fitasa usando el vector pGBFin23

### 7.2.a Fundamentos

10 En el vector pGBFin23 un gen de prueba ha sido insertado (por ejemplo fitasa) en una forma similar a como ha sido descrito en el ejemplo 4 para el vector pGBFin11. El vector resultante, pGBFin26, ha sido analizado en relación con la producción de la fitasa y su funcionalidad.

### 15 7.2.b Construcción de un vector de expresión de la fitasa, pGBFin26

En este ejemplo el gen de la fitasa fue procesado con PCR con un oligo 5' que contenía un sitio *HindIII* y un oligo 3' que contenía un sitio *XhoI*. Después de la digestión con *HindIII* y *XhoI* este fragmento fue clonado directamente en el pGBFin23, generando de esta forma el pGBFin26. Después del aislamiento de un número de clones que contenían el gen de la fitasa, las inserciones de fitasa fueron secuenciadas para verificar la introducción de errores PCR putativos. Finalmente, un plásmido pGBFin26 correcto (sin cambios en la secuencia de la proteína codificada) fue seleccionado y usado para la transformación y el análisis subsiguiente.

### 25 7.2.c Transformación de *A. niger* con el pGBFin26 y análisis de los transformantes del pGBFin26

El pGBFin26 fue usado para la transformación de *A. niger* y el análisis subsiguiente de los transformantes como ha sido detallado en los ejemplos 1, 4 y 6 para los transformantes de pGBFin5, pGBFin13 y pGBFin25, respectivamente. Los resultados fueron similares a como ha sido indicado para los transformantes de pGBFin13 lo cual demostró la aplicabilidad del vector pGBFin23 para los propósitos de la clonación de expresión.

## 30 Ejemplo 8

### 8.1 Construcción de los vectores de expresión de plásmidos basados en AMA1 apropiados para la clonación de expresión del ADNc (pGBFin6 y pGBFin15)

#### 35 8.1.a Fundamentos

En otro ejemplo las funcionalidades para activar la alta expresión de los ADNc clonados y un marcador seleccionable fueron usadas en plásmidos los cuales contienen en adición una así llamada secuencia de AMA1. Como resultado 40 fue generado un plásmido de clonación de expresión el cual fue mantenido de manera autónoma en *Aspergillus*. En este tipo de vectores de clonación de expresión las frecuencias de transformación altamente eficientes obtenibles con las funcionalidades y los vectores basados en el tipo AMA1 que activan la alta expresión de los ADNc clonados son combinados. Dos vectores de expresión los cuales diferían en el gen marcador de selección usado para la selección de 45 los transformantes en *Aspergillus* y ambos diseñados para los sistemas de clonación de expresión basados en AMA1 fueron construidos.

#### 8.1.b Construcción del vector pGBFin6

El pTZamdsX-2 (ver la Figura 2) fue linealizado con *HindIII* después de lo cual el fragmento AMA1 *HindIII* de 5,2 kb a partir de *A. nidulans* (como es descrito por Aleksenko y Clutterbuck, 1998) fue clonado en el, resultando en el 50 plásmido intermedio pAMAamds. A continuación pAMAamds fue digerido con *Knpl* and *BgIII* y el fragmento que contiene AMA1 de aproximadamente 9 kb fue aislado. Después de la digestión del vector pGBFin2 (ver la Figura 2) con *Knpl* y *BgIII* el fragmento que contiene el promotor de la glucoamilasa de 5,2 kb fue aislado. El fragmento de 5,2 kb derivado del pGBFin2 es clonado en el fragmento de 9 kb del pAMAamds resultando en el plásmido de clonación 55 de expresión basado en la selección de acetamida y AMA1 pGBFin6 (Ver la figura 11).

#### 8.1.b Construcción del vector pGBFin15

El pGBFin6 fue digerido con *XhoI* y el fragmento que contiene el promotor de la glucoamilasa fue aislado. A 60 continuación, el plásmido pAN8-1 (ver la Figura 12), que contiene el gen funcional *ble* (que codifica la resistencia a la pleomicina) activado por un promotor del *gpdA* de *A. nidulans* y terminado por un terminador del *trpC* fue usado como una plantilla en una reacción PCR. Los cebadores PCR fueron diseñados de tal manera que fue generado un fragmento contenido un promotor del *gpdA* truncado (pero aún completamente funcional), el gen *ble* y un terminador *trpC* truncado (pero aún completamente funcional) el cual contenía en adición en ambos extremos del fragmento un sitio 65 *XhoI* funcional. Además, el cebador 5' contenía un sitio *HindIII* el cual era necesario para los pasos de clonación posteriores (como es detallado en la construcción del pGBFin15). Después de la digestión con *XhoI* del producto de PCR de aproximadamente 1,9 kb este fue clonado en el fragmento de *XhoI* aislado previamente a partir del pGBFin2. El plásmido resultante (pGBFin14; ver la Figura 13) fue verificado en relación con la orientación correcta a través del

# ES 2 287 989 T3

análisis de restricción y para detectar los errores PCR a través de la secuenciación. El pGBFin14 fue linealizado con *HindIII* después de lo cual el fragmento *AMA1 HindIII* de 5,2 kb fue insertado, resultando en el plásmido pGBFin15 (ver la Figura 14).

## 5 8.2 *Expresión de la fitasa en los vectores basados en AMA1*

### 8.2.a *Fundamentos*

10 Las construcciones de expresión basadas en *AMA1* fueron analizadas en relación con la expresión de una fitasa de manera similar a como ha sido descrito para los vectores de expresión integrativos. Nuevamente un gen de prueba fue insertado (por ejemplo fitasa) de una manera similar a como ha sido descrito en el ejemplo 1 para el vector pGBFin5. Los vectores resultantes, fueron analizados en relación con la producción de fitasa para demostrar la funcionalidad y la aplicabilidad de los vectores de expresión basados en *AMA1*.

### 15 8.2.b *Construcción del pGBFin7 y del pGBFin16*

20 Ambos vectores, el pGBFin6 y el pGBFin15, fueron linealizados a través de una digestión doble con *PacI* y *Ascl*. A continuación el plásmido pGBFin5 fue digerido con *PacI* y *Ascl* para liberar el fragmento que codifica el gen de la fitasa (con los extremos cohesivos *PacI* y *Ascl*). Este fragmento de la fitasa fue clonado directamente en los vectores pGBFin6 y pGBFin15 digeridos para generar, el pGBFin7 y el pGBFin16, respectivamente.

### 8.2.c *Transformación de Aspergillus niger con pGBFin7 y pGBFin16*

25 El pGBFin7 y el pGBFin16 fueron transformados para *A. niger* de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores y adicionalmente detallados en Materiales y Métodos. Los transformantes del pGBFin7 fueron seleccionados en un medio que contiene acetamida como única fuente de nitrógeno, mientras los transformantes del pGBFin16 fueron seleccionados de un medio que contiene pleomicina. Ambos plásmidos demostraron una frecuencia de transformación significativamente incrementada comparado con el tipo integrativo de los vectores de expresión; las frecuencias de transformación de los plásmidos basados en *AMA1* fueron de hasta  $10^5$  transformantes por ug de plásmido. Los transformantes positivos fueron purificados mediante re-veteado de las colonias simples en un medio selectivo y finalmente almacenados.

### 8.2.d *Ánalisis de la expresión de la fitasa en los transformante del pGBFin16*

35 Despues de la purificación 20 transformantes de pGBFin16 seleccionados aleatoriamente fueron fermentados en frascos de agitación usando el mismo medio (en este caso suplementado con pleomicina) que ha sido descrito para los vectores integrativos. Las muestras de la fermentación fueron ensayadas en relación con la producción de la fitasa la cual fue demostrada oscilaba en todos los casos (excepto para uno) desde aproximadamente 40 U/ml hasta 60 U/ml. En un caso particular la expresión fue de 117 U/ml lo que fue probablemente un resultado de la integración del plásmido pGBFin16 en el genoma (ver también los comentarios en el ejemplo 1; 1.2.d.)

45 Estos resultados demuestran que los plásmidos basados en *AMA1* como es descrito en este ejemplo pueden ser usados para la clonación de expresión directa en *Aspergillus*. Debido al uso de las funcionalidades del *glaA* las cuales son capaces de activar una expresión de alto nivel de la producción de los ADNc clonados, aunque reducida en comparación con la expresión después de la integración en un locus de alta expresión, la expresión es aún ciertamente suficientemente alta para una detección eficiente en una biblioteca de expresión que contiene *AMA1*, especialmente cuando la frecuencia de transformación significativamente incrementada es tenida en cuenta. Una ventaja adicional de los vectores basados en *AMA1* es proporcionada por el hecho de que la recuperación (re-aislamiento) de estos plásmidos a partir del hospedero de expresión del hongo filamentoso es simplificada en comparación con los plásmidos integrativos. La transformación directa de *E. coli* con el ADN total aislado del hospedero en cuestión será suficiente en este aspecto.

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para aislar una secuencia de ADN que codifica para una proteína con propiedades de interés, dicho método comprendiendo los pasos de:
  - (a) preparar, en un vector de clonación apropiado que comprende un gen marcador de selección, una biblioteca de ADN a partir de un organismo sospechoso de ser capaz de producir una o más proteínas con propiedades de interés,
  - (b) transformar las células hospederas del hongo filamento con la biblioteca de ADN del paso (a) y seleccionar los transformantes usando el gen marcador de selección,
  - (c) cultivar las células hospederas transformadas obtenidas en (b) bajo condiciones que conducen a la expresión de secuencias de ADN en la biblioteca de ADN y,
  - (d) detectar los clones de las células hospederas transformadas que expresan una proteína con propiedades de interés mediante el análisis de las proteínas producidas en (c).
2. Un método de acuerdo a la reivindicación 1, donde el vector de clonación comprende un fragmento de ADN el cual es homólogo a una secuencia de ADN en un locus diana predeterminado en el genoma de la célula hospedera del hongo filamento.
3. Un método de acuerdo a la reivindicación 2, donde el locus diana predeterminado comprende un gen altamente expresado.
4. Un método de acuerdo a las reivindicaciones 2 o 3, donde la célula hospedera del hongo filamento comprende más de una copia del locus diana predeterminado.
5. Un método de acuerdo a la reivindicación 1, donde el vector de clonación es un vector que es capaz de mantenerse de manera autónoma en una célula hospedera del hongo filamento.
6. Un método de acuerdo a la reivindicación 5, donde el vector capaz del mantenimiento autónomo es un vector que comprende una secuencia de AMA1.
7. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la secuencia de ADN que codifica para la proteína con propiedades de interés es expresada a partir de un promotor, el cual es derivado de un gen de hongo filamento altamente expresado.
8. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la célula hospedera del hongo filamento es una especie de los géneros *Aspergillus* o *Trichoderma*.
9. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la célula hospedera del hongo filamento es una especie seleccionada del grupo que consiste de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, la especie del Grupo *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*.
10. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el organismo sospechoso de ser capaz de producir una o más proteínas con propiedades de interés es un eucariota.
11. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el eucariota es un hongo, preferiblemente un hongo filamento.
12. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la proteína con propiedades de interés es una enzima.

55

60

65

Fig. 1

**Construcción del pGBTOP-8**

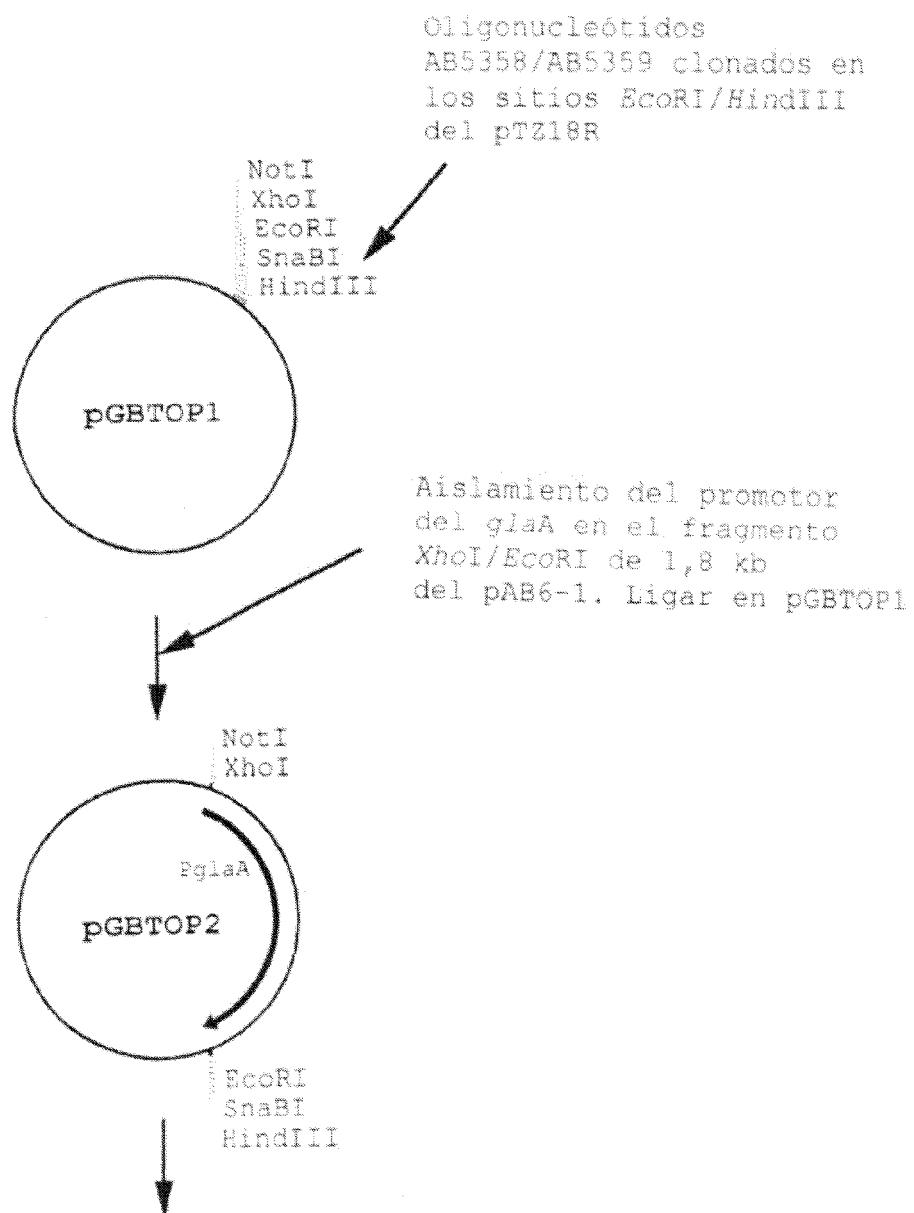


Figura 1, continuación  
**Construcción del pGBTOP-8**

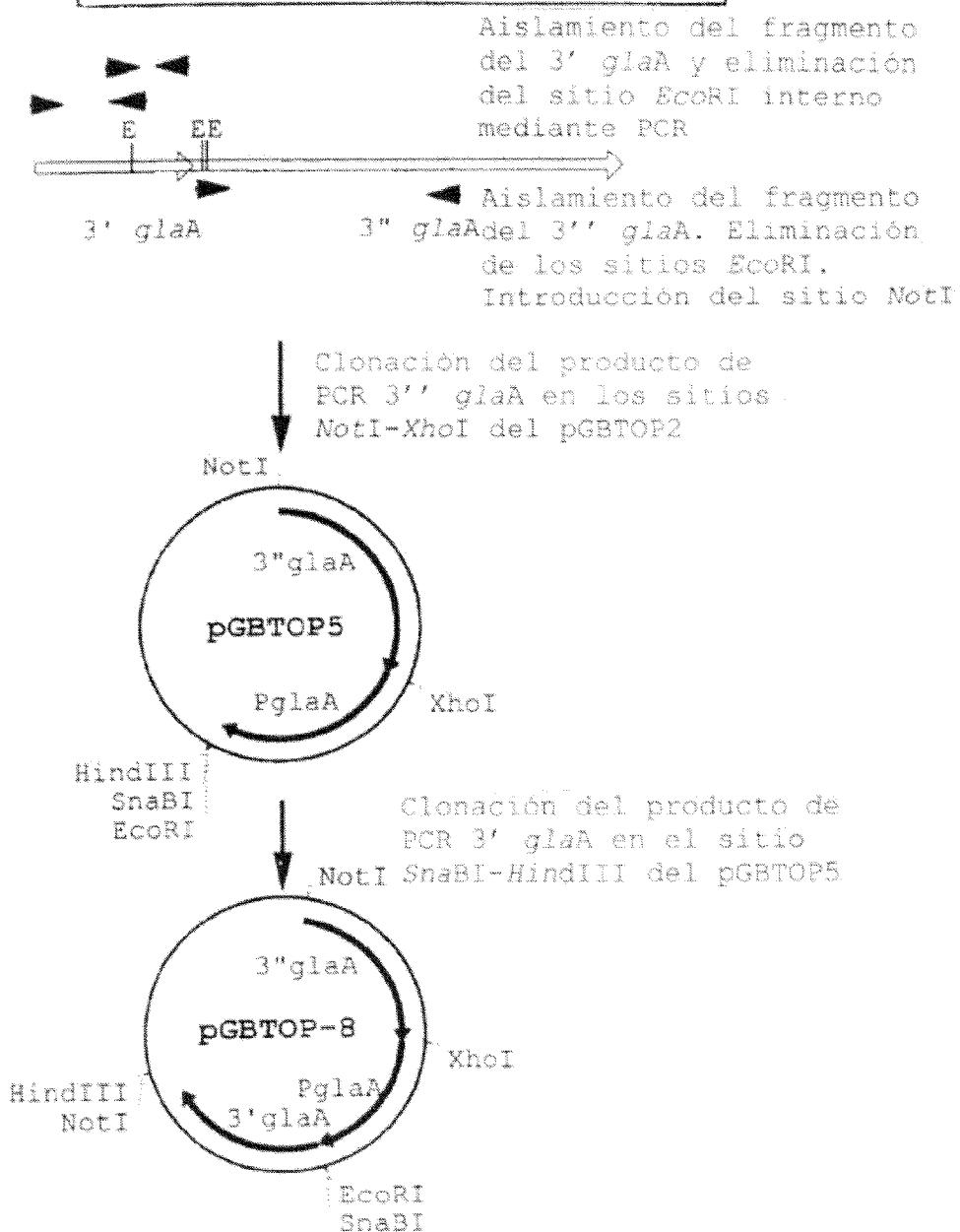


Fig. 2A

## Construcción del pGBFin2

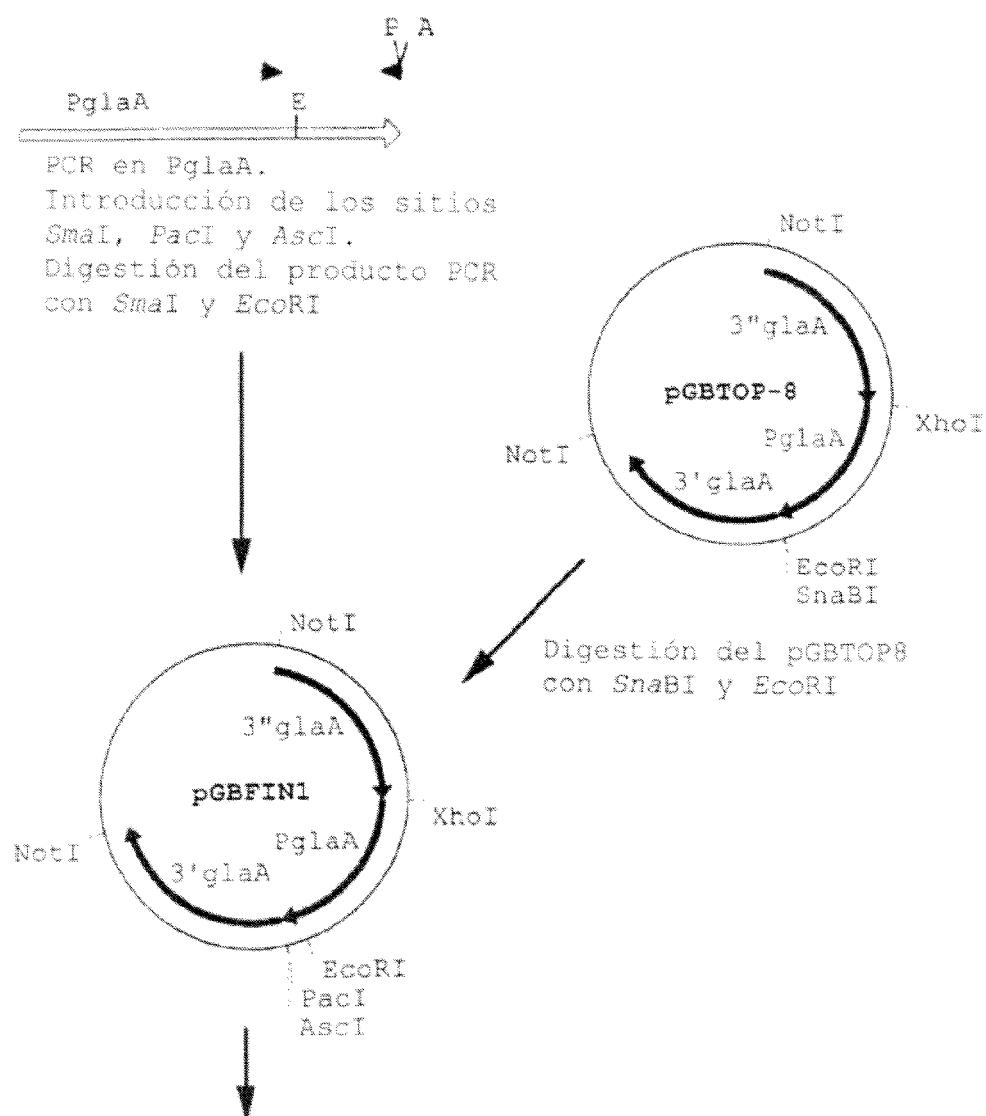


Figura 2A, continuación 2

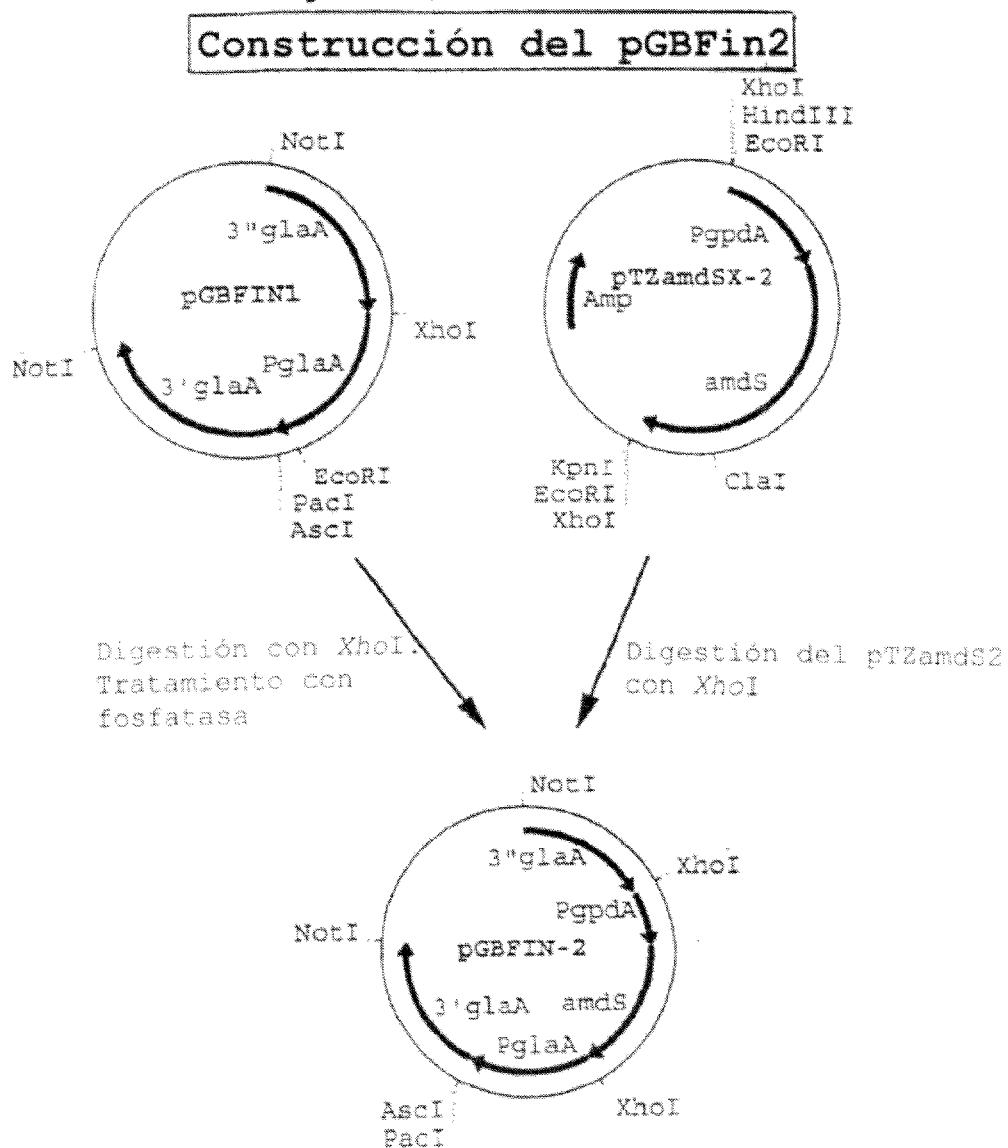


Figure 2B

**Construcción del pGBFin5**

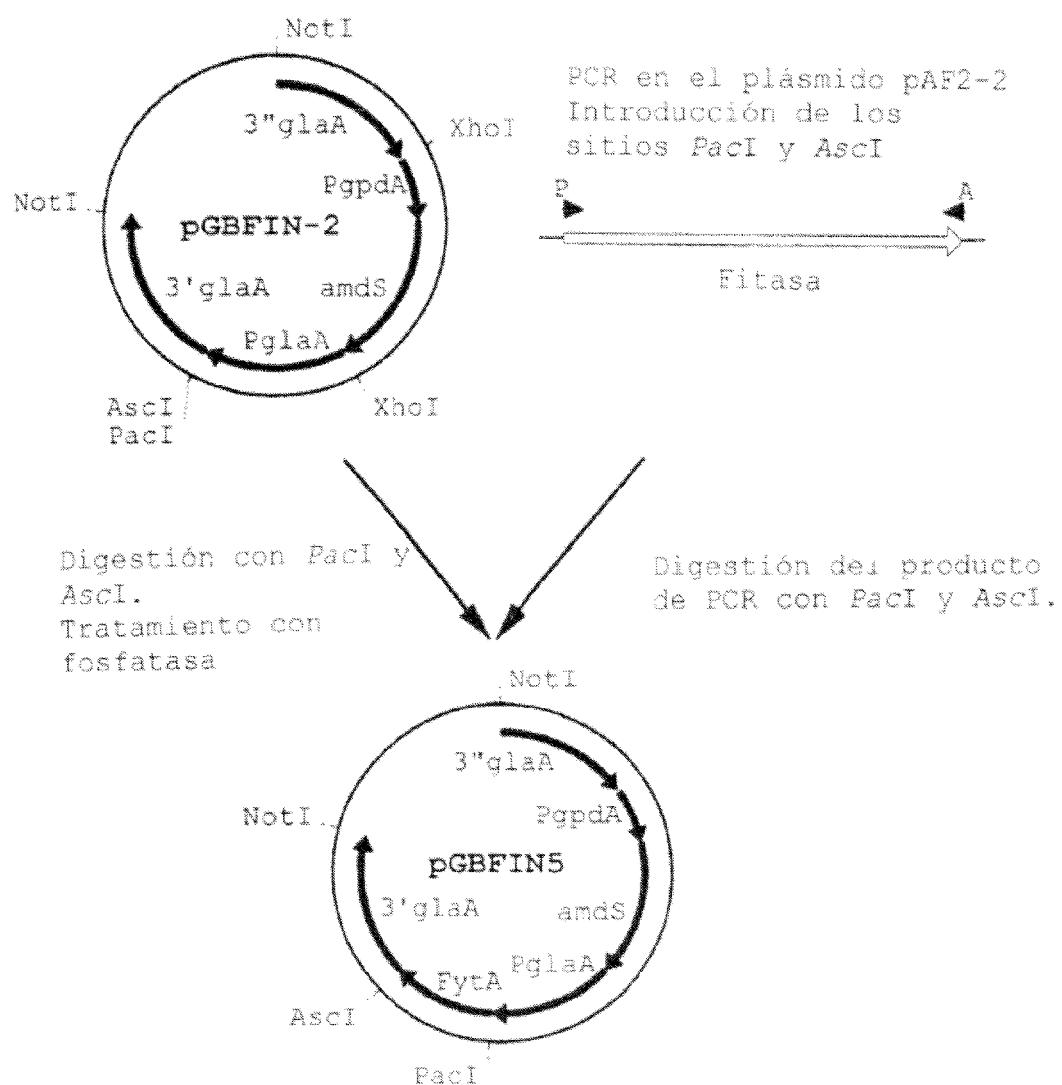
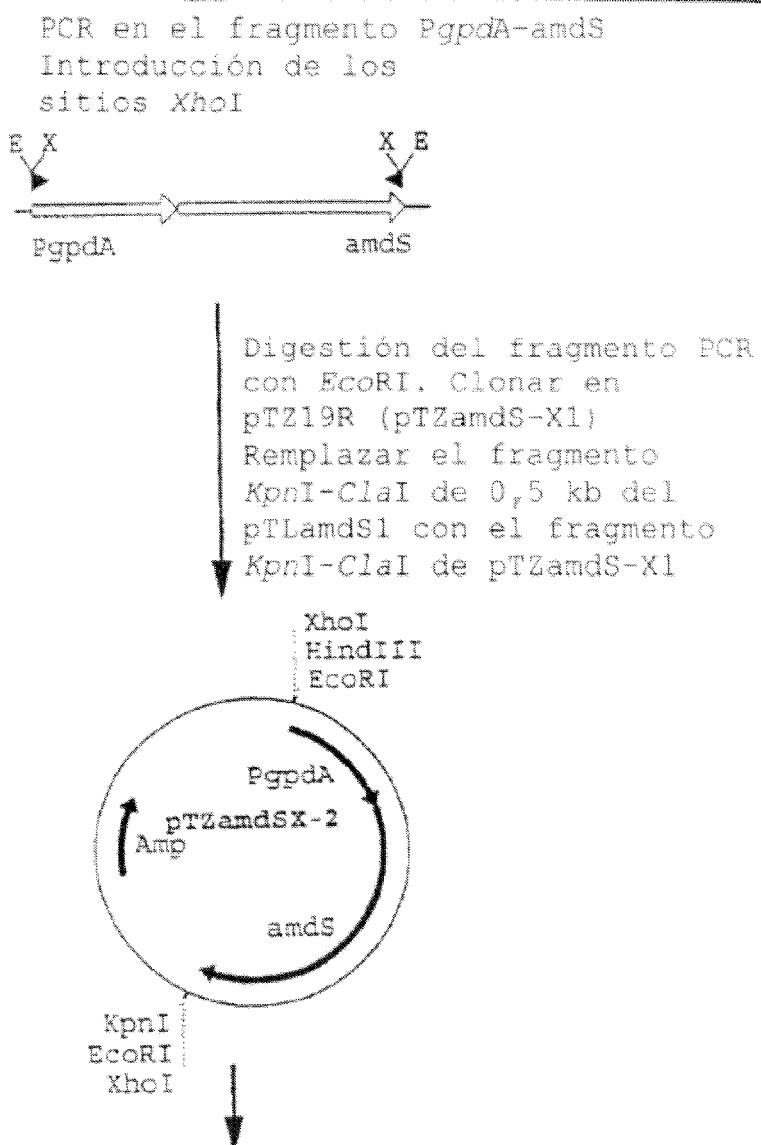


Figura 2A, continuación 1

**Construcción del pGBFin2**



# ES 2 287 989 T3

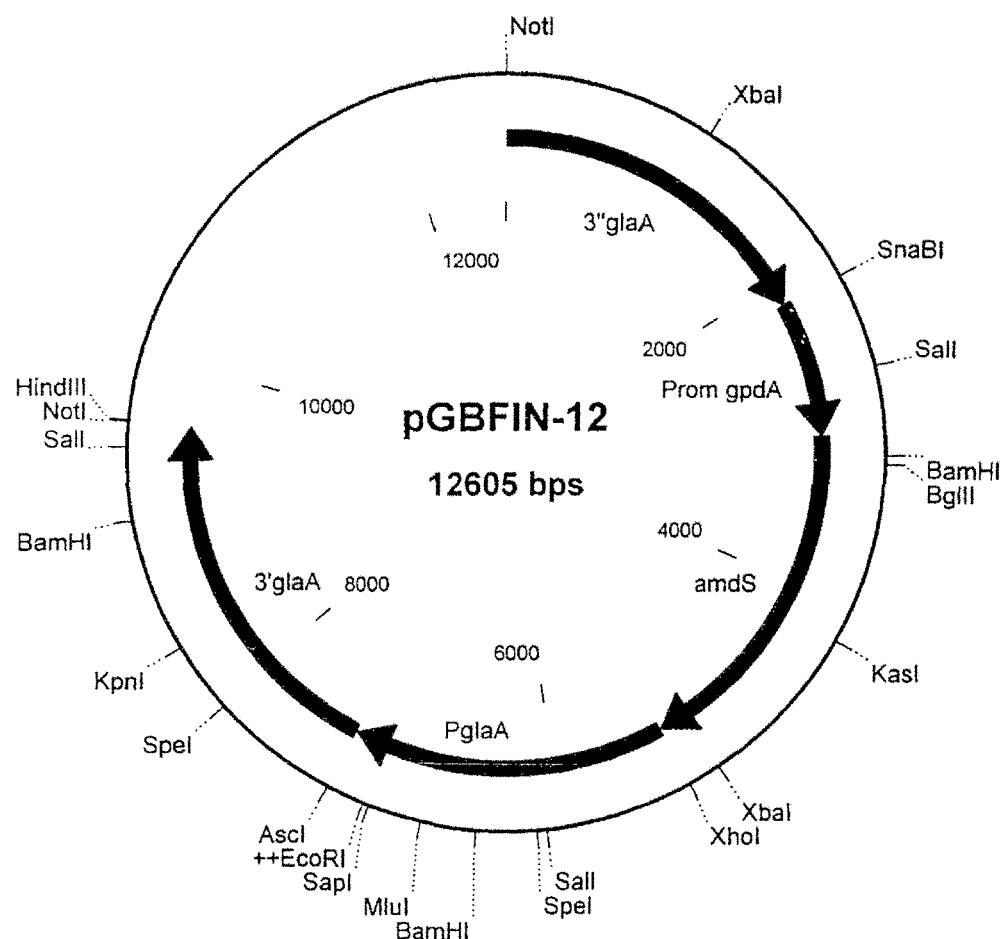


Figura 3: Mapa físico del plásmido pGBFin12

## ES 2 287 989 T3

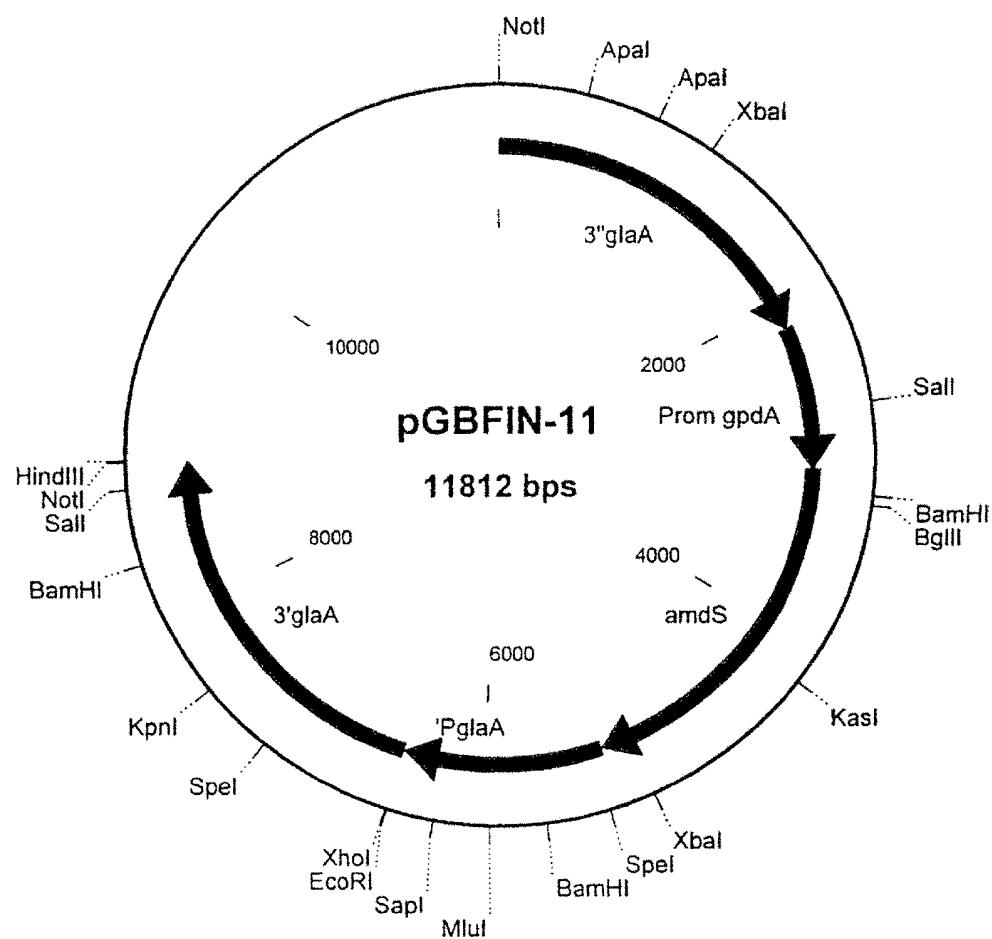


Figura 4: Mapa físico del plásmido pGBFin11

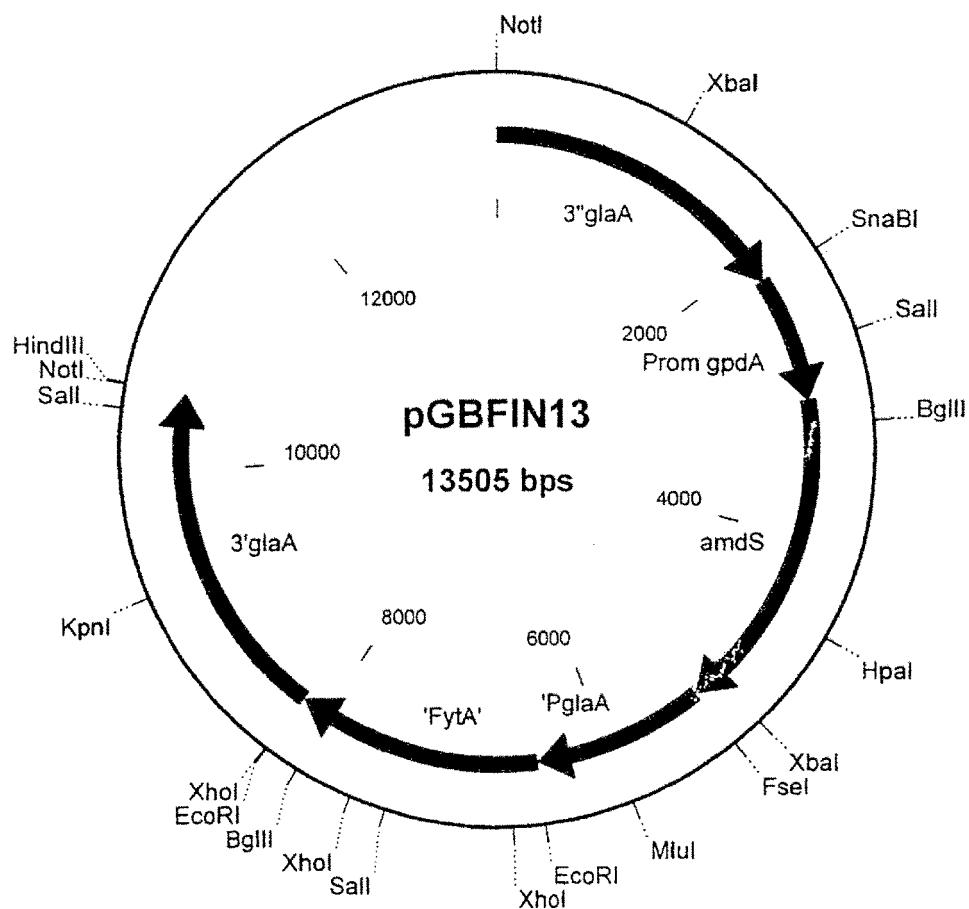


Figura 5: Mapa físico del plásmido pGBFin13

## ES 2 287 989 T3

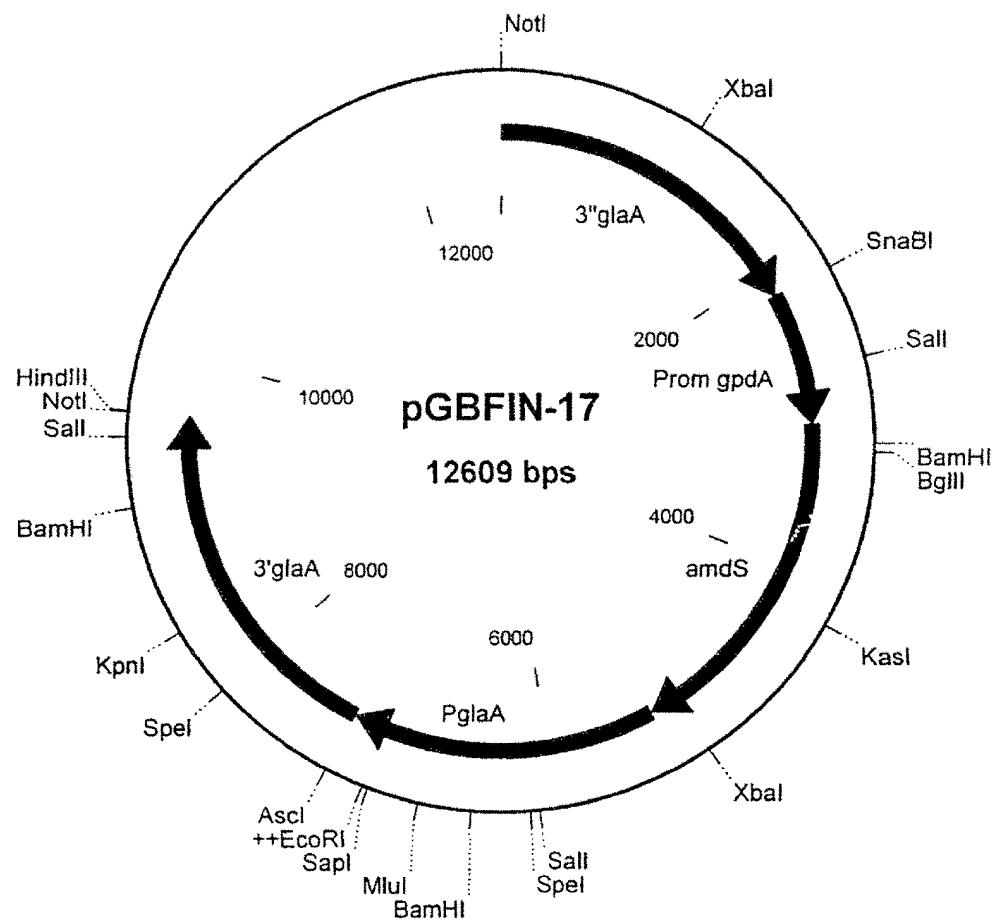


Figura 6: Mapa físico del plásmido pGBFin17

# ES 2 287 989 T3

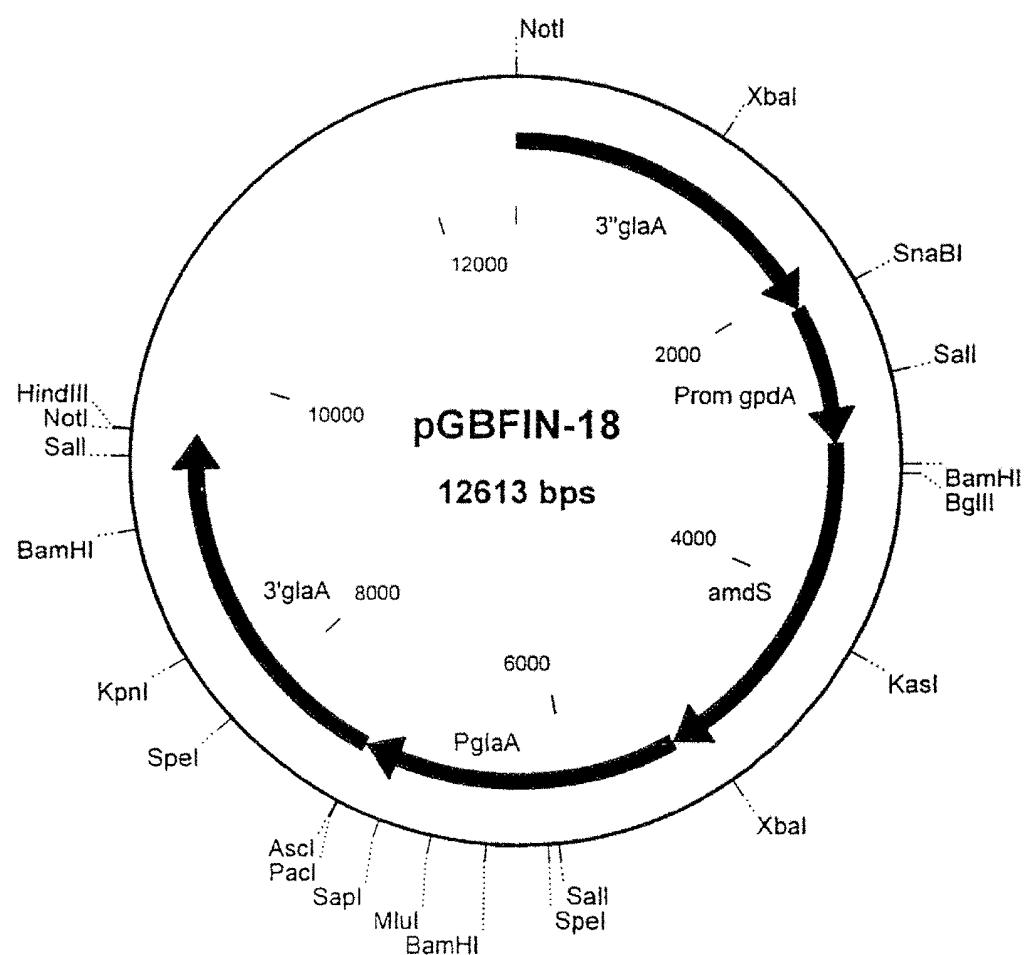


Figura 7: Mapa físico del plásmido pGBFin18

# ES 2 287 989 T3

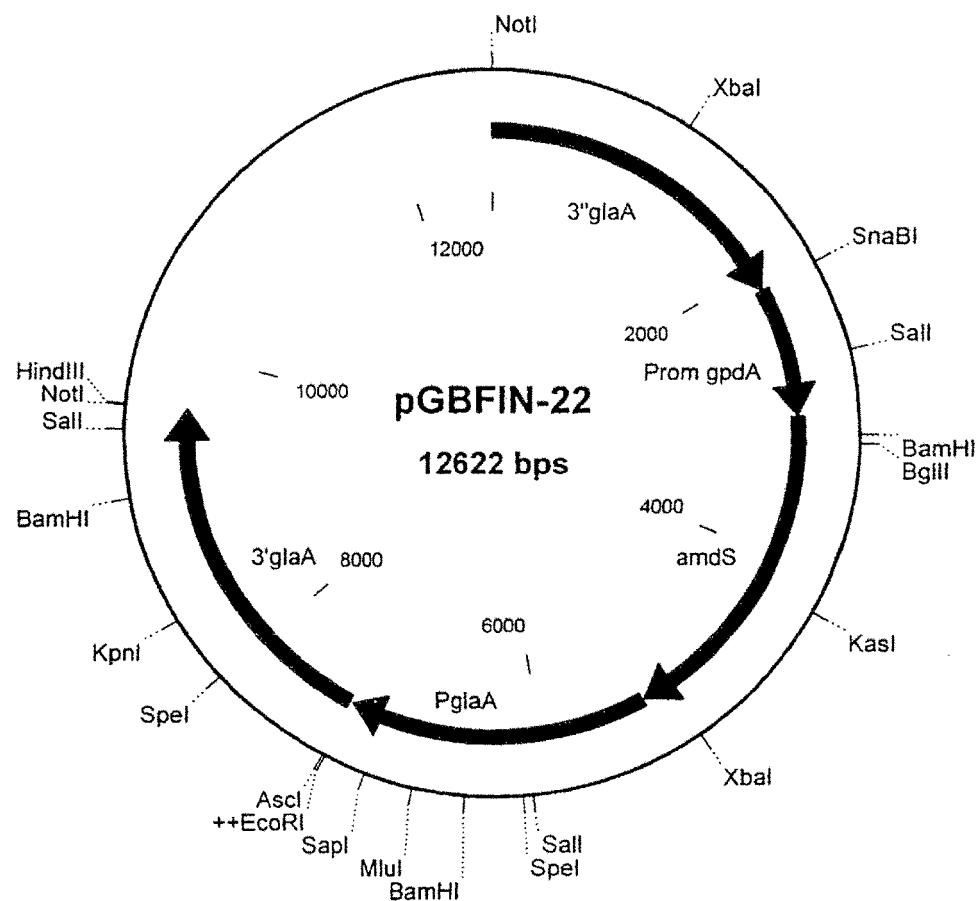


Figura 8: Mapa físico del plásmido pGBFin22

ES 2 287 989 T3

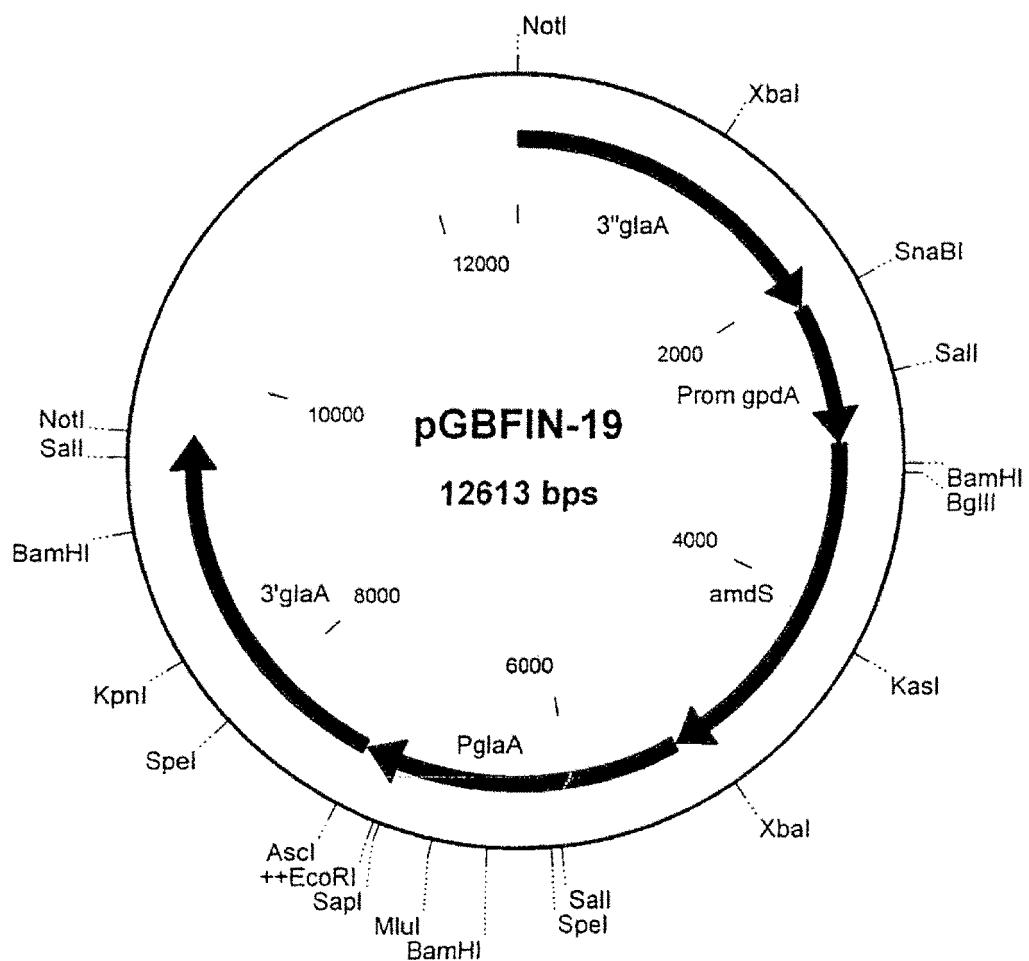


Figura 9: Mapa físico del plásmido pGBFin19

# ES 2 287 989 T3

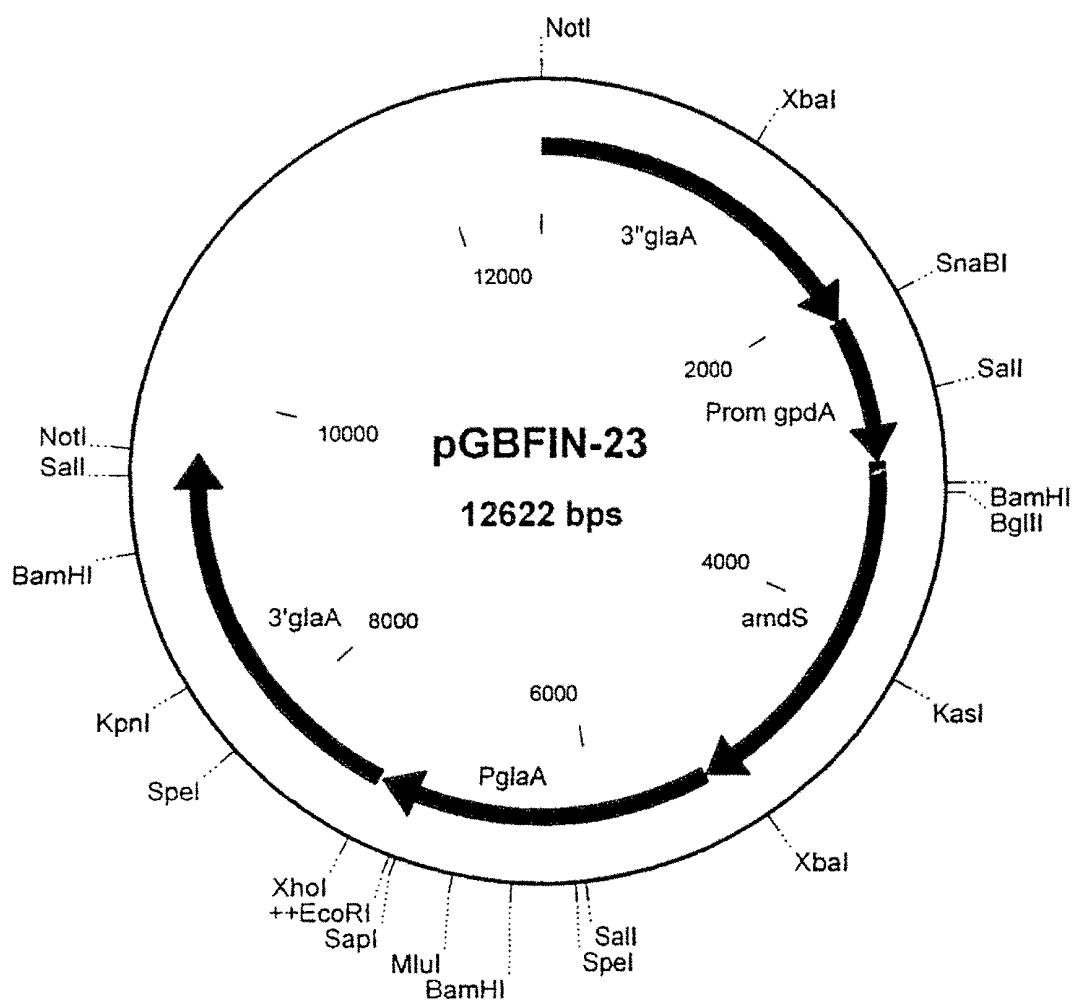


Figura 10: Mapa físico del plásmido pGBFin23

ES 2 287 989 T3

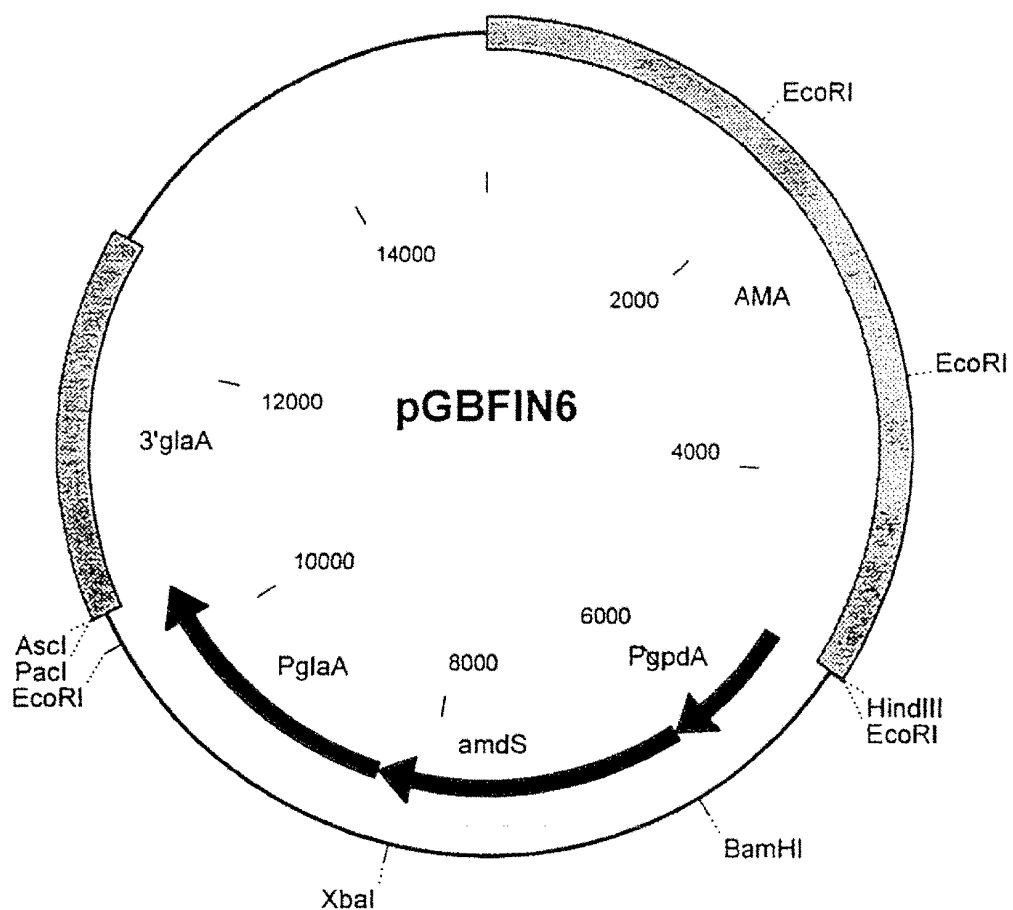


Figura 11: Mapa físico del plásmido pGBFin6

## ES 2 287 989 T3

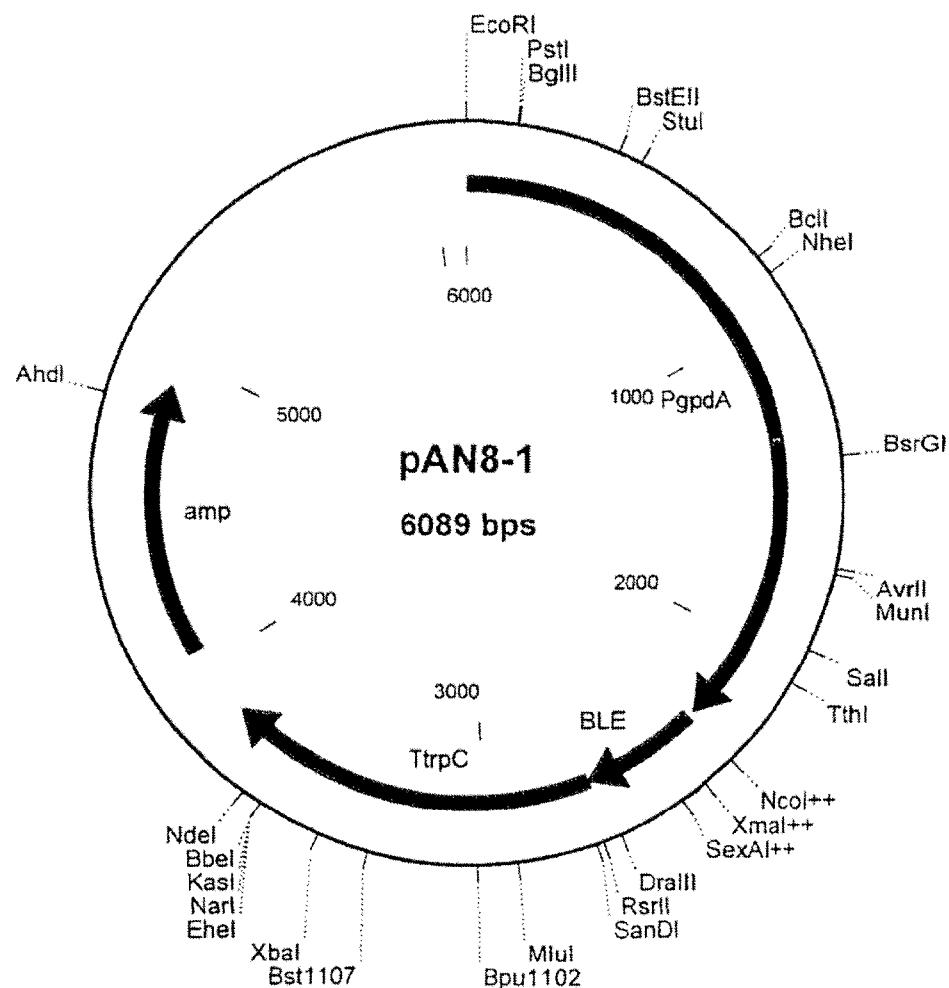


Figura 12: Mapa físico del pAN8-1

## ES 2 287 989 T3

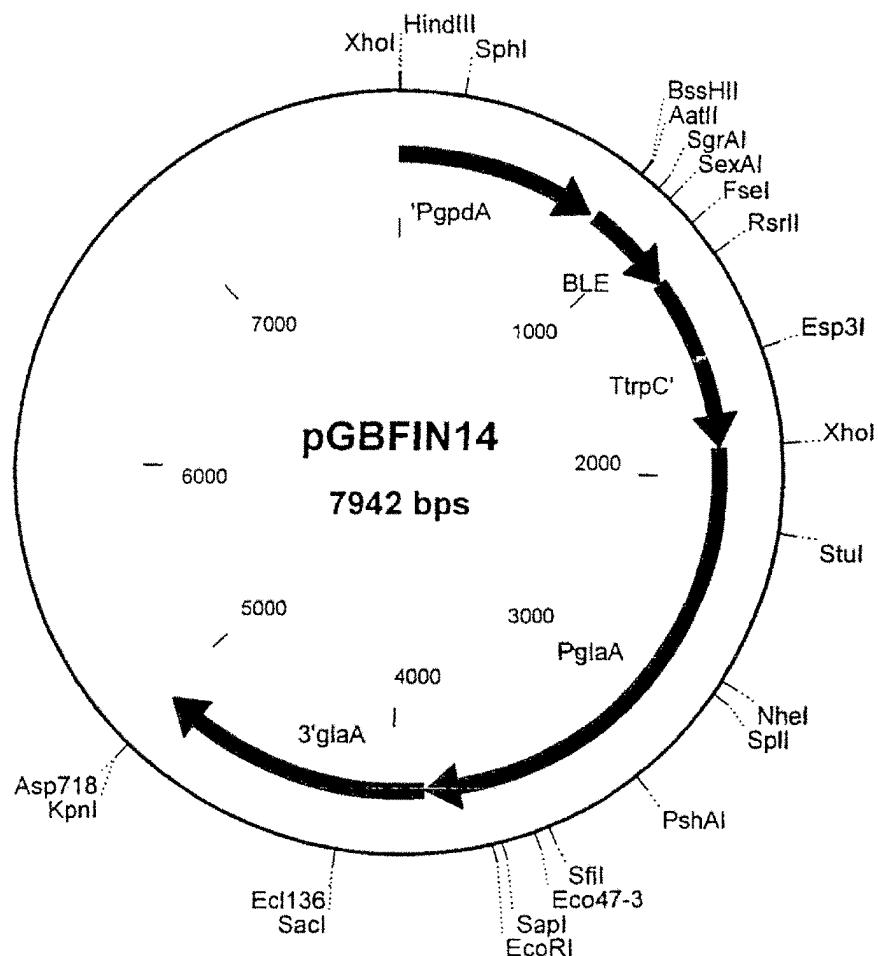


Figura 13: Mapa físico del plásmido pGBFin14

ES 2 287 989 T3

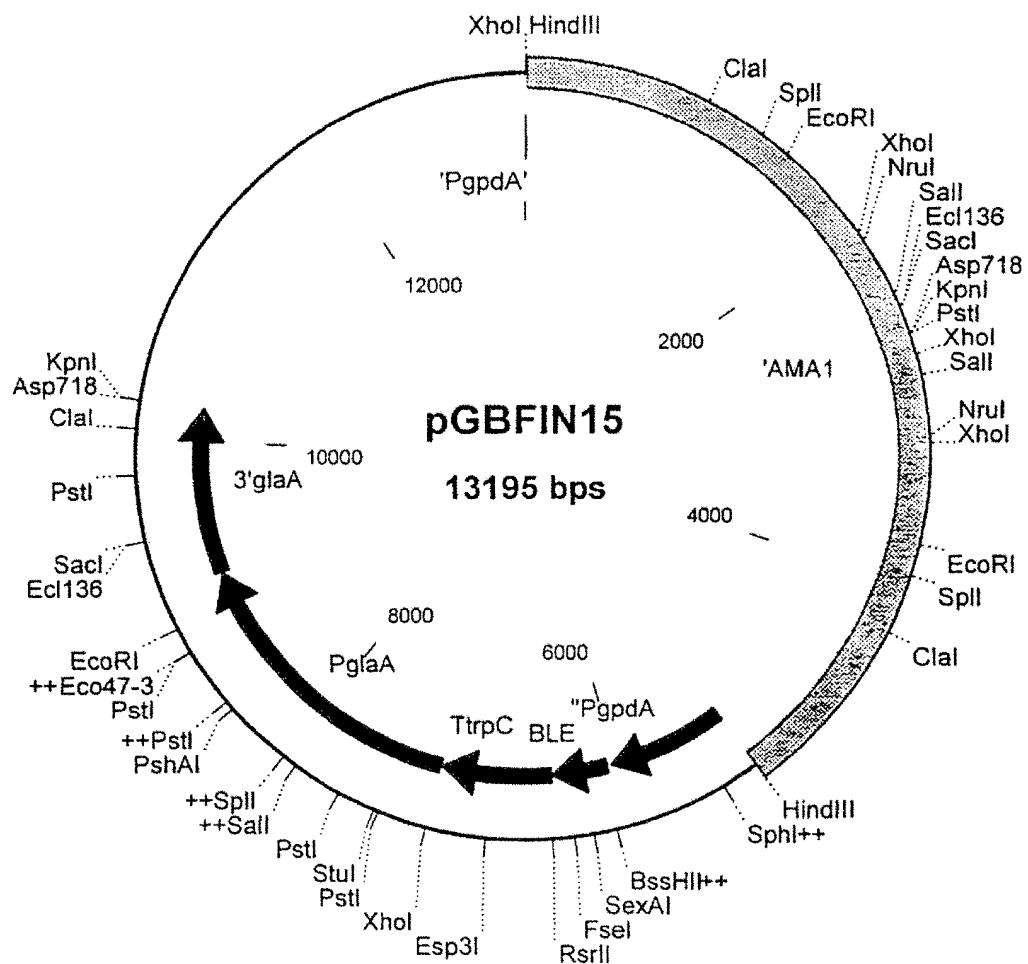


Figura 14: Mapa físico del plásmido pGBFin15

# ES 2 287 989 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Gist-brocades B.V,

5 <120> detección de expresión en hongos filamentosos

<130> 2865-p

10 <140>

<141>

<160> 22

15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

20 <211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> oligonucleótido 5288

<400> 1

30 tagtacgttag cgccccacaat caatccattt cgctatagtt aaaggatgcg ga 52

<210> 2

35 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> oligonucleótido 5289

<400> 2

45 gatcaggatc tccggatcaa tactccggcg tat 33

<210> 3

50 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> oligonucleótido 5290

<400> 3

60 atacgecgga ctattcatcc ggagatccctg atc 33

<210> 4

65 <211> 84

<212> ADN

ES 2 287 989 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> oligonucleótido 5291

<400> 4

10        **cgaaaaagctt cactgacgta accaggaccc ggccggcttat ccatcatggg aaacaacacc** 60

**tacaaaatccg ccacaatact ctcg** 84

15 <210> 5

<211> 45

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 5292

25 <400> 5

30        **gcaatccctcg aggtccacc ggcaaacatc tgcccataga agaac** 45

<210> 6

<211> 88

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 5293

40 <400> 6

45        **agtgaagctt tccgtggtag taagagagag gttactcacc gatggagccg tattcgccct** 60

**caagcaccgc gtgacccac tattogac** 88

50 <210> 7

<211> 46

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 5358

60 <400> 7

65        **aatttgccgc cgcccgctcg agcggggaat tcccggtacg tacgca** 46

<210> 8

<211> 46

ES 2 287 989 T3

5	<220>		
	<223> oligonucleótido 5359		
	<400> 8		
10		agcttgcgta cgtaccggga attcccccgt cgagcgggcg gccgca	46
	<210> 9		
15	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> oligonucleótido 5361		
	<400> 9		
25		ccaggacgcg gccgcttata catcatggga	30
	<210> 10		
30	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
35	<220>		
	<223> oligonucleótido 5361		
	<400> 10		
40		tagtacgtac aatcaatcca ttgcgtat	29
	<210> 11		
45	<211> 44		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
50	<220>		
	<223> oligonucleótido 5367		
	<400> 11		
55		cccaagctg cggccgcgtc ctggttacgt cagtgtatgtt tccg	44
	<210> 12		
60	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
65	<220>		
	<223> oligonucleótido 5454		

# ES 2 287 989 T3

<400> 12

tccgeatgcc agaaagagtc accgg

25

5 <210> 13

<211> 25

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 5456

15 <400> 13

gcatccatcg gccaccgtca ttgga

25

20 <210> 14

<211> 39

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 6856

30 <400> 14

cggcagagta ggtgatagcg ttagaagaac cagtggcc

39

35 <210> 15

<211> 33

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 6963

45 <400> 15

acggaattca agcttagatgc taaggatat tgc

33

50 <210> 16

<211> 29

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 6964

60 <400> 16

ttaattaact cataggcatc atggcgctc

29

65 <210> 17

<211> 32

## ES 2 287 989 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> oligonucleótido 6965

<400> 17

10 ggcgcgccga gtgtgattgt ttaaagggtg at 32

<210> 18  
15 <211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> oligonucleótido 6967

<400> 18

25 atcatcggcg cgcctttttt tttttttt tt 32

<210> 19  
30 <211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> oligonucleótido 7423

<400> 19

40 ggaattctcg aggccgcaag ctcagcgcc aattc 35

<210> 20  
45 <211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> oligonucleótido 7424

<400> 20

55 ggaattctcg agcacgcatg gggtgagtgg tatgg 35

<210> 21  
60 <211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

65 <220>  
<223> oligonucleótido 7676

# ES 2 287 989 T3

<400> 21

taggccatat gggccat

17

5 <210> 22

<211> 15

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 7677

15 <400> 22

ggcccatatg gccta

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65