



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias
Departamento de Genética

Papel de la *N*-glicosilación de proteínas en la virulencia de *Fusarium oxysporum*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba para optar al grado de Doctor en Biología por la licenciada

Loida López Fernández

Dirigido por

Dra. M. Isabel González Roncero
Dra. Carmen Ruiz Roldán

Córdoba 2013

TITULO: *Papel de la N-glicosilación de proteínas en la virulencia de Fusarium oxysporum*

AUTOR: *Loida López Fernández*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Dña. M. Isabel González Roncero, Catedrática del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba,

Dña. Carmen Ruiz Roldán, Investigadora del Programa Ramón y Cajal del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba,

Informan:

Que el trabajo titulado “**Papel de la N-glicosilación de proteínas en la virulencia de *Fusarium oxysporum***” realizado por Dña. Loida López Fernández bajo su dirección, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste, expedimos el siguiente informe
Córdoba, Septiembre.

M. Isabel González Roncero

Carmen Ruiz Roldán

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, y financiado por el MICINN (BIO2007-62661, BIO 2010-15505). Loida López Fernández ha sido beneficiaria de una beca FPI del MICINN (BES-2008-0078079).

A mis padres

*“Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí;
lo hice y lo aprendí”*

Confucio

Portada diseñada por Marian Álvaro Gallo

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que a lo largo de estos años han contribuido a la realización de esta Tesis doctoral. Muchas de ellas me han acompañado, colaborado y ayudado durante el desarrollo de este trabajo en el departamento de Genética de la Universidad de Córdoba o en el CIB; mientras otras han sido clave en mi formación y, sin saberlo, me han conducido hasta aquí, despertando un interés y entusiasmo por la ciencia y la investigación que me ha acompañado en estos años.

Quiero agradecer de forma especial a mis directoras de tesis la Prof. M. Isabel (Reyes) González Roncero y la Dra. Carmen Ruiz Roldán por su esfuerzo y dedicación. Me siento muy afortunada de haber trabajado en su grupo. Reyes ha sido un ejemplo por su tenacidad y optimismo, dirigiendo con éxito esta investigación y sacando lo mejor de mí, y Carmela me ha aportado conocimientos y me ha ayudado a adquirir soltura en el laboratorio. Les agradezco que me hayan guiado por este mundo de la biología molecular durante este tiempo y espero seguir teniéndolas como punto de referencia.

A los Profs. Antonio Di Pietro, Concha de la Hera, Encarna Alejandre y Manolo Ruiz quiero decirles un sincero “gracias” por el interés que han mostrado siempre por mi y por mi trabajo, y por sus amenas clases de Genética durante el Master en las que aprendí y disfruté mucho.

Mis agradecimientos a los grupos de Genética de Veterinaria, de Plantas y a la Prof. Angelines Alonso por ser tan buenos compañeros.

Muchas gracias también a los Profs. del Departamento de Biología Celular José Manuel Villalba, por enseñarnos a utilizar el citómetro, siempre con humor y mucha paciencia, y José Antonio González Reyes, por su colaboración.

Gracias con especial afecto a la Dra. Alicia Prieto del CIB-CSIC de Madrid por sus valiosas enseñanzas y su esfuerzo, acercándome al mundo de la química y haciendo que ésta resulte más interesante y divertida de lo que nunca hubiera imaginado. De los meses que pasé en su grupo me llevo buenos recuerdos y no olvidaré la calurosa acogida de todos los compañeros del CIB, en especial de Valle y a Sara.

Gracias a todos los amigos y compañeros del laboratorio con los que he compartido opiniones, consejos, risas y ferias. Juntos hemos crecido como personas y como investigadores. En especial quiero dar las gracias a Mennat y a Gesabel por su compañía y amistad y por los momentos inolvidables que hemos vivido fuera y dentro del laboratorio, a Yolanda por su ayuda en el comienzo de la tesis, a las Maribeles por su cariño, su sentido del humor y sus buenos consejos, a Gabriela Roca por su espontaneidad y sus sorpresas, a Lola por su apoyo informático y a Esther e Isabel por su colaboración.

Gracias a Gaby porque su compañía me ha alegrado la etapa de escritura de la tesis, a Latifa y a Humberto por su ayuda y sincera amistad.

No podría olvidarme de dar las gracias a mis amigos que desde la distancia siempre me han animado, en especial a Oly por su apoyo y amistad desde que comenzamos juntas la carrera, a Nuri y a Tere que no dejan de preguntarme cuando termino la tesis, a Ceci por sus consejos, a Adelita porque es única y me ha dado siempre muchos ánimos, y a Marichu que ha diseñado la portada de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial a mi familia, y sobre todo a mis padres que son la razón de todos mis logros.

Y finalmente, gracias a Cristian por estar siempre a mi lado, apoyarme y creer en mí.

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	9
1. El género <i>Fusarium</i>	11
1.1. Biología.....	11
1.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	12
1.3. Ciclo de vida y proceso de infección	13
2. Pared celular fúngica	14
2.1. Composición química y estructura de la pared fúngica	15
2.2. Proteínas de la pared celular fúngica.....	16
3. Glicosilación.....	17
3.1. Tipos de glicoconjugados	18
3.2. Glicosilación de proteínas	18
3.2.1. N-glicosilación	19
3.2.2. O-glicosilación	24
3.2.3. C-manosilación.....	24
3.2.4. Anclaje GPI	25
3.2.5. Fosfoglicosilación	25
3.3. Maquinaria de glicosilación	25
3.3.1. Tráfico vesicular entre RE y AG	26
3.3.2. Proteínas del aparato de Golgi	28
3.4. Funciones biológicas de la glicosilación.....	30
3.4.1. Proteínas de membrana.....	30
3.4.2. Proteínas de la vía secretora	31
3.4.3. Lectinas	31
3.4.4. Glicoproteínas intracelulares.....	32
3.4.5. Lipopolisacáridos y glicolípidos	32
3.5. Respuesta celular a defectos en glicosilación	33
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39

4. Materiales	41
4.1. Material biológico.....	41
4.2. Medios de cultivo.....	42
4.2.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	42
4.2.2. Medios de cultivo para <i>Fusarium oxysporum</i>	42
4.2.3. Compuestos químicos.....	43
4.3. Oligonucleótidos sintéticos	44
4.4. Vectores de clonación	45
4.5. Programas de análisis de datos	45
5. Métodos	47
5.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos	47
5.1.1. Bacterias	47
5.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	47
5.1.3. Plantas	47
5.2. Aislamiento de ácidos nucleicos	48
5.2.1. Purificación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña escala con CTAB (miniprep).....	48
5.2.2. Extracción de ADN de <i>F. oxysporum</i>	48
5.2.3. Extracción de ADN de plantas infectadas.....	49
5.2.4. Extracción de ARN total.....	49
5.3. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos.....	50
5.3.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción.....	50
5.3.2. Defosforilación.....	50
5.3.3. Unión de fragmentos de ADN	51
5.4. Electroforesis de ácidos nucleicos	51
5.4.1. Geles de agarosa	51
5.4.2. Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa	51
5.5. Cuantificación de ácidos nucleicos	52
5.6. Hibridación y detección de ácidos nucleicos.....	52
5.6.1. Transferencia y fijación de ADN a membranas de nailon para análisis <i>Southern</i>	52
5.6.2. Prehibridación	53
5.6.3. Hibridación	53
5.6.4. Lavados y detección.....	54
5.6.5. Sustitución de la sonda	54
5.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	55
5.7.1. PCR estándar.....	55

5.7.2. PCR de marcaje	55
5.7.3. Precipitación de los productos amplificados por PCR	56
5.7.4. Transcripción reversa del ARN (RT-PCR)	56
5.7.5. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo final	57
5.8. Transformación genética	57
5.8.1. Transformación de <i>E. coli</i>	57
5.8.2. Transformación genética de <i>F. oxysporum</i>	58
5.9. Construcción de alelos mutantes	59
5.10. Fusión traduccional con la proteína GFP	61
5.11. Análisis filogenético	62
5.12. Ensayos de infección.....	63
5.12.1. Infección de plantas	63
5.12.2. Infección en <i>Galleria mellonella</i>	64
5.13. Ensayos de fenotipos relacionados con virulencia	64
5.13.1. Aglutinación	64
5.13.2. Fusión vegetativa	65
5.13.3. Resistencia a enzimas líticas de pared fúngica	65
5.14. Afinidad a colorantes y lectinas, específicos de componentes de pared	65
5.14.1. Unión del compuesto Alcian Blue a paredes celulares....	65
5.14.2. Unión a lectina <i>GSII</i> conjugada con el fluoróforo FITC....	66
5.15. Fraccionamiento subcelular	67
5.16. Manipulación de proteínas	67
5.16.1. Extracción de proteínas totales	67
5.16.2. Extracción de proteínas extracelulares en condiciones de inducción	68
5.16.3. Extracción de proteínas de la pared celular de <i>F. oxysporum</i>	69
5.16.4. Inhibidores de proteasas	70
5.16.5. Concentración de proteínas en las muestras	71
5.16.6. Determinación de la concentración de proteínas.....	71
5.16.7. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	72
5.16.8. Tinción de geles	73
5.16.9. Desglicosilación de proteínas	74
5.17. Electroforesis bidimensional.....	74
5.17.1. Isoelectroenfoque (IEF).....	75
5.17.2. 2D-SDS-PAGE	76
5.17.3. Visualización de las proteínas.....	76

5.17.4. Análisis de imágenes para la evaluación de la expresión diferencial.....	76
5.17.5. Identificación de spots mediante digestión triptica y Maldi/TOFF	77
5.18. <i>Western Blot</i>	78
5.19. Actividades enzimáticas	78
5.19.1. Actividad GDPasa	78
5.19.2. Actividad citocromo c reductasa	79
5.20. Microscopía	79
5.20.1. Microscopía óptica	79
5.20.2. Microscopía de fluorescencia.....	79
5.20.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	80
5.21. Manipulación de polisacáridos	81
5.21.1. Extracción y purificación de polisacáridos de pared	81
5.21.2. Análisis e identificación de azúcares mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS)	83
5.22. Extracción de lipopolisacáridos extracelulares	84
RESULTADOS	85
CAPÍTULO 1: PAPEL DE LAS N-ACETILGLUCOSAMINA-TRANSFERASAS	87
6. Genes <i>N</i> -acetilglucosamina transferasas.....	89
6.1. Identificación de parálogos <i>gnt</i> en el genoma de <i>Fusarium oxysporum</i>	89
6.2. Análisis filogenético	93
6.3. Análisis <i>in silico</i> de genes de la ruta de <i>O</i> - y <i>N</i> -glicosilación en <i>F. oxysporum</i>	94
7. Delección dirigida de los genes <i>gnt2</i> . Caracterización molecular y complementación de los mutantes.....	98
8. Caracterización fenotípica del mutante $\Delta gnt2$	100
8.1. Comportamiento patotípico de los mutantes $\Delta gnt2$ y $\Delta gnt2::gnt2100$	
8.2. Aglutinación y fusión de hifas	102
8.3. Sensibilidad a estrés térmico.....	103
9. Localización subcelular de la proteína Gnt2	104
9.1. Obtención de mutantes portadores de la fusión traduccional GFP:: <i>Gnt2</i>	104

9.2. Efecto de la brefeldina A sobre mutantes GFP::Gnt2	105
9.3. Fraccionamiento subcelular y análisis de las fracciones enriquecidas en Golgi.....	106
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DE LA PARED CELULAR DEL MUTANTE $\Delta gnt2$	109
10. Fenotipos relacionados con pared	111
10.1. Sensibilidad a compuestos que interaccionan con la pared ...	111
10.2. Resistencia al tratamiento con glucanasas	112
10.3. Afinidad de la pared celular a Alcian Blue	112
10.4. Unión de la pared celular a la lectina <i>GS II-FITC</i>	114
10.5. Agregación de hifas.....	116
11. Composición y análisis de la pared celular fúngica.....	119
11.1. Polisacáridos de pared celular	119
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS Y GLICOCONJUGADOS EN EL MUTANTE $\Delta gnt2$.....	129
12. Análisis comparativo del proteoma total del mutante $\Delta gnt2$	131
13. Proteínas de pared	136
13.1. Extracción de proteínas de pared	136
13.2. Identificación de proteínas de pared	137
13.3. Desglicosilación de proteínas de pared por tratamiento con PNGasa F.....	144
14. Identificación de moléculas glicosiladas secretadas por el hongo	145
14.1. Enzimas extracelulares	145
14.2. Lipopolisacáridos.....	150
DISCUSIÓN	153
15. Conservación de las rutas de glicosilación en <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	155
16. Papel de ScGnt1 y sus ortólogos de <i>F. oxysporum</i> en la elongación de <i>N-glicanos</i>	156
17. Alteraciones de la pared celular causadas por defectos en <i>N-glicosilación</i>	157
17.1. Diferencias en las proteínas de pared del mutante $\Delta gnt2$	158

17.2. Mayor agregación de hifas en el mutante $\Delta gnt2$ causada por alteraciones de la pared	159
18. Alteraciones del contenido proteico relacionadas con defectos en glicosilación en $\Delta gnt2$	160
18.1. Producción de enzimas de secreción en el mutante $\Delta gnt2$	160
18.2. Producción de enzimas relacionadas con rutas de secreción y señalización en el mutante $\Delta gnt2$	162
18.3. El mutante $\Delta gnt2$ presenta modificaciones en la abundancia de algunas proteínas intracelulares.	163
19. Sensibilidad a temperatura en el mutante $\Delta gnt2$	164
20. Menor capacidad de fusión vegetativa entre hifas en $\Delta gnt2$	165
21. Comportamiento patotípico: virulencia reducida en $\Delta gnt2$	166
22. Los lípidos como posibles moléculas diana de $gnt2$ y su relación con patogénesis	166
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	173

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias del género <i>Fusarium</i> en medio PDA.	12
Figura 2. Esporas de <i>Fusarium</i>	12
Figura 3. Ciclo de vida de <i>F. oxysporum</i>	14
Figura 4. Estructura de la pared celular fúngica.	15
Figura 5. Primer paso de la <i>N</i> -glicosilación: el oligosacárido de Glc ₃ Man ₉ GlcNAc ₂ transferido al residuo Asn de la proteína.	20
Figura 6. <i>N</i> -glicosilación de proteínas en RE.	21
Figura 7. Ciclo de la calnexina-calreticulina.	22
Figura 8. Tipos de estructuras del core de <i>N</i> -glicanos.	22
Figura 9. <i>N</i> -glicosilación en el aparato de Golgi.	23
Figura 10. Estructuras del core en <i>O</i> -glicanos.	24
Figura 11. Esquema del transporte vesicular entre RE y AG.....	27
Figura 12. Estructura general de una glicosiltransferasa del AG.	29
Figura 13. Estrategia para disrupción mediante el método DelsGate.	61
Figura 14. Esquema de la proteína de fusión GFP:: <i>Gnt2</i>	62
Figura 15. Índices de enfermedad de plantas de tomate infectadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	63
Figura 16. Obtención de las fracciones F01S50S de <i>O</i> -glicanos y F1S50S de <i>N</i> -glicanos	82
Figura 17. Proteínas <i>Gnt</i> deducidas en <i>F. oxysporum</i> y ortólogos de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. cinerea</i>	92
Figura 18. Árbol filogenético construido con proteínas <i>Gnt</i> fúngicas	93
Figura 19. Deleción del gen <i>gnt2</i> y complementación del mutante obtenido.	99
Figura 20. Comportamiento patotípico de los mutantes $\Delta gnt2$ y $\Delta gnt2::gnt2$	101
Figura 21. PCR a tiempo final de los genes <i>chsV</i> (<i>Fusarium</i>) y <i>tomQB</i> (tomate).	102
Figura 22. Fusión vegetativa entre hifas.....	103
Figura 23. Crecimiento a 28 °C y en condiciones de estrés térmico a 35 °C.	104
Figura 24. Construcción para el etiquetado de <i>Gnt2</i> fusionado a GFP.	105
Figura 25. Efecto de la brefeldina A sobre la estructura y el tráfico vesicular entre AG y RE.	105

Figura 26. Efecto de la brefeldina A sobre la distribución de fluorescencia en los transformantes GFP:: <i>Gnt2</i>	106
Figura 27. Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial y ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.	107
Figura 28. Localización de la proteína GFP:: <i>Gnt2</i> tras fraccionamiento subcelular FP.	108
Figura 29. Crecimiento en presencia de SDS y CFW.	111
Figura 30. Formación de protoplastos.	112
Figura 31. Estructura molecular del Alcian Blue.	113
Figura 32. Afinidad por el colorante Alcian Blue de la pared de esporas.	113
Figura 33. Fluorescencia y dispersión de la luz de microconidias unidas a <i>GSI-FITC</i>	115
Figura 34. Análisis mediante citometría de porcentaje de sub-poblaciones celulares.	115
Figura 35. Fluorescencia relativa de las sub-poblaciones de células (individuales y agregadas).	116
Figura 36. Conidias teñidas con <i>GSI-FITC</i> observadas al microscopio óptico con Nomarski y fluorescencia.	117
Figura 37. Micrografías electrónicas de hifas y esporas de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta gnt2$	118
Figura 38. Calibración de la columna de Sepharose CL-6B.	121
Figura 39. Perfiles de elución de las fracciones O- y N-linked	122
Figura 40. Polisacáridos unidos a proteínas de pared	124
Figura 41. Análisis GC-MS de las fracciones O- y N- glicanos de proteínas de pared.	125
Figura 42. Estructura deducida del heteropolisacárido ácido.	126
Figura 43. Análisis mediante GC-MS de fracciones insolubles extraídas de pared celular.	127
Figura 44. Estructura deducida del homopolisacárido lineal presente en algunas fracciones insolubles de pared celular.	128
Figura 45. Proteínas totales separadas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE.	131
Figura 46. Análisis de proteínas totales mediante electroforesis en geles 2D-SDS-PAGE.	132
Figura 47. Estructura química de la tiamina.	135
Figura 48. Proteínas de pared celular.	136

Figura 49. Representación en % del total de proteínas en extractos de pared celular ausentes en $\Delta gnt2$	138
Figura 50. Representación de proteínas de pared ausentes en $\Delta gnt2$ en función de % de sitios de <i>N</i> -glicosilación y de dominios de unión a membrana.	143
Figura 51. Sitios sensibles a la acción de la desglucosidasa PNGasa F..	144
Figura 52. Análisis de las proteínas de pared en geles SDS-PAGE tratadas o no con PNGasa F	145
Figura 53. Proteínas extracelulares inducidas en distintas fuentes de carbono:.....	146
Figura 54. Proteínas secretadas por la estirpe silvestre y el mutante $\Delta gnt2$	147
Figura 55. Proteínas extracelulares de la estirpe silvestre y el mutante $\Delta gnt2$ separadas mediante electroforesis bidimensional.....	148
Figura 56. Ejemplo de estructuras de lipopolisacáridos.	151
Figura 57. Separación electroforética de lípidos extracelulares de la estirpe silvestre (wt) y mutante $\Delta gnt2$	152

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Material biológico empleado.....	41
Tabla 2. Compuestos químicos utilizados.....	43
Tabla 3. Oligonucleótidos universales.....	44
Tabla 4. Oligonucleótidos específicos de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> ...	44
Tabla 5. Oligonucleótidos específicos de genes de tomate.....	45
Tabla 6. Vectores utilizados.	45
Tabla 7. Programas para el análisis de datos.	46
Tabla 8. Condiciones estándar de PCR.....	55
Tabla 9. Fuentes de carbono para la inducción de enzimas extracelulares	68
Tabla 10. Proporciones de mezclas aleatorias en extractos de proteínas extracelulares empleados para el análisis 2D-SDS-PAGE.....	74
Tabla 11. Programación del isoelectroenfoque.....	75
Tabla 12. Familia génica de <i>gnt</i> en <i>F. oxysporum</i>	90
Tabla 13. Identidad entre las proteínas deducidas de genes <i>gnt</i>	91
Tabla 14. Genes implicados en glicosilación de proteínas en <i>S. cerevisiae</i> y sus ortólogos en <i>F. oxysporum</i>	95
Tabla 15. Proteínas que participan en rutas de glicosilación ausentes en <i>F. oxysporum</i>	97
Tabla 16. Fracciones obtenidas mediante fraccionamiento subcelular. ...	107
Tabla 17. Efecto del pH sobre la agregación de esporas y germínulas ...	117
Tabla 18. Fracciones de carbohidratos extraídas de pared celular	119
Tabla 19. Peso seco de azúcares de pared celular/pesos seco de micelio.	120
Tabla 20. Características de los polisacáridos purificados mediante filtración en columna de exclusión molecular	123
Tabla 21. Porcentaje de monosacáridos neutros.....	124
Tabla 22. Tipos de enlace deducidos de análisis de GC-MS	126
Tabla 23. Tipos de enlaces deducidos de análisis de GC-MS.	127
Tabla 24. Proteínas de pared ausentes en el mutante $\Delta gnt2$	139
Tabla 25. Clasificación funcional de las proteínas ausentes en $\Delta gnt2$	142
Tabla 26. Proteínas extracelulares identificadas en el análisis 2D-SDS-PAGE mediante maldi TOF/TOF-MS.....	149

ABSTRACT

Protein glycosylation is a process widely studied in eukaryotes, localized in two different cellular compartments but functionally connected: the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. Due to the complexity and diversity of its reactions, some enzymatic pathways are still unknown in many organisms, emerging as new research topics in filamentous fungi.

The initial glycosylation steps localized in the ER are highly conserved in eukaryotes, by contrast GA steps show wide variations in the sequential addition of monosaccharides that conform the elongation of the previously synthesized glycans, being some of these enzymatic reactions substrate specific.

Protein glycosylation in mammalian species presents a high structural diversity in which glycans are decorated by fucose, xilose, glucose, sialic acid and mannose in terminal positions. Fungal and yeast have less diversity and only present galactose, glucose, uronic acids and mannose as terminal residues.

N-acetylglucosamine transferases participate in terminal glycosylation, attaching GlcNAc to enlarge glycan molecules, but considering other studies on eukaryotes, this monosaccharide can be localized in terminal position or at bisecting points in the polysaccharide chains. With the aim to decipher the molecular dialogue and cross talk between *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersci* and the host during infection and to understand the molecular bases that govern fungal pathogenicity, we have analyzed the genes encoding *N*-acetylglucosaminyl transferases, presumably involved in glycosylation of glycoproteins, glycolipids, proteoglycans or small molecule acceptors. In silico analysis revealed the existence of seven putative *N*-glycosyl transferase encoding genes in the *F. oxysporum* f.sp. *lycopersci* genome. Deletion mutants in the *N*-acetylglucosaminyl transferase gene *gnt2* showed a dramatic reduction in virulence on both plant and animal hosts. The $\Delta gnt2$ mutants had alterations in cell wall properties related to terminal α - or β -linked *N*-acetylglucosamine. In the present study we conclude that is indeed a terminal monosaccharide, based on the cytometry analyses by fluorescence quantification of the lectin *GSII-FITC* bound to germling cell walls, although we can not discard a bisecting position as well. Mutant conidia and germlings also differed from the wild type in surface structure and physicochemical surface properties. Spore and hyphal aggregation in liquid culture differ between the mutant and the wild type, in a pH independent manner. Transmission electron micrographs of mutant germlings show strong cell-to-cell adherence likely caused by increased formation of an extracellular chemical matrix. $\Delta gnt2$ cell walls showed a significant reduction in *N*-linked oligosaccharides,

demonstrating that Gnt2 is required for efficient *N*-glycosylation of cell wall proteins. Gnt2 was localized in the Golgi-like sub-cellular compartments as determined by fluorescence microscopy of GFP::Gnt2 fusion protein after treatment with the antibiotic Brefeldin A. Furthermore, density gradient ultracentrifugation allowed identification of GFP::Gnt2 fusion protein in subcellular fractions enriched in Golgi specific enzymatic activities. Our results support that *N*-glycosylation is a key component for structural cell wall proteins and influences recognition of *F. oxysporum* by both plant and animal hosts during pathogenicity.

The direct implication of Gnt2 in protein *N*-glycosylation has been demonstrated by quantification of total *N*-linked glycans from cell wall glycoproteins, where a 30 % reduction was found in the mutant in comparison to the wild type strain, whereas *O*-linked glycan content was similar. We conclude that the cell wall *N*-glycans reduction causes an increase in hyphal aggregation observed by cytometric and electronic transmission microscopy analyses.

The $\Delta gnt2$ mutant shows decreased ability to form anastomosis bridges between its conidia and hyphae, which results in less compact mycelia.

The whole proteomic analyses revealed changes in the content of intra- and extracellular proteins, likely caused by glycosylation defects and others possibly by metabolic reorganization and cellular stress.

These results allow to conclude that phenotypes observed in the mutant are caused by protein *N*-glycosylation defects, resulting in decrease invasion and tissue colonization efficiency, as well as increased sensitivity to toxic compounds and stress conditions, heat, cellular and oxidative stress.

RESUMEN

El proceso de glicosilación de proteínas, ampliamente estudiado en eucariotas, tiene lugar en dos compartimentos celulares separados aunque funcionalmente conectados: el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (AG). Debido a su complejidad, aún se desconocen algunas de las rutas enzimáticas que lo constituyen en muchos organismos, resultando un tema muy novedoso de estudio en hongos filamentosos.

Las etapas de glicosilación iniciales localizadas en el RE están muy conservadas en eucariotas, mientras que las etapas del AG son más variables y corresponden a la adición secuencial de monosacáridos que alargan el glicano sintetizado, siendo algunas específicas de sustrato. En mamíferos la elongación de glicanos es muy diversa, dando lugar a cadenas oligosacáridicas decoradas con fucosa, xilosa, glucosa, ácido siálico o manosa terminales. En hongos y levaduras la diversidad es menor, presentando tan solo residuos galactosa, glucosa, ácidos urónicos o manosa en los extremos.

El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum* ha revelado la existencia de seis posibles genes de *N*-acetilglucosamina transferasas (Gnt) ortólogos a GNT1 de *Saccharomyces cerevisiae*, proteína identificada como enzima de glicosilación anclada a la membrana del AG.

Para estudiar el papel de *gnt2* en la fisiología y virulencia de *F. oxysporum*, en este trabajo se ha llevado a cabo la delección de ambas copias del gen y la posterior complementación de los mutantes resultantes, con el alelo silvestre.

El proceso de infección con el mutante deficiente $\Delta gnt2$, tanto en plantas de tomate como en la larva de la polilla de la cera *Galleria mellonella*, ha resultado en una reducción de la capacidad de invasión de los tejidos del huésped y en un retraso significativo en el desarrollo de enfermedad. Por el contrario, los individuos infectados con el transformante complementado han mostrado un desarrollo de la enfermedad similar a la estirpe silvestre, con la recuperación total de la virulencia.

La anulación de *gnt2* produce cambios en la pared celular que conllevan la alteración de la sensibilidad y la afinidad a compuestos que interactúan con la pared celular fúngica y a enzimas líticas de pared, así como una reducción en la formación de puentes de fusión entre conidias e hifas, dando como resultado un micelio menos cohesionado.

Estos análisis han revelado en el mutante un aumento en la sensibilidad a dichos compuestos tóxicos, y mayor resistencia a la acción de glucanasas y quitinasas, así como menor afinidad por el colorante Alcian Blue.

Los resultados de este trabajo demuestran que Gnt2 es una *N*-acetilglucosamina transferasa que interviene en la *N*-glicosilación de proteínas, ya que su anulación produjo una reducción del 30 % en los *N*-glicanos unidos a proteínas de pared, mientras que el contenido de *O*-glicanos resulta similar, respecto a la estirpe silvestre. Concluimos que el menor contenido de *N*-glicanos de pared en $\Delta gnt2$ es causante del elevado grado de agregación de sus hifas, según resultados de los análisis de citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión.

Los análisis proteómicos comparativos realizados en este trabajo han mostrado alteraciones en el contenido de proteínas intra- y extracelulares en el mutante $\Delta gnt2$, algunas causadas por defectos en glicosilación y otras posiblemente como consecuencia de reajustes metabólicos y de estrés celular.

Estos resultados permiten concluir que los fenotipos observados en el mutante se deben a defectos en *N*-glicosilación de proteínas, que redundan en una menor eficiencia en la invasión y colonización de tejidos, así como en la resistencia a compuestos tóxicos ya condiciones de estrés, térmico, celular y oxidativo.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Objetivos

1. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un amplio y heterogéneo grupo de hongos filamentosos (Hifomicetos) que se encuentran en casi todos los ecosistemas terrestres (Nelson *et al.*, 1994). Pertenece al filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Nectriaceae.

Algunas especies son causantes de la marchitez vascular en numerosos cultivos y plantas ornamentales; aunque también se incluyen especies no patógenas, saprófitas y parásitas de otros organismos, incluido el ser humano (Ortoneda *et al.*, 2004; Vartivarian *et al.*, 1993). En la actualidad, algunas las especies de *Fusarium* han sido descritas como patógenos oportunistas, causando diversas patologías, en el hombre y en otros animales.

La clasificación de especies del género ha resultado inestable a lo largo de la historia de la micología, debido a la naturaleza variable en cuanto a sus características morfológicas y fisiológicas. Se han contabilizado cientos de especies de *Fusarium*, y tras sucesivas revisiones se ha llegado a la clasificación simplificada de Snyder y Hanssen (1954) que establecieron nueve especies. Sin embargo, la situación taxonómica actual presenta al género constituido por unas setenta especies, según la última clasificación (Leslie & Summerell, 2006).

1.1. Biología

Las especies del género *Fusarium* se caracterizan por presentar macroconidios tabicados en forma de huso, microconidios terminales o en cadena, y producir clamidosporas en la mayoría de sus especies. Algunas pueden completar el ciclo sexual, mientras que la mayoría presentan reproducción asexual o anamorfa.

Las hifas se desarrollan a partir de una espora que emite un tubo germinativo mediante crecimiento apical, con ramificaciones en las células no terminales. La reproducción puede ser sexuada (teleomorfa) con fusión de núcleos, y asexual (anamorfa) sin fusión de núcleos.

Las características macroscópicas más evidentes del género *Fusarium* son crecimiento rápido y desarrollo de colonias con micelio aéreo de aspecto algodonoso (Figura 1), que muestran colores pálidos; aunque a veces aparecen pigmentos rosados, anaranjados o púrpura en función de las condiciones nutritivas y abióticas del medio.

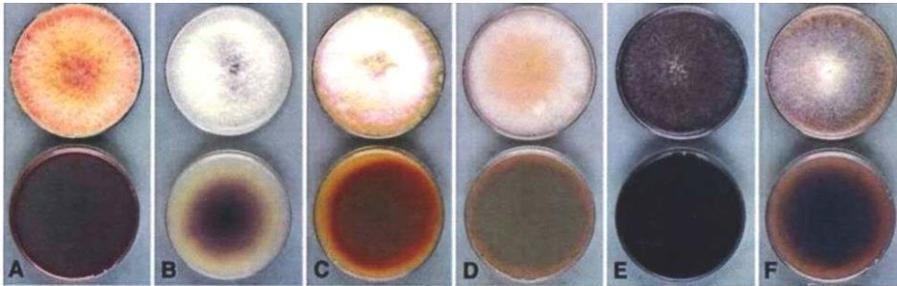


Figura 1. Colonias del género *Fusarium* en medio PDA. A, *F. poae*; B, *F. oxysporum*; C, *F. acuminatum*; D, *F. nelsonii*; E, *F. subglutinans*; F, *F. nigamaï*; G, *F. pseudonigamaï*; H, *F. laterium*; I, *F. thapsinum*; J, *F. decemcellulare*; K, *F. verticillioides*; L, *F. culmorum*.

Las características microscópicas más relevantes para la identificación de especies del género *Fusarium* son la formación de tres tipos de esporas: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Los macroconidios son pluriseptados, fusiformes y de mayor tamaño que el resto; los microconidios son unicelulares o bicelulares con forma huso; y las clamidosporas que presentan una pared gruesa, se originan por la modificación de un segmento de la hifa cuya función, más que propagación, es la supervivencia durante largos periodos de tiempo (Figura 2).

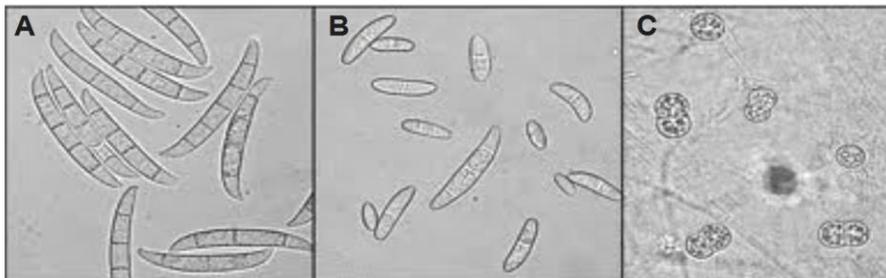


Figura 2. Esporas de *Fusarium*. A) Macroconidios B) microconidios y C) clamidosporas.

1.2. *Fusarium oxysporum*

Todas las especies de *Fusarium* de la sección Elegans se incluyeron en una única denominada *F. oxysporum* por Snyder y Hansen (1940). Estos autores definieron el concepto de *forma specialis* (f.sp.) para referirse a cada aislado de *F. oxysporum* con capacidad de infectar una especie, un género o

un grupo vegetal restringido, aunque se trate de estirpes con características fisiológicas y de cultivo indistinguibles. Hoy en día, el concepto de *forma specialis* sigue en uso y aunque algunas infectan a un único hospedador, para otras el rango es más amplio y actúan sobre un grupo restringido de especies vegetales (Burnett, 1984).

Estudios moleculares recientes relacionan este fenómeno con la existencia de cromosomas específicos presentes exclusivamente en el genoma de determinadas estirpes, que son portadores de genes relacionados con patogénesis que confieren especificidad para el hospedador (Ma *et al.*, 2010). Por ejemplo, *F. oxysporum* f.sp.*lycopersici*, cepa empleada en este trabajo, es patógena para la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y posee cuatro cromosomas únicos (3, 6, 14 y 15), de un total de quince. Estos cuatro cromosomas se caracterizan por presentar un alto número de elementos móviles y regiones variables, que confieren al hongo su capacidad patogénica-específica y una elevada diversidad genética.

1.3. Ciclo de vida y proceso de infección

F. oxysporum se encuentra en la microbiota normal del suelo, en donde puede permanecer largos períodos de tiempo en ausencia de la planta hospedadora, principalmente en forma de clamidospora o creciendo en restos de materia orgánica o exudados de raíces, pudiendo también existir en la superficie externa de raíces de plantas no hospedadoras (estado saprofito) (Beckman, 1987).

Las plantas sanas cuando crecen en suelos contaminados son susceptibles de ser infectadas a través de sus raíces. La proximidad de éstas induce la germinación de las esporas, favoreciendo su desarrollo y la penetración en el tejido vegetal (estado parasítico). *F. oxysporum* es capaz de atravesar la epidermis de la planta sin necesidad de estructuras especializadas, como sucede en otras especies de *Fusarium*. Una vez en el interior de la planta hospedadora, el hongo crece intra- e intercelularmente atravesando el córtex radicular hasta alcanzar los vasos del xilema, por el cual coloniza e invade las partes aéreas de la planta (fase patogénica) (Beckman, 1987). En estados avanzados de la enfermedad, el hongo se extiende fuera del sistema vascular produciendo conidias y clamidosporas, y provocando el marchitamiento e incluso la muerte de la planta hospedadora.

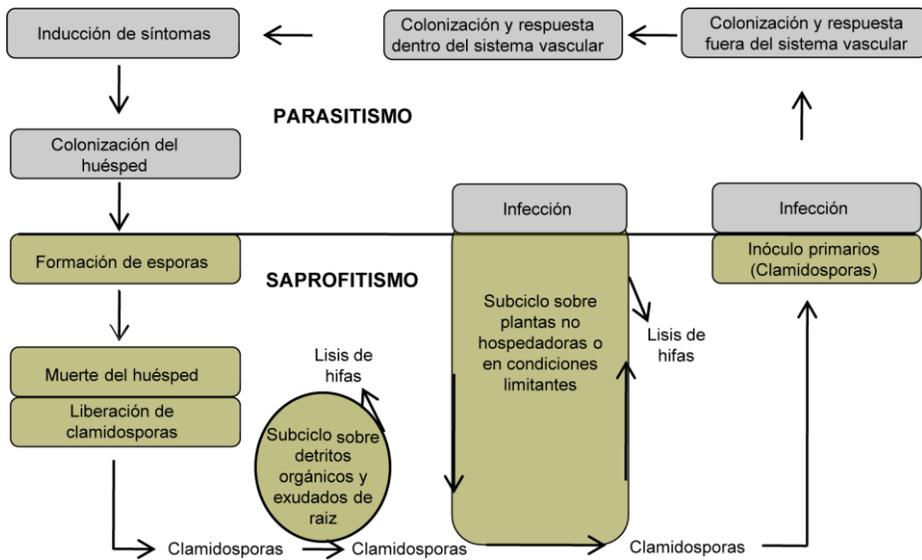


Figura 3. Ciclo de vida de *F. oxysporum* (Beckman, 1987)

La repercusión económica de la fusariosis vascular, junto con la capacidad de las especies de este género de infectar de forma específica a un amplio número de especies vegetales, ha suscitado el interés en el estudio de los mecanismos de infección, convirtiéndolo en modelo para conocer mejor el proceso de patogénesis en hongos.

2. Pared celular fúngica

La pared celular fúngica es una cubierta externa que actúa como interfaz entre el microorganismo y el entorno extracelular. Es una estructura plástica compleja compuesta por polisacáridos que rodean la membrana plasmática y proteínas glicosiladas que se encuentran ancladas de distintas formas a la membrana o a los polisacáridos de pared. La pared protege a la célula del entorno extracelular, le da forma y actúa como barrera osmótica, resultando esencial para la supervivencia del hongo. Defectos en la estructura de la pared pueden causar lisis o muerte celular.

La pared celular no es una estructura inerte, participa activamente en fenómenos de permeabilidad, interacción y comunicación célula-célula, y en la recepción de señales del medio externo, ya que en su superficie se localizan receptores que activan reacciones dentro de la célula, como respuesta a antibióticos o respuesta inmune.

2.1. Composición química y estructura

La pared celular fúngica de *Fusarium* está formada por una capa principal interna constituida por polisacáridos, rodeada por una superficial fibrilar de proteínas generalmente glicosiladas (Schoffemeer *et al.*, 2001). Los polisacáridos principales de la pared de los hongos son los β -glucanos y la quitina, que forman una estructura de microfibrillas rígidas que les diferencia de procariontas y de células vegetales (Figura 4).

De forma variable, y dependiendo del grupo taxonómico, existen otros polisacáridos además de proteínas, lípidos y pigmentos, en orden decreciente de abundancia.

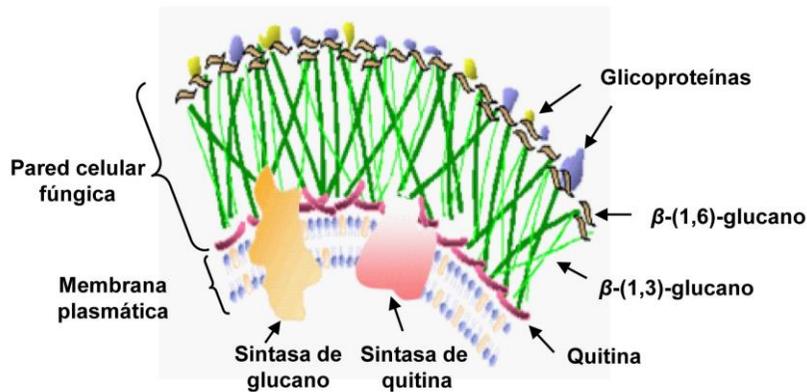


Figura 4. Estructura de la pared celular fúngica.

Los principales componentes de la pared celular fúngica son:

- **β -1,3-glucano.** Polímero de glucosa muy ramificado con enlaces β -1,6 y alto grado de entrecruzamiento íntimamente ligado a la quitina (Manners *et al.*, 1973).
- **Quitina.** Polímero lineal constituido por cadenas antiparalelas de β -1,4 *N*-acetilglucosamina formando una estructura que rodea la membrana plasmática. Se encuentra en todos los grupos taxonómicos, excepto en los Zigomicetos que tienen quitosano (Bartnicki-Garcia, 1968; Bartnicki-Garcia & Reyes, 1968).
- **α -1,3 glucano.** Polímero lineal de glucosa, abundante en la pared de algunos Ascomicetos y Basidiomicetos, encontrándose en algunas

especies en las capas más externas de la pared (Bacon *et al.*, 1968; Hogan & Klein, 1994; Wessels *et al.*, 1972). Su proporción varía entre especies, representando hasta el 15-25 % del peso seco de la pared (Bacon *et al.*, 1968).

- **Glicoproteínas.** Se localizan en la parte más externa asociadas a los β -glucanos mediante enlaces covalentes (Lipke & Ovalle, 1998). Contienen una fracción glucídica compuesta por homo- y heteropolisacáridos que representa entre 5-15 % del peso seco en Ascomicetos. Los más abundantes son los heteromananos, formados por manosa, galactosa y glucosa en proporciones variables y distintos tipos de enlace en función del taxón (Leal *et al.*, 2010). En levaduras los glicanos de glicoproteínas están formados por α -manosa muy ramificada, mientras que los Ascomicetos Hypocreales, como *Fusarium*, contienen un esqueleto o core de α -manano corto y cadenas principales de galactofuranosa ramificadas con distintos azúcares (Ahrazem *et al.*, 2000). En el género *Fusarium* esta fracción glucídica contiene además residuos de ácidos urónicos (Ruiz-Herrera, 1967).

2.2. Proteínas de la pared

Las proteínas de la pared pueden unirse a los β -glucanos mediante enlaces covalentes (glicosídico, éster, o a través de dominios específicos de unión a glicanos), enlaces iónicos con moléculas cargadas negativamente o mediante anclaje GPI. Algunas se encuentran unidas a β -1,6-glucanos, extendiéndose hacia el exterior de la pared, sin embargo, otras se anclan internamente a los β -1,3-glucanos, formando complejos de polisacárido-proteína-polisacárido, como las proteínas PIR de *S. cerevisiae* (Yin *et al.*, 2008). También pueden estar unidas a otras proteínas mediante enlaces disulfuro.

La caracterización de proteínas asociadas a pared resulta difícil por la contaminación, con proteínas de membrana y citosólicas, durante los procesos de extracción y purificación (Klis *et al.*, 2007).

En *S. cerevisiae* se ha descrito que las proteínas de pared están implicadas en diversas funciones, contribuyen al mantenimiento de su integridad favoreciendo el entrecruzamiento de polisacáridos y reduciendo así la acción de glucanasas exógenas (de Groot *et al.*, 2005).

Estas proteínas se clasifican de acuerdo a su papel en:

- Entrecruzamiento de glicanos (adhesinas, PIR)

- Formación de biofilms
- Flocculación
- Remodelación de pared (glucanasas, quitinasas, sintasas de quitina, glicosidasas)
- Adquisición de hierro
- Degradación (proteasas)
- Modulación de la reproducción sexual

El contenido proteico de la pared es dinámico, al igual que las proteínas secretadas y el resto de proteínas intracelulares, y cambia en función de los requerimientos del organismo y del entorno, estando relacionado con procesos de desarrollo, invasión e infección (Durán & Nombela, 2004; Yin *et al.*, 2008).

3. Glicosilación

La glicosilación es una modificación de proteínas y lípidos característica de organismos eucariotas y de algunos procariontes, que consiste en la adición de oligosacáridos para formar glicoconjugados (Alberts *et al.*, 1983). Al igual que otras modificaciones (fosforilación y acetilación), aporta información biológica y amplía la diversidad de estas moléculas.

La glicosilación implica la adición y la eliminación secuencial de monosacáridos a una molécula aceptora mediante la acción de glicosiltransferasas y glicosidasas, respectivamente. Estas modificaciones conducen al plegamiento correcto de las proteínas, alterando sus propiedades biofísicas, y en consecuencia, afectan a la conformación, solubilidad, agregación e incluso a la funcionalidad.

El ensamblaje de los monosacáridos que conforman los glicanos, a diferencia de la síntesis proteica o de ácidos nucleicos, no se encuentra codificado, sino que es el resultado de la acción secuencial de numerosas glicosiltransferasas e hidrolasas que dan lugar a su micro-heterogeneidad.

3.1. Tipos de glicoconjugados

Existen diversos glicoconjugados donde un azúcar se une covalentemente a otra molécula.

- Las **glicoproteínas** contienen carbohidratos unidos covalentemente con un alto grado de ramificación. Los proteoglicanos, presentes en la matriz extracelular de organismos multicelulares, contienen un esqueleto proteico unido principalmente a glicosaminoglucanos, es decir, largas cadenas de oligosacáridos lineales formadas por repeticiones de un disacárido (hexosa y ácido glucurónico) que presenta sulfonación.
- Los **lipopolisacáridos (LPS)**, característicos de pared en bacterias gram-negativas, están formados por un elemento central (*core*) de O-glicano y una fracción lipídica (lípidos A), que consta de dos *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas a ácidos grasos. Los lipoquitooligosacáridos (LCO) actúan como moléculas señalizadoras durante la infección y nodulación entre *Rhizobium* y leguminosas (factores NOD) y difieren de los LPS, ya que están formados por cadenas de GlcNAc unidas entre sí por un ácido graso.
- Los **glicolípidos** están constituidos por la unión de uno o varios monosacáridos a moléculas hidrofóbicas como los lípidos. Destacan los esfingolípidos y glicosfingolípidos característicos de paredes bacterianas.
- Las **proteínas con anclaje GPI** presentan unión en su extremo carboxilo a una molécula de glicosilfosfatidil inositol (GPI), la cual se ancla a la membrana plasmática.

3.2. Glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas es la unión covalente de carbohidratos cadenas laterales de determinados aminoácidos, siendo una de las principales modificaciones de las proteínas. Existen distintos tipos de glicosilación proteica:

- *N*-glicosilación
- O-glicosilación
- C-manosilación
- Anclaje GPI
- Fosfoglicosilación

Las secuencias consenso indican posibilidad, pero no implican necesariamente glicosilación; de hecho, solo un 30-50 % de los sitios posibles presentes en las glicoproteínas están glicosilados.

Los monosacáridos que constituyen los glicanos de las glicoproteínas varían según la especie y el tipo celular, presentando gran diversidad de estructuras en *N*- y *O*-glicosilación.

La *O*-glicosilación difiere mucho según la especie, mientras que los *N*-glicanos presentan estructuras comunes. Las etapas iniciales de la *N*-glicosilación localizadas en el RE se encuentran conservadas y son comunes a todos los eucariotas. Sin embargo, esta estructura común contrasta con la diversidad encontrada en las glicoproteínas maduras, como resultado de modificaciones posteriores a lo largo de la ruta de glicosilación (Helenius & Aebi, 2004)

En mamíferos, los *N*-glicanos presentan variedad estructural donde el *core* de manosa puede sufrir modificaciones en el AG hasta resultar en una estructura ramificada con *N*-acetilglucosamina, galactosa, mucosa y/o ácido siálico. En levaduras, las cadenas de *N*- y de *O*-glicanos están formadas por un *core* de manosa que puede contener residuos de manosa extras o ser elongado hasta formar un polisacárido de manano ramificado (Munro, 2001). Sin embargo, en la mayoría de Ascomicetos los glicanos de proteínas presentan un alto porcentaje de glucosa y galactosa en las cadenas principales, con ramificaciones de manosa y ácidos urónicos (Leal *et al.*, 2010).

3.2.1. *N*-glicosilación

La *N*-glicosilación es un tipo de glicosilación proteica conservada en todos los organismos. En células eucariotas es una modificación generalizada cuya función principal es favorecer el plegamiento de las proteínas (Helenius, 1994). Consiste en la adición de un oligosacárido, cuya composición final es $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, durante la síntesis proteica sobre la secuencia Asn-X-Ser/Thr, (donde X es cualquier aminoácido excepto Pro), estableciéndose un enlace covalente entre el (-NH) del Asn y el primer oligosacárido que siempre es *N*-acetilglucosamina (Figura 5).

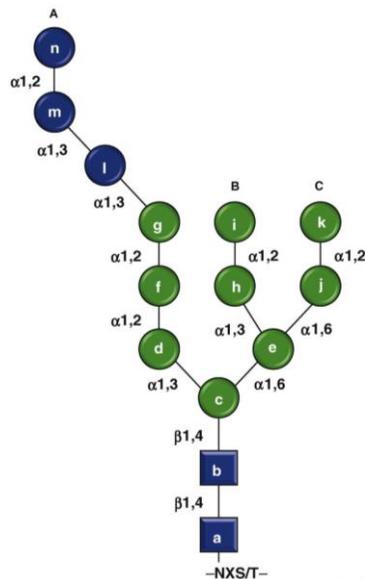


Figura 5. Primer paso de la N-glicosilación: el oligosacárido de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ es transferido al residuo Asn de la proteína. Se indican en cuadrado azul N-acetilglucosamina, en círculo verde manosa y en círculo azul glucosa (Aebi *et al.*, 2010).

Las proteínas resultan N-glicosiladas tras la acción de enzimas durante su recorrido por el RE y, en algunos casos, continúan el proceso de maduración en el AG, donde sufren sucesivas modificaciones hasta alcanzar su estado final de glicosilación.

Las proteínas que ingresan en el RE presentan una secuencia específica en su extremo carboxilo que les permite ser reconocidas por una partícula de reconocimiento (SRP) durante su síntesis en un ribosoma libre, y ser trasladadas a la membrana del RE. Tras la unión del complejo formado por ribosoma-péptido a un receptor de membrana (receptor de SRP), el polipéptido es translocado al lumen del RE a través de un canal proteico, conjugándose a chaperonas (BiP) que ayudarán a configurar su plegamiento y comenzar el proceso de glicosilación (Fink, 1999; Gething, 1999; Helenius *et al.*, 2002).

La primera etapa de glicosilación consiste en la transferencia en bloque del oligosacárido pre-ensamblado ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) desde una molécula de dolicolpifosfato hasta un residuo de asparagina (Asn). Este oligosacárido inicial unido a P-P-dolicol ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$) se ensambla secuencialmente por acción de glicosiltransferasas (genes *alg*), localizadas en las caras citoplasmática y luminal de la membrana del RE, y se transfiere

por acción del complejo multiproteico OST (oligosacaryltransferasa) dentro del lumen del RE (Kelleher & Gilmore, 2006) (Figura 6).

Tras la remodelación inicial del oligosacárido por acción de glucosidasas (glucosidasa I y glucosidasa II) y la retención temporal por las chaperonas-lectinas calnexina y su homóloga soluble calreticulina, que facilitan su plegamiento (Helenius, 1994), todas las proteínas correctamente plegadas y con la misma composición oligosacáridica ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) abandonan el RE mediante transporte vesicular hasta su destino final o bien pasan al AG para culminar su maduración (Figura 7).

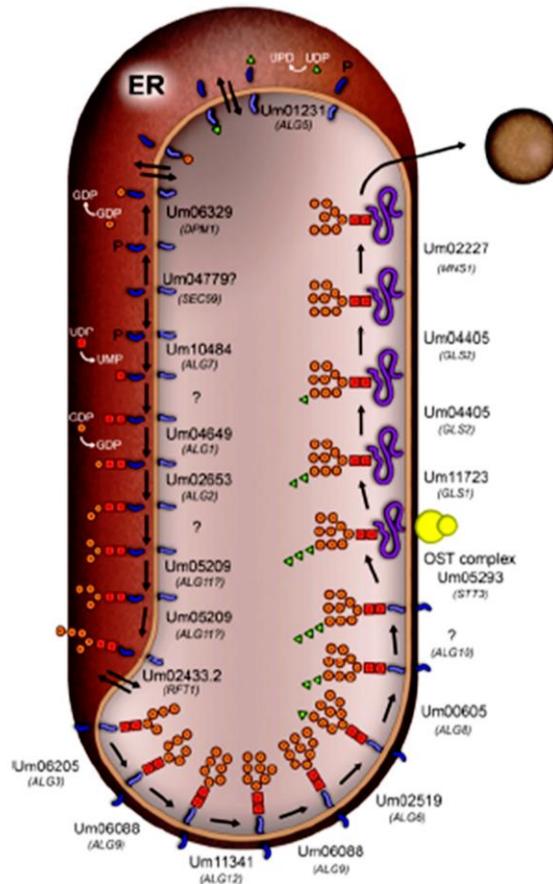


Figura 6. N-glicosilación de proteínas en RE. Esquema tomado de Fernández-Álvarez *et al.*, (2010).

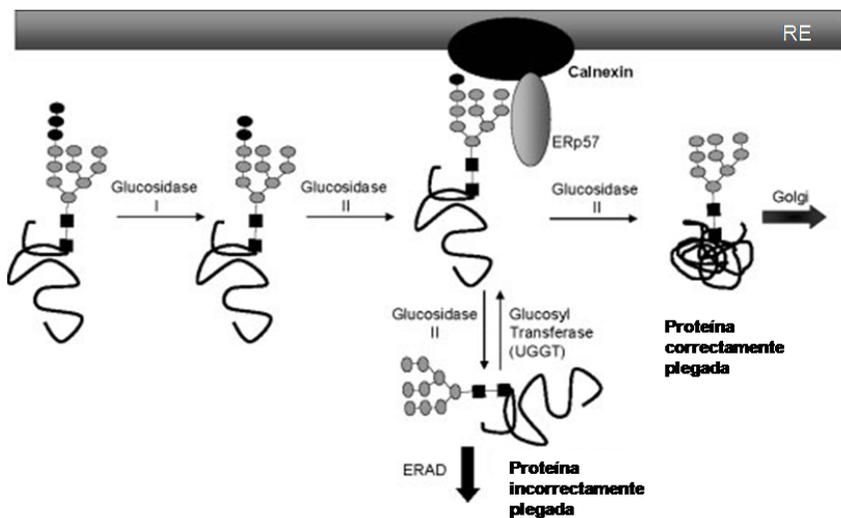


Figura 7. Ciclo de la calnexina-calreticulina que actúan como control de calidad de las glicoproteínas en el RE. Imagen obtenida de Weerapana *et al.*, (2006).

En la última etapa de la glicosilación actúan las glicosiltransferasas y glucosidasas localizadas en el lumen del AG. Este proceso comienza con la eliminación de tres residuos manosa en el lado *cis* y posteriores modificaciones que varían según la proteína y el organismo, dando lugar a varios tipos de glicanos que varían en la composición de monosacáridos y en el grado de ramificación (ricos en manosa, complejos o híbridos) (Figura 8 y Figura 9).

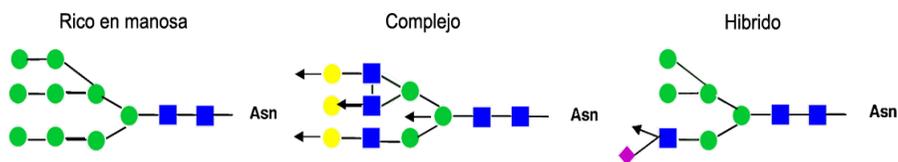


Figura 8. Tipos de estructuras del core de N-glicanos. Se indica en cuadrado azul *N*-acetilglucosamina, en círculo verde manosa, en círculo amarillo galactosa y en cuadrado violeta ácido siálico. Imagen obtenida de Casado *et al.*, (2009).

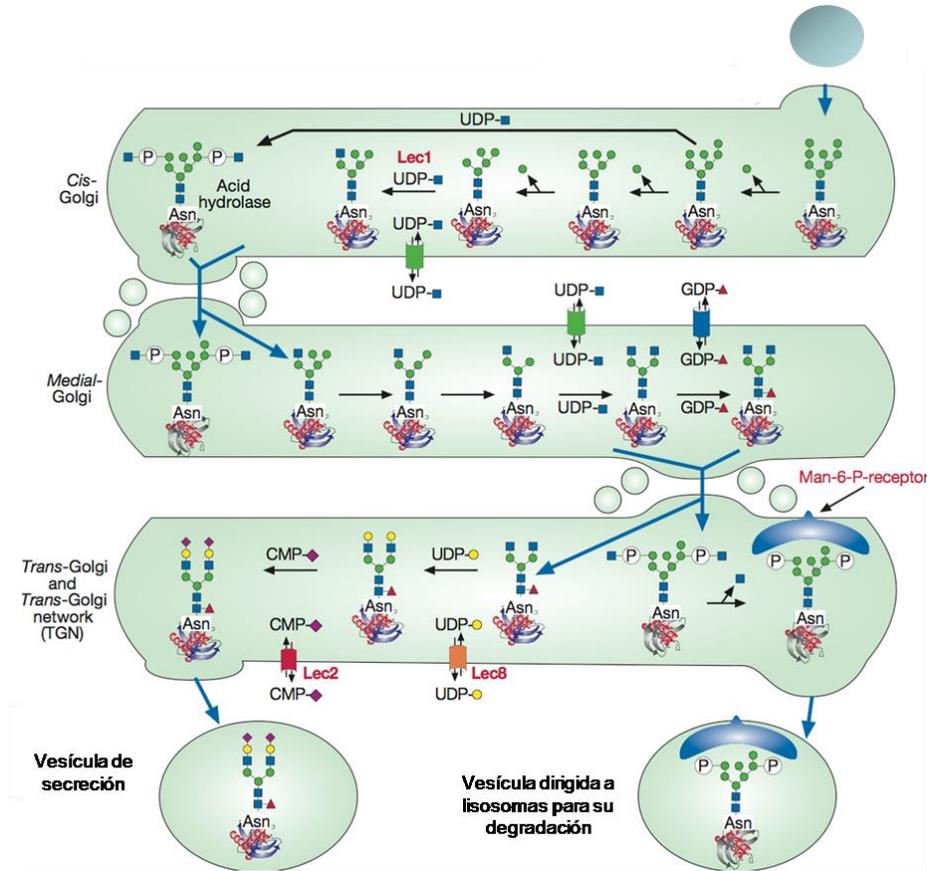


Figura 9. N-glicosilación en el Golgi. Imagen obtenida de Kornfeld & Kornfeld (1985).

Una vez completado el proceso de glicosilación, las proteínas salen por el lado *trans* del AG y son distribuidas hasta su destino mediante transporte vesicular (Lehninger *et al.*, 1993).

En levaduras la N-glicosilación implica la adición de residuos manosa, resultando en glicanos altamente manosilados y ramificados. En mamíferos, las glicosiltransferasas del AG añaden monosacáridos como N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), ácido siálico, fucosa, y N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Wildt & Gerngross, 2005)

3.2.2. O-glicosilación

La O-glicosilación puede comenzar en el RE o en el lado *cis* del AG, dependiendo del organismo. Consiste en la unión covalente de un oligosacárido al grupo hidroxilo (-OH) de una serina (Ser) o treonina (Thr) sin que exista una secuencia consenso en la proteína diana para que tenga lugar. Este proceso puede comenzar con la adición de dos manosas en el RE en levaduras y hongos, o más comúnmente con la adición en Golgi de un residuo de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). Tras sucesivas adiciones de monosacáridos estos residuos serán alargados durante el recorrido por el AG hasta completar su glicosilación, presentando mayor heterogeneidad en estructuras finales que la *N*-glicosilación (Figura 10).

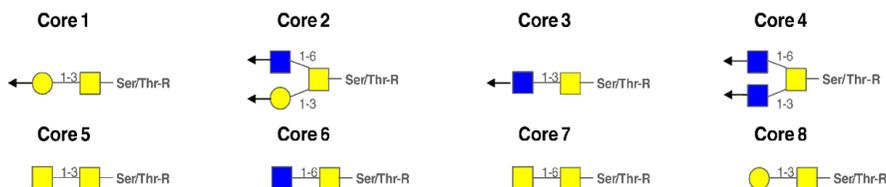


Figura 10. Estructuras del core en O-glicanos. En cuadrado amarillo *N*-acetilgalactosamina, en cuadrado azul *N*-acetilglucosamina y en círculo amarillo galactosa. Imagen obtenida de Casado *et al.*, (2009).

Las proteínas citosólicas y nucleares son portadoras de un tipo excepcional de glicosilación, mediante unión covalente a una Ser/Thr de GlcNAc como primer y único monosacárido (Schindler *et al.*, 1987; Turner *et al.*, 1990).

3.2.3. C-manosilación

La C-manosilación fue descubierta inicialmente en la RNasa 2 humana (Hofsteenge *et al.*, 1994), y es un tipo menos abundante de glicosilación presente en eucariotas (mamíferos, aves, anfibios...), que hasta ahora no se ha identificado en insectos, levaduras ó bacterias (Furmanek & Hofsteenge, 2000).

La C-manosilación de proteínas consiste en la adición de una α -manosa a un residuo Trp mediante un enlace C-C, que implica el reconocimiento de la secuencia consenso WXXW, resultandomanosilado el primer Trp (W)(Doucey *et al.*, 1998).

3.2.4. Anclaje GPI

Numerosas proteínas presentan modificaciones co-traduccionales por unión de un glicolípido de glicofosfatidil inositol (GPI) en su extremo carboxilo, que sirve de anclaje a la membrana celular. La proteína se une a una molécula de fosfoetanolamina seguida de una fracción glucídica variable (manosa y glucosamina) y una molécula de fosfatidil inositol con ácidos grasos anclados a la membrana (Ferguson, 1991). La molécula de GPI comienza su biosíntesis en la cara citosólica del RE y continúa en el lumen, donde se transfiere a la proteína. Además de servir de anclaje a las membranas la molécula de GPI, junto con otras cadenas glicosiladas, marca a las proteínas para su transporte por la vía endocítica (Chatterjee & Mayor, 2001).

3.2.5. Fosfoglicosilación

Este tipo de modificación postraducciona se ha identificado en algunos parásitos (*Leishmania* y *Trypanosoma*) y mohos mucilaginosos (*Dictyostelium*) considerándose un nuevo tipo de glicosilación. Se caracteriza por la unión de un glicano a una Ser/ Thr de la proteína por un enlace fosfodiéster (Haynes, 1998; Ilg *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 1995). Los proteofosfoglicanos (PPG's) se localizan a nivel subcelular, como en proteínas de membrana y proteínas secretadas, y su biosíntesis tiene lugar en el AG (Gaur *et al.*, 2009).

3.3. Maquinaria de glicosilación

En células eucariotas, la glicosilación tiene lugar en el lumen del RE y del AG. Ambos orgánulos están constituidos por complejos sistemas membranosos de sáculos y cisternas comunicados mediante transporte vesicular.

EL RE está formado por un sistema de cisternas, vesículas y túbulos que comunican con la membrana nuclear, en cuyo espacio interno ó lumen residen proteínas solubles e integrales, como las chaperonas encargadas del plegamiento lento y ordenado de proteínas (Ellgaard *et al.*, 1999), y enzimas glicosiltransferasas y glicosidasas que coordinan un sistema de glicosilación y

de control de calidad proteica. Las glicosiltransferasas del RE presentan dominios transmembrana multienzimáticos. Las moléculas que ingresan en el RE se pliegan, y sufren modificaciones como *N*- y *O*-glicosilación, isomerización de prolina, formación de puentes disulfuro, acetilación, etc. Si el plegamiento de las moléculas resulta defectuoso, son conducidas a una reglicosilación o bien retrotranslocadas al citosol en el proteosoma (Parodi, 2000; Trombetta & Parodi, 2003). Las proteínas con plegamiento correcto abandonan el RE en vesículas transportadoras cubiertas por la proteína citosólica COPII en transporte anterógrado. En levaduras, las vesículas cubiertas por COPII se dirigen directamente al AG, mientras que en mamíferos se fusionan con un estructura vesículo-tubular intermedia entre RE y AG (ERGIC) (Aebi *et al.*, 2010).

Algunas proteínas glicosiladas en el RE continúan su maduración en AG, mientras que otras comienzan directamente la glicosilación en el AG, cuya función es la síntesis de glicoproteínas y glicolípidos y su posterior distribución y exportación por la vía secretora hasta su destino final mediante marcaje selectivo (Munro, 1998). El AG participa en la síntesis de glicoproteínas y glicolípidos, además de servir como distribuidor de estas moléculas marcándolas selectivamente y exportándolas hasta su destino final mediante la vía secretora (Munro, 1998). El AG varía su posición según el tipo de célula y la especie, localizándose habitualmente entre el núcleo y la membrana apical en células secretoras, y en posición perinuclear en células no polarizadas. Está formado por cisternas aplanadas y fenestradas, apiladas formando dictiosomas con una organización clasificada en *cis*, medio y *trans*. Esta polaridad estructural resulta en una polaridad funcional, ya que en el lumen de estos compartimentos residen proteínas que procesan secuencialmente el esqueleto oligosacárido de proteínas y lípidos mediante actividades específicas durante su recorrido desde el lado *cis* hasta el *trans*, alargando y ramificando dicha estructura. Como resultado de la diversidad de proteínas que intervienen se obtienen distintos patrones de glicosilación en función del tipo de molécula diana y de su destino.

3.3.1. Tráfico vesicular entre RE y AG

El RE y el AG se encuentran íntimamente ligados y mantienen un transporte vesicular en ambos sentidos (anterógrado y retrógrado). Estas vesículas de transporte contienen proteínas citosólicas de cubierta (COP) formando complejos multiproteicos, que al autoensamblarse, deforman la membrana donadora y generan vesículas. Así las vesículas que viajan desde el RE al AG están cubiertas por proteínas COPII. En levaduras, las vesículas cubiertas por COPII se dirigen directamente al AG y en mamíferos, éstas se

fusionan con un estructura vesículo-tubular intermedia entre el RE y el AG (ERGIC) para luego formar vesículas cubiertas por COPI que llegan al *cis* AG (Aebi *et al.*, 2010; Nickel *et al.*, 1998) (

Figura 11).

Algunos estudios sobre la formación de vesículas de transporte en el AG han permitido identificar a lípidos de membrana (fosfolípidos) y al dominio citoplásmico de lipoproteínas integrales como receptores de las proteínas COPI y COPII (Nickel *et al.*, 1998).

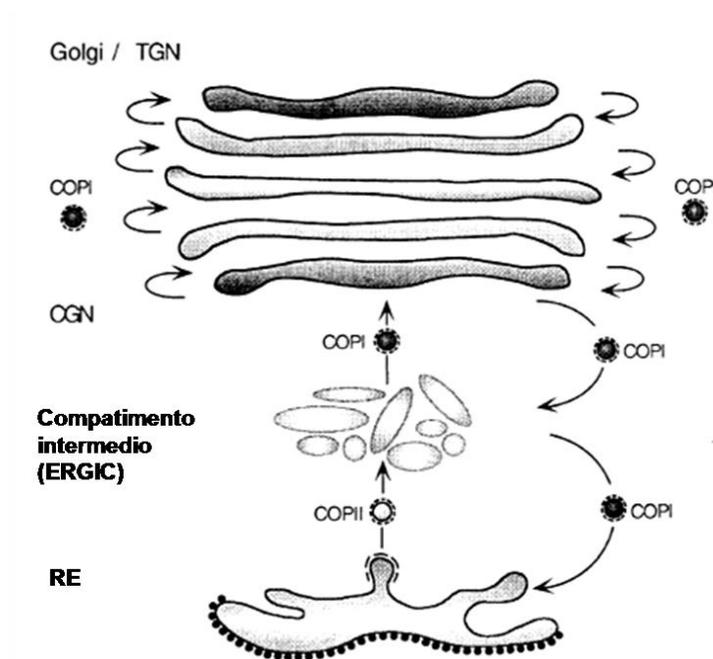


Figura 11. Esquema del transporte vesicular entre RE y AG. Imagen obtenida de Nickel *et al.*, (1998).

Se han propuesto dos modelos alternativos que explican el transporte de moléculas en la ruta de secreción del AG. El de maduración o progresión de cisternas, propuesto por Morré (1987), según el cual un compartimento individual del AG se desarrolla y las moléculas se mantienen en una misma cisterna hasta alcanzar su estado de maduración final. Y el más aceptado que establece un transporte de moléculas de un compartimento a otro mientras que cada cisterna se mantiene estable (Opat *et al.*, 2001). Según

este último modelo se formarían vesículas asociadas a proteínas de cubierta COPI en cada cisterna, actuando como mediadoras en el tráfico anterógrado entre los compartimentos del AG. Esta hipótesis explica satisfactoriamente la existencia de interconexiones entre cisternas observadas mediante microscopía electrónica de fluorescencia (Cole *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 2001), así como la distribución asimétrica de proteínas y la composición variable de lípidos de membrana en los compartimentos del AG (Opat *et al.*, 2001).

Existe un equilibrio dinámico del tráfico vesicular que implica transporte en ambos sentidos, lo que permite mantener la integridad estructural del AG. El transporte retrógrado permite el reciclaje de membranas, de proteínas de transporte y de proteínas integrales y solubles que retornan al RE de donde provienen. Algunas de estas proteínas presentan la secuencia K(H)DEL de retención en retículo (Cole *et al.*, 1998). El transporte vesicular seguido de fusión específica de membranas está regulado por la interacción molecular de complejos proteicos denominados SNARE, presentes en la membrana de las vesículas (v-SNARE) así como en la membrana de destino (t-SNARE). Muchas proteínas asociadas a vesículas, entre las que se encuentran NSF ATPasas citosólicas, actúan unidas a un factor soluble de unión a NSF (SNAP), dado que la formación de estas vesículas requiere energía (Nichols & Pelham, 1998).

3.3.2. Proteínas del aparato de Golgi

Las proteínas integrales de membrana, encargadas de modificar *N*- y *O*-glicanos y glicolípidos, se localizan en el lumen del AG. Son glicosiltransferasas y glicosidasas. Junto a ellas también se localizan otras proteínas esenciales para la glicosilación, como los transportadores de monosacáridos o la GDPasa, encargada de escindir un fosfato del nucleósido difosfato producido por la transferencia de un monosacárido de un nucleótido-azúcar donador, permitiendo el transporte antiporte GDP-azúcar/GMP y evitando su acumulación dentro del lumen (Berninsone *et al.*, 1995; Munro, 1998; Vowels & Payne, 1998).

Se han descrito proteínas periféricas ancladas a la membrana por su extremo citoplásmico, como los receptores de vesículas de transporte y las proteínas estabilizadoras de complejos enzimáticos que se unen a las colas citoplásmicas de glicosiltransferasas y glicosidasas (ejemplo, Vps74p) (Schmitz *et al.*, 2008).

Las glicosiltransferasas (GT's) del AG se encuentran ancladas a la membrana, y presentan una configuración tridimensional en forma de horquilla mediada por puentes disulfuro entre cisteínas de los extremos de las

cadena polipeptídica (Figura 12). Las glicosidasas presentan también características similares a las glicosiltransferasas, pero no siempre tienen dominio de unión a membrana. Sin embargo los transportadores de monosacáridos presentan entre seis y diez dominios trans-membrana y sus extremos amino y carboxilo se encuentran en el lado citosólico del AG (Berninsone & Hirschberg, 2000).

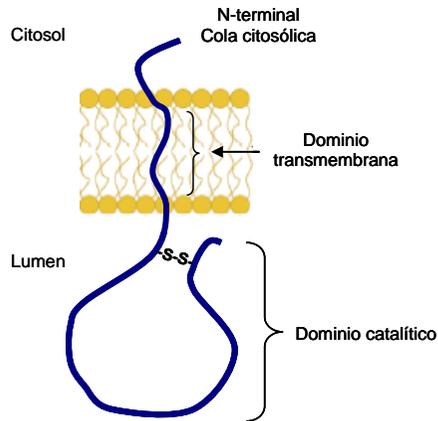


Figura 12. Estructura general de una glicosiltransferasa del AG.

La biosíntesis correcta de oligosacáridos requiere la localización precisa de las glicosiltransferasas, según el orden requerido para la formación de oligosacáridos. La mayoría son específicas del sustrato al que añaden monosacáridos, aunque algunas pueden reconocer varios e incluso actuar en la glicosilación de proteínas y de lípidos. Estas enzimas varían entre especies y tipos celulares (Stolz & Munro, 2002). La escasa homología existente entre las glicosiltransferasas induce a concluir que las señales de retención en AG corresponden más a estructuras secundarias que a primarias. Ciertas características comunes, como único dominio transmembrana de un paso (tipo II), dominio luminal grande, dominio aminoterminal citoplasmático corto, capacidad de formación de dímeros (homo- y hetero-) y complejos multi-enzimáticos, podrían ser responsables de su localización y retención en AG (Colley, 1997; Schafer *et al.*, 1995; Tu & Banfield, 2010). Además, muchas presentan sitios de corte en el dominio luminal que les permiten ser liberadas como proteínas solubles en el lumen del AG.

Otro factor determinante para la correcta localización de las proteínas ancladas en el AG es su membrana, cuya composición lipídica diferencial

entre cisternas y menor grosor respecto a otras membranas celulares podrían ser determinantes en distribución y retención (Tu & Banfield, 2010; van Meer *et al.*, 2008). La composición lipídica del AG es intermedia entre RE y la membrana plasmática, además presenta un gradiente creciente de colesterol y esfingolípidos a lo largo de las cisternas *cis* a *trans*, incrementado asimismo el grosor de las membranas (van Meer, 1998).

La localización de las GTs no es constante ya que están sujetas a procesos dinámicos de retención y liberación, asociadas a vesículas de transporte contribuyendo a una distribución no uniforme y permitiendo de ese modo su reciclaje (Tu & Banfield, 2010).

3.4. Funciones biológicas de la glicosilación

La glicosilación de proteínas es una modificación co-traducciona que favorece su estabilidad y asegura que puedan alcanzar una estructura nativa funcional que les permita realizar su función biológica. La *N*-glicosilación juega un papel esencial en el correcto plegamiento y el control de calidad proteico, permitiendo detectar defectos y marcándolas para ser degradadas o alternativamente transportadas hasta su destino final a través del transporte vesicular. Algunas proteínas dependen del *N*-glicano para su conformación correcta sólo durante su síntesis, y otras lo requieren durante toda su existencia (Helenius, 1994).

Generalmente las *N*- y *O*- glicoproteínas se encuentran en rutas de secreción y endocíticas, aunque estudios recientes han demostrado también la presencia de glicoproteínas citosólicas y nucleares (Comer & Hart, 2000).

Aunque se desconoce con precisión el papel biológico de los carbohidratos que componen estas fracciones glucídicas, se sabe que la glicosilación es relevante para el reconocimiento célula-célula, para los procesos de adhesión y para la distribución intracelular de las proteínas en su transporte hasta su destino final (Drickamer & Taylor, 1998).

3.4.1. Proteínas de membrana

Algunas glicoproteínas se encuentran ancladas a la membrana plasmática, un ejemplo son las integrinas que actúan como receptores de hormonas y otras moléculas, y participan en la adhesión, reconocimiento de señales y regulación del crecimiento. Las proteínas ancladas a la membrana mediante el glicolípido glicosilfosfatidil inositol (GPI) son proteínas glicosiladas con características estructurales y funcionales diversas. Se desconoce la función que aporta la molécula de fosfatidil inositol, aunque se

cree que puede facilitar movilidad a las proteínas con respecto a las ancladas mediante un dominio trans-membrana.

3.4.2. Proteínas de la vía secretora

Las glicoproteínas fúngicas forman parte de la pared celular o bien son secretadas al espacio extracelular como enzimas líticas: hidrolasas y proteasas. Además de su función en la degradación y nutrición, las enzimas líticas desempeñan un papel importante en el proceso de infección, facilitando la hidrólisis de tejidos del hospedador y favoreciendo su penetración. Por otra parte, las glicoproteínas de la pared y matriz celular son reconocidas durante las primeras etapas de la invasión activando procesos de adhesión y reconocimiento y modulando la respuesta inmune del huésped (Timpel *et al.*, 2000). Éstas también intervienen en la adhesión, en el reconocimiento celular (reproducción, células inmunológicas) y en la protección, como las mucinas.

3.4.3. Lectinas

Las lectinas son en su mayoría proteínas glicosiladas que se unen de forma específica a determinados carbohidratos (manosa, galactosa, *N*-acetilgalactosamina, *N*-acetilglucosamina, fucosa, ácido siálico). Presentan secuencias de aminoácidos que reconocen y se unen a glúcidos terminales que forman parte de cadenas de oligosacáridos libres o de otras moléculas. Son esenciales para el reconocimiento de estructuras glicosiladas a nivel de célula, tejido y organismo (Khan & Khan, 2011). Intervienen en señalización celular, interacción y reconocimiento entre huésped-patógeno, adhesión y protección frente a patógenos y depredadores, por lo que generalmente son extracelulares, aunque algunas actúan a nivel subcelular como ciertas chaperonas del RE. Presentan alta especificidad por el carbohidrato y son multivalentes, dando lugar a procesos de aglutinación (Sharon & Lis, 2004).

Se descubrieron inicialmente en plantas por su capacidad de unión a glicoconjugados de superficies celulares, pero se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos, desde bacterias hasta animales. En vertebrados existen lectinas que intervienen en procesos inmunes, en modulación del crecimiento celular, en endocitosis, en inducción de la apoptosis y en adhesión de células tumorales (Konska, 2006).

Las primeras lectinas fúngicas identificadas fueron glicoproteínas tóxicas que actúan como agentes hemolíticos o hemo-aglutinantes (Sharon & Lis, 2004). Otros estudios relacionan la producción de lectinas fúngicas como agentes activos durante los procesos de infección y el establecimiento de

simbiosis en micorrizas (Giollant *et al.*, 1993; Konska, 2006). Se ha descrito que pueden favorecer la adhesión entre hifas durante el desarrollo (Kaneko *et al.*, 1993).

3.4.4. Glicoproteínas intracelulares

Las glicoproteínas también se localizan en el citoplasma y en compartimentos subcelulares como el AG, el RE, las mitocondrias y el núcleo (Ades, 1990; Eufemi *et al.*, 1991). Debido a sus características de unión a distintas lectinas, como la concanavalina A (Con A), la aglutinina de germen de trigo (WGA), la aglutinina de soja (SBA), la aglutinina de ricino común (RCA) o la aglutinina de *Limax fablus* (LFA), se han identificado y localizado en determinadas fracciones subcelulares. Las glicoproteínas nucleares presentan un tipo de glicosilación único con unión a GlcNAc (Jackson & Tjian, 1988) que han sido identificadas mediante unión a WGA, como factores transcripcionales, proteínas de poro y RNA polimerasas, sugiriendo su implicación en regulación y activación génica (Finlay & Forbes, 1990; Kelly *et al.*, 1993). Algunas glicoproteínas citoplásmicas intervienen en la regulación de la síntesis proteica como la proteína p67 de unión al factor de elongación IF2 (Hart, 1997). En vertebrados existen glicoproteínas intracelulares con otras funciones, como las que actúan como factores anticongelantes (Ewart *et al.*, 1999) o en el transporte de iones (como la transferrina y la ceruloplasmina plasmáticas) (Gomme *et al.*, 2005).

3.4.5. Lipopolisacáridos y glicolípidos

Los lipopolisacáridos (LPS) son abundantes en la pared de bacterias Gram-negativas, actuando como endotoxinas fácilmente reconocidas por eucariotas superiores (plantas y animales) y que desencadenan respuestas inmunes o de defensa en los hospedadores (Erridge *et al.*, 2002). Los LCO son factores NOD característicos de bacterias fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium* (Roche *et al.*, 1991) y en algunos hongos micorrizas (Maillet *et al.*, 2011). Los glicolípidos son componentes de la membrana plasmática de procariontes y eucariotas que proporcionan estabilidad frente al estrés ambiental, aunque también pueden localizarse en endo-membranas. Los glicoesfingolípidos son glicolípidos de membranas presentes en células nerviosas y en algunas células sanguíneas humanas. Estas moléculas pueden actuar como receptores que intervienen en adhesión, en el crecimiento celular y, en general, en comunicación celular (Malhotra, 2012).

3.5. Respuesta celular a defectos en glicosilación

Los defectos en glicosilación que afectan al plegamiento ocasionan la acumulación de proteínas mal plegadas en RE. La acción de chaperonas que detectan las proteínas mal plegadas o agregadas, junto con la activación de la UPR (Unfolded Protein Reaction) que potencia la expresión de chaperonas, contribuyen a restaurar la homeostasis REDOX en la célula (Malhotra & Kaufman, 2007). La UPR modula la capacidad biosintética de la célula mediante sensores de estrés (PERK, ATF6 e IRE1) con funciones diversas (quinasa, fosfatasa, RNAsa...) que pueden reducir la síntesis proteica y activar factores de transcripción que inducen la transcripción de chaperonas, de genes que intervienen en ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation), y de genes relacionados con la biosíntesis de fosfolípidos (Liu & Kaufman, 2003).

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis ha sido investigar la *N*-glicosilación terminal de proteínas en la especie patógena de tomate *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, centrándose en el estudio de una *N*-acetilglucosamina transferasa (Gnt2) localizada en el aparato de Golgi.

Para analizar el papel de Gnt2 se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el resultado de la inactivación dirigida de *gnt2* sobre la virulencia de *Fusarium*, en ambos sistemas modelo, animal y vegetal.
2. Caracterización fisiológica y química de la pared celular del mutante deficiente en ambos genes *gnt2*.
3. Localización subcelular de la proteína Gnt2 mediante fusión traduccional de la fase codificante del gen con la correspondiente de la proteína verde fluorescente (GFP), y análisis bioquímicos y microscópicos de las estirpes silvestre y mutantes obtenidas.
4. Analizar la función de la *N*-acetilglucosamina transferasa determinada por *gnt2* sobre el patrón de proteínas totales de la estirpe silvestre 4287 del hongo. Análisis de proteínas intra- y extra-celulares y cuantificación de los *N*-glicanos unidos a las glicoproteínas de pared.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. Materiales

4.1. Material biológico

Las estirpes bacterianas y fúngicas, y los cultivares de plantas utilizados en este trabajo se describen en la tabla:

Tabla 1. Material biológico empleado (¹Dpto. Producción Vegetal, Universidad de Almería; ²Dpto. Genética, Universidad de Córdoba; ³ Syngenta Seeds, Almería).

Especie	Estirpe/Variación	Características
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> . Receptora en los experimentos de transformación genética
<i>Fusarium oxysporum</i>	4287 Δ <i>gnt2</i> Δ <i>chsV</i> Δ <i>gnt2::gnt2</i> wt::GFP:: <i>gnt2</i> Δ <i>gnt2::GFP::gnt2</i>	Estirpe silvestre (f.sp. <i>lycopersici</i> raza 2) (Dr. J. Tello ¹) Gen <i>gnt2</i> delecionado (esta Tesis) Gen <i>chsV</i> anulado (Madridet <i>al.</i> , 2003) Mutante Δ <i>gnt2</i> complementado con dos copias de <i>gnt2</i> Transformante con fusión traduccional de <i>gnt2::GFP</i> Mutante Δ <i>gnt2</i> complementado con fusión traduccional de <i>gnt2::GFP</i>
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Daniella Liso Monika ³ Moneymaker	Cultivar de tomate sensible a raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> Cultivar de tomate sensible a raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> Cultivar sensible a raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> Cultivar sensible a raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>

4.2. Medios de cultivo

Los medios se esterilizaron en el autoclave a 120 °C durante 20 min o mediante filtración (Millipore con diámetro de poro de 0,22µm).

4.2.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

A. Medio Luria-Bertani

Líquido (LB): bacto triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (5 g/L).

Sólido (LA): medio líquido LB suplementado con 15 g/L de bactoagar.

B. Medio LA-XGal-Ampicilina-IPTG

Medio LA suplementado con 134 µM de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG), 0,005 % (p/v) X-Gal (disuelto en formamida) y 0,005 % ampicilina (p/v).

4.2.2. Medios de cultivo para *Fusarium oxysporum*

El pH del medio se ajustó a 8,0 con NaOH cuando contenía fleomicina y a pH 6,5 cuando contenía Calcoflúor White (CFW).

A. Medio nutritivo

Líquido (PDB): hervir 200g de patatas peladas y troceadas en 1 L de agua durante 60 min. Filtrar, añadir 20g de glucosa, enrasar hasta 1 L y esterilizar en el autoclave.

Sólido (PDA): 3,9 % agar de patata y dextrosa (p/v) (Scharlau Microbiology).

Cuando fue necesario, se añadió higromicina B (20 µg/mL en PDB ó 55 µg/mL en PDA) ó fleomicina (2 µg/mL en PDB ó 5,5 µg/mL en PDA).

B. Medio sintético de ARNE (SM)

Líquido: MgSO₄ 7 H₂O (0,2 g/L), KH₂PO₄ (0,4 g/L), KCl (0,2 g/L), NH₄NO₂ (1 g/l), FeSO₄ (0,01 g/L), ZnSO₄ (0,01 g/L), MnSO₄ (0,01 g/L) y glucosa (10 g/L).

Sólido: medio líquido suplementado con 15 g/L de bacto-agar.

C. Medio mínimo de regeneración

Líquido: $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), KCl (0,5 g/L), NaNO_3 (2 g/L), glucosa (20 g/L) y sacarosa (200 g/L).

Sólido: medio líquido suplementado con 12,5 g/L agar (Oxoid) para medio sólido ó 4 g/L para agar de cobertera.

D. Medio de casaminoácidos (CA)

Medio líquido: casaminoácidos (10 g/L); 10 mM sulfato amónico; base nitrogenada de levadura (0,5 g/L) (Difco).

Medio sólido: medio líquido suplementado con 20 g/L de agar. El pH del medio se ajustó a 7,0 con NaOH.

E. Medio con tejido vascular de tomate (TVT)

Se utilizó tejido vascular a partir de tallos de plantas de tomate desprovistos de ramas y hojas (25 g/L) y se añadió como única fuente de carbono al medio mínimo (SM).

F. Medio con ácido glutámico

Ácido L-glutámico monohidrato (10 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L), KH_2PO_4 (0,4 g/L), KCl (0,2 g/L), FeSO_4 (0,01 g/L), ZnSO_4 (0,01 g/L), MnSO_4 (0,01 g/L) y sacarosa (2 g/L).

4.2.3. Compuestos químicos

Para estudiar el efecto de algunos compuestos que intervienen con la pared o con la membrana celular se utilizaron los siguientes: Congo Red (Sigma), Sodium dodecil sulfato (SDS) (Fluka) y Calcofluor White (CFW) (Sigma) sobre el crecimiento del hongo, o realizar tinciones, se prepararon soluciones a las concentraciones indicadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Compuestos químicos utilizados

Compuesto	Almacenamiento
Congo Red	25 mg/mL en agua; -20 °C (oscuridad)
SDS	0,1 g/mL en agua; a temperatura ambiente (RT)
CFW	20 mg/mL en 80 % glicerol; 0,5 % KOH, pH 6,5; -20 °C (oscuridad)

4.3. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación y secuenciación se diseñaron con el programa Oligo, optimizando su estabilidad interna y excluyendo la formación de horquillas y dímeros no deseados, así como diversos parámetros físicos y químicos (T_m , T_d , % G+C, % A+T). Los oligonucleótidos se sintetizaron en empresas comerciales (MWG-Biotech ó Bonsai Technologies).

Tabla 3. Oligonucleótidos universales.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Posición
Forward	CGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Flanqueante al sitio de clonación
Reverse	GCGGATAACAATTTACACAGG	Flanqueante al sitio de clonación
gpdA-15B	AATAGTGGTGAAATTGATCGTGT	Promotor <i>gpdA</i>
trpTer-8B	TCGACCATCCGGTGCTCTG	Terminador <i>TrpC</i>

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. En letras mayúsculas se indican las secuencias específicas del ADN molde, en minúsculas cursivas se muestran las secuencias añadidas y en negrita los sitios de restricción.

Gen	Nombre	Secuencia (5' → 3')
actina (<i>act</i>)	Act-2	GAGGGACCGCTCTCGTCGT
actina (<i>act</i>)	Act-6q	GGAGATCCAGACTGCCGCTCAG
<i>gnt2</i>	FOXG_12436F	GTTTCGACATAAGGATAATACGGA
<i>gnt2</i>	FOXG_12436R	TATTTCCGAGCCCAGATACTTG
<i>gnt2</i>	<i>gnt2-3</i>	AGTGAAGTTGTTGATTTTTGGTGG
<i>gnt2</i>	<i>gnt2-7</i>	GTGATCCTCTCGACGCAGAC
<i>gnt2</i>	<i>gnt2-8</i>	CTATTCAGCTACCTGCGCCAT
<i>gnt2</i>	<i>gnt2-18B</i>	<i>cgcggatcc</i> ATGATAGGTGTCGCCGATTA
<i>gnt2</i>	<i>gnt2-19S</i>	<i>acgcgtcgac</i> CTAGTTCAGCTGCAGATTTC
<i>gnt2</i>	<i>gnt2-31N</i>	<i>catgcat</i> ATGATAGGTGTCGCCGATTACTC
<i>gnt2</i>	<i>gnt2-33X</i>	<i>ccccggg</i> GCTGCAGATTTCTTGCGTTTTAT
<i>gnt2</i>	<i>gnt2ScelF</i>	<i>tagggataacagggtaat</i> CCTCGTGAGTTTATCCAGCAG
<i>gnt2</i>	<i>gnt2ScelR</i>	<i>attaccctgttatcccta</i> CCCAGAAATCCAACAAGATAGG
<i>gnt2</i>	<i>gnt2attB1</i>	<i>ggggacaagttgtacaaaaagcaggctaa</i> CAGGTACTIONGCTATTGGTCAC
<i>gnt2</i>	<i>gnt2attB2</i>	<i>ggggaccactttgtacaagaagctggta</i> GACTTCCAATGAAACGCAAGG
<i>chsV</i>	<i>ChsV-20</i>	GCACAATTTGGCTGAGCTTAT
<i>chsV</i>	<i>ChsV-26</i>	GGAGGTACTIONGCTATGTCGT

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos de genes de tomate.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>tomQB</i>	tomQB-1	CCTCATCAACCAATCCTCCAA
<i>tomQB</i>	tomQB-2	TCATTCACAACAACCTCCAGGG

4.4. Vectores de clonación

Los vectores de clonación utilizados se detallan a continuación:

Tabla 6. Vectores utilizados.

Plásmido	Características	Referencia
pGem®-T	Derivado de pGemT [®] -5Zf(+), con las secuencias promotoras T7 y SP6 flanqueando el sitio de clonación múltiple, linearizado con la enzima <i>EcoR</i> V y con una T en cada extremo 3'. Permite la clonación de fragmentos de PCR con adenina en sus extremos.	Biotech S.L.
pSpark	Promotores T7 y SP6 flanqueando al sitio de clonación múltiple, linearizado con la enzima <i>EcoR</i> V, gen de resistencia a ampicilina. Permite la clonación de fragmentos de ADN con extremos <i>romos</i> .	Biotech S.L.
pAN8-1	Promotor del gen <i>gpdA</i> de <i>A. nidulans</i> ; gen de resistencia a fleomicina y terminador del gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> clonados en pUC18 <i>EcoR</i> I- <i>Sal</i> I.	Mattern <i>et al.</i> , 1988
p1902	Contiene el promotor <i>gpdA</i> de <i>A. nidulans</i> fusionado a GFP, y los sitios <i>Xma</i> I y <i>Nsi</i> I para la clonación en fase de los genes de interés portadores de las correspondientes secuencias compatibles.	M. Peñalva, CIB-CSIC

4.5. Programas de análisis de datos

Para el procesado y manejo de los datos obtenidos durante este trabajo, se utilizaron los siguientes programas informáticos:

Tabla 7. Programas para el análisis de datos.

Programa		Aplicación
BLAST (NCBI)	tblastn (estándar)	Búsqueda de secuencias nucleotídicas similares a la problema
	blastp (estándar de proteína)	Búsqueda de proteínas similares a la proteína en estudio
	tblastx (traducido)	Búsqueda de secuencias de proteínas similares a la traducción de la secuencia nucleotídica en estudio
	tblastx (traducido)	Búsqueda de proteínas, deducidas de traducciones de secuencias nucleotídicas, similares a la traducción de la secuencia nucleotídica problema
Lasergene (DNA-Star)	EditSeq	Edición de secuencias
	MapDraw	Análisis de la ORF y de sitios de restricción
	MegAlign	Alineamiento de secuencias para determinar su identidad
	SeqMan	Gestión de contigs y ensamblaje de secuencias de ADN
Oligo (Mol. Biology Insights Inc., EE.UU.)		Selección de oligonucleótidos en una secuencia problema con las características óptimas
CBS prediction server (http://www.cbs.dtu.dk/services/ g)		Predicción de dominios y sitios de modificación post-traduccional de proteínas
BioEdit v7.0.0		Edición y alineamiento de secuencias
Modelgenerator v84 (Keane <i>et al.</i> , 2006)		Optimización de parámetros para la construcción de árboles filogenéticos
PhyML v2.4.4 (Guindon y Gascuel, 2003)		Alineamiento entre secuencias y elaboración de árboles filogenéticos
MEGA4		Construcción y edición de árboles filogenéticos
KODAK 1D Image Análisis		Captura y análisis de imágenes obtenidas de geles
Leica IM 500 y Leica QWin		Edición y análisis de imágenes obtenidas con el microscopio óptico.
FUJIFILM Intelligent Dark Box LAS-3000		Captura y análisis de imágenes obtenidas tras revelado mediante detección quimioluminiscente.
AxioVision Rel. V4.8		Captura, ajuste y análisis de imágenes obtenidas en microscopía
Image J		Diseño y edición de imágenes
GraphPad Software, Inc 1992-2007(v5.00)		Elaboración de gráficas de supervivencia
PD-Quest TM v7.3 (BioRad)		Análisis de imágenes de geles 2D-SDS PAGE para identificar y cuantificar "spots"
SPSS 15.0 para Windows		Análisis estadístico

5. Métodos

5.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos

5.1.1. Bacterias

Escherichia coli se cultivó a 37 °C, con agitación (250 rpm) si se trataba de medio líquido LB, y en estufas si era medio sólido.

La conservación de estirpes bacterianas durante largos períodos de tiempo se llevó a cabo a -80 °C en medio LB con 30 % glicerol (v/v). Para períodos cortos, las estirpes portadoras de algún gen de resistencia se mantuvieron en medio LA a 4 °C con el antibiótico de selección.

5.1.2. *Fusarium oxysporum*

Los cultivos de hongos se incubaron a 28 °C, y en caso de medio líquido la incubación se realizó con agitación orbital (170 rpm).

Para la conservación de las estirpes se recogieron esporas de un cultivo de 3-4 días en medio PDB. Para ello el cultivo se filtró a través de nailon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm) para separar germínulas y micelio. El filtrado se centrifugó a 12.000g durante 10 min, se lavó con agua destilada estéril y se almacenó a -80 °C con 30 % glicerol (v/v). Esta suspensión se utilizó como inóculo para la obtención de esporas frescas en ensayos posteriores.

5.1.3. Plantas

Las semillas del cultivar indicado se esterilizaron sumergiéndolas en 20 % lejía (v/v) durante 30 min seguido de 3 lavados durante 10 min cada vez con abundante agua, previamente a la siembra en vermiculita humedecida. Se incubaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, fotoperíodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad) a una temperatura de 28 °C. Los ensayos de infección se realizaron con plántulas de dos semanas, cuando ya habían aparecido las primeras hojas verdaderas.

5.2. Aislamiento de ácidos nucleicos

5.2.1. Purificación de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala con CTAB (miniprep)

El protocolo utilizado es el descrito por Murray y Thompson (1980), con algunas modificaciones. Se inoculó una colonia aislada de la estirpe portadora del plásmido de interés en 5 mL de medio selectivo. Después de 12-14 h de incubación, se centrifugaron 3 mL del cultivo durante 3 min a 13.000 rpm. Una vez eliminado el sobrenadante, la muestra de células se resuspendió en 200 μ L de solución STET⁽¹⁾. A continuación, se añadieron 4 μ L de lisozima (50 mg/mL) para provocar la lisis celular y 2 μ L de ribonucleasa A (RNasa) (10 mg/mL) para eliminar el ARN, y se incubó a RT durante 10 min. Seguidamente, la muestra se calentó a 100 °C durante 45 s y se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm. Los restos celulares, que quedaron en el fondo del tubo con aspecto mucoso, se retiraron con un palillo de dientes estéril. Se añadieron 10 μ L de CTAB⁽²⁾ al sobrenadante para precipitar el ADN y se incubó a RT durante 5 min. Después de centrifugar durante 10 min a 13.000 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 μ L de una solución 1,2M NaCl y 750 μ L de 100 % etanol frío. Se homogenizó y se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm. El precipitado se lavó con 70 % etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 20 μ L de agua desionizada estéril.

Cada muestra de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel de agarosa.

1. **STET:** 8 % sacarosa p/v; 0,1 % Tritón X-100 v/v; 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 8,0.

2. **CTAB:** 5 % bromuro de hexadeciltrimetilamonio p/v. Mantener a 37 °C para evitar que precipite.

5.2.2. Extracción de ADN de *F. oxysporum*

La purificación de ADN se realizó a partir de micelio procedente de un cultivo del hongo de 3-4 días, recogido por filtración a través de nailon Monodur (diámetro de poro 10-15 μ m). El micelio se secó con papel de filtro, y se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

Se siguió el protocolo de extracción rápida con CTAB descrito por Torres y colaboradores (1993) con modificaciones. Con ayuda de un mortero se pulverizaron en nitrógeno líquido 100 mg de micelio y se transfirieron a un vial de 2 mL con 1 mL de tampón de extracción CTAB⁽¹⁾. Se homogenizó vigorosamente, se añadieron 4 μ L de β -mercaptoetanol (Merck) y 500 μ L de una

solución cloroformo:octanol (24:1, v/v), y se incubó a 65 °C durante 30 min. Posteriormente, se incubó a RT durante 15 min y se centrifugó 5 min a 10.000g. Al sobrenadante se le añadió 1 mL de 100% etanol frío y se mantuvo a -20 °C durante 10 min. Después se centrifugó 5 min a 7.500g y se lavó dos veces consecutivas con 1 mL de 75% etanol (v/v). Finalmente, se resuspendió en 50-100 µL de agua desionizada estéril, se añadieron 4 µL de RNasa (10 mg/mL) y se continuó el tratamiento a 37 °C durante 30 min.

Cada muestra de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel de agarosa.

1. Tampón de extracción CTAB: 12,1 g/L Trizma base; 7,44 g/L EDTA; 81,8 g/l NaCl y 20 g/L bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Para disolver se calentó a 60 °C y ajustó a pH 8,0 con NaOH. Se llevó a 100 mL y se almacenó a 37 °C para evitar que precipitara.

5.2.3. Extracción de ADN de plantas infectadas

La purificación de ADN a partir de plantas infectadas se llevó a cabo mediante pulverización de aproximadamente 100 mg de tallos o raíces en nitrógeno líquido, siguiendo el protocolo especificado en el apartado 5.2.2.

5.2.4. Extracción de ARN total

La extracción de ARN se realizó a partir del micelio producido en las condiciones adecuadas según el experimento. Para ello se inocularon $1,25 \times 10^8$ esporas frescas en 25 mL de medio PDB y se incubaron durante 12 h con 170 rpm de agitación a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se recogieron las germínulas por filtración a través de de nailon Monodur (diámetro de poro de 10-15µm), se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en 1 mL de agua estéril. A continuación, se alicuotaron 250 µL en matraces con 25 mL del medio de interés para el estudio de la expresión génica. Transcurrido el tiempo adecuado, se recogió el micelio utilizando un filtro de nailon, se secó con papel de filtro y se almacenó rápidamente a -80 °C hasta su utilización.

Para la extracción de ARN, se pulverizaron 100 mg de micelio en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero, y se transfirieron a un vial de 2 mL que contenía 1 mL de *Tripure Isolation Reagent* (Roche). Se homogenizó vigorosamente y se centrifugó a 4 °C, durante 10 min y 12.000g. El sobrenadante se transfirió a un vial nuevo y se incubó a 0 °C durante 5 min, para permitir la completa disociación de los complejos nucleoprotéicos. Se añadieron 200 µL de cloroformo y se homogenizó vigorosamente durante 15s. Posteriormente, se incubó a 0 °C durante 15 min. Después de centrifugar a 4 °C durante 15 min a 12.000g, la solución se separó en tres fases. La fase superior,

acuosa e incolora, se transfirió a un vial limpio, al que se le añadieron 500 μ L de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a 0 °C durante 10 min. A continuación, se centrifugó a 4 °C durante 10 min y 12.000g para recoger el ARN precipitado. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 mL de 75 % etanol (v/v). Finalmente, se centrifugó a 7.500g, a 4 °C durante 5 min, se secó, se resuspendió en 50 μ L de agua libre de RNAsas y se incubó a 55-60 °C durante 10-15 min.

Cada muestra de ARN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel al 1 % agarosa (p/v).

5.3. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos

5.3.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por Roche. Los tratamientos del ADN con una o dos enzimas de restricción se realizaron en el tampón y a la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Se emplearon 100 ng/ μ L de ADN plasmídico y 1-2 unidades de enzima por microgramo de ADN, sin que el volumen añadido superara nunca el 10 % del total. En el caso de los tratamientos de ADN genómico (ADNg) para análisis *Southern*, se trataron 5 μ g de ADN con cada enzima. Las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima durante 2- 3 h.

En los tratamientos con dos enzimas que no actúan en el mismo tampón, se añadió primero la enzima cuyo tampón contenía menor concentración salina, y se dejó actuar al menos 1 h. A continuación, se añadieron las sales necesarias para el funcionamiento óptimo de la segunda, así como la propia endonucleasa, y se prolongó la incubación durante otros 60 min a su temperatura óptima de reacción.

Las enzimas de restricción se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por choque térmico.

5.3.2. Defosforilación

La eliminación de grupos fosfato de los extremos 5' linearizados antes de su unión con el inserto correspondiente disminuye drásticamente la frecuencia de reacciones intramoleculares y por tanto, se optimiza el número de plásmidos recombinantes que se obtienen después de la ligación. Para la reacción de defosforilación, se empleó la fosfatasa alcalina de gamba (SAP) (Applied Bioscience). Se añadió 1 unidad de SAP por cada 50 ng de plásmido linearizado

y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se inactivó la enzima a 65 °C durante 15 min.

5.3.3. Unión de fragmentos de ADN

Para la unión de fragmentos de ADN a vectores linearizados se utilizó la ADN ligasa del fago T4 (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante (normalmente una relación molecular 3:1 de inserto y vector).

Para fragmentos de ADN amplificados por PCR, se empleó el kit comercial *pGEM[®]-T Vector System* (Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de su unión los productos de PCR se purificaron precipitando con etanol (5.7.3).

5.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

5.4.1. Geles de agarosa

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (*Agarose SPI[®]*, Duchefa) disuelta en tampón TAE⁽¹⁾. La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos que se querían separar, oscilando entre 0,7 y 2 % (p/v). Para visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Cada muestra se mezcló con tampón de carga para geles de agarosa⁽²⁾ en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 V/cm.

Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN, se incluyeron los marcadores de tamaño “Enzimax” y “100bp ladder” (Canvax Biotech S.L.), que contienen fragmentos desde 75 pb a 20 kb y desde 80 pb a 1.031 pb, respectivamente.

1. **Tampón TAE:** 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA pH 8,0.
2. **Tampón de carga para geles de agarosa:** 0,25 % azul de bromofenol p/v; 0,25 % azul de xilencianol p/v y 40 % sacarosa p/v en 5x TAE.

5.4.2. Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN se realizó empleando la resina “glass milk” como se detalla a continuación.

Se recortó con ayuda de un bisturí la sección del gel con el fragmento de ADN de interés y se transfirió a un tubo eppendorf. Se le añadieron 2-3 vol de solución con NaI⁽¹⁾ y se disolvió a 55 °C con agitación para facilitar el proceso. Se añadieron 10 µL de resina glass milk⁽²⁾ por cada mL de solución, se mezcló y se incubó 10 min a 4 °C. Se centrifugó a 12.100g durante 1 min eliminando el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces con New Wash Buffer⁽³⁾ y se resuspendió en agua destilada, se incubó 5 min a 55 °C y, tras centrifugación, se recuperó el ADN purificado del sobrenadante.

1. **Solución NaI:** NaI 6M; 120 mM Na₂SO₃.
2. **Glass milk:** 100 mg/mL de dióxido de silicio (Sigma) en tampón TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA a pH 7,8).
3. **New Wash Buffer:** 20 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA y 100 mM NaCl disuelto en 50% etanol (v/v).

5.5. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de muestras de ADN y de ARN se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000, a 260 nm. En algunas ocasiones se comparó la intensidad de las bandas con cantidades conocidas del marcador de tamaño molecular.

5.6. Hibridación y detección de ácidos nucleicos

5.6.1. Transferencia y fijación del ADN a membranas de nailon para análisis *Southern*

Tras el tratamiento con endonucleasas de restricción y transcurrida la electroforesis, el gel se fotografió y se trató para la desnaturalización del ADN y su posterior hibridación. Los tratamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (RT), con agitación suave y por duplicado. Primero se sometió el ADN a despurinización ácida (hidrólisis parcial) sumergiendo el gel en 0,25N HCl durante 15 min. A continuación se desnaturalizó con 0,5N NaOH:1,5 M NaCl, durante 15 min. Finalmente se neutralizó sumergiendo el gel en 0,5M Tris pH 7,5:1,5 M NaCl. A continuación el ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche).

La transferencia se llevó a cabo en una bandeja con una solución 10X SSC⁽¹⁾ sobre la que se colocaron, por orden:

- una bandeja de electroforesis invertida

- cuatro piezas de papel de filtro del tamaño del gel empapadas en la solución 10X SSC. Estas piezas deben quedar en contacto con la solución de la bandeja
- tres piezas de papel Whatman 3MM, humedecidas en 10X SSC
- el gel de agarosa
- la membrana de nailon humedecida en 3X SSC
- tres piezas de papel Whatman 3MM empapadas en 3X SSC
- tres piezas de papel Whatman 3MM secas
- una pila de 10 cm de servilletas de papel
- una placa de cristal y un peso de 0,5 kg

Todo ello se dispuso eliminando las posibles burbujas de aire que pudieran quedar entre el papel Whatman 3MM y el gel, o entre el gel y la membrana de nailon. La transferencia se prolongó durante 12 h a RT. Finalmente, la fijación del ADN a la membrana se realizó a 80 °C durante 90 min.

1. **Tampón 10x SSC:** 1,5 M NaCl y 0,15 M citrato sódico pH 7,0.

5.6.2. Prehibridación

Para los análisis *Southern*, la membrana con el ADN fijado se incubó a 50 °C durante 1 h con 0,3 mL/cm² de membrana de agente de bloqueo *DIG Easyhyb* (Roche). Para la preparación del agente de bloqueo se siguieron las instrucciones del fabricante.

5.6.3. Hibridación

La hibridación se realizó a 50 °C durante 12 h con 0,3 mL/cm² de membrana de solución de hibridación⁽¹⁾. Para desnaturalizar la sonda previamente a su uso, la solución de hibridación se incubó a 100 °C durante 10 min y se enfrió rápidamente en hielo durante 5 min. Tras su uso, la solución de hibridación se conservó a -20 °C para su posterior reutilización (hasta tres veces), desnaturalizándose previamente.

1. **Solución de hibridación:** 25 ng/mL de sonda marcada con digoxigenina en solución de prehibridación.

5.6.4. Lavados y detección

Una vez retirada la solución de hibridación, los filtros se lavaron dos veces con 2X SSC: 0,1 % SDS (v/v) a RT durante 5 min y con agitación. A continuación, se realizaron otros dos lavados de 15 min a 50 °C con una solución precalentada de 0,5X SSC: 0,1 % SDS (v/v). Posteriormente se equilibró con tampón 1⁽¹⁾ (0,5 mL/cm² de membrana) a RT durante 2-5 min, y se bloqueó con tampón 2⁽²⁾ (1 mL/cm² de membrana), a RT durante 30 min. La incubación con tampón 2 (0,2 mL/cm² de membrana), conteniendo el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (750 U/mL, Roche) diluido 1:20.000, se realizó a RT durante 30 min. A continuación, se lavó dos veces la membrana durante 15 min con tampón 1 (1 mL/cm² de membrana) conteniendo 0,3 % Tween 20 (v/v) y se equilibró con tampón 3⁽³⁾ (0,2 mL/cm² de membrana) durante 15 min.

La detección se llevó a cabo por la acción enzimática de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato CDP-Star^{®(4)} (Roche) que da una señal quimioluminiscente. Para ello, se colocó la membrana sobre una pieza de acetato y se le añadió la solución CDP-Star^{®(5)} (1 mL/100cm² de membrana). Posteriormente, la membrana se cubrió con otra pieza de acetato y se retiró el exceso de líquido. Finalmente, se capturó la imagen emitida con la cámara oscura Fujifilm LAS-3000.

1. **Tampón 1:** 0,1 M ácido maleico y 0,15 M NaCl pH 7,5.
2. **Tampón 2:** 1 % agente de bloqueo de Roche (p/v) en tampón 1.
3. **Tampón 3:** 0,1 M Tris-HCl y 0,1 M NaCl pH 9,5.
4. **CDP-Star®:** disodio de 4-cloro-3-(metoxispiro (1,2-dioxetano-3,2-(5-cloro) triciclo [3.3.1.13,7] decan)-4-il) fenil fosfato.
5. **Solución CDP-Star®:** 1 % en tampón 3 (v/v).

5.6.5. Sustitución de la sonda

Para rehibridar la membrana empleada en el análisis *Southern* con una nueva sonda, es necesario retirar previamente la sonda anterior utilizada. Para ello, siguiendo el manual del sistema "DIG" de Roche, la membrana se lavó dos veces con agua destilada estéril a RT durante 5 min. A continuación, se incubó dos veces con una solución 0,2 M NaOH: 0,1 % SDS (p/v) a 37 °C durante 10 min, con agitación suave. Por último, se lavó con una solución 2X SSC dos veces durante 5 min a RT. Una vez terminados los lavados, se

volvió a prehibridar e hibridar con la nueva sonda siguiendo los procesos descritos en los apartados 5.6.2 y 5.6.3.

5.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

5.7.1. PCR estándar

Para la amplificación estándar de fragmentos de ADN se emplearon polimerasas termoestables (FIRE POL[®] TAQ de Canvax Biotech o Expand High Fidelity PCR System de Roche) en las condiciones indicadas en la Tabla 8. La reacción se llevó a cabo con 300 nM de cada cebador, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP y 0,05 U/μL de polimerasa. La cantidad de ADN molde fue de 20 ng/μL para amplificar ADN genómico o 2 ng/μL para ADN plasmídico.

Tabla 8. Condiciones estándar de PCR. Tan es la temperatura de unión de los cebadores al molde, y text es el tiempo de extensión de la reacción (en general, 1 minuto/kb de amplicón).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	35s	30
Unión del cebador	Tan	35s	
Extensión	72 °C	Text	
Extensión final	72 °C	7 min	1
	10 °C	indefinido	

5.7.2. PCR de marcaje

En los análisis de hibridación *Southern* se emplearon sondas bicatenarias marcadas con digoxigenina dUTP. El marcaje se realizó por PCR empleando los cebadores y dNTPs de DIG DNA Labeling Mix (Roche), que contiene una mezcla de digoxigenina-dUTP y el resto de dNTPs sin marcar.

Para las sondas bicatenarias se realizó una PCR estándar (30 ciclos) en la que se sustituyeron los dNTPs por la DIG DNA Labeling Mix.

La purificación de la sonda se realizó como se describe en el apartado 5.7.3.B.

5.7.3. Precipitación de los productos amplificados por PCR

A. Precipitación con etanol

Esta técnica se utilizó para productos de PCR únicos, con el fin de eliminar el tampón, la polimerasa y los dNTPs sobrantes. Para ello, se añadió en este orden 1/10 del volumen a precipitar de 3 M de acetato de sodio pH 5,2 y 2,5 vol de etanol. Se incubó a RT durante 30 min y se centrifugó durante 30 min a 12.100g. Después de eliminar el sobrenadante el sedimento se lavó dos veces con 70 % etanol (v/v) y se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

B. Precipitación con Cloruro Litio

Al producto de PCR marcado se añadieron 10 % de una solución 8 M de cloruro de litio (v/v) y 3 vol de 100% etanol frío. Se incubó a -20 °C durante 30 min y se centrifugó 30 min a 12.000g. Posteriormente se lavó con 70 % etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 10 µL de agua des-ionizada.

5.7.4. Transcripción reversa del ARN (RT-PCR)

A. Eliminación de restos de ADN

El ARN purificado se trató con DNAsa I (Fermentas) durante 30 min a 37 °C, a 0,1 µg/µL de ARN y 0,1 U/µL de enzima. Para detener la acción de la DNAsa la mezcla se incubó a 65 °C durante 10 min, añadiendo EDTA a concentración final 2,5 mM para prevenir la hidrólisis del ARN durante el calentamiento.

B. Síntesis de ADN copia

Para la síntesis de ADN copia (ADNc), el ARN tratado con DNAasa I se sometió a transcripción inversa usando la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). En un volumen final de 20 µL se mezcló 1 µg de ARN total con 100pmol de oligodT y se desnaturalizó a 70 °C durante 10 min. A continuación se mantuvo en hielo y se añadieron 0,4 mM de dNTPs, 1x tampón *First Strand Buffer* (Invitrogen), 4 U/µL del inhibidor de RNAsas *RNasin® Plus RNase Inhibitor* (Promega) y 5 mM de Ditiotreitól (DTT). A continuación, se incubó a RT durante 10 min y, transcurrido ese tiempo, se añadió la retrotranscriptasa (10 U/µL). Se incubó la reacción a 37 °C durante 50 min y finalmente se calentó a 70 °C durante 15 min, para inactivar la enzima.

5.7.5. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo final

Una vez sintetizado el ADNc, se realizó una PCR estándar empleando 0,05 – 0,1 µL del ADNc sintetizado en la transcripción inversa como molde por µL de reacción de PCR. Una vez terminada la PCR, las muestras se cargaron en geles de agarosa.

5.8. Transformación genética

5.8.1. Transformación de *E. coli*

La obtención y transformación de bacterias competentes congeladas, se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (1985) con algunas modificaciones que se describen a continuación.

A. Obtención de células competentes

Una colonia fresca de *E. coli* XL1-Blue se inoculó en 5 mL de PSI-b⁽¹⁾ y se incubó durante 12 h a 37 °C con agitación. El cultivo estacionario se transfirió a 100 mL de PSI-b en un matraz de 1 L (precalentado a 37 °C) y se incubó con agitación vigorosa hasta densidad óptica 0,45-0,5 a 550 nm. A continuación, el cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó a 4 °C durante 5 min a 5.000g. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 mL de solución Tfb-1⁽²⁾ fría. Después de incubar 5 min en hielo, se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 5.000g, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 mL de solución Tfb-2⁽³⁾ fría. Por último, se enfrió en hielo durante 15 min, se repartieron en alícuotas de 100 µL en viales previamente enfriados y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

1. **PSI-b:** 5 g/L extracto de levadura; 20 g/L triptona y 5 g/L MgSO₄ 7 H₂O. Ajustar a pH 7,6 con KOH. Esterilizar en autoclave.

2. **Solución Tfb-1:** 30 mM acetato potásico pH 6,9; 50 mM MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂ y 15 % glicerol v/v. Esterilizar por filtración.

3. **Solución Tfb-2:** 10 mM MOPS pH 7,0; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl y 15 % glicerol (v/v). Esterilizar por filtración.

B. Transformación de células competentes

Las células competentes se descongelaron en hielo. Se mezclaron alícuotas de 50 μL con 5 μL de la solución con el ADN y se incubaron 30 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 90 s y se dejaron en hielo 5 min. Las células transformadas se incubaron a RT y sin agitación durante 15 min con 100 μL de medio LB para permitir la expresión del gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Por último, toda la mezcla de transformación se esparció en placas de medio selectivo, que se incubaron a 37 °C durante 12-14 h. En el caso de plásmidos con resistencia a otros antibióticos, las células se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 h en 1 mL de medio LB. Posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en 150 μL de medio LB, se repartieron en placas de medio selectivo y se incubaron a 37 °C durante 12-14 h.

5.8.2. Transformación genética de *F. oxysporum*

A. Obtención de protoplastos

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Powell y Kistler (1990) con modificaciones.

Se inocularon 10^9 microconidias frescas en 200 mL de PDB. Después de 12-14 h de incubación a 28 °C con agitación a 170 rpm, se recogieron las germínulas por filtración en nailon Monodur (10-15 μm) y se lavaron con abundante solución OM⁽¹⁾. A continuación se recogieron con una espátula estéril y se resuspendieron en 20 mL de OM con 0,5 % (p/v) de una mezcla comercial de enzimas líticas de paredes celulares fúngicas (Lallzyme de Lallemand S.A., o Glucanex[®] de Novozymes). El tratamiento enzimático se prolongó durante 45 min a 30 °C y agitación suave. Transcurrido este tiempo la formación de protoplastos se comprobó al microscopio. Cuando el número y la calidad de los protoplastos fueron adecuados, se filtró la muestra a través de dos capas de nailon Monodur (10-15 μm) y se lavó con STC⁽²⁾ frío. Posteriormente, se centrifugó a 4 °C y a 1.500g durante 15 min para recoger los protoplastos. Éstos se resuspendieron suavemente en 1 mL de STC y se determinó su concentración utilizando una cámara Thoma. Se repartieron en alícuotas de 100 μL a una concentración de 2×10^8 protoplastos mL^{-1} . A continuación, se procedió a su transformación o a su almacenamiento a -80 °C, después de añadirles 10 % de solución PEG⁽³⁾ (v/v) y 1 % de DMSO (Merck) (v/v).

1. **Solución OM:** 1,2 M MgSO_4 ; 10 mM Na_2HPO_4 , pH 5,8-6,0 ajustado con ácido ortofosfórico.

2. **Solución STC:** 0,8M sorbitol; 50 mM CaCl₂ y 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.
3. **Solución PEG:** 60 % polietilenglicol Mw 6.000 (p/v) en 0,6M MOPS.

B. Transformación de protoplastos

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Malardier y colaboradores (1989), con algunas modificaciones.

En un vial se mezclaron 1-2 µg de ADN transformante con 10 µL de ácido aurintricarboxílico (inhibidor de nucleasas) y se llevó hasta un volumen final de 60 µL con solución TEC⁽¹⁾. Para experimentos de cotransformación se añadió 1 µg del ADN que confiere resistencia al antibiótico de selección y doble cantidad del ADN de interés. La mezcla se incubó en hielo durante 20 min, al igual que los protoplastos para ser transformados. Transcurrido este tiempo, se mezclaron suavemente la solución de ADN y los protoplastos y se incubaron 20 min en hielo. Seguidamente se añadieron 160 µL de solución PEG y se prolongó la incubación a RT durante 15 min antes de añadir 1 mL de STC. Se centrifugaron 5 min a 604g para recoger los protoplastos y se resuspendieron en 200 µL de STC. Posteriormente se mezclaron alícuotas de 50 µL de protoplastos con 3 mL de agar de cobertera⁽²⁾ a 45 °C, y se repartieron en placas de Petri con medio de regeneración. Se incubaron a 28 °C durante un período de tiempo variable en función del antibiótico de selección, para permitir la expresión del ADN transformante. Para la selección con higromicina B se incubaron durante 14 h, y para la selección con fleomicina durante 2 h. Transcurrido este tiempo se añadieron 3 mL de agar de cobertera con el antibiótico de selección. Por último, se prosiguió la incubación a 28 °C hasta la aparición de colonias.

Los transformantes obtenidos se replicaron a nuevo medio selectivo para la obtención de colonias puras originadas a partir de una única microconidia, y se realizaron dos ciclos sucesivos de siembra de esporas aisladas y recolección de su descendencia de manera individualizada.

1. **Solución TEC:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA y 40 mM CaCl₂.
2. **Agar de cobertera:** 0,4 % agar (Oxoid) (p/v) en medio de regeneración.

5.9. Construcción de alelos mutantes

La obtención de mutantes deficientes en los genes de interés se realizó mediante delección dirigida de la fase codificante del gen de interés. Esta técnica consistió en reemplazar a través de una recombinación homóloga el alelo silvestre por una construcción obtenida mediante el método DelsGate (García-Pedrajas *et al.*, 2010).

Para la interrupción del gen *gnt2* se siguió el siguiente protocolo (Figura 13):

- 1) Se realizaron dos PCRs simultáneas e independientes sobre ADN genómico para amplificar los extremos 5' y 3' flanqueantes del gen utilizando parejas de oligonucleótidos específicos conteniendo colas para facilitar su clonación en el vector pDNOR. Para la amplificación del extremo 5' se empleó un oligonucleótido forward (*gnt2*-ScelF) cuya cola tenía incorporado el sitio de reconocimiento para *Scel*, y otro reverse (*gnt2*-attB1) cuya cola contenía la secuencia attB1 para la recombinación de la región attP1 del vector pDONR (Tabla 4). Para la amplificación del extremo 3' se empleó un oligonucleótido forward (*gnt2*-attB2) cuya cola contenía la secuencia attB2 para la recombinación de la región attP2 del vector pDONR, y uno reverse (*gnt2*-ScelR) cuya cola contenía el sitio de reconocimiento para la endonucleasa I-*Scel* (Tabla 4).
- 2) **Clonación** de los productos de PCR en el vector pDNOR por recombinación homóloga *in vitro* entre los extremos attB1 y attB2 de los fragmentos amplificados, con las secuencias attP1 y attP2 del vector, respectivamente. Esta recombinación catalizada por la enzima BP clonasa II (Invitrogen, Carlsbad, CA) genera una molécula lineal y elimina la región flanqueada por los extremos attP1 y attP2 correspondiente al gen *ccdB* que es letal en la estirpe DH5 α empleada. De esta manera se crea un alelo con la región codificante del gen sustituida por el vector pDNOR que contiene secuencias flanqueantes del gen *gnt2* y el casete de resistencia a higromicina B (Hyg^R).
- 3) **Transformación** de *E. coli* con el fragmento lineal obtenido y circularización *in vivo* gracias a la homología entre las secuencias 18pb de los extremos del fragmento, correspondientes al sitio de restricción *Scel*. Los transformantes se seleccionaron en LA-kanamicina, cuyo casete de resistencia (Kn^R) se encuentra integrado en la construcción. Esto permite la obtención y purificación del nuevo plásmido recombinante.
- 4) **Linearización** del plásmido con la endonucleasa *Scel* y precipitación con etanol (5.7.3 A).

Se utilizó aproximadamente 1 μ g de este fragmento purificado para la transformación de protoplastos de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

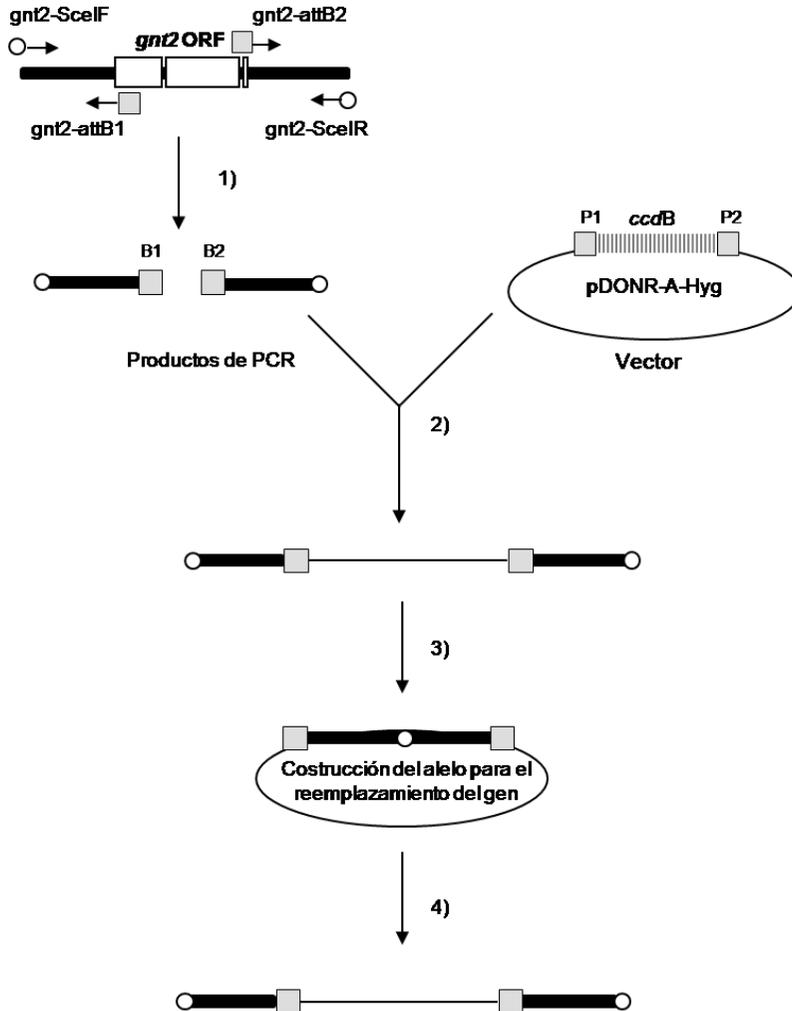


Figura 13. Estrategia empleada para obtener el vector de disrupción mediante el método DelsGate para el reemplazamiento génico dirigido de *gnt2* en *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

5.10. Fusión traduccional con la proteína GFP

La fusión traduccional de *gnt2* con la proteína verde fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) se realizó por clonación de la fase codificante del gen en el vector p1902 (Peñalva, M. CIB-CSIC) que contiene la proteína GFP en fase con el promotor constitutivo P*gpdA* de *A. nidulans* (Punt *et al.*, 1988) y los sitios de restricción *Nsi* I y *Xma* I para la clonación del inserto que den lugar a la fusión traduccional de la proteína recombinante resultante anterior al terminador del gen *gpdA* (Figura 14).

Con objeto de realizar una clonación direccional de *gnt2* fusionada a GFP, se amplificó la ORF de *gnt2* sin codón de inicio sobre ADNc, utilizando oligonucleótidos específicos (*gnt2*-31N y *gnt2*-33X) que introducen sitios de restricción *Xma* I y *Nsi* I en los extremos 5' y 3' de la ORF, respectivamente (Tabla 4).

El fragmento amplificado se clonó en *pGEM*[®]-*T Vector System* de Promega, se transformó en *E. coli* y se purificó (5.4.2) tras el tratamiento del vector recombinante con las enzimas de restricción *Xma* I + *Nsi* I. A continuación, se linearizó el vector p1902 por con las enzimas *Xma* I + *Nsi* I, y se unió con el fragmento purificado. Se transformó *E. coli* y se comprobó la identidad del inserto en el vector recombinante obtenido mediante secuenciación del ADN inserto.

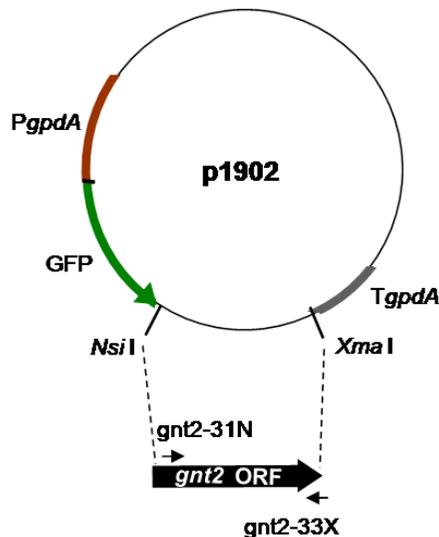


Figura 14. Esquema de la construcción de la proteína de fusión GFP::*Gnt2*.

5.11. Análisis filogenético

Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *gnt2* de *F. oxysporum* y los ortólogos de otras especies fúngicas se analizaron mediante el algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) para su alineamiento. Tras editar y eliminar los huecos originados por las regiones hipervariables con el programa GBlocks v0.91b (Castresana, 2000) se realizó el análisis filogenético con el programa PhymIv2.4.4 (Guindon & Gascuel, 2003) aplicando el método de máxima verosimilitud, con optimización del modelo de sustitución rREV (Dimmic *et al.*, 2002) y los parámetros “gamma” y “alpha” en el programa modelgenerator v84 (Keane *et al.*, 2006).

La construcción de los árboles filogenéticos se realizó empleando el método bootstrap no paramétrico con 1.000 repeticiones y el resultado obtenido se representó mediante un cladograma construido con el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

5.12. Ensayos de infección

5.12.1. Infección de plantas

Para determinar el comportamiento patotípico de las distintas estirpes de *F. oxysporum* generadas en este trabajo, se infectaron plantas de tomate (cv. Monika ó cv. Moneymaker). Las semillas fueron proporcionadas por Syngenta (El Ejido, Almería); ó por el Dr. Jesús Cantero (La Mayora, CSIC, Málaga), respectivamente.

Las plantas se cultivaron según se describe en el apartado 5.1.3 hasta que presentaron su primera hoja verdadera y, posteriormente, sus raíces se sumergieron en una suspensión de 5×10^6 esporas mL^{-1} durante 30 min. A continuación, se trasplantaron a celdas individuales con vermiculita y se incubaron en cámara de cultivo con condiciones ambientales controladas (5.1.3).

Se evaluó la evolución de la enfermedad durante las tres semanas siguientes a la infección. Para ello se tuvieron en cuenta los índices de enfermedad descritos por Huertas-González y colaboradores (1999) que corresponden con los siguientes estadios: 1, planta sana; 2, primeras hojas afectadas; 3, hojas y pecíolos caídos; 4, hojas muertas y tallo erguido, y 5, planta muerta (Figura 15).



Figura 15. Índices de enfermedad de plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

En el análisis de supervivencia se empleó el método de análisis estadístico no paramétrico Kaplan-Meier y las funciones obtenidas se compararon mediante el test log-rank (Lopez-Berges *et al.*, 2012). Los datos se representan gráficamente como una función de supervivencia escalonada en el software GraphPad Prism 4.

Para los ensayos de colonización fúngica la infección se realizó en matraces, sumergiendo las raíces en suspensiones de 5×10^8 esporas mL^{-1} e incubando a 28 °C y 80 rpm durante 3, 5, 10 ó 15 días. Después de la incubación, se recogieron por separado las raíces y los tallos y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

5.12.2. Infección en *Galleria mellonella*

Para estudiar la virulencia de la cepa silvestre y las distintas cepas mutantes de *F. oxysporum* en un modelo animal se infectaron larvas de *G. mellonella* (Navarro-Velasco *et al.*, 2011) con suspensiones de microconidios frescos. Para ello se seleccionaron al azar de 10 a 15 larvas con peso entre 0,1 y 0,2 g. Una jeringuilla (Terumo de 1 mL) y un microinyector (Burkard Auto Microapplicator de 0,1 a 10 μL) fueron usados para inyectar 8 μL con $1,6 \times 10^5$ microconidias totales en PBS 1X¹ dentro del hemocele de cada larva, a través de la penúltima pata derecha. Se utilizaron dos controles, uno con larvas sin esporas inyectando solo PBS 1X, y otro sin inyectar. Las larvas infectadas con esporas del hongo junto con los dos tipos de control se incubaron a 30 °C durante 8 días y se evaluó diariamente el número de larvas muertas.

En el análisis de supervivencia se empleó el método de análisis estadístico no paramétrico Kaplan-Meier y las funciones obtenidas se compararon mediante el test log-rank (Lopez-Berges *et al.*, 2012). Los datos se representan gráficamente como una función de supervivencia escalonada en el software GraphPad Prism 4.

1 PBS (Solución de buffer salino): 137 mM NaCl; 2,7mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,8mM KH_2PO_4 .

5.13. Ensayos de fenotipos relacionados con virulencia

5.13.1. Aglutinación

Se inocularon 10^7 microconidias frescas en 2 mL de NaNO_3 25 mM con 4 % de PDB en tubos de inóculo de 30 mL, que se incubaron durante 30 h a

28 °C con agitación a 170 rpm. Posteriormente el cultivo se agitó vigorosamente durante 15 s en un vortex y se depositó en una placa multiwell de doce pocillos para la observación del grado de aglutinación del micelio mediante lupa estereoscópica (5X).

5.13.2. Fusión vegetativa

Para la cuantificación de la fusión vegetativa entre hifas, se prepararon placas con 4 mL de medio sólido conteniendo NaNO_3 25 mM y 0,5 % agar Oxoid. A continuación se depositaron alícuotas de 50 μl con 10^6 microconidias mL^{-1} y se incubaron a RT durante 12 h. Mediante observación al microscopio óptico con el objetivo de 40 X se determinó el porcentaje de fusiones existentes entre un total de 200 hifas adyacentes.

5.13.3. Resistencia a enzimas líticas de pared fúngica

Para evaluar la resistencia de la pared celular a enzimas líticas, se incubaron germínulas de 14 h de cada estirpe con 50 mg/mL de una mezcla comercial de glucanasas (Glucanex), siguiendo el protocolo descrito para la obtención de protoplastos (5.8.2.A). Los protoplastos formados se cuantificaron mediante observación al microscopio óptico Olympus y recuento en cámara Thoma.

5.14. Afinidad a colorantes y lectinas, específicos de componentes de pared

5.14.1. Unión del compuesto Alcian Blue a paredes celulares

El Alcian Blue es un colorante catiónico que se une a células cargadas negativamente (Friis & Ottolenghi, 1970). El ensayo se realizó a pH ácido ya que en estas condiciones los grupos fosfato y los radicales ácidos de los azúcares influyen sobre las cargas negativas de la pared.

Para determinar la unión a Alcian Blue de las microconidias, se preparó una solución 0,025 % en HCl 0,002 N de Alcian Blue 8GX (Sigma) y se elaboró una curva estándar por mediciones de la densidad óptica a 620 nm ($D.O_{620}$) de diluciones seriadas (Herrero *et al.*, 2002).

Alícuotas con 10^8 microconidias se lavaron con 1 mL de agua y 1 mL HCl 0,002 N sucesivamente y se centrifugaron 5 min a 1.073g. El precipitado se resuspendió en 200 μL de Alcian Blue (0,025 %) y se incubó 20 min a RT. Las

muestras se centrifugaron nuevamente durante 5 min a 1.073g y se determinó la D.O.₆₂₀ del sobrenadante.

La cantidad de Alcian Blue libre se extrapoló de la curva patrón, y el porcentaje se determinó como el valor resultante de la diferencia de colorante presente en el sobrenadante respecto a la cantidad inicial del mismo.

5.14.2. Unión a lectina GSII conjugada con el fluoróforo FITC

Debido a la especificidad de la lectina GSII de *Grifonia simplicifolia* (tetrámero de 113 kDa) para unirse a residuos de α ó β -N-acetilglucosamina terminales, se empleó esta lectina conjugada al fluorocromo FITC para determinar la posible presencia de N-acetilglucosamina en los polisacáridos de glicoproteínas superficiales.

Se preparó una solución de GSII-FITC (1 mg mL⁻¹ en 10 mM de tampón fosfato) que contenía 15 mM NaCl y 0,5 mM CaCl₂. Se recogieron microconidias frescas de un cultivo de 3 días y se alicuotaron en 10⁷ microconidias. Las germínulas obtenidas tras incubación durante 3 h en 1 mL de PDB a 28 °C con agitación a 170 rpm, se centrifugaron a 1.677g 5 min y se lavaron con H₂O destilada y tampón fosfato 50 mM pH 7,5 con 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ y 0,1 mM MnCl₂ dos veces y se resuspendieron en 180 μ l del mismo tampón. Se añadieron 20 μ l de GSII-FITC (concentración final de 0,1 mg mL⁻¹.) a ambas muestras, y se incubaron a 28 °C en agitación a 170 rpm durante 30 min, tras lo cual se centrifugaron a 1.677g 5 min y se lavaron dos veces en NaCl 0,9 %:2 mM CaCl₂. Finalmente se resuspendieron en 1 mL del mismo tampón y se determinó la fluorescencia emitida por las esporas y las germínulas (marcadas) en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences, San José, CA) mediante excitación a 488 nm (láser de argón) y detección de la emisión verde (530-550 nm) con el detector FL1. Se aplicó un flujo de 200-300 s⁻¹ y se cuantificaron 20.000 eventos independientes para cada muestra.

La fluorescencia individual es directamente proporcional a la cantidad de lectina unida a la pared de cada célula. La intensidad de fluorescencia emitida por cada población celular se representó en histograma de distribución de frecuencias. Por otro lado la dispersión de la luz, que es función del tamaño y morfología de las células, se representó mediante histograma biparamétrico: dispersión frontal (FSC-H) y dispersión lateral (SSC-H).

5.15. Fraccionamiento subcelular

Con objeto de determinar la localización intracelular de la proteína Gnt2 se realizó el fraccionamiento subcelular de germinulas de los mutantes *GFP::gnt2* (5.10) cultivados durante 14 h en PDB. Para ello se empleó el método de separación y purificación de fracciones subcelulares mediante ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa descrito (Antebi & Fink, 1992) con algunas modificaciones.

El proceso requiere la rotura celular, por lo que el micelio se trituró y homogenizó en N₂ líquido hasta conseguir un polvo muy fino y se resuspendió en 1 mL de tampón de permeabilización⁽¹⁾ con 1 mM PMSF y 1 % coctel inhibidor proteasas (v/v). Tras centrifugar a 4 °C durante 5 min a 1.000g, se desechó el precipitado y el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a 10.000g durante 10 min a 4 °C para obtener la fracción enriquecida en retículo endoplásmico (P₁₀). Esta fracción P₁₀ se resuspendió en 350 µl de tampón de permeabilización con 1 mM PMSF y 1 % coctel inhibidor de proteasas (v/v), y se mantuvo a -20° hasta su uso. El sobrenadante S₁₀ se aplicó sobre una columna con gradiente de sacarosa previamente preparada, depositando alícuotas de 500 µL de tampón de permeabilización con 1 mM PMSF y 1 % coctel inhibidor de proteasas con las concentraciones de sacarosa: 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50 y 54 % (p/v). Las fracciones de sacarosa se depositaron desde la parte inferior a la superior de la columna en orden decreciente de concentración. El gradiente se dejó reposar 12 h a 4 °C antes de su utilización. Una vez depositada la muestra S₁₀ sobre el gradiente, se sometió a centrifugación durante 90 min a 4 °C en un rotor SW50 a 160.000g y se recogieron 14 nuevas fracciones de aproximadamente 350 µL cada una desde la parte superior del gradiente.

La concentración de sacarosa de cada fracción se determinó con ayuda de un refractómetro (Atago Co., LTD) y las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

1. **Tampón de permeabilización:** 10 mM HEPES; 1 mM MgCl₂ pH 7,5 ajustado con NaOH.

5.16. Manipulación de proteínas

5.16.1. Extracción de proteínas totales

Para la obtención de extractos proteicos totales a partir de micelio se aplicó el método basado en lisis celular mecánica, separación y eliminación de restos celulares por centrifugación y precipitación de las proteínas solubles mediante lavados sucesivos con agua, metanol y cloroformo.

Alícuotas con 5×10^8 esporas frescas se inocularon en 250 mL de medio PDB y se incubaron tres días a 28 °C en agitación a 170 rpm. Se recolectó el micelio mediante filtración por monodur, se lavó con agua y se congeló a -80 °C.

La rotura celular se realizó en mortero con N₂ líquido hasta conseguir un polvo muy fino que se transfirió a un tubo de 2 mL y se resuspendió en 500 µL de tampón de lisis⁽¹⁾. Tras incubar el lisado 30 min en hielo, se centrifugó a 11.337g durante 10 min a 4 °C y se alicuotó el sobrenadante en volúmenes de 200 µL. Se añadieron sucesivamente 4 vol de metanol, 1 vol de cloroformo y 3 vol de agua destilada, agitando energéticamente la mezcla tras cada adición, quedando con un aspecto blanquecino. Se centrifugó nuevamente a 9.660g 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el anillo de proteínas formado en la interfase. Posteriormente se realizó un último lavado añadiendo 3 vol de metanol, agitando la mezcla y centrifugando a 9.660g 5 min a 4 °C. Tras la eliminación del sobrenadante, la muestra se dejó secar a RT y se resuspendió en tampón de hidratación⁽²⁾ para su posterior análisis mediante SDS-PAGE.

1- Tampón de lisis: 25 mL Tampón A (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 % SDS; 150 mM NaCl; 10 % glicerol (v/v); 1 % Tritón (v/v); 5 mM EDTA); 1 mM PMSF (Sigma); 1 % coctel inhibidor de proteasas (Sigma).

2 Tampón de deshidratación: 8 M urea; 2 % CHAPS ([3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]] (p/v) (sigma).

5.16.2. Extracción de proteínas extracelulares en condiciones de inducción

Las proteínas extracelulares se obtuvieron a partir de cultivos en medio SM (4.2.2.B) sin glucosa suplementados con distintas fuentes de carbono (Tabla 9) para la inducción específica de distintas enzimas extracelulares.

Tabla 9. Fuentes de carbono para la inducción de enzimas extracelulares

Fuente de carbono	Abreviatura
1 % Casaminoácidos (4.2.2.D)	Ca
2 % Aceite de germen de trigo	WGO
2,5 % Tejido vascular de tomate	TVT
2 % Sacarosa; 0,2 % glucosa	S+G

Se inocularon 10^9 esporas frescas en 400 mL de PDB (4.2.2.A) y se incubaron 14 h a 28 °C, en agitación a 170 rpm. Se recogieron las germínulas mediante filtración por monodur, se lavaron con agua y se repartieron en cinco partes inoculando una alícuota en cada medio de inducción (con WGO se cultivó por duplicado para obtener suficiente extracto proteico) y se incubaron 20 h a 28 °C y 170 rpm. Tras este periodo de tiempo, cada sobrenadante se transfirió a membranas de diálisis (diámetro de poro de 12 kDa) y se dializó 12 h frente a agua a 4 °C. Se concentraron durante 5 h con PEG siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.16.5.A, se acortaron las membranas de diálisis y se dializaron nuevamente 5 h frente a agua destilada a 4 °C para eliminar los restos de PEG adheridos a la membrana.

Todo el proceso de extracción y concentración se realizó a 4 °C. A cada extracto proteico concentrado hasta un volumen final de 3 mL (33 X, excepto el medio WGO concentrado 66 X) se le añadió inhibidores de proteasas para evitar la degradación por proteasas liberadas al medio (5.16.4) y se congeló a -20 °C para su posterior análisis mediante SDS-PAGE.

5.16.3. Extracción de proteínas de la pared celular de *F. oxysporum*

Las proteínas de pared se extrajeron a partir de micelio obtenido de un cultivo de 25 mL de 1-2 días de incubación a 28 °C en agitación a 170 rpm y congelado a -80 °C, siguiendo el protocolo descrito por Meijer y colaboradores (2006) con algunas modificaciones.

A. Aislamiento de paredes celulares.

El micelio triturado y homogenizado en N₂ líquido hasta polvo muy fino se resuspendió en 1 mL de tampón fosfato 10 mM (pH 7,5) que posteriormente se mezcló con batidora IKA T10. Para obtener mayor lisis celular se añadieron 1/5 vol de bolas de vidrio de 0,5 mM de diámetro y se agitó en un mini-Beadbeater durante tres ciclos de 15 s, enfriando en hielo después de cada agitación.

El homogenizado obtenido se lavó tres veces con 1 mL NaCl 1 M, para eliminar proteínas intracelulares y proteínas no unidas covalentemente a la pared, y se centrifugó 15 min tras cada lavado a 1.677g.

B. Extracción de proteínas de pared solubles en SDS

Se realizó una primera extracción de proteínas de pared solubles en SDS, resuspendiendo en 1 mL de tampón de extracción Laemli⁽¹⁾ previamente calentado a 100 °C. La mezcla se incubó 10 min a 100 °C, se dejó enfriar 5 min

a RT y el sobrenadante se recogió tras centrifugación 15 min a 1.677g. Se volvió a añadir 1 mL de tampón de extracción y se repitió la incubación seguida de la centrifugación y la recuperación del sobrenadante.

Ambos sobrenadantes se mezclaron y el volumen resultante se dializó frente a agua destilada a 4 °C en membranas de 14 kDa de diámetro de poro. A continuación se congeló a -80 °C y se liofilizó.

C. Extracción de proteínas de pared insolubles en SDS

Para extraer la fracción proteica insoluble en SDS se eliminaron previamente los restos del tampón Laemli. La muestra de paredes celulares se lavó tres veces en 1 mL de agua destilada y se centrifugó 15 min a 1.677g. A continuación, se resuspendió en 1 mL de 0,1 M acetato de sodio pH 5,5 y se centrifugó 15 min a 1.677g. Este lavado se repitió cinco veces y finalmente se resuspendió en 2 mL del mismo tampón. Para extraer las proteínas de la muestra resuspendida en 2 mL de tampón se añadieron 0,5 unidades de laminarinasa⁽²⁾ (Sigma); y se incubó 2 h a 37 °C. Se prolongó el tratamiento otras 2 h añadiendo 0,5 unidades de laminarinasa. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación 15 min a 1.677g durante y se dializó frente a agua destilada a 4 °C en membranas de 14 kDa de diámetro de poro. A continuación se congeló a -80 °C y se liofilizó.

1. **Tampón de extracción Laemli:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 2 % SDS y 10 % glicerol.
2. **Solución de laminarinasa (162U/g):** 83 µg/µL en 0,1 M acetato de sodio pH 5,5.

5.16.4. Inhibidores de proteasas

Para evitar la posible proteólisis durante la extracción, y en todas las etapas de la purificación de proteínas, se utilizaron inhibidores de proteasas para inhibir la actividad de posibles proteasas secretadas por el hongo e impedir así la degradación interna de los extractos proteicos. Se añadió 1 mM de fenilmetilsulfonil (PMSF)¹(Sigma) y 1 % (v/v) del coctel inhibidor de proteasas (Sigma).

1. **PMSF:** 100 mM de PMSF disuelto en etanol.

5.16.5. Concentración de proteínas en las muestras

A. Con polietilenglicol

Los sobrenadantes de los cultivos inducidos obtenidos se transfirió a membranas de diálisis (diámetro de poro 12 kDa) que se mantuvieron en contacto externo con polietilenglicol (PEG) 35.000 (Fluka) (Di Pietro & Roncero, 1996). Seguidamente las membranas se lavaron cuidadosamente con agua para eliminar los posibles restos de PEG y se dializaron a 4 °C frente a 5 L de agua con agitación suave durante 12 h.

B. Con metanol-cloroformo

Protocolo basado en Wessel y Flugge (1984). A los sobrenadantes de los cultivos inducidos obtenidos se añadieron sucesivamente 4 vol de metanol, 1 vol de cloroformo y 3 vol de agua desionizada agitando tras cada adición. Se centrifugó 5 min a 9.660g y se desechó la fase superior con cuidado de no extraer el anillo blanquecino formado por las proteínas en la interfase. Se añadieron 3 vol de metanol y se eliminó el sobrenadante tras centrifugación 5 min a 9.660g. El precipitado se secó y finalmente se resuspendió en agua o en el tampón adecuado.

5.16.6. Determinación de la concentración de proteínas

Las proteínas solubles se cuantificaron mediante Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Este método se basa en la reacción colorimétrica entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie (Brilliant blue G-250) con grupos amino libres de los aminoácidos básicos en las proteínas (arginina, lisina e histidina).

El valor de absorbancia a 595 nm indica la concentración de proteína presente, extrapolado a partir de una recta patrón. Para la elaboración de esta recta se utilizó una disolución de BSA de concentración conocida (2 mg mL^{-1}) y un mínimo de 6 diluciones seriadas entre 0,2 y $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad). Para la cuantificación de las muestras problema se procedió igualmente añadiendo el mismo volumen de extracto en el reactivo Bradford y tras 15 min en oscuridad se determinó la absorbancia a 595 nm.

5.16.7. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis) (Laemmli, 1970). Es una técnica rápida y sensible que permite la separación de los polipéptidos en función de su tamaño.

A. Preparación de muestras

Las muestras bajo análisis se mezclaron con tampón de carga para proteínas⁽¹⁾, se desnaturalizaron 10 min a 100 °C, se centrifugaron 10 min a 11.337g y se visualizaron por electroforesis en gel SDS-PAGE.

1. **Tampón de carga para proteínas:** 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 8 % glicerol v/v; 1,6 % SDS p/v; 4 %β-mercaptoetanol v/v; 0,1 % azul de bromofenol.

B. Preparación de gel

Gel separador. Para la preparación de 5 mL se mezclaron 1,25 mL de solución LGB⁽¹⁾ con la cantidad deseada de 40 % Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1 (BioRad) para lograr la concentración de interés, y agua desionizada. La polimerización se inició al añadir 30 µL de 10 % persulfato de amonio (APS, de BioRad) v/v y 10 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina, Sigma).

Gel concentrador. Para la preparación de 5 mL se mezclaron 1,25 mL de solución UGB⁽²⁾ con 0,75 mL de 40 % Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1 y 3 mL de agua desionizada. La polimerización se inició tras la adición de 30 µL de 10 % APS (v/v) y 10 µL de Temed.

1. **LGB (Lower Gel Buffer):** 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS.
2. **UGB (Upper Gel Buffer):** 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS.

C. Electroforesis

Las electroforesis se realizaron en tampón Tris-Glicina⁽¹⁾ a un voltaje 80 V durante 15 min y 120 V durante el tiempo deseado, en el sistema vertical mini Protean® cell de Bio-Rad. Como patrón de peso molecular se utilizó una mezcla comercial de proteínas (Bio-Rad) compuesta por: miosina (200 kDa), β-galactosidasa (116,25 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina (66,2 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa).

- 1 **Tampón Tris-Glicina:** 25 mM Tris (Trizma base); 192 mM glicina; 0,1 % SDS (p/v); pH 8,3.

5.16.8. Tinción de geles

A. Tinción de coomassie

Los geles se tiñeron con disolución de Coomassie⁽¹⁾. Para eliminar el exceso de tinción se lavaron 30 min con la disolución High Destain⁽²⁾ y durante 1 h con la disolución Low Destain⁽³⁾.

1. **Disolución de Coomasie:** 0,1 % Coomasie Blue; 60 % metanol; 10 % ácido acético (v/v).
2. **Disolución High Destain:** 50 % metanol; 10 % ácido acético.
3. **Disolución Low Destain:** 5 % metanol; 7 % ácido acético.

B. Tinción plata

Se siguió el protocolo descrito por Heuskeshven y Dernik (1985).

El gel se fijó 45 min con 50 % etanol y 10 % ácido acético y 15 min con 8,3 % de glutaraldehído. Tras lavar sucesivas veces con agua se procedió a teñir 30 min con 0,25 % de nitrato de plata (Sigma) en oscuridad. Tras lavar nuevamente con agua se reveló con solución de revelado⁽¹⁾. La reacción se detuvo eliminando la solución de revelado y añadiendo una solución de ácido acético 5 %.

1. **Solución de revelado:** 0,015 % de formaldehído en 2,5 % Na₂CO₃.

C. Tinción fluorescente ProQ-Emerald para glicoproteínas y glicoconjugados

Para detectar concentraciones bajas de glicoproteínas se utilizó el kit comercial Pro-Q Emerald-300 (Molecular Probes). Este compuesto se une específicamente a los carbohidratos de las proteínas y su detección en un transiluminador es posible mediante excitación a 280-300 nm y emisión de fluorescencia a 530 nm (verde). Tras realizar un SDS-PAGE se siguieron las instrucciones del fabricante para la tinción y observación.

D. Tinción Fluorescente Sypro ruby (BioRad)

En este caso se utilizó el compuesto Sypro Ruby (BioRad). Las proteínas se fijaron 30 min con una solución de fijación⁽¹⁾, posteriormente se incubaron 12 h en Sypro Ruby y se lavaron 30 min con solución de fijación para eliminar la fluorescencia del fondo.

1. **Solución de fijación:** 7 % v/v ácido acético, 10 % v/v metanol.

5.16.9. Desglicosilación de proteínas

Para la *N*-desglicosilación de proteínas se empleó la endoglicosidasa PNGasa F (Sigma)⁽¹⁾ que hidroliza el enlace entre el oligosacárido y la asparragina de la proteína glicosilada. Se añadieron 2,5 µL de enzima a 10 µg del extracto proteico y se incubó durante 12 h a 37 °C. Transcurrido dicho periodo se comprobó la de-glicosilación mediante visualización en geles SDS-PAGE con tinción proQ Emerald y Coomassie (5.16.8 A).

1. **PNGasa F:** 50 U/100 µL agua desionizada.

5.17. Electroforesis bidimensional

El análisis se llevó a cabo a partir de cuatro réplicas analíticas por cada condición (estirpe silvestre y estirpe mutante). En el análisis de proteínas totales se emplearon réplicas biológicas independientes mientras que para proteínas extracelulares se prepararon mezclas aleatorias de los distintos extractos obtenidos bajo condiciones de inducción, debido a que cada extracto procedía de varios cultivos (Tabla 10). Para cada réplica se utilizaron 150 µg de proteínas.

Tabla 10. Proporciones de mezclas aleatorias en extractos de proteínas extracelulares empleados para el análisis 2D-SDS-PAGE.

		Mezcla 1 (120 µg)	Mezcla 2 (120 µg)	Mezcla 3 (120 µg)	Mezcla 4 (120 µg)
Extracción 1 (120 µg)	30 µg Ca 30 µg WGO 30 µg TVT 30 µg S+G	50%		50 %	
Extracción 2 (120 µg)	30 µg Ca 30 µg WGO 30 µg TVT 30 µg S+G		50 %		50 %
Extracción 3 (120 µg)	30 µg Ca 30 µg WGO 30 µg TVT 30 µg S+G		50 %	50 %	
Extracción 4 (120 µg)	30 µg Ca 30 µg WGO 30 µg TVT 30 µg S+G	50 %			50%

5.17.1. Isoelectroenfoque (IEF)

Esta técnica permite la separación de proteínas en función del punto isoeléctrico (pI) con alta resolución. Se basa en el principio de desplazamiento de moléculas cargadas eléctricamente en un gradiente de pH, hasta alcanzar el pH donde su carga neta sea cero. Se separaron muestras de extractos de proteína total (5.16.1) y de proteínas extracelulares (5.16.2) en condiciones desnaturalizantes.

El isoelectroenfoque se realizó en el equipo *Protean IEF cell* (BioRad), utilizando tiras de gel de poliacrilamida de 17cm con un gradiente lineal de pH inmovilizado (IPG) entre 5,0-8,0 (*ReadyStrips IPG Strips*, BioRad) (Bjellqvist *et al.*, 1982).

Cada muestra se resuspendió en tampón de carga⁽¹⁾ y agua hasta un volumen final de 350 μ L y tras 30 min de incubación a RT, se depositó sobre la tira IPG (gradiente inmovilizado de pH) previamente hidratada con tampón⁽²⁾ y se realizó la electroforesis en una cámara de IEF a 20 °C, aplicando las pautas anotadas en la Tabla 11.

Una vez finalizada la primera dimensión, la tira fue equilibrada durante 10 min en tampón⁽³⁾ con 2 % DTT y a continuación otros 10 min en el mismo tampón con 0,24 M iodoacetamida.

Tabla 11. Programación del isoelectroenfoque. Aplicación del voltaje en pendiente lineal (L).

Pasos		Voltaje(V)	Duración (h:min)	Voltios/hora V/h)
Rehidratación pasiva		Sin voltaje	1 h	-
Rehidratación activa		50	11:00	-
Isoelectroenfoque	1	250	0:15	-
	2	4.000	2:00	-
	3	4.000 (L)	-	20.000

- Tampón de carga:** Tampón de rehidratación con 2,8 mg/mL DTT fresco.
- Tampón de rehidratación:** urea 7 M; tiourea 2M; CHAPS 4 %; DTT 20 mM; tritón X-100 0,5 %; Anfólitos 0,5 %; Azul de bromofenol.
- Tampón de equilibrado:** 375 mM Tris-HCL; pH 8,8; 6 M urea; 2 %SDS; 20 % glicerol; azul de bromofenol y H₂O.

5.17.2. 2D-SDS-PAGE

El gel de IPG fue transferido a un sistema de electroforesis vertical *Protean Plus Dodeca cell* (BioRad) para la separación en la segunda dimensión en geles desnaturalizantes SDS-PAGE de 12 % de poliacrilamida, junto con una tira de papel *Whatmann* embebida en los marcadores de peso molecular (Sigma) colocada en un extremo; y se sellaron con 0,5 % (p/v) agarosa. La electroforesis se llevó en tampón de electroforesis¹ a cabo a 8 °C aplicando 30 V durante 30 min, y 60 V hasta que el frente alcanzó el final del gel.

2. Tampón de electroforesis (tampón Tris-Glicina): 25 mM Tris (Trizma base); 192 mM glicina; 0,1 % SDS (p/v); pH 8,3.

5.17.3. Visualización de las proteínas

La visualización de proteínas en el gel se llevó a cabo mediante tinción con SYPRO-Ruby (Bio-Rad) (D) y digitalización en un escáner FX-Imagen (Bio-Rad).

5.17.4. Análisis de imágenes para la evaluación de la expresión diferencial

Las imágenes obtenidas de los geles se analizaron con el programa *PD-Quest* (Tabla 7). La normalización entre geles se basó en la cantidad total de proteína aplicada al gel ("*Total quantity in valid spots*").

El criterio de selección cuantitativa para determinar diferencias presencia/ausencia de manchas proteicas entre réplicas fue de $2 < V < 0,5$, siendo V el volumen normalizado de la mancha en unidades de ppm CNT (unidades de cuantificación).

El análisis estadístico de las manchas con expresión diferencial se hizo mediante el test "*T-Student*" para determinar la probabilidad de que éstas se debieran al azar. Previamente se comprobó la normalidad de la distribución (test de *Wilks-Shapiro*), y la igualdad ó no de varianzas (test *F-Snedecor*). Las manchas con un *P-valor* < 0,05 se consideraron proteínas con expresión diferencial en las estirpes analizadas.

5.17.5. Identificación de spots mediante digestión trípica y Maldi/TOF

Las proteínas de interés fueron escindidas del gel en una estación ProPic Investigator™ (Genomic Solution), y sometidas a digestión trípica según el protocolo de Schevchenko (1996) con pequeñas modificaciones, en el digestor ProPrep II (Degilab) siguiendo los siguientes pasos:

- Lavado con 25 mM bicarbonato amónico y acetonitrilo.
- Reducción con 10 mM ditioneol en 25 mM bicarbonato amónico.
- Alquilación con 100 mM iodoacetamida en 50 mM bicarbonato amónico.
- Eliminación de residuos con 50 mM bicarbonato amónico y acetonitrilo, y secado bajo nitrógeno gaseoso.
- Tratamiento con 12,5 ng/μL de tripsina porcina (Promega, Madison WI) en 25 mM bicarbonato amónico, que se llevó a cabo en microondas dos ciclos sucesivos de 5 min a 200W.
- Elución con 25 mM bicarbonato amónico y detención con 0,1 % ácido trifluoroacético (TFA) (v/v) en 50μL de volumen final.
- Purificación en microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore), y elución en una solución de matriz⁽¹⁾ sobre la placa MALDI en un vol de 1 μL.

Tras la cocrystalización sobre la placa, las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para obtener la huella peptídica (MS) en un espectrómetro 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). De cada muestra se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS) de las m/z más intensas.

La identificación de proteínas se realizó combinando los espectros MS y sus correspondientes MS/MS sobre la base de datos NCBIInr, utilizando MASCOT (MatrixScience) como motor de búsqueda y limitando la categoría taxonómica a *Fusarium*. El error máximo permitido en la búsqueda fue de 100 ppm y el número máximo de errores en el corte de la proteasa fue uno.

1. **Solución matriz:** 3 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidoxicinámico en 70 % acetonitrilo/ 0,1 % TFA.

5.18. Análisis de hibridación *Western*

Para los análisis de hibridación *Western* se emplearon 25 μ L de cada fracción subcelular (obtenida en 5.15) resuspendida en tampón de carga¹ y se separaron en geles al 10 % de SDS-policacrilamida (29:1) (Laemmli, 1970) a voltaje constante según lo indicado en el apartado 5.16.7.

El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-rad) usando Mini Trans-blot® Cell (Bio-Rad) en el tampón de transferencia² a 100 V durante 2 h a 4 °C. Tras finalizar el proceso de transferencia, las membranas se bloquearon con 5 % de leche descremada, disuelta en TBST³, durante 1 h a 4 °C en agitación suave y se lavaron con TBST para eliminar el exceso de leche descremada. Para identificar la proteína GFP::*Gnt2* se realizó hibridación de la membrana con 10 μ L de anticuerpo primario anti-GFP (Roche) disuelto en 10 mL de solución TBST con 1 % BSA durante 1 h a RT. Transcurrido este tiempo se realizaron sucesivos lavados con TBST, seguido de hibridación durante 1h a RT con 10 μ L del anticuerpo secundario anti-mouse (Cell signalling technology, Inc) disuelto en 10 mL de solución TBST con 1 % BSA. Tras sucesivos lavados con solución TBST, se detectó la quimioluminiscencia con ECL Plus reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante empleando la cámara oscura Fujifilm LAS-3.000.

1. **Tampón de carga:** 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 8 % glicerol (v/v); 1,6 % SDS w/v; 4 % β -mercaptoetanol (v/v); 0,1 % bromofenol blue.
2. **Tampón de transferencia:** 48 mM Tris-HCl pH 7.5; 39 mM glicina; 0,0375 % SDS; 20 % metanol.
3. **TBST:** 900 μ L de H₂O; 1 mL Tween 20; 100 mL TBS 100X (0,2 M Trizma base; 1,37 M NaCl ajustado a pH 7,6 con HCl)

5.19. Actividades enzimáticas

5.19.1. Actividad GDPasa

La hidrólisis de GDP se midió en las fracciones subcelulares obtenidas tras el fraccionamiento subcelular en gradiente de glucosa (5.15) mediante el ensayo enzimático descrito por Herrero y colaboradores (2002), con algunas modificaciones. Para ello 5 μ L de cada fracción se mezclaron con tampón de reacción¹ y se incubaron en una placa de 96 pocillos a 30 °C durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo 10 μ L de SDS al 10 % y manteniendo a 0 °C. Seguidamente se añadieron 40 μ L de H₂O y 140 μ L del reactivo de AMES² a

cada reacción, se incubaron a 45 °C durante 20 min y se midió la absorbancia a 660 nm.

1. **Tampón de reacción:** 0,2M imidazol pH 7,5; 10 mM CaCl₂; 0,1 % Tritón X-100; 2 mM GDP.
2. **Reactivo de AMES:** Mezcla 1:6 ácido ascórbico al 10 % y 0,42 % molibdato de amonio disuelto en ácido sulfúrico 1N.

5.19.2. Actividad *citocromo c reductasa*

Para determinar la actividad NADPH *citocromo c reductasa* de la flavoproteína NADPH *citocromo c* P450 localizada en el RE, se utilizó el kit comercial (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se emplearon 5 µL de cada fracción obtenida tras el fraccionamiento subcelular en gradiente de glucosa (5.15) en un volumen final escalado de 224 µL.

5.20. Microscopía

Para la observación microscópica de las estirpes de *F. oxysporum* empleadas en este trabajo, 5×10^6 esporas mL⁻¹ de cada estirpe se germinaron durante 14 h en el medio líquido correspondiente. Las germínulas se recogieron por centrifugación a 13.000 rpm 10 min.

5.20.1. Microscopía óptica

Los análisis de microscopía óptica se llevaron a cabo con germínulas y esporas obtenidas en medio PDB. Para su observación se empleó la técnica Nomarsky, con un objetivo 100 X en un microscopio Leica DMR.

5.20.2. Microscopía de fluorescencia

Para los análisis de fluorescencia en los transformantes portadores de la fusión traduccional con GFP, se utilizaron germínulas cultivadas 12 h en medio PDB. Estas se incubaron a temperatura ambiente durante 5-90 min en 2 mL de PDB y alícuotas de 10 µL se depositaron en bloques de 1 % de agarosa sobre un portaobjetos para su observación al microscopio Zeiss Axio Imager M2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) equipado con el filtro adecuado.

5.20.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se empleó para visualizar la ultraestructura de esporas y germínulas obtenidas tras crecimiento en PDB.

Las células se fijaron mediante 12 h de incubación en una mezcla de 2,5 % glutaraldehído (v/v) y 2 % paraformaldehído (p/v) en 0,1 M tampón cacodilato sódico a pH 7,0. Posteriormente, se lavaron dos veces con 0,1 M tampón cacodilato sódico durante 30 min y se post-fijaron con 1 % tetróxido de osmio (v/v) en 0,1 M tampón cacodilato sódico pH 7,0. La post-fijación se prolongó durante 12 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron dos veces con 0,1 M tampón cacodilato sódico durante 30 min y se llevó a cabo su deshidratación en una serie ascendente de alcoholes, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % y 100 % (v/v), incubando con cada dilución durante 30 min. La deshidratación con 100 % etanol se realizó tres veces consecutivas. Una vez deshidratadas, se llevó a cabo la inclusión de las muestras siguiendo el siguiente protocolo:

- Tratamiento con óxido de propileno, 30 min (dos veces).
- Tratamiento con óxido de propileno:Epón (EMBed 812) (3:1, v/v), 2 h.
- Tratamiento con óxido de propileno:Epón (EMBed 812) (1:1, v/v), 2 h.
- Tratamiento con óxido de propileno: Epón (EMBed 812) (1:3, v/v), 2 h.
- Tratamiento con Epón (EMBed 812) puro 12 h.
- Tratamiento con Epón (EMBed 812) puro 1 h adicional.

Todas las incubaciones se realizaron a 4 °C. Una vez realizada la inclusión, se dejó polimerizar a 65 °C 48 h.

Las muestras se seccionaron con un ultramicrotomo para obtener cortes de 80 nm de grosor y se montaron en rejillas de cobre. Para contrastar las muestras las rejillas se incubaron a 37 °C durante 2 min en 2 % acetato de uranilo (p/v), se lavaron en agua destilada y se transfirieron a citrato de plomo donde se incubaron 3 min a RT (Reynolds, 1963). Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico Philips CM 10.

5.21. Manipulación de polisacáridos

5.21.1. Extracción y purificación de polisacáridos de pared

El micelio obtenido de cultivos en SM (4.2.2) de tres días a 170 rpm y 28 °C se recolectó por filtración en monodur, se congeló a -80 °C y se liofilizó. A continuación se trituró, en molinillo Ika A10, hasta un polvo fino con fragmentos entre 5 y 15 µm y se procedió a la extracción de los polisacáridos.

A. Extracción de polisacáridos unidos a proteínas de pared

A partir del micelio pulverizado se realizó una extracción fraccionada de polisacáridos unidos a proteínas de pared con enlaces *O*- y *N*- glicosídicos.

La rotura del enlace *O*-glicosídico se realizó añadiendo a los 10g de micelio pulverizado, 150 mL de NaOH 0,1 M; 0,3M borohidruro de sodio y agitando la mezcla a RT durante 4-12 h. Posteriormente se centrifugó 15 min a 12.400g, se reservó el sobrenadante y se volvió a resuspender el sedimento en la misma solución repitiéndose (2-3 veces) este proceso hasta llegar al agotamiento. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron y se les añadió 2 vol de etanol al 96 % obteniéndose un precipitado que se recuperó por centrifugación a 12.400g. Este precipitado se dializó frente a agua para la eliminación de los restos de NaOH y alcohol (3-4 días), y finalmente se liofilizaron las fracciones obtenidas, una soluble en agua (F01S) y otra insoluble (F01I) (Figura 16).

Para la extracción de carbohidratos unidos a proteínas con enlaces *N*-glicosídicos, se añadieron 150 mL de NaOH 1 M al sedimento insoluble de la anterior extracción y se procedió de la misma forma hasta obtener una fracción soluble en agua (F1S) y otra insoluble (F1I) (Figura 16). Ambas fracciones solubles en agua (F01S y F1S) se purificaron por solubilidad en etanol-agua 1:1 (v/v), dando nuevamente lugar a fracciones solubles (F01S50S y F1S50S) y fracciones insolubles (F01S50I y F1S50I) en el solvente etanol-agua (Figura 16). Todas las fracciones obtenidas se liofilizaron y se determinó su peso seco en una balanza analítica.

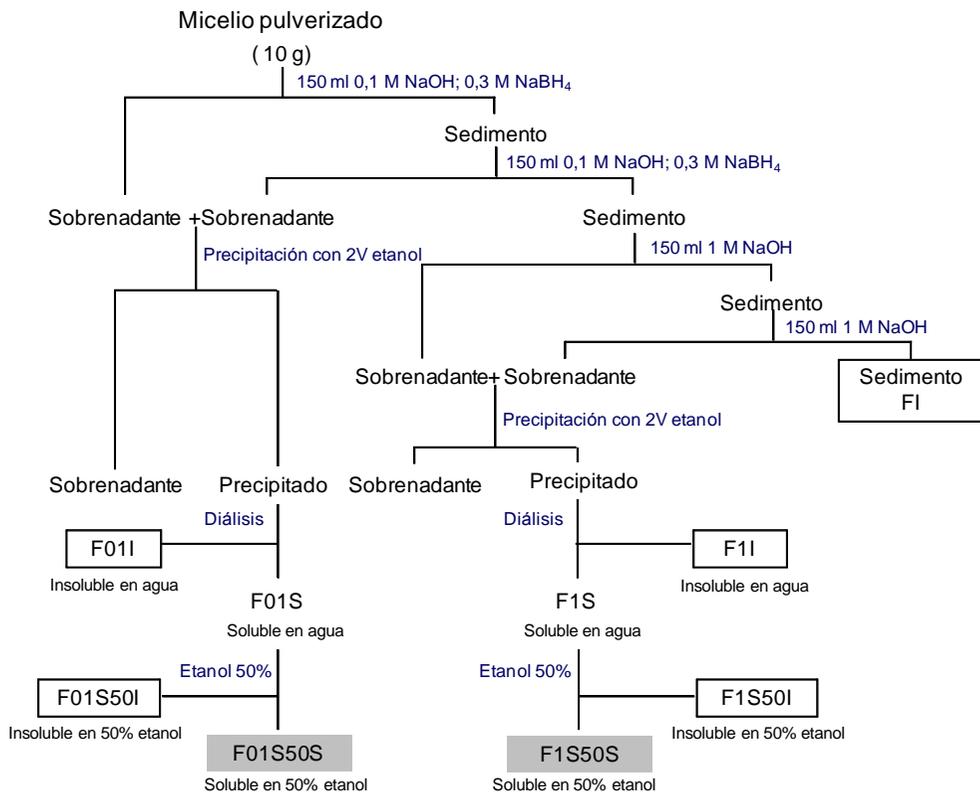


Figura 16. Obtención de las fracciones F01S50S (O-glicanos) y F1S50S (N-glicanos)

B. Purificación de polisacáridos solubles F01S50S y F1S50S mediante cromatografía por filtración en gel

Esta técnica está basada en la retención de moléculas en una red tridimensional constituida por un polímero de agarosa. Dicha retención es mayor al disminuir el peso molecular de las sustancias, y en consecuencia ocurre la separación de compuestos en función de su peso molecular.

Para separar los polisacáridos de cada fracción soluble y comprobar su pureza, éstas se filtraron a través de una columna (90 x 2,6 cm) de Sepharose CL-6B que retiene polisacáridos de peso molecular inferior a 10⁶ Da. Como eluyente se empleó agua destilada con un flujo de 22-23 mL h⁻¹. La calibración de la columna se realizó cargando una mezcla de patrones de peso molecular conocido:

- Azul dextrano (2×10^6 Da)
- Dextrano T-500 (5×10^5 Da)
- Dextrano T-10 (1×10^5 Da)
- Vitamina B₁₂ (1.355 Da)

La muestra se preparó a partir de 100 mg de polisacáridos de las fracciones F01S50 S ó F1S50S, que se diluyeron en 2 mL de agua destilada y se centrifugaron a 11.337g durante 15 min. La solución obtenida se cargó en una columna, recogiendo fracciones, de 4,5 mL aproximadamente, en un colector automático ULTRARAC II. La presencia de polisacáridos se detectó mediante el método del fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Las fracciones adecuadas se mezclaron y se liofilizaron para su posterior análisis.

5.21.2. Análisis e identificación de azúcares mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS)

Se realizó un proceso de permetilación e hidrólisis de los polisacáridos, seguido de separación de los derivados por cromatografía de gases y detección e identificación en un espectrómetro de masas.

A. Metilación de polisacáridos y derivatización a acetatos de alditol

Este método consiste en la permetilación de los polisacáridos y su posterior hidrólisis, reducción y acetilación, obteniéndose acetatos de alditol parcialmente metilados. Para la metilación de los polisacáridos, se siguió el procedimiento descrito por Ciucanu y Kerek (1984) .

Se utilizaron de 1-2,5 mg de fracción purificada mediante cromatografía por filtración en gel y se derivatizó a acetatos de alditol parcialmente metilados mediante el siguiente proceso:

- Metilación con yoduro de metilo
- Reducción de ácidos urónicos con borohidruro de sodio deuterado (Taylor & Conrad, 1972).
- Primera hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA) 0,15 N (1 h a 120 °C) y posterior reducción con borohidruro de sodio deuterado.
- Acetilación con piridina y anhídrido acético (1 h a 100 °C).

- Segunda hidrólisis con TFA 3 N (1 h a 120 °C) y posterior reducción con borohidruro de sodio deuterado.
- Acetilación con piridina y anhídrido acético (1 h a 100 °C).

Las muestras se secaron y se resuspendieron en cloroformo para su posterior análisis mediante GC/MS.

B. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS)

Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en un instrumento Agilent 7980A-5975C equipado con una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,2 mm espesor de la película), con helio (15 psi) como gas portador y aplicando un programa de temperatura: 170 °C (1 min), rampa de 2 °C min⁻¹ hasta 210 °C (1 min). El inyector y la línea de transferencia se mantuvieron a 250°C durante el análisis. Cada uno de los picos del cromatograma se identificó mediante su tiempo de retención y su espectro de masas. La ionización se llevó a cabo por impacto electrónico. De los fragmentos primarios y secundarios obtenidos en el espectro de masas, se dedujo el tipo de sustitución de los monómeros. La cuantificación se realizó atendiendo al área de picos.

5.22. Extracción de lipopolisacáridos extracelulares

Para la extracción de moléculas de naturaleza lipídica secretadas al medio por el hongo se utilizó el método de extracción de factores de nodulación descrito (Roche *et al.*, 1991) con algunas modificaciones.

Para simular condiciones de disponibilidad de nutrientes parecidas a las de la infección, se cultivaron 5 x 10⁶ esporas mL⁻¹ de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta gnt2$ en SM (4.2.2.B) sin glucosa ni amonio, suplementado con 1 % ácido glutámico y 0,2 % sacarosa. Tras 14-18 h de incubación a 28 °C y 170 rpm se recogieron los sobrenadantes de los cultivos mediante filtración con monodur y millipore 0,22 µm y se mantuvieron libres de células.

Las moléculas de naturaleza lipídica se purificaron dos veces consecutivas mediante extracción con 1/5 V de n-butanol. La fracción recogida se secó en rotavapor, se resuspendió en 50 mL de agua destilada y se lavó dos veces con un volumen de etil-acetato. Tras llevar a sequedad se resuspendió en agua y se liofilizó para su posterior análisis mediante SDS-PAGE (5.16.7), visualización mediante tinciones (plata 1.1.1.B ó proQ Emerald 1.1.1.C), y análisis químico GC/MS.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

PAPEL DE LAS N-ACETILGLUCOSAMINA- TRANSFERASAS

6. Genes *N*-acetilglucosamina transferasas

La glicosilación de proteínas y lípidos en células eucariotas es un proceso complejo en el que participan numerosas enzimas. El interés en estas enzimas de glicosilación en *F. oxysporum* surgió de un estudio previo realizado en nuestro laboratorio con un mutante nulo en una sintasa de quitina de la clase V ($\Delta chsV$) (Madrid *et al.*, 2003). En dicho trabajo se descubrió el papel esencial de *chsV* en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, el crecimiento apical y el desarrollo de la patogénesis del hongo, ya que el mutante presentaba defectos en la estructura de la pared e incapacidad de producir marchitez vascular en plantas de tomate.

Un análisis posterior de la expresión de un conjunto de genes responsables de enzimas extracelulares y transferasas en el mutante $\Delta chsV$ durante el proceso de invasión del tejido vegetal (Pareja-Jaime, Tesis Doctoral 2010), reveló niveles de expresión superiores de un gen duplicado FOXG_12436/FOXG_14101 respecto a la estirpe silvestre. Para identificar genes ortólogos en otros hongos se realizó una búsqueda *in silico* en la base de datos www.ncbi.nlm.nih.gov/ basada en la secuencia proteica deducida del gen. Se identificaron los genes Gnt1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Yoko-o *et al.*, 2003) y Gnt1 y Gnt2 de *Coprinopsis cinerea* (Buser *et al.*, 2010) con valores de identidad significativos, responsables de *N*-acetilglucosamina transferasas fúngicas pertenecientes a la familia GT8. Estas enzimas catalizan la adición de *N*-acetilglucosamina (GlcNA) a polisacáridos unidos con enlace *N*-glicosídico a proteínas u otras biomoléculas, formando parte de la ruta de *N*-glicosilación.

6.1. Identificación de parálogos a *gnt* en el genoma de *Fusarium oxysporum*

Para identificar en *F. oxysporum* genes responsables de *N*-acetilglucosamina transferasas ortólogos al Gnt1 de *S. cerevisiae* se realizó un análisis *in silico*. Con la secuencia de aminoácidos deducida de Gnt1 se realizó un análisis blast en la base de datos (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group).

Los resultados obtenidos revelaron la existencia de seis ortólogos a Gnt1 (Tabla 12). Todos ellos mostraron regiones muy conservadas con sitios activos característicos de glicosiltransferasas fúngicas.

Tabla 12. Familia génica de *gnt* en *F. oxysporum*

Gen	Locus	Cromosoma
<i>gnt1</i>	FOXG_01495	5
<i>gnt2</i>	FOXG_12436 y FOXG_14101	3 y 6
<i>gnt3</i>	FOXG_12874	9
<i>gnt4</i>	FOXG_12897	9
<i>gnt6</i>	FOXG_14149	14
<i>gnt7</i>	FOXG_16408	14

El análisis de los dominios conservados en las secuencias de amino ácidos deducidas de *F. oxysporum* y otras de especies fúngicas indicó la existencia de errores en la anotación de los genes *gnt2*, *gnt4*, *gnt6* y *gnt7*, lo que llevó a su curación manual. Para ello se clonaron y secuenciaron los cDNA de dichos genes, y se confirmaron las siguientes modificaciones:

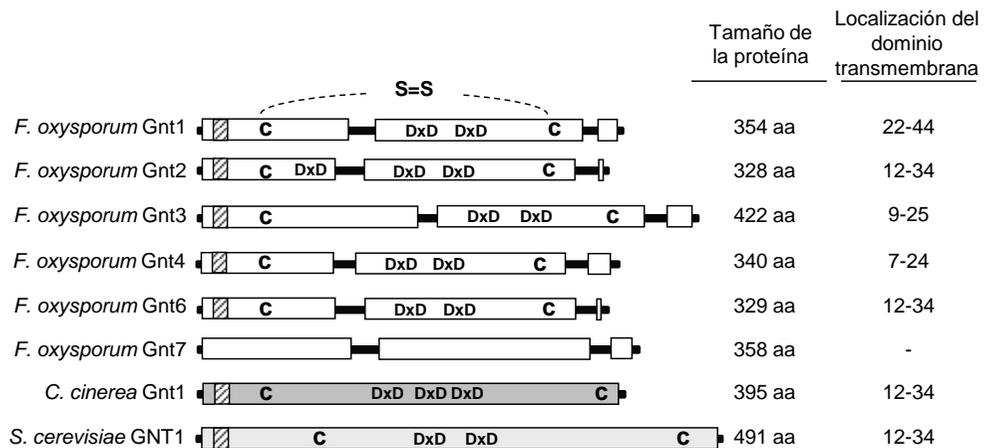
- El codón de inicio del **gen *gnt2*** se localiza 264 pb aguas arriba de lo anotado en la base de datos. Además, este gen posee un segundo intrón de 58 pb situado a 73 pb aguas arriba del fin de mensaje anotado que origina un cambio en la pauta de lectura y aparición de un nuevo fin de mensaje. Estos cambios originan un marco abierto de lectura de 984 pb que determinaría un polipéptido de 328 aa.
- En ***gnt4*** el segundo intrón es de menor tamaño que lo anotado, con una longitud total de 55 pb, seguido del exón 3 que cambia de posición y pasa a tener 63 pb. El nuevo codón fin de mensaje se sitúa 158 pb aguas arriba del anotado. Estos cambios originan un marco abierto de lectura de 1020 pb que determina un polipéptido de 340 aa.
- **El gen *gnt6*** comienza 267 pb aguas arriba del inicio anotado; posee un segundo intrón de 58 pb localizado 70 pb antes del fin de mensaje, que origina un cambio en la fase abierta de lectura y la aparición de un nuevo codón fin de mensaje 26 pb aguas arriba de lo anotado. Estos cambios dan lugar a un marco abierto de lectura de 987 pb que determina un polipéptido deducido de 329 aa.
- En ***gnt7*** el primer intrón tiene 78 pb (126 pb menor que lo anotado en la base de datos). Este cambio origina un nuevo marco de lectura de 1.074 pb que determina un polipéptido de 358 aa.

El alineamiento de las secuencias de amino ácidos deducidas de los genes *gnt* mostró un grado de identidad entre 51,5-97,6 % (Tabla 13), siendo en el caso de *gnt2* y *gnt6* del 97,6 % (Tabla 13).

Tabla 13. Identidad entre las proteínas deducidas Gnt de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Gnt2	Gnt3	Gnt4	Gnt6	Gnt7	
65,2 %	55,8 %	59,5 %	65,2 %	89,5 %	Gnt1
	52,5 %	58,4 %	97,6 %	64,6 %	Gnt2
		52,8 %	51,5 %	55,6 %	Gnt3
			58,7 %	60,7 %	Gnt4
				64,5 %	Gnt6

A



B

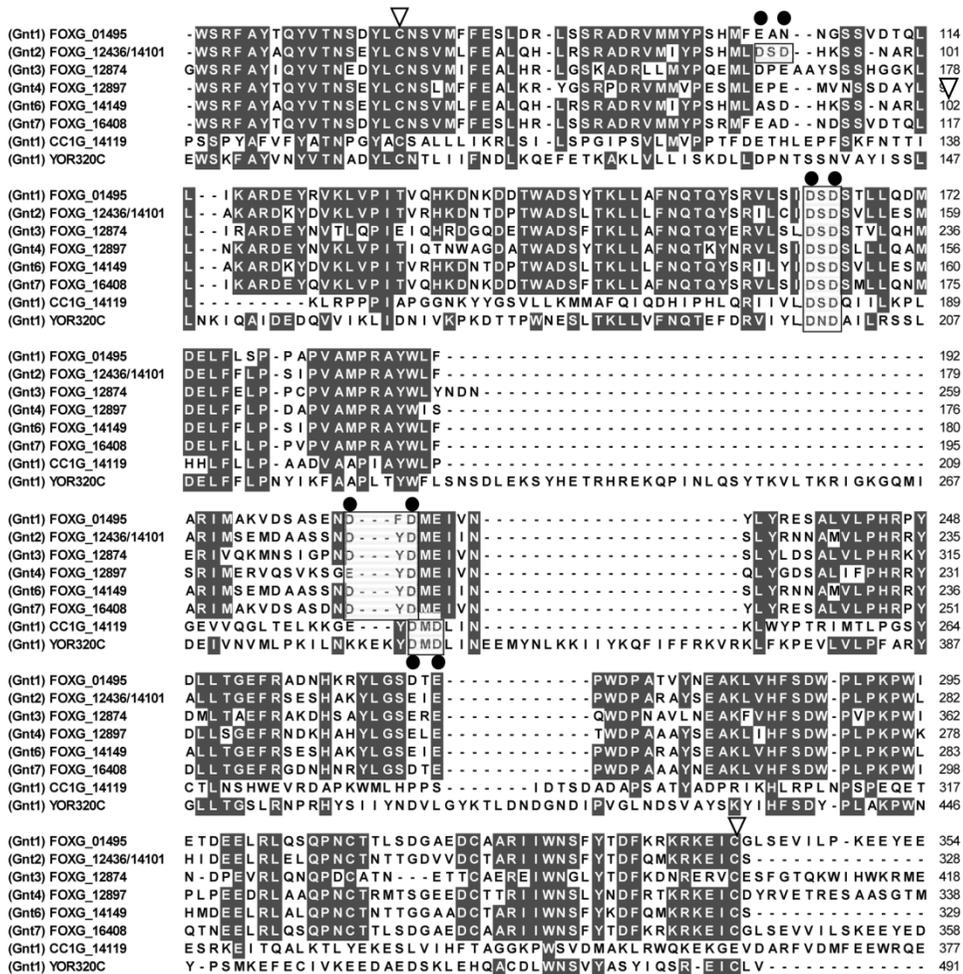


Figura 17. A) Alineamiento de las proteínas Gnt deducidas en *F. oxysporum*, *S. cerevisiae* (YOR320C) y *C. cinerea* (CC16408-14119) indicando las regiones conservadas: dominio transmembrana (cuadrado rayado), cisteínas (C) y sitio activo DxD. B) Alineamiento de las secuencias e identificación de regiones conservadas: cisteínas (▽) dominios DxD y aa que actúan en la unión a iones metálicos (●).

Las proteínas deducidas presentan dominios estructurales y funcionales característicos de *N*-acetilglucosamina transferasas (Figura 17). Estas secuencias conservadas son: dominio transmembrana con un solo paso (tipo II) en su extremo amino, dos o tres sitios activos DxD esenciales para la unión a

caciones (sitio catalítico), y residuos cisteínas que permiten la formación de puentes disulfuro resultando una conformación de horquilla.

6.2. Análisis filogenético

Para evaluar la distribución y el grado de conservación entre los genes *gnt*, se realizó un análisis filogenético basado en las secuencias proteicas deducidas de *gnts*, de especies de hongos filamentosos, ortólogas a Gnt2 de *F. oxysporum*. Se seleccionaron veinte secuencias de diez especies pertenecientes al género *Fusarium* y otras de patógenos vegetales, además de la levadura *S. cerevisiae* y del basidiomiceto *Coprinopsis cinerea*. Se estableció como criterio selectivo que la identidad fuera superior al 31 % y la conservación de todos los dominios característicos de estas proteínas.

El árbol filogenético presentó dos clados principales, uno que incluía Gnt1, Gnt2, Gnt4, Gnt6 y Gnt7 de *F. oxysporum* con sus ortólogos más próximos de *F. verticilloides* y *F. graminearum*, y otro con Gnt3 y sus ortólogos de *F. verticilloides* y *F. graminearum* (Figura 18).

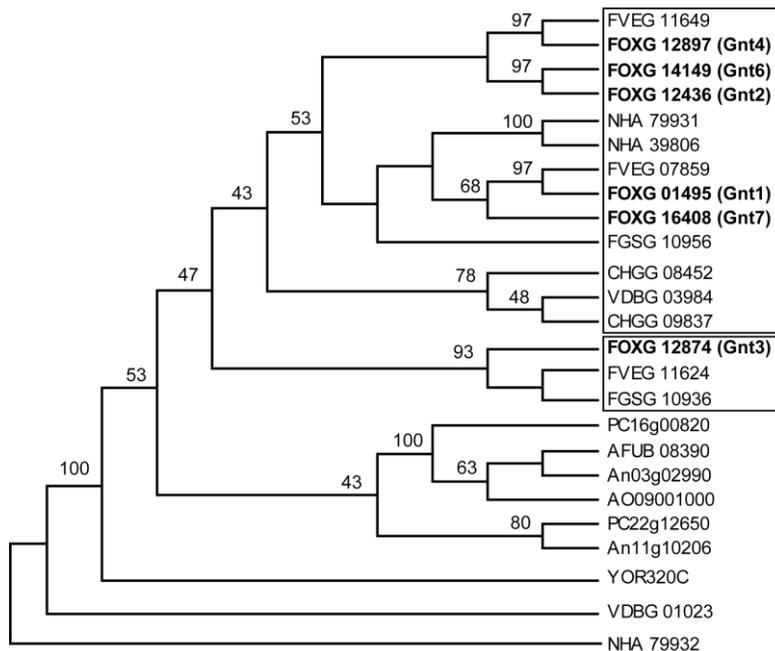


Figura 18. Árbol filogenético construido a partir del alineamiento de proteínas Gnt con W-clustal formado por 148 aa, usando el método de Neighbor-joining, el modelo de sustitución LG y el valor optimizado de parámetro gamma 0,87. La nomenclatura utilizada es: FOXG: *F. oxysporum*; FVEG: *F. verticilloides*; FGSG: *F. graminearum*; CHGG: *Chaetomium globosum*; AF: *Aspergillus fumigatus*; An: *A. niger*; AO: *A. oryzae*; NHA: *Nectria haematococca* y YOR: *S. cerevisiae*.

En todas las especies analizadas se han identificado uno o dos genes *gnt*, salvo tres en *F. verticilloides*. Esto contrasta con la familia génica identificada en *F. oxysporum* integrada por seis genes localizados en cinco cromosomas distintos.

6.3. Análisis *in silico* de genes de la ruta de O- y N-glicosilación en *F. oxysporum*

Con el objetivo de estudiar el grado de conservación de proteínas implicadas en N- y O-glicosilación, se llevó a cabo un análisis *in silico* de secuencias ortólogas a las proteínas de *S. cerevisiae*, cuyas rutas de glicosilación están bien identificadas. Se realizó un análisis blast en la base de datos: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html utilizando la herramienta blast_p y como secuencias de búsqueda las obtenidas de la base de datos <http://www.yeastgenome.org/>.

Las rutas de N-glicosilación localizadas en el retículo endoplásmico (RE) se encuentran muy conservadas en eucariotas, mientras que las etapas del aparato de Golgi (AG), que corresponden con la glicosilación terminal, difieren entre organismos. Por el contrario la O-glicosilación es más variable y en algunos organismos, como *S. cerevisiae*, tiene lugar fundamentalmente en el lumen del AG, a excepción de la adición de la primera manosa realizada por proteínas de la familia Pmt en RE.

Las 67 proteínas que participan en glicosilación de proteínas desempeñan las siguientes funciones:

- Transferencia de monosacáridos
- Escisión de monosacáridos
- Translocación de moléculas
- Transporte de monosacáridos
- Transporte de proteínas
- Estabilización y retención de otras proteínas
- Chaperonas
- ATPasa

Los resultados obtenidos en el análisis, basado en el criterio de aceptación de secuencias ortólogas con valores *E* inferiores a 10^{-9} , se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Genes implicados en glicosilación de proteínas en *S. cerevisiae* y sus ortólogos de *F. oxysporum*. LS, localización subcelular. C, citoplasma. RE, retículo endoplásmico. AG, aparato de Golgi.

Proteína	<i>S. cerevisiae</i>			<i>F. oxysporum</i>	
	Gen	Función	Gen	E-value	LS
Hoc1	YJR075W	α -1,6 manosiltransferasa implicada en biogénesis de pared en <i>N</i> -glicosilación	FOXG_06111	0	AG
			FOXG_03626	$3 e^{-30}$	
			FOXG_10373	$3 e^{-28}$	
Ire 1	YHR079C	Serina-treonina quinasa y endoribonucleasa	FOXG_08844	0	RE
Kar2	YJL034W	ATPasa y chaperona implicada en transporte en RE	FOXG_06136	0	RE
Kre2/ Mnt1	YDR483W	α -1,2 manosiltransferasa en <i>O</i> - y <i>N</i> -glicosilación	-	-	AG
Kre5	YOR336W	UDP glucosa:glucosiltransferasa en <i>N</i> -glicosilación	FOXG_03728	$1,37 e^{-19}$	RE
Kre6	YPR159W	Glucosidasa	-	-	RE
Ktr1	YOR099W	α -1,2 manosiltransferasa en <i>O</i> - y <i>N</i> -glicosilación	FOXG_08407	0	AG
			FOXG_06418	$5,06 e^{-37}$	
Ktr2	YKR061W	Manosiltransferasa en <i>N</i> -glicosilación	-	-	AG
Ktr3	YBR205W	α -1,2 manosiltransferasa en <i>O</i> - y <i>N</i> -glicosilación	-	-	AG
Ktr4	YBR199W	Manosiltransferasa en <i>N</i> -glicosilación	FOXG_01521	-	AG
Ktr5	YNL029C	α -1,2 manosiltransferasa en <i>N</i> -glicosilación	FOXG_10333	0	AG
Ktr6/ Mnn6	YPL053C	Manosiltransferasa implicada en síntesis de <i>N</i> -glicanos	-	-	AG
Ktr7	YIL085C	α -1,2 manosiltransferasa implicada en <i>O</i> -y <i>N</i> -glicosilación	-	-	AG
Mnl1	YHR204W	α -1,2 exomanosidasa, forma complejo con Pdi1, escinde la 8ª manosa y produce Man ₇ GlcNAc para su degradación en el proteosoma	FOXG_05493	$4,9 e^{-23}$	RE
Mnn1	YER001W	α -1,3 manosiltransferasa implicada en <i>O</i> -glicosilación (4ª manosa) y <i>N</i> -glicosilación	FOXG_05718	$1,3 e^{-15}$	AG
			FOXG_12231	$1,3 e^{-9}$	
Mnn2	YBR015C	α -1,2 manosiltransferasa, añade la 1ª manosa ramificada	FOXG_12373	$2,6 2^{-39}$	AG
Mnn4	YKL201C	Regulador de mnn6	-	-	AG
Mnn5	YJL186W	α -1,2 manosiltransferasa en <i>cis</i> -Golgi, añade la 2ª manosa ramificada al <i>core</i> de <i>N</i> -glicanos y a la mantriosa de <i>O</i> -glicanos	-	-	AG
Mnn8/ Anp1	YEL036C	Subunidad del complejo α -1,6 manosiltransferasa implicada en elongación de <i>N</i> -glicanos	FOXG_11346	0	AG
			FOXG_05317		
Mnn9	YPL050C	Subunidad del complejo α -1,6 manosiltransferasa implicada en elongación de <i>N</i> -glicanos	FOXG_01971	0	AG
Mnn10	YDR245W	Subunidad del complejo α -1,6 manosiltransferasa implicada en elongación de <i>N</i> -glicanos	FOXG_01933	0	AG
Mnn11	YJL183W	Subunidad del complejo α -1,6 manosiltransferasa implicada en elongación de <i>N</i> -glicanos	FOXG_13822	$1,4 e^{-22}$	AG

Tabla 14. (continuación)

<i>S. cerevisiae</i>			<i>F. oxysporum</i>		
Proteína	Gen	Función	Gen	E-value	LS
Mns1	YJR131W	α -1,6 manosidasa, escinde la 1ª manosa generando Man ₆ GlcNAc ₂ en N-glicosilación	FOXG_00435	0	RE
Mnt3	YIL014W	α -1,3 manosiltransferasa, añade la 4ª y 5ª manosa a O-glicanos	-	-	AG
Mnt4	YNR059W	α -1,3 manosiltransferasa, dispensable en O-glicosilación	-	-	AG
Och1	YGL038C	Manosiltransferasa, elonga N-glicanos añadiendo las 1ª α -1,6 manosa en <i>cis</i> -Golgi	FOXG_06111	0	AG
Ost1	YJL002C	Subunidad α del complejo oligosacariiltransferasa (OST) en N-glicosilación	FOXG_00557	5,6 e ⁻⁴⁵	RE
Ost2	YOR103C	Subunidad ϵ del complejo oligosacariiltransferasa (OST) en N-glicosilación	FOXG_01713	1,9 e ⁻¹⁸	RE
Ost3	YOR085W	Subunidad γ del complejo oligosacariiltransferasa (OST) en N-glicosilación	FOXG_05558	8,7 e ⁻¹⁸	RE
Ost4	YDL232W	Subunidad del complejo oligosacariiltransferasa (OST) en N-glicosilación	-	-	RE
Ost5	YGL226C	Subunidad z del complejo oligosacariiltransferasa (OST) en N-glicosilación	-	-	RE
Ost6	YML019W	Subunidad del complejo oligosacariiltransferasa (OST) en N-glicosilación	-	-	RE
Pcm1	YEL058W	N-acetilglucosamina-fosfato mutasa, convierte GlcNAc-6P en GlcNAc-1-P, implicada en biosíntesis de quitina, N-glicoproteínas y anclaje GPI	FOXG_00256	0	C
Pdi1	YCL043C	Proteína multifuncional con actividad disulfito isomerasa, para la formación de puentes disulfuro. Forma complejo con Mnl1, escinde la 8ª manosa y produce Man ₇ GlcNAc ₂ para su degradación en el proteosoma	FOXG_00140	0	RE
Pmr1/ SSC1	YGL167C	ATPasa dependiente de Ca ²⁺	-	-	AG
Pmt1	YDL095W	O-manosiltransferasa	FOXG_03668	0	RE
Pmt2	YAL023C	O-manosiltransferasa	FOXG_11176	0	RE
Pmt3	YOR321W	O-manosiltransferasa	-	-	RE
Pmt4	YJR143C	O-manosiltransferasa	FOXG_00440	0	AG
Pmt5	YDL093W	O-manosiltransferasa	-	-	AG
Pmt6	YGR199W	O-manosiltransferasa	-	-	AG
Png1	YPL096W	N-glicanasa, necesaria para la de-glicosilación de proteínas incorrectamente plegadas	FOXG_01189	0	C
Qri1	YDL103C	UDP-N-acetilglucosaminapirifosforilasa, en N-glicosilación y anclaje GPI	FOXG_00832	0	C
Rft1	YBL020W	Flipasa, translocación de Man ₆ GlcNAc ₂ -PP-Dol del lado citoplásmico al lado luminal del RE	FOXG_10617	0	RE
Sec59	YMR013C	Dolicol quinasa, biosíntesis de Dol-P en N-glicosilación	FOXG_07836	4,9 e ⁻¹⁹	RE

Tabla 14. (continuación)

<i>S. cerevisiae</i>			<i>F. oxysporum</i>		
Proteína	Gen	Función	Gen	E-value	LS
Stt3	YGL022W	Subunidad del complejo de oligosacariltransferasa (OST) en <i>N</i> -glicosilación	FOXG_00621	0	RE
Van1	YML115C	α -1,6 manosiltransferasa en <i>N</i> -glicosilación	FOXG_05317	0	AG
Vrg4/ Van2	YGL225W	Transportador de GDP-manosa	FOXG_10351 FOXG_145011	0 0	AG
Yur1	YJL139C	α -1,2 manosiltransferasa en <i>N</i> -glicosilación	-	-	AG

La búsqueda reveló la ausencia de 17 ortólogas en *F. oxysporum* que participarían en rutas de glicosilación (Tabla 15). Además, como muestra la Tabla 15, algunas de las proteínas parálogas con función redundante en *S. cerevisiae*, como las manosiltransferasas Ktr2, Ktr6 y Yur1 que participan en *N*-glicosilación en AG y las *O*-manosiltransferasas de RE Pmt2 y Pmt3, también estaban ausentes.

Tabla 15. Proteínas ausentes (marcadas en color azul en Tabla 14) en *F. oxysporum* que participan en rutas de glicosilación.

Proteínas del RE	Proteínas del AG
Ost4 (N)	Ktr2, Ktr6 y Yur1 (N)
Ost5 (N)	Ktr3 (O, N)
Ost6 (N)	Ktr7 (O, N)
Pmt2 y Pmt3 (O)	Mnn4 (N)
	Mnn5 (N,O)
	Mnt3 (O)
	Mnt4 (O)
	Pmr1
	Pmt5 (O)
	Pmt6 (O)

(N) *N*-glicosilación

(O) *O*-glicosilación

Estas proteínas ausentes, se localizan en su mayoría en el AG y participan en la elongación de *N*-glicanos de polimanoosa ó en O-glicosilación. Cabe resaltar la ausencia de tres subunidades del complejo OST implicado en la translocación de la molécula de dolicol-P y de las manosiltransferasas Pmt2 y Pmt1 del RE.

Por otro lado, *F. oxysporum* también presenta redundancia funcional en proteínas del AG implicadas en *N*-glicosilación (Hoc1, Mnn8, Gtr1, Gnt1, Mnn1), y en biosíntesis de GDP-manosa (Alg4) y de UDP-GlcNAc (Gna1).

7. Delección dirigida de los genes *gnt2*. Caracterización molecular y complementación de los mutantes

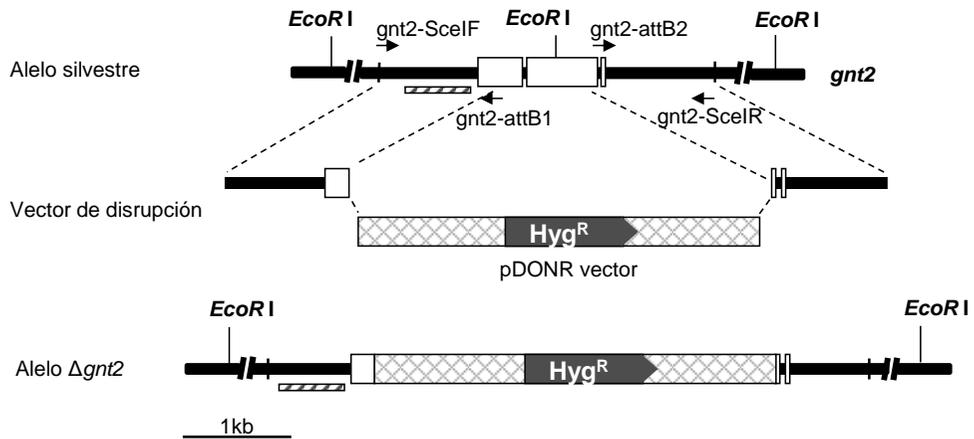
La alteración del proceso glicosilación mediante delección de genes que codifican enzimas implicadas en este proceso y el estudio de los cambios producidos que afectan a la célula, permite analizar el papel biológico de dichas enzimas. Nuestro trabajo se ha centrado en analizar *gnt2* en *F. oxysporum* generando un mutante con ambas copias del delecionadas. Para ello se construyó un vector mediante el método DelsGate (5.9) donde la región codificante del gen quedaba sustituida por el vector pDONR portador del casete de resistencia a higromicina (Figura 19 A).

La selección de transformantes Hyg^R permitió aislar un mutante con ambos alelos delecionados. Los transformantes Hyg^R se analizaron mediante *Southern* tras tratamiento doble del ADN_g con *EcoR* I y *Xho* I e hibridación con una sonda del promotor del gen, presente tanto en el silvestre como en el mutante. En la estirpe silvestre se identificaron dos bandas de 3,5 y 2kb correspondientes a los genes *gnt2* y *gnt6*, respectivamente. En el transformante $\Delta gnt2$ (#55) la banda de 3,5 kb fue sustituida por una de 7 kb (Figura 19 B). El transformante #46 mostró una inserción ectópica del vector de transformación.

La complementación del mutante $\Delta gnt2$ (#55) se realizó mediante cotransformación de protoplastos con el casete Phle^R y un fragmento de ADN genómico conteniendo el alelo silvestre *gnt2* obtenido al amplificar con los oligonucleótidos *gnt2*-7 y *gnt2*-3 (Tabla 4).

Los transformantes Phle^R se analizaron mediante *Southern* y se identificaron aquellos que habían insertado dos copias del alelo *gnt2* (transformante #6) (Figura 19B).

A



B

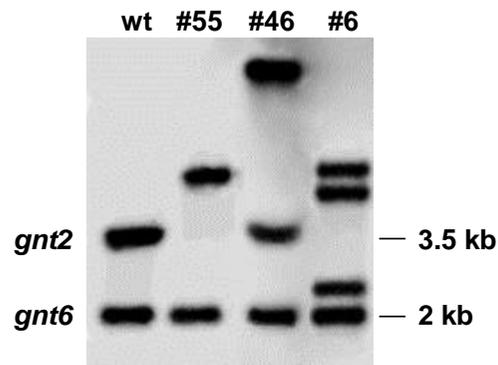


Figura 19. Deleción del gen *gnt2* y complementación del mutante obtenido. A) Mapa de restricción de la región genómica conteniendo el alelo *gnt2* silvestre, y del vector de deleción construido con el método DelsGate. Las flechas indican la posición y dirección de los oligonucleótidos empleados para la construcción del vector. La barra corresponde a la sonda empleada en el análisis *Southern*. B) Resultado del *Southern* del ADNg de las estirpes indicadas tratado con *EcoR* I y *Xho* I e hibridado con la sonda indicada. $\Delta gnt2$ (#55), ectópico (#46) y complementado con dos copias del gen (#6).

8. Caracterización fenotípica del mutante $\Delta gnt2$

8.1. Comportamiento patotípico de los mutantes $\Delta gnt2$ y $\Delta gnt2::gnt2$

Para determinar el papel de *gnt2* en la virulencia de *F. oxysporum*, se llevaron a cabo ensayos de infección de raíces de plantas de tomate y de larvas de polilla de la cera *Galleria mellonella*.

Se inocularon plantas de dos semanas, mediante inmersión de sus raíces durante 30 min en una suspensión microconidial de la estirpe silvestre, el mutante $\Delta gnt2$ y la complementada $\Delta gnt2::gnt2$. A continuación, se sembraron en vermiculita y se evaluó el desarrollo de la enfermedad durante las 2-3 semanas posteriores.

Para la infección de *G. mellonella* se utilizaron 12 larvas de entre 0,2-0,3 g de peso por tratamiento, y se inocularon mediante inyección dentro del hemocele de $1,6 \times 10^5$ conidias en un volumen de 8 μ L. La supervivencia de las plantas y las larvas infectadas con las tres estirpes se calculó mediante el método de Kaplan-Meier y los resultados se representaron en porcentaje de supervivencia, que permite comparar de forma simplificada y objetiva la virulencia de las estirpes (Lopez-Berges *et al.*, 2013; Navarro-Velasco *et al.*, 2011).

Las plantas inoculadas con la estirpe silvestre presentaron los síntomas característicos de marchitez vascular diez días después de la inoculación. La severidad de los síntomas incrementó a lo largo del tiempo y la mayoría de las plantas habían muerto veinte días tras la inoculación. Por el contrario, las plantas infectadas con el mutante $\Delta gnt2$ mostraron un retraso en la progresión de la enfermedad quedando el 90 % de plantas vivas a los 30 días post-evaluados. El mutante complementado presentó valores de desarrollo de la enfermedad muy similares a la estirpe silvestre (Figura 20 A). Por otro lado, el proceso de infección en *G. mellonella* se caracteriza por una melanización progresiva del individuo hasta alcanzar la muerte. Se observó un retraso en el desarrollo de la enfermedad en individuos infectados con esporas del mutante, respecto a los del silvestre. Todos los individuos inoculados con la estirpe silvestre habían muerto cuatro días tras la inoculación, mientras que en los inoculados con la estirpe mutante, ocho días tras la inoculación, aún quedaban un 13 % de individuos vivos (Figura 20 B).

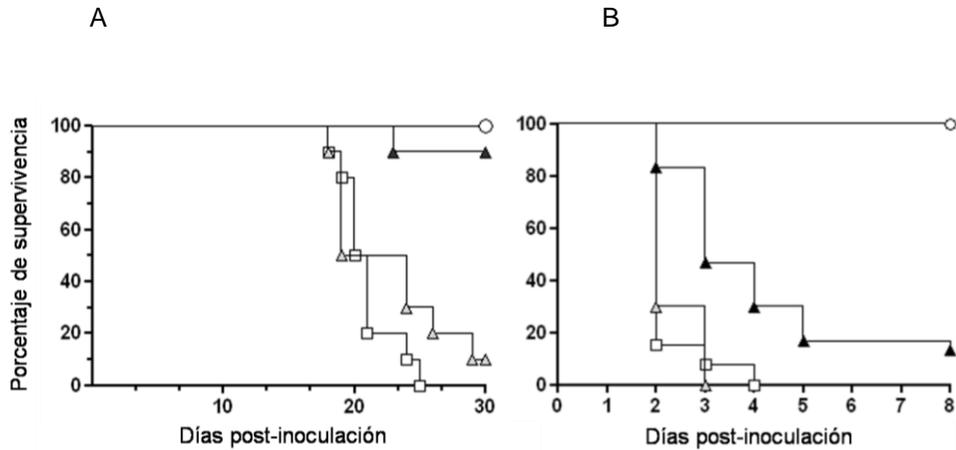


Figura 20. Comportamiento patotípico de los mutantes $\Delta gnt2$ y $\Delta gnt2::gnt2$ A) sobre plantas de tomate (cv. Monika) y B) en lavas de *G. mellonella*. Se indican los porcentajes de supervivencia. Los símbolos se refieren a plantas inoculadas con la estirpe silvestre 4287 (□), $\Delta gnt2$ (▲), $\Delta gnt2::gnt2$ (▲) y el control no inoculado (○). Se representan los valores obtenidos en un experimento representativo.

En ambos casos se observaron diferencias significativas en el desarrollo de la enfermedad entre el silvestre y el mutante, cuyos valores de P resultaron inferiores a 0,05 en el test de Mantel-Cox, mientras que no las hubo entre los individuos inoculados con la estirpe silvestre y el complementado.

Para evaluar la capacidad de invasión de la planta por el mutante $\Delta gnt2$ se cuantificó la biomasa fúngica en los tejidos vegetales. Para ello se realizó PCR a tiempo final del ADNg extraído de raíces y tallos tres, cinco, diez y quince días tras la inoculación con esporas de cada estirpe, utilizando cebadores específicos del gen *chsV* de *F. oxysporum* (Madrid *et al.*, 2003). Como control del ADNg de planta se utilizaron cebadores específicos del gen *tomQB* (β -1,3 glucanasa) de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Tabla 5).

No se observaron diferencias significativas en la colonización de los tejidos radiculares, siendo la amplificación similar en todas las estirpes analizadas (Figura 21). En cambio, el mutante $\Delta gnt2$ mostró retraso en la colonización de los tallos con respecto al silvestre, en las primeras etapas de colonización (3-10 días). El silvestre había colonizado eficientemente los tejidos del tallo tras cinco-diez días, mientras el doble mutante lo hacía tras quince días.

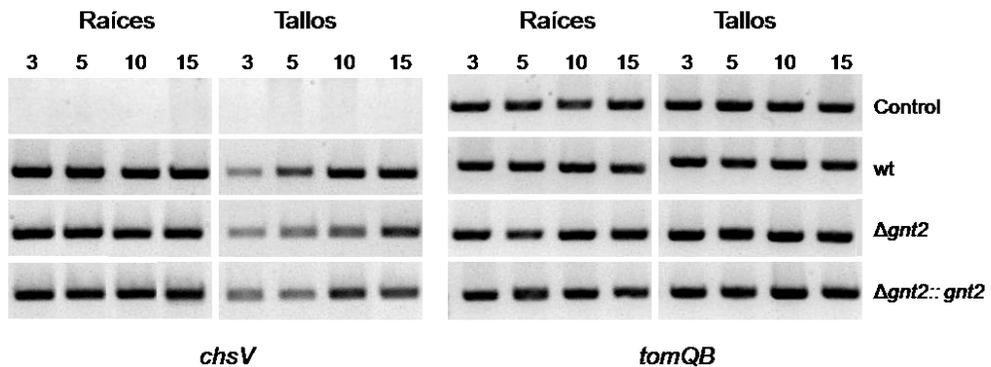


Figura 21. PCR a tiempo final de los genes *chsV* (*Fusarium*) y *tomQB* (tomate) sobre ADNg total extraído de tallos y raíces sin infectar (control) o infectados con la estirpe silvestre (wt), el mutante $\Delta gnt2$ o la estirpe complementada $\Delta gnt2::gnt2$, a los 3, 5, 10 o 15 días tras la inoculación.

8.2. Aglutinación y fusión de hifas

La fusión vegetativa es un proceso que ocurre durante la germinación de conidias y el crecimiento de las hifas en hongos filamentosos, dando lugar a un micelio septado con una compleja red de hifas intercomunicadas (Roca *et al.*, 2005).

Para determinar si existían diferencias en la capacidad de fusión del mutante $\Delta gnt2$ respecto al silvestre, se analizó la aglutinación tras 30 h de incubación mediante observación en estereoscopio (Figura 22 A). En medio de aglutinación la estirpe silvestre presentó un alto grado de aglutinación formando un micelio aglomerado y muy cohesionado, que no se disgregó tras 15 s de agitación fuerte. En cambio, se observó una reducción significativa en el doble mutante, cuyo micelio mostraba un aspecto poco compacto y disperso. La estirpe complementada recuperó el fenotipo silvestre formando aglomerados de micelio muy cohesionados. La cuantificación mediante observación al microscopio de los puentes de fusión entre hifas adyacentes reveló un 40 % de hifas fusionadas en la estirpe silvestre. El doble mutante presentó un 50 % menos de fusión mostrando una reducción estadísticamente significativa con un p-valor inferior a 0,05 en el test *T-Student*, y el complementado alcanzó el 84% de fusiones (Figura 22 B), ambos respecto al silvestre.

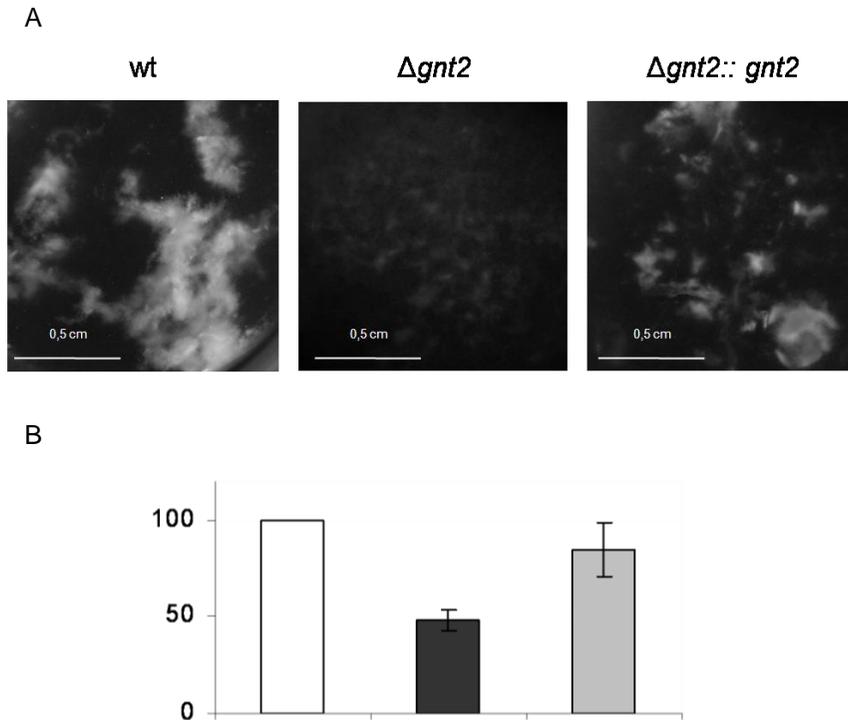


Figura 22. Fusión vegetativa entre hifas. A) Imágenes de micelio de la estirpe silvestre (wt), el doble mutante ($\Delta gnt2$) y el complementado ($\Delta gnt2:: gnt2$), en condiciones de aglutinación tomadas al estereoscopio Leica XZ FLIII con magnificación 5X. B) Número de fusiones entre hifas expresado en porcentaje respecto al silvestre. Se representa wt (blanco), mutante $\Delta gnt2$ (gris oscuro) y complementado (gris claro).

8.3. Sensibilidad a estrés térmico

La temperatura es un factor que afecta al crecimiento del hongo, y su capacidad de adaptación a temperaturas elevadas está relacionada con respuestas metabólicas como producción de proteasas, proteínas reguladoras y chaperonas, proporcionando termoestabilidad al metabolismo celular (Morimoto, 1998).

Para evaluar la adaptación del mutante a condiciones de estrés térmico se cultivaron las estirpes del hongo a 35 °C durante 7 días, o a 28 °C como control, durante 3 días. Los resultados mostraron menor crecimiento del silvestre a 35 °C, con colonias más compactas que en condiciones óptimas, y la incapacidad del mutante de crecer a esta temperatura. La estirpe complementada mostró una recuperación parcial del fenotipo silvestre.

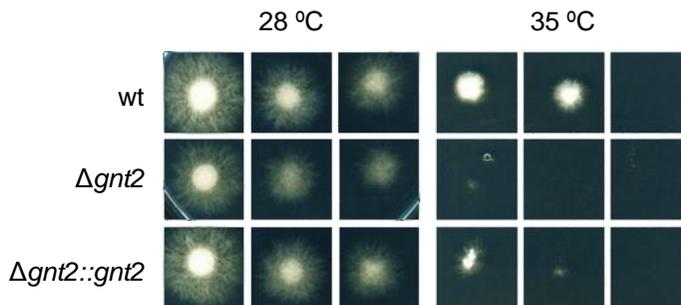


Figura 23. Crecimiento a 28 °C y en condiciones de estrés térmico (35 °C), en medio SM, de la estirpe silvestre (wt), el doble mutante ($\Delta gnt2$) y el complementado ($\Delta gnt2::gnt2$). Se inocularon suspensiones de 10^3 , 5×10^2 y 10^2 microconidias (de izquierda a derecha).

9. Localización subcelular de la proteína Gnt2

La proteína Gnt1 de *S. cerevisiae* ha sido funcionalmente caracterizada como proteína anclada a membrana del aparato de Golgi que pertenece al conjunto de enzimas de *N*-glicosilación. El análisis de las características estructurales de su ortólogo Gnt2 en *F. oxysporum* reveló la presencia de dominios transmembrana de un solo paso en el extremo amino terminal entre los aminoácidos C₁₂ y P₃₄, así como una posible señal de retención en Golgi.

Para investigar la localización subcelular de Gnt2 se procedió a etiquetar a dicha proteína mediante fusión traduccional con la proteína verde fluorescente (GFP) y se analizaron los transformantes obtenidos mediante microscopía de fluorescencia e inmunoensayos de las fracciones subcelulares tras fraccionamiento subcelular por ultra centrifugación.

9.1. Obtención de mutantes portadores de la fusión traduccional GFP::*Gnt2*

Se obtuvieron estirpes portadoras de la construcción GFP::*Gnt2*, en los fondos genéticos wt y $\Delta gnt2$, obtenidas mediante fusión de la ORF de *gnt2* en su extremo 5' a la ORF de la proteína verde fluorescente GFP de *Aequorea victoria* y bajo la regulación del promotor y terminador del gen *gpdA* de *Aspergillus nidulans*, utilizando el plásmido p1902 cedido por el Prof. M. Peñalva (CIB-CSIC) (Figura 24).

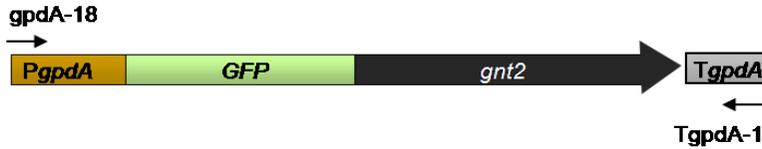


Figura 24. Construcción para el etiquetado de Gnt2 fusionado a GFP.

El escrutinio e identificación de mutantes que habían integrado la construcción en su genoma y expresaban la proteína fusionada GFP::Gnt2 se realizó por la fluorescencia detectada mediante microscopía óptica de, lo cual permitió seleccionar los transformantes que mostraron fluorescencia estable y características morfológicas y fisiológicas normales.

9.2. Efecto de la brefeldina A sobre mutantes GFP::Gnt2

El tratamiento con Brefeldina A interrumpe de forma reversible el tráfico vesicular entre el RE y AG ocasionando disgregación de los sáculos (Figura 25) (Chege & Pfeffer, 1990). Con la finalidad de observar posibles cambios en la distribución de la fluorescencia que permitieran localizar la proteína GFP::Gnt2 en el AG, las germínulas de los transformantes GFP::Gnt2 fueron tratadas con brefeldina A durante periodos de 5-90 min.

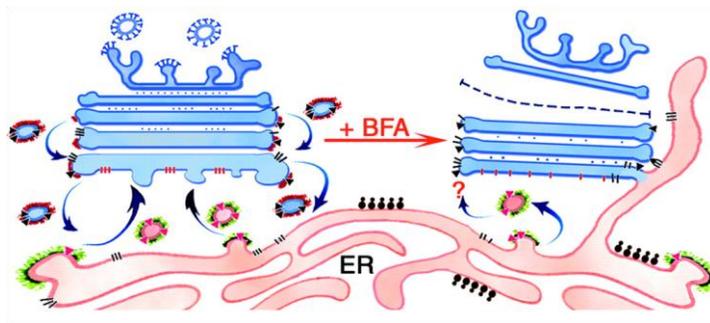


Figura 25. Efecto de la brefeldina A sobre la estructura y el tráfico vesicular entre AG y RE.

La observación al microscopio de fluorescencia reveló la presencia de acúmulos en distintos compartimentos intracelulares en ambas estirpes (wt y $\Delta gnt2$), sugiriendo la localización de la proteína en compartimentos discretos.

Estos puntos de fluorescencia se desagregaron en otros de menor tamaño tras el tratamiento con Brefeldina A (Figura 26).

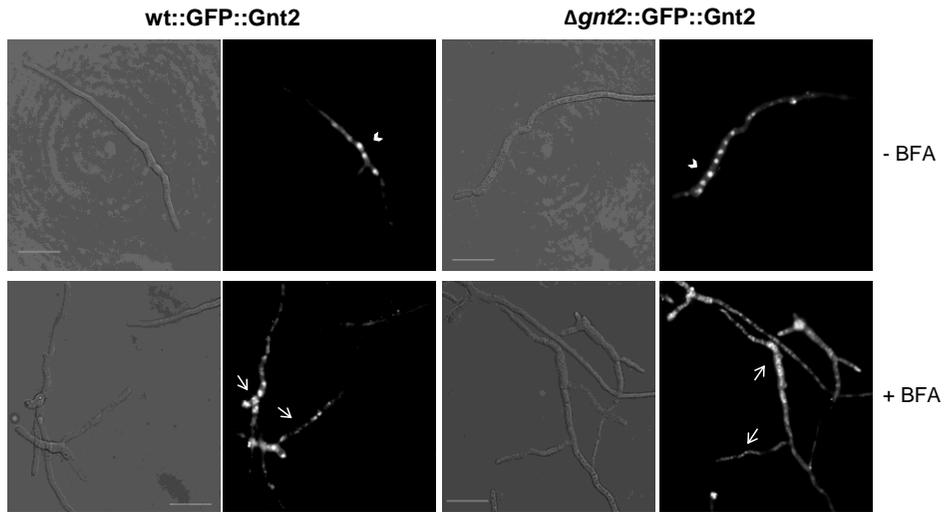


Figura 26. Efecto de la brefeldina A sobre la distribución de fluorescencia en los transformantes GFP::Gnt2. Imágenes de microscopía de fluorescencia de hifas sin brefeldina (-BFA) y tratadas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brefeldina (+BFA) tras 5 min de incubación.

Este resultado indica la desorganización del AG dentro de la célula como efecto del tratamiento con Brefeldina A. Ello provoca una dispersión de la fluorescencia observada que implica que la proteína de fusión GFP::Gnt2 también sufre modificación en su distribución celular. Este resultado sugiere que Gnt2 es una proteína residente en las cisternas del Golgi.

9.3. Fraccionamiento subcelular y análisis de las fracciones enriquecidas en Golgi

Para confirmar la localización subcelular de Gnt2, se llevó a cabo la separación de membranas y orgánulos celulares en función de su masa y densidad mediante centrifugación diferencial que permitió obtener fracciones separadas enriquecidas en vesículas de Golgi (AG) y en retículo endoplásmico (RE).

Tras obtener lisados celulares de hifas del hongo portadoras de la fusión GFP::Gnt2 en fondo wt y Δgnt2 , los homogéneos se sometieron a centrifugación secuencial a baja velocidad hasta la obtención de fracciones solubles que contenían una mezcla de orgánulos celulares. Posteriormente estas fracciones se sometieron a ultracentrifugación de equilibrio en gradiente de densidad de sacarosa (26-54 %) (Figura 27). Las fracciones obtenidas se detallan en la Tabla 16.

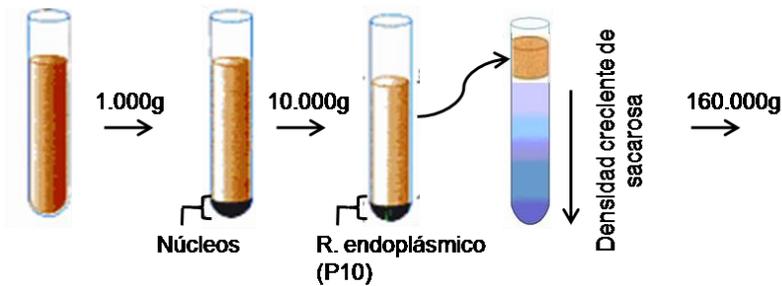


Figura 27. Proceso de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial y ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

Tabla 16. Fracciones obtenidas mediante fraccionamiento subcelular.

	Velocidad	Fracción	Componentes
Centrifugación diferencial	1.000g	Precipitado	Núcleos
	10.000g	Precipitado (P10)	Reticulo endoplásmico Membrana plasmática
Centrifugación en gradiente de sacarosa	160.000g	Sobrenadante (S1-S14)	Citosol Aparato de Golgi Ribosomas y polirribosomas pequeños
	160.000g	Precipitado (P160)	Polirribosomas Restos de membrana plasmática y RE

Las fracciones colectadas se analizaron para determinar las enriquecidas en AG y comprobar la presencia de GFP::*Gnt2*.

La identificación de fracciones se realizó utilizando como marcadores específicos del AG y RE las actividades enzimáticas GDPasa y Cyt C reductasa, respectivamente.

Como era de esperar, en ambas estirpes se detectó mayor actividad Cyt C reductasa en la fracción P10, y menor actividad en las fracciones S1 a S14 y P160, con niveles residuales de RE en esta última. Las fracciones S1, S2 y S3 de ambas estirpes mostraron mayor actividad GDPasa, con un pico en la

fracción S2 que se identificó como la mayoritaria enriquecida en AG (Figura 28 A).

A continuación se realizó un análisis *Western* de las proteínas presentes en las fracciones purificadas, utilizando el anticuerpo específico anti-GFP. Como era de esperar, en ambas estirpes se detectó una banda de 64,8 kDa correspondiente a la proteína de fusión monomérica GFP::*Gnt2* en las fracciones S1, S2 y S3, siendo más abundante en S2, confirmando su co-localización en el AG (Figura 28 B).

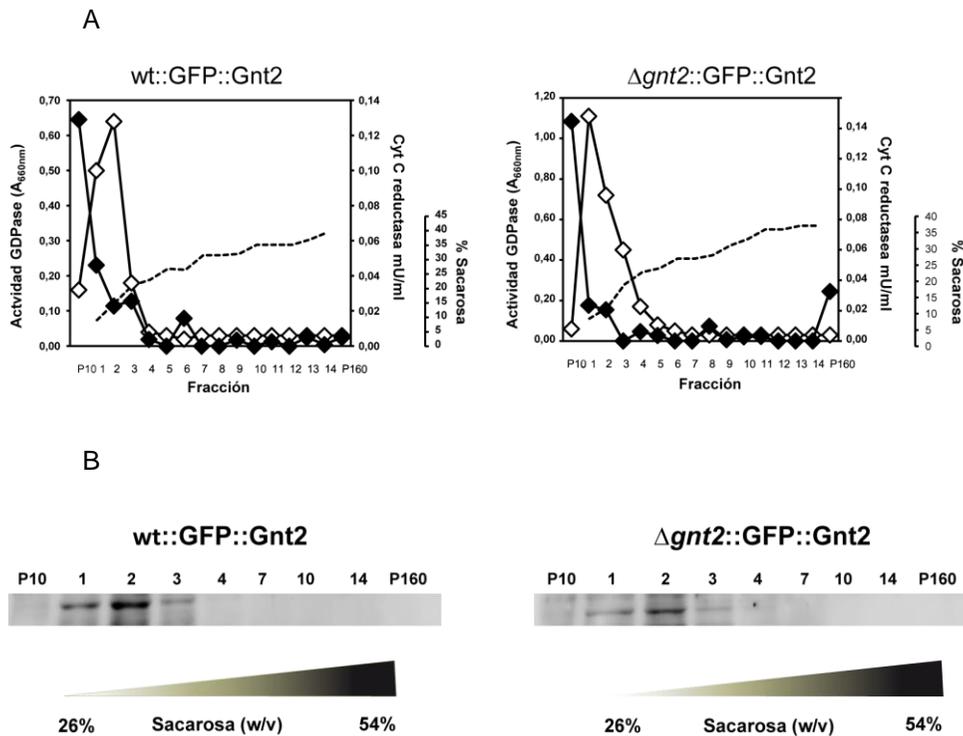


Figura 28. Localización de la proteína GFP::*Gnt2* tras fraccionamiento subcelular de lisados de estirpes portadoras de la proteína de fusión. A) Actividad enzimática específicas GDPasa (rombos blancos), y Cyt C reductasa (rombos negros), como marcadores de AG y RE, respectivamente, en las fracciones sub-celulares obtenidas tras ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (1 a 14). Se incluyeron en el análisis alícuotas de las fracciones P10 y P160 (Tabla 16). La línea discontinua representa la concentración de sacarosa en cada fracción. B) Análisis de hibridación *Western* de proteínas presentes en las fracciones indicadas, utilizando un anticuerpo anti-GFP.

CAPÍTULO 2

**CARACTERIZACIÓN DE LA PARED CELULAR
DEL MUTANTE $\Delta gnt2$**

10. Fenotipos relacionados con pared

Con objetivo de identificar cambios a nivel estructural y molecular en la pared celular del mutante $\Delta gnt2$, se realizaron ensayos de sensibilidad y/o resistencia a compuestos que interactúan con la pared, así como ensayos de afinidad por colorantes específicos, y se determinó cuantitativa y químicamente el contenido proteico y glucídico de fracciones obtenidas de paredes celulares.

10.1. Sensibilidad a compuestos que interactúan con la pared

Para estudiar la respuesta fisiológica del mutante a compuestos tóxicos que interactúan con la pared celular, se analizó su crecimiento en medio sintético (SM) con Calcofluor White (CFW), colorante que interactúa de forma específica con la quitina, y Sodio Dodecil Sulfato (SDS), surfactante iónico que actúa sobre la membrana lipídica y las proteínas.

El doble mutante mostró inhibición del crecimiento en presencia de ambos compuestos, presentando menor diámetro y masa fúngica en presencia de CFW, y ausencia de crecimiento en SDS cuando los inóculos fueron inferiores a 10^3 microconidias (Figura 29). La estirpe complementada mostró fenotipos silvestre.

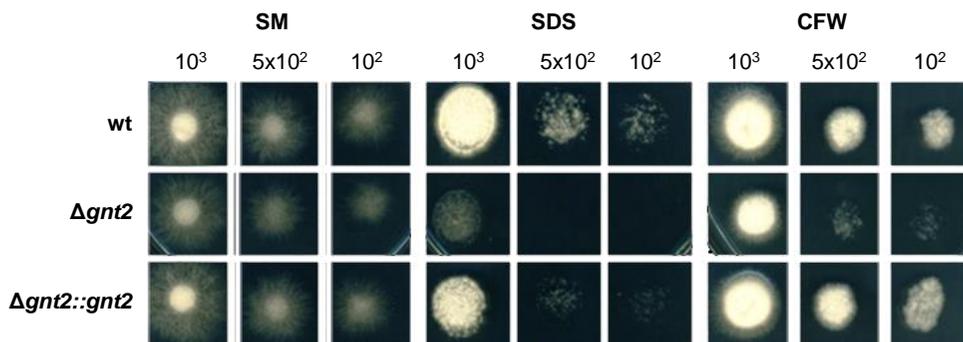


Figura 29. Crecimiento en presencia de 0,025 % Sodio Dodecil Sulfato (SDS) y $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calcofluor White (CFW) de la estirpe silvestre (wt), el doble mutante ($\Delta gnt2$) y el complementado ($\Delta gnt2::gnt2$). Se inocularon suspensiones de 10^3 , 5×10^2 y 10^2 microconidias.

10.2. Resistencia al tratamiento con glucanasas

Para profundizar en la caracterización de la pared celular del mutante, se analizó la cinética de lisis y degradación por acción de enzimas que hidrolizan los polisacáridos de la pared celular fúngica. Las células desprovistas parcialmente del complejo β -glucano-quitina se vuelven esféricas por la presión osmótica dando lugar a protoplastos que son cuantificados por observación microscópica.

La formación de protoplastos en el mutante resultó 50 % inferior ala del silvestre, indicando una menor degradación de su pared. A su vez la estirpe complementada mostró recuperación del fenotipo silvestre presentando el mismo grado de susceptibilidad a la acción de glucanasas y quitinasas que el silvestre (Figura 30).

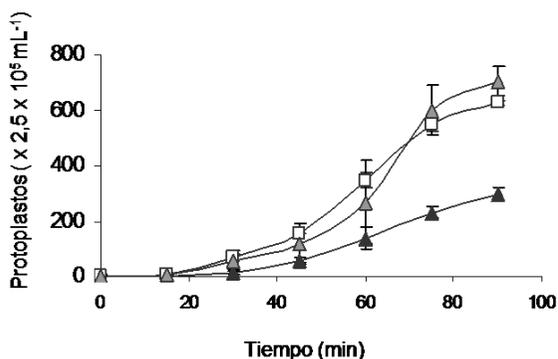


Figura 30. Formación de protoplastos de la estirpe silvestre 4287 (□), del mutante $\Delta gnt2$ (▲) y de la estirpe complementada $\Delta gnt2::gnt2$ (▲). Las barras indican el error estándar de tres experimentos independientes.

10.3. Afinidad de la pared celular a Alcian Blue

La afinidad de las células por el colorante Alcian Blue (8GX) está relacionada con la composición de su pared celular, como resultado de las cargas negativas expuestas en la superficie que se unen a esta ftalocianina catiónica tetravalente (Vzorov *et al.*, 2003) (Figura 31). La capacidad de interaccionar y formar complejos con carbohidratos ácidos de glicanos de pared permite caracterizar la composición en función de la afinidad por este colorante. Para ello alícuotas de esporas de la estirpe silvestre, el mutante $\Delta gnt2$ y el complementado, se trataron con una solución de Alcian Blue al 0,025 %. Tras la incubación y sucesiva centrifugación, se determinó la cantidad de colorante libre en el sobrenadante a partir del valor de absorbancia a 620 nm y la conversión a

valores de concentración utilizando la la curva patrón. La cantidad de colorante unido a pared celular se calculó por depleción, a partir del valor de colorante libre en el sobrenadante.

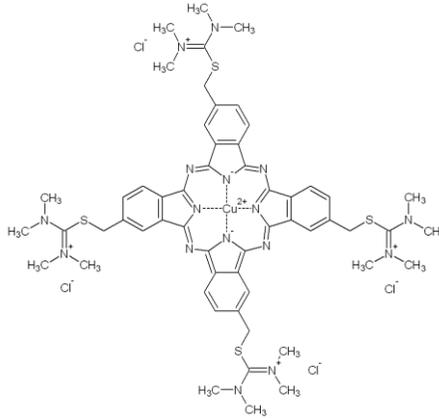


Figura 31. Estructura molecular del Alcian Blue.

Los resultados obtenidos muestran que las esporas del silvestre unían el 95 % del colorante y las del mutante el 65 % (Figura 32). Esta menor afinidad del mutante sugiere menor cantidad de cargas negativas como resultado de una distribución y/o composición alteradas en los polisacáridos de superficie. La estirpe complementada mostró recuperación total de la capacidad de unión a dicho colorante.

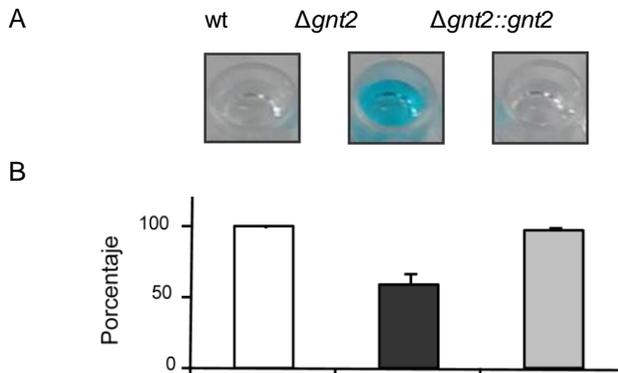


Figura 32. Afinidad por el colorante Alcian Blue de la pared de esporas de la estirpe silvestre (blanco), el mutante $\Delta gnt2$ (negro) y el complementado ($\Delta gnt2::gnt2$) (gris). A) Sobrenadantes tras el tratamiento. B) Porcentaje de Alcian Blue unido. Las barras representan el error estándar obtenido de tres experimentos independientes.

10.4. Unión de la pared celular a la lectina *GS II-FITC*

El uso de lectinas para la detección de azúcares de superficie se basa en la capacidad de reconocimiento y unión reversible a mono- y oligosacáridos específicos que pueden estar presentes en las proteínas.

La lectina *GSII* obtenida de la planta *Griffonia simplicifolia* es una proteína tetramérica que se une específicamente a residuos terminales de α - y β -*N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) (Zhu *et al.*, 1996).

Para analizar la presencia de GlcNAc en la pared fúngica y determinar diferencias entre la estirpe silvestre y el mutante $\Delta gnt2$, se determinó la interacción entre la lectina *GS II* conjugada con el fluoróforo *FITC* (isocianato de fluoresceína) y los residuos de GlcNAc terminales en ambas estirpes.

La unión de la lectina *GS II-FITC* a la *N*-acetilglucosamina terminal se analizó mediante detección por citometría de flujo. La fluorescencia emitida por microconidias tratadas con *GS II-FITC* se detectó a través del canal FL1, que determina la intensidad relativa, y el canal auxiliar, que indica la intensidad lineal emitida y que está relacionada con el tamaño de las partículas.

Las propiedades de dispersión de la luz en distintas poblaciones se determinaron a través de los canales SSC y FSC, siendo la intensidad de dispersión de la luz dependiente de la masa, y de la forma y la complejidad de cada partícula.

La interpretación de los resultados de intensidad lineal frente a intensidad relativa reveló la existencia de una población homogénea (H3) en todas las estirpes cuyo valor de intensidad lineal se mantuvo constante en un rango de intensidad relativa entre $0-2 \times 10^1$; y una población heterogénea (H4) cuyos valores de intensidad lineal fueron más altos y dispersos, correspondiendo a valores de intensidad relativa $> 2 \times 10^1$ (Figura 33A). Estos resultados, junto a los análisis de dispersión de la luz (Figura 33B), confirmaron la existencia de dos sub-poblaciones en cada estirpe: la población H3 de células individuales y la población H4 de células con diversos grados de agregación. El mutante $\Delta gnt2$ presentó un 20 % de microconidias agregadas mientras que en las estirpes silvestre y complementada los valores fueron inferiores al 12 % (Figura 34).

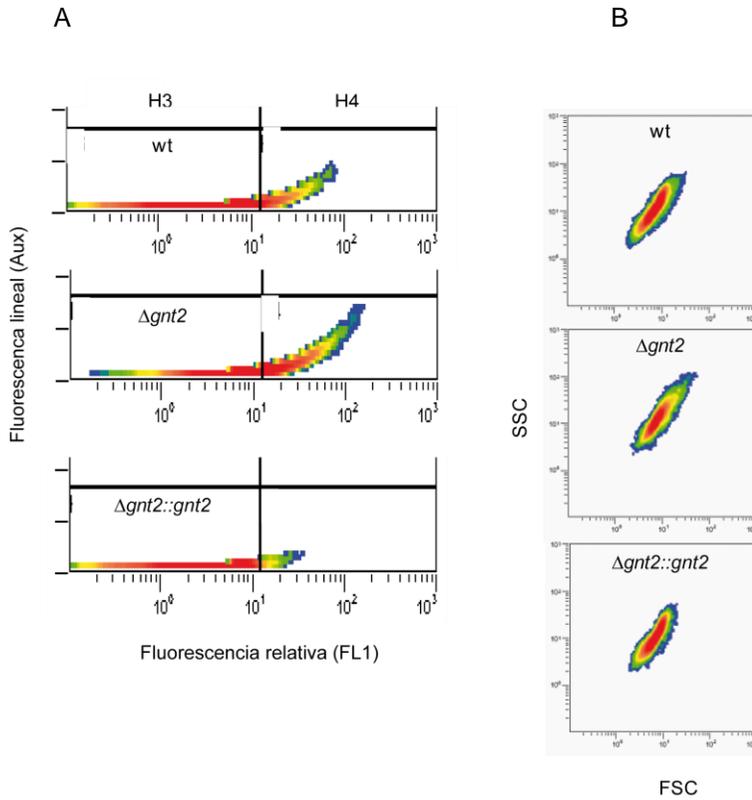


Figura 33. A) Fluorescencia de microconidias unidas a *GS II-FITC* representando emisión de fluorescencia lineal respecto a emisión de fluorescencia relativa. B) Histograma de la dispersión de la luz, representando FSC (dispersión axial de luz) frente a SSC (dispersión lateral de luz) en la estirpe silvestre (wt), el doble mutante ($\Delta gnt2$) y el complementado ($\Delta gnt2::gnt2$).

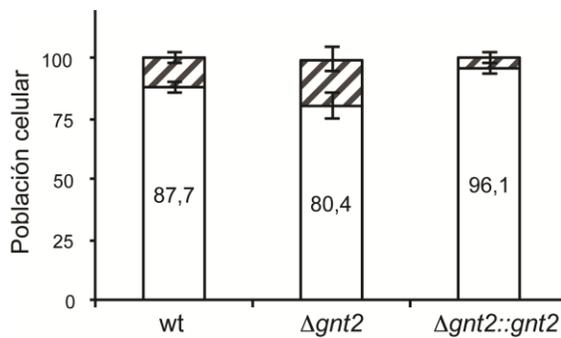


Figura 34. Porcentaje de sub-poblaciones de células individuales (blanco) y células agregadas (rayado) en las estirpes indicadas.

La fluorescencia emitida por células individuales de cada estirpe no mostró diferencias significativas, al igual que las poblaciones agregadas que presentaron valores medios de fluorescencia muy superiores (Figura 35).

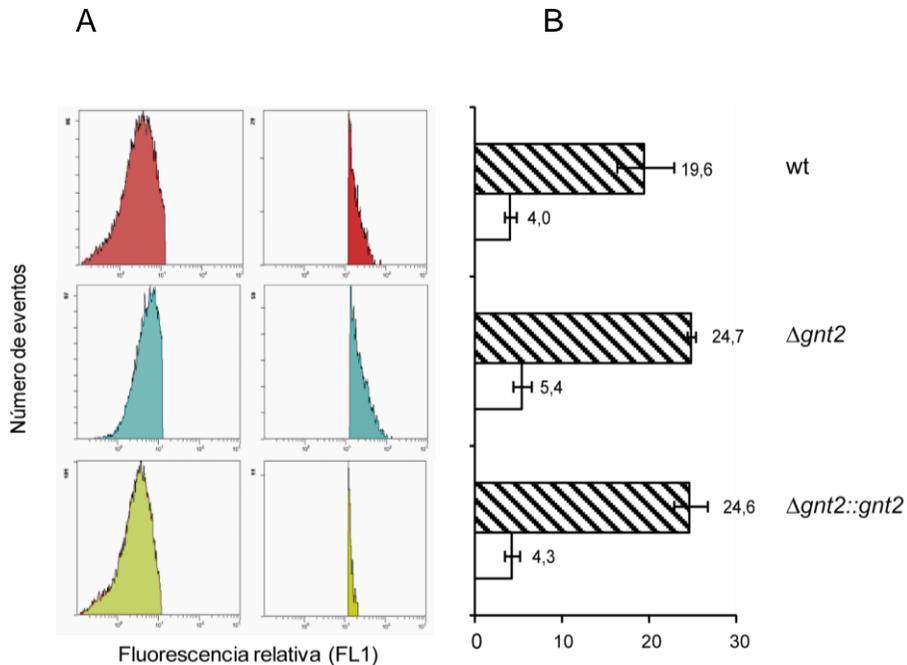


Figura 35. Fluorescencia relativa de las sub-poblaciones de células individuales (H3) y agregadas (H4). A) Histogramas de fluorescencia de la estirpe silvestre (rojo), mutante $\Delta gnt2$ (azul) y complementada (verde). B) Valores medios de fluorescencia relativa en células individuales (blanco) y en células agregadas (rayado).

10.5. Agregación de hifas

La agregación de conidias (incubadas tres horas en PDB) teñidas con la lectina *GSII-FITC* se observó mediante microscopía óptica de fluorescencia (Figura 36). Las imágenes mostraron mayor grado de agregación de conidias en el mutante con respecto al silvestre y al complementado.

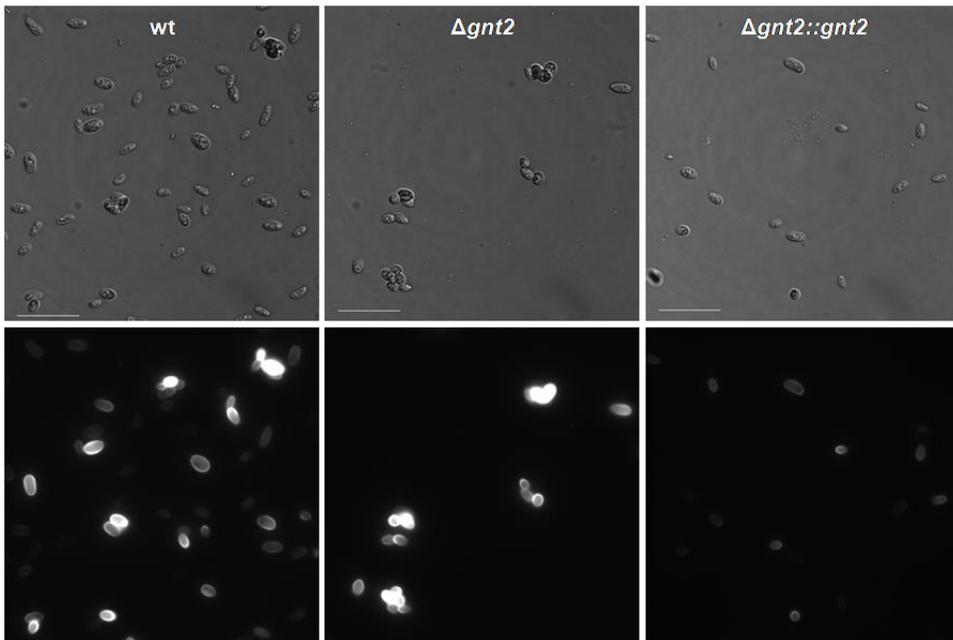


Figura 36. Imágenes de conidias teñidas con *GSII-FITC* observadas al microscopio óptico con Nomarski (superior) y con fluorescencia (inferior).

El fenómeno de agregación de esporas y germínulas jóvenes está influenciado por factores ambientales como el pH o la concentración salina del medio de cultivo (Grimm *et al.*, 2005). La influencia del pH en la interacción entre superficies y en la agregación de germínulas jóvenes en las tres estirpes del hongose cuantificó, en medio sintético con distintos pHs, mediante observación al microscopio óptico. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 17. Efecto del pH sobre la agregación de esporas y germínulas a lo largo del tiempo (medio mínimo, 28 °C y 170 rpm) en la estirpe silvestre (wt) y el doble mutante ($\Delta gnt2$). Se representa el porcentaje de germínulas agregadas tras 5 y 7h de incubación.

	wt		$\Delta gnt2$	
	5 h	7 h	5 h	7 h
pH 2	6 %	19 %	30 %	20 %
pH 3,5	11 %	21 %	22 %	33 %
pH 5	10 %	16 %	20 %	43 %

El mutante $\Delta gnt2$ mostró mayor agregación que el silvestre en todas las condiciones estudiadas, formando agregados constituidos por numerosas células. Esta agregación se hizo evidente mediante observación por microscopía electrónica de transmisión de hifas cultivadas 14 h en medio nutritivo. Las imágenes muestran agregados de hifas en el mutante que parecen adheridas entre sí por una matriz extracelular, ausentes en la estirpe silvestre. Esta matriz de naturaleza aún desconocida podría ser la causante de la adhesión y la compactación anómala de las hifas (Figura 37).

Además, las hifas del mutante $\Delta gnt2$ mostraron septos de morfología aberrante y muy retorcidos comparados con la estirpe silvestre, sugiriendo defectos en su estructura. Sin embargo no se encontraron diferencias aparentes en la pared exterior entre el mutante y la estirpe silvestre.

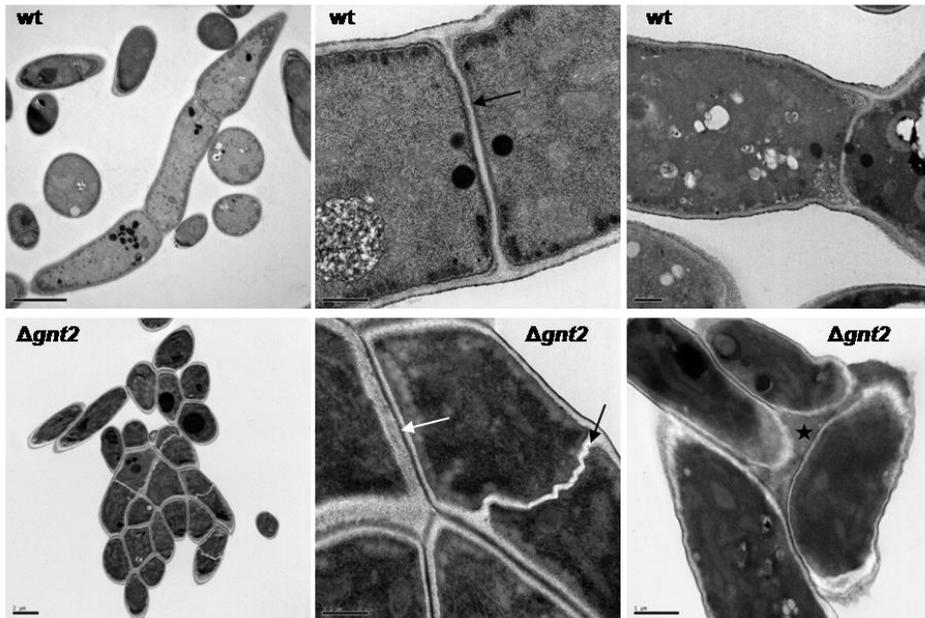


Figura 37. Micrografías electrónicas de hifas y esporas de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta gnt2$. En el mutante se observan agregación de hifas con alto grado de compactación (flecha blanca), así como septos torcidos (flecha negra) y material extracelular cohesionando el micelio (asterisco).

11. Composición y análisis de la pared celular fúngica

La composición química de la pared celular es determinante en sus propiedades. La pared celular está formada por carbohidratos que constituyen hasta el 80 % de su peso seco (Sentandreu *et al.*, 1991). Estos azúcares se encuentran asociados formando polisacáridos estructurales (homo- y heteropolisacáridos), o formando parte de las glicoproteínas. La parte glucídica se une mediante enlaces *N*-glicosídicos (*N*-linked) u *O*-glicosídicos (*O*-linked). Las glicoproteínas de pared se localizan principalmente en la superficie unidas mediante enlaces covalentes, pero también se pueden asociar a membranas o al complejo β -glucano-quitina mediante anclaje GPI (Bowman & Free, 2006).

Con objeto de detectar posibles diferencias en el patrón de glicosilación de estas proteínas se examinó la composición de la pared celular, en la estirpe silvestre, el mutante $\Delta gnt2$ y el complementado, mediante análisis químicos que permitieron determinar los glicanos unidos a proteínas de pared.

11.1. Polisacáridos de pared celular

A. Fraccionamiento de paredes celulares

Los componentes de la pared celular se pueden separar en función de su solubilidad en hidróxido de sodio, dando lugar a fracciones solubles e insolubles en álcali, que a su vez se separan sucesivamente por su solubilidad en agua y en etanol-agua 1:1 (v/v).

Un análisis preliminar permitió comparar la eficiencia de la extracción de polisacáridos a partir de paredes purificadas, o de micelio. No se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de extracción. Por tanto, la separación de estos compuestos se realizó sin purificación previa de paredes celulares, eliminando los restos intracelulares por sucesivas extracciones con hidróxido de sodio tras precipitación con etanol de los polisacáridos.

Las fracciones obtenidas solubles e insolubles en álcali, agua y etanol-agua 1:1 se liofilizaron y se analizó su peso seco (Tabla 18 y Tabla 19). El porcentaje de pared fúngica respecto a la biomasa total se determinó como la suma total de las fracciones extraídas relativas al peso seco del micelio. Los porcentajes de pared respecto a la masa de micelio seco resultaron similares en todos los casos (60-70 % del micelio).

Tabla 18. Fracciones de carbohidratos extraídas de pared celular

Fracción	Tipo de glicano	Propiedades
FI	Complejo β -glucano-quitina	Insoluble en álcali y agua
F01I F1I	α -glucano	Soluble en álcali e insoluble en agua
F01S50I F1S50I		Soluble en álcali y agua Insoluble en 1:1(v/v) etanol-agua
F01S50S	O-linked	Soluble en álcali (0,1 M NaOH), agua y 1:1(v/v) etanol-agua
F1S50S	N-linked	Soluble en álcali (1 M NaOH), agua y 1:1(v/v) etanol-agua

El complejo β -glucano-quitina se extrajo como fracción insoluble en álcali (FI) formando un denso sedimento durante el proceso de extracción. Esta fracción representa el componente mayoritario de la pared celular constituyendo entre 30-37 % del micelio, según la estirpe en estudio (Tabla 19).

Se obtuvieron componentes minoritarios de pared, no unidos a proteínas, como contaminantes de las extracción con álcali, correspondientes a: fracciones solubles en NaOH e insolubles en agua (F01I y F1I, respectivamente), así como subfracciones solubles en álcali y en agua, e insolubles en etanol-agua (F01S50I y F1S50I, respectivamente) que fueron analizados e identificados posteriormente (11.1G) (Tabla 19).

Las fracciones solubles en etanol-agua 1:1 (v/v) F01S50S y F1S50S correspondían con los O- y N-glicanos, respectivamente, unidos a proteínas de pared, siendo generalmente proteínas de superficie. El porcentaje de carbohidratos en estas glicoproteínas variaba entre estirpes, siendo inferior en el mutante $\Delta gnt2$ y similar en las otras estirpes (Tabla 19).

Tabla 19. Peso seco del complejo β -glucano-quitina, de otros polisacáridos presentes en la pared y de glicanos unidos a proteínas referidos al peso seco del micelio.

Estirpe	β -glucano-quitina	Otros polisacáridos	Polisacáridos unidos a proteínas
wt	30-37 %	15-20 %	1,6-2 %
$\Delta gnt2$	31-35 %	13-24 %	1-1,7 %
$\Delta gnt2::gnt2$	30-33 %	14-26 %	1,1-1,9 %

B. Purificación de polisacáridos unidos a glicoproteínas.

Las fracciones de glicanos unidos a proteínas de pared mediante enlaces *O*-glicosídicos (F01S50S) y *N*-glicosídicos (F1S50S) fueron extraídas tras tratamiento con álcali, y aisladas por sus propiedades de solubilidad en agua y etanol-agua. Tras liofilizar se purificaron mediante filtración en gel, lo que permitió separar compuestos de distinto peso molecular.

Las muestras se separaron en una columna de Sepharose CL-6B y las fracciones eluidas en agua se recogieron en un colector automático. El contenido de azúcares se valoró tras reacción colorimétrica de fenol-sulfúrico y la masa de los componentes eluidos se extrapoló de la correspondiente curva patrón. La calibración previa de la columna se realizó empleando una mezcla comercial de compuestos de masa molecular conocida (Figura 38).

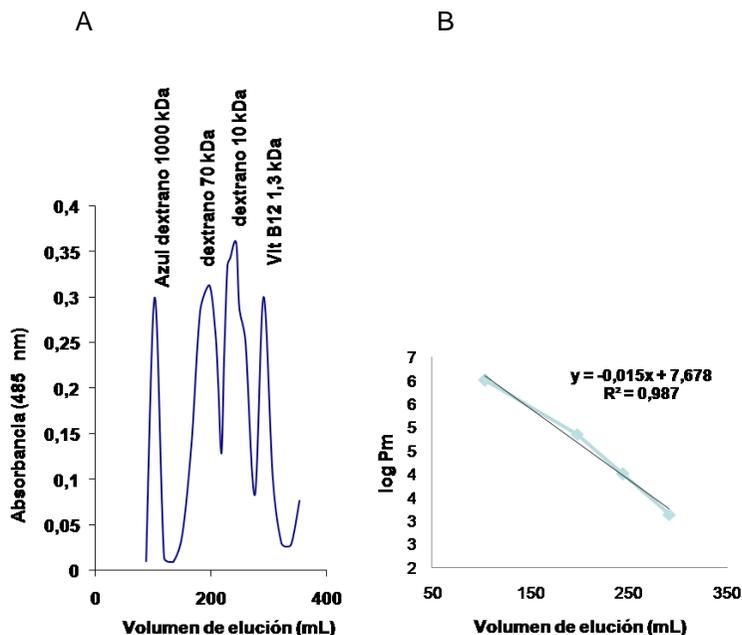


Figura 38. Calibración de la columna de Sepharose CL-6B (60x2, 6cm). A) perfil de elución de polisacáridos comerciales y B) recta patrón deducida.

En la estirpe silvestre las fracciones *O*-linked (F01S) y *N*-linked (F1S50S) presentaron perfiles de elución similares (Figura 39). En ambas se identificó un único polisacárido (I) de elevado peso molecular, además de picos de menor intensidad que resultaron ser residuos de polisacáridos de pared. En cambio el mutante mostró mayor complejidad en la composición de glicanos en ambas fracciones (*O*-linked y *N*-linked) (Figura 39).

Los perfiles de elución revelaron la presencia de polisacáridos de elevado peso molecular (1.000-280 kDa) con una variación de tamaño gradual (I, II, III en fracciones *O*-linked; I, II, III y IV en fracciones *N*-linked). Estos polisacáridos aparecían en proporciones muy similares en ambas fracciones. Al igual que en la estirpe silvestre, se identificaron picos de menor intensidad y menor tamaño correspondientes a residuos de pared celular.

El peso molecular de dichos polisacáridos, deducido de sus correspondientes perfiles de elución, corresponde al peso real de las moléculas sin conformaciones que ofrezcan resistencia hidrodinámica para atravesar el gel.

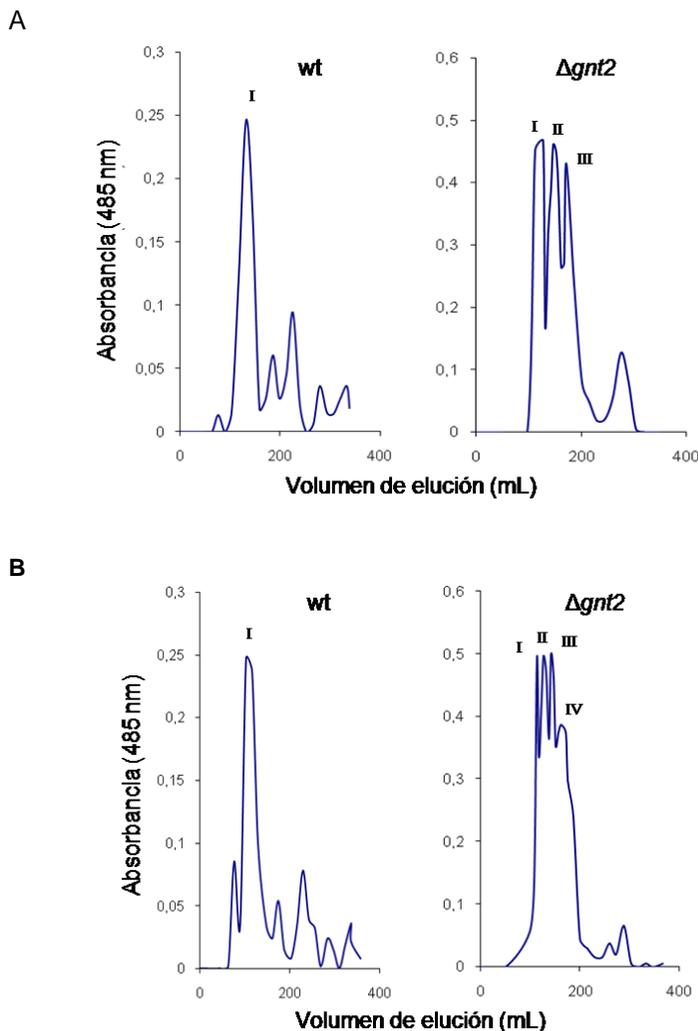


Figura 39. Perfiles de elución de las fracciones *O*-linked (F01S50S) A y *N*-linked (F1S50S) B de la estirpe silvestre (wt) y mutante $\Delta gnt2$ mediante filtración en gel de sefarosa. Los números romanos indican fracciones de purificación de polisacáridos con peso molecular decreciente constituyentes de las glicoproteínas de pared celular.

Para determinar el tamaño real, se analizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) las moléculas purificadas. El resultado fue sorprendente ya que los espectros RMN revelaron menor tamaño de los polisacáridos purificados (entre 60-18 kDa) (Tabla 20).

Tabla 20. Características de los polisacáridos presentes en las fracciones purificadas mediante filtración en columna de exclusión molecular.

Fracción	Pico	Volumen de elución	Equivalencia con marcador	Tamaño aparente	Tamaño real
wt O-linked	I	100-170 mL	Azul dextrano-Dextrano T70	800-1.000 kDa	60 kDa
wt-N-linked	I	100- 150 mL	Azul dextrano-Dextrano T70	800-1.000 kDa	60 kDa
$\Delta gnt2$ -O-linked	I	110-130 mL	Dextrano T70	1.000 kDa	60 kDa
	II	137-170 mL	Dextrano T70	800 kDa	40 kDa
	III	170-230 mL	Dextrano T70-Dextrano T10	500 kDa	20 kDa
$\Delta gnt2$ -N-linked	I	100-120 mL	Azul dextrano	1.000 kDa	60 kDa
	II	123-137 mL	Azul dextrano	8.000 kDa	40 kDa
	III	142-152 mL	Dextrano T70	500 kDa	20 kDa
	IV	157-200 mL	Dextrano T70	280 kDa	18 kDa

La cuantificación de los polisacáridos contenidos en las fracciones extraídas reveló menor cantidad de glicanos con unión de tipo *N*-glicosídico en el mutante $\Delta gnt2$ que en la estirpe silvestre, siendo un 30 % inferior en las glicoproteínas del mutante (Figura 40). Estas diferencias se consideran estadísticamente significativas, con un p-valor inferior a 0,05 en el análisis de *T-Student*. Sin embargo, como era de esperar, no se observaron diferencias en la fracción O-linked.

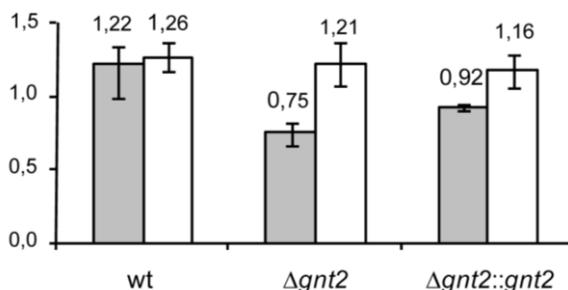


Figura 40. Porcentaje de polisacáridos unidos a proteínas de pared respecto al peso seco de pared, en la estirpe silvestre (wt), el mutante $\Delta gnt2$ o el complementado ($\Delta gnt2::gnt2$). Se representan N-glicanos (gris) y O-glicanos (blanco).

Para determinar la composición y estructura de los carbohidratos unidos a proteínas de pared se realizaron análisis químicos para identificar:

- Los polisacáridos de cada fracción
- Los monosacáridos que lo componen y sus proporciones
- Los tipos de enlace
- La configuración anomérica del enlace glicosídico: α ó β

Los azúcares neutros liberados tras hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA) 3M seguida de derivatización a acetatos de alditol de las fracciones F01S50S (O-linked) y F1S50S (N-linked) se describen en la Tabla 21. Los porcentajes de monómeros en ambas fracciones mostraron valores similares, siendo siempre la galactosa el mayoritario. En la estirpe silvestre la proporción de manosa-galactosa fue 1:2, mientras que en $\Delta gnt2$ resultó ser 1:1,5.

Tabla 21. Monosacáridos neutros presentes en las fracciones F01S50S y F1S50S tras purificación en columna. Man: manosa, Glc: glucosa, Gal: galactosa y Ara: arabinosa.

Fracciones	Man	Glc	Gal	Ara	% recuperación
wt-O-linked (I)	13	17	22	1,3	57,3
wt-N-linked (I)	10	20	20	-	52
$\Delta gnt2$ -O-linked (I, II y III)	13	13	18	1	47
$\Delta gnt2$ -N-linked (I, II y III)	15	15	22	-	53

En las fracciones *O*-linked se detectó un bajo porcentaje de arabinosa, y nada en las fracciones *N*-linked.

El análisis mediante espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases (GC-MS) de las fracciones *O*- y *N*-linked de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta gnt2$ mediante metilación y derivatización a acetatos de alditol, permitió identificar la composición y estructura de sus polisacáridos (Figura 41). De esta manera se identificó un único polisacárido presente en fracciones *O*-linked y *N*-linked en ambas estirpes.

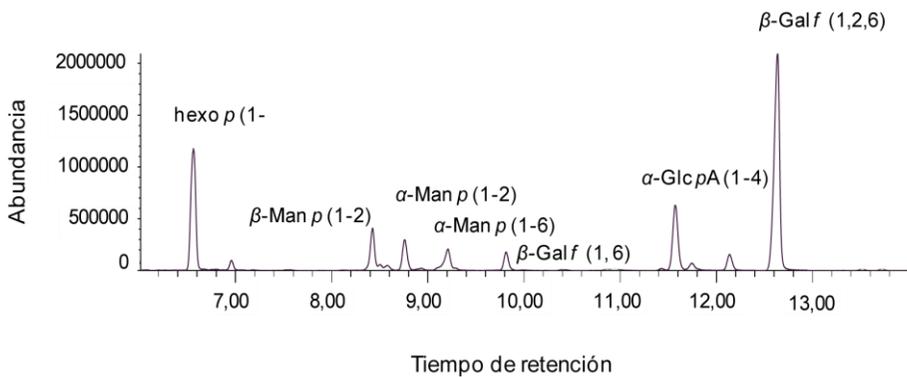


Figura 41. Análisis mediante GC-MS de las fracciones *O*- y *N*- glicanos de la estirpe silvestre y el mutante $\Delta gnt2$. Los monosacáridos fueron identificados por sus espectros de masas y tiempo de retención.

Estos resultados permiten concluir que se trata de un polisacárido ácido con esqueleto de galactofuranosa muy ramificado, con sustituciones en el segundo carbono formando cadenas laterales de un único residuo de glucopiranososa y cadenas de ácido glucurónico con residuos terminales de manopiranososa (Tabla 22 y Figura 42). La α -D-manopiranososa presente en baja proporción, constituye el núcleo (*core*) del carbohidrato.

Tabla 22. Tipos de enlace deducidos de análisis de GC-MS

Monosacáridos	Tipo de enlace
β -D-galactofuranosa	$\rightarrow 6$ -Galf-(1, \rightarrow $\rightarrow 6$ -Galf-(1 \rightarrow
β -D-manopiranososa	$\rightarrow 2$ -Manp-(1 \rightarrow Manp-(1 \rightarrow
α -D-glucopiranososa	Glc p-(1 \rightarrow
ácido α -D-glucopiranososa	$\rightarrow 4$ -Glc pA-(1 \rightarrow
α -D-manopiranososa	$\rightarrow 6$ -Manp-(1 \rightarrow $\rightarrow 2$ -Manp-(1 \rightarrow

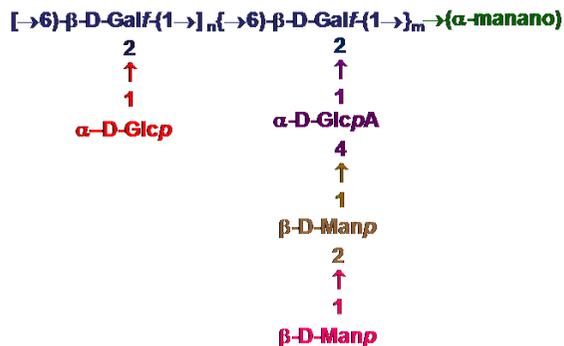


Figura 42. Estructura deducida del heteropolisacárido ácido que constituye la fracción glicósídica de las glicoproteínas de pared celular unidas por enlaces O- y N-glicanos.

C. Análisis químico de las fracciones insolubles F01I, F1I, F01S50I y F1S50I

Los resultados del análisis químico de las fracciones insolubles en agua y etanol-agua (Tabla 18) y los picos de menor intensidad obtenidos tras filtración de las muestras F01S50S y F1S50S en columna de exclusión molecular (Figura 39) revelaron la presencia del mismo polímero en todas las fracciones analizadas.

El análisis mediante espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases (GC-MS) de las fracciones de la estirpe silvestre y del mutante $\Delta gnt2$ mediante metilación y derivatización a acetatos de alditol, permitió identificar su naturaleza química (Figura 43). Se identificó como un homopolisacárido lineal de glucopiranososa con enlaces α (1 \rightarrow 4) y con escasas ramificaciones en el carbono 6 con un único residuo de glucopiranososa (Tabla 23) (Figura 44). Su función, hasta ahora desconocida, podría estar relacionada con el mantenimiento de la estructura e integridad de la pared celular.

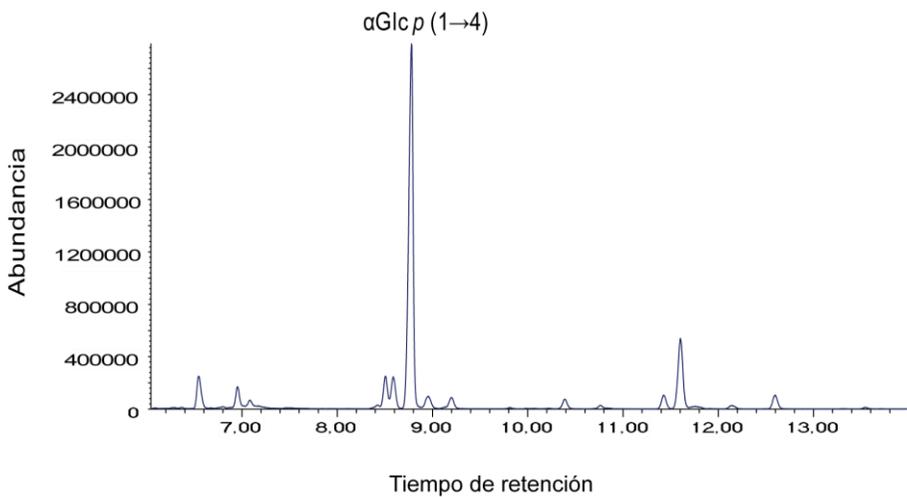


Figura 43. Análisis mediante GC-MS de las fracciones F011, F11, F01S50I y F1S50I de la estirpe silvestre y el mutante $\Delta gnt2$. Los monosacáridos fueron identificados por sus espectros de masas y tiempo de retención.

Tabla 23. Tipos de enlaces deducidos de análisis de GC-MS.

Monosacáridos	Tipo de enlace
α -D-glucopiranososa	\rightarrow 4)-Glc p -(1 \rightarrow
	\rightarrow 4)-Glc p -(1, \rightarrow
	\rightarrow 6)- Glc p -(1 \rightarrow

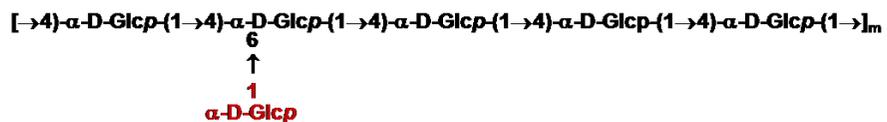


Figura 44. Estructura deducida del homopolisacárido lineal que constituye las fracciones insolubles en agua y etanol: agua presentes en la pared de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* pero no unido a proteínas.

CAPÍTULO 3

**ANÁLISIS DE PROTEÍNAS Y
GLICOCONJUGADOS EN EL MUTANTE $\Delta gnt2$**

12. Análisis comparativo del proteoma total del mutante $\Delta gnt2$

Se ha realizado un análisis comparativo de las proteínas totales entre la estirpe silvestre y el mutante $\Delta gnt2$ con objeto de identificar posibles diferencias en su abundancia relativa, causadas por modificaciones pos-traduccionales que pudieran alterar su función, localización o interacción con otras proteínas.

Las proteínas totales extraídas de cuatro muestras biológicas independientes se visualizaron en geles SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida (Figura 45).

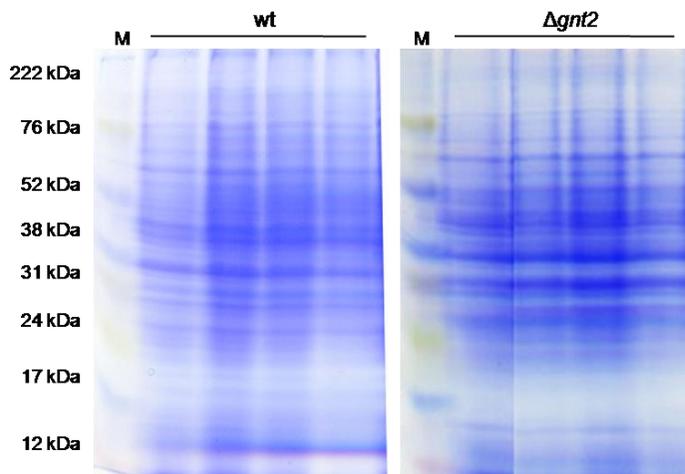


Figura 45. Proteínas totales separadas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida teñidas con azul Coomassie. M, marcadores de peso molecular.

El análisis proteómico diferencial cuantitativo de ambas estirpes se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional en geles 2D-SDS-PAGE, en gradientes inmobilizados de pH entre 5 y 8 (Figura 46). El análisis bioinformático de las imágenes digitalizadas de los geles con el programa PDQuest identificó proteínas con niveles de representación diferencial en extractos de ambas estirpes. Se seleccionaron 26 proteínas con diferencias estadísticamente significativas entre ambas estirpes, de las cuales doce fueron identificadas a partir de su huella peptídica de masas mediante Maldi TOF y su huella peptídica de fragmentación mediante Maldi TOF/TOF (Figura 45).

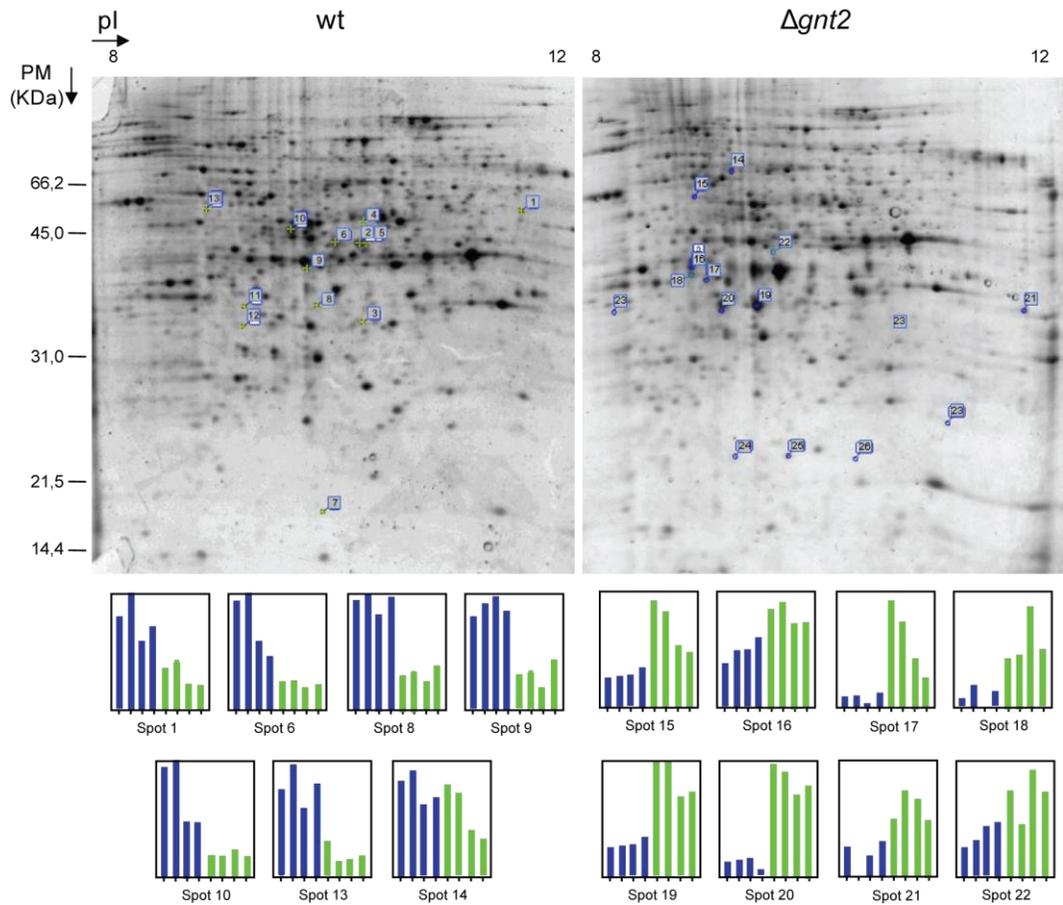


Figura 46. Análisis de proteínas totales mediante electroforesis en geles 2D-SDS-PAGE (tinción con Sypro). Se indican las proteínas seleccionadas para su identificación mediante análisis químicos. Las gráficas en la parte inferior muestran los niveles de representación de 15 manchas proteicas en las réplicas seleccionadas mediante análisis digital bioinformático de los geles. Las cuatro barras azules indican los valores de representación de las proteínas en la estirpe silvestre, y las verdes los valores en $\Delta gnt2$.

Tabla 23. Proteínas diferenciales del proteoma de wt y $\Delta gnt2$ identificadas a partir de su huella peptídica clasificadas de acuerdo a la función biológica que realizan y la ruta bioquímica en que participan. La abundancia relativa marcada en azul indica las proteínas más abundantes en wt y en rojo las del mutante. 1: Localización subcelular, 2: Posibles sitios de N-glicosilación, 3: Punto isoeléctrico y masa molecular (kDa) teóricos. Se indican C: citosol, Mit: mitocondria, N: núcleo y Per: peroxisoma.

Spot	Gen	Nº acceso	Proteína	Función biológica	Presencia		Loc. Celular ¹	Sitios N ²	pI/ Mw teóricos ³	Comentarios/ Referencias
					wt	$\Delta gnt2$				
Metabolismo										
<i>Metabolismo de proteínas</i>										
1		FOXG_12759	Metiltetrahydropteril triglutamato-homocisteína metiltransferasa	Biosíntesis metionina	+	-2,47	C	1	5,90 / 86,55	
6		FOXG_00630	Adenosil-metionina sintetasa	Metabolismo metionina	+	-2,93	C	1	5,77 / 44,31	
9		FOXG_09273	Adenosil-homocisteinasa	Metabolismo proteínas	+	-2,32	C	2	5,58 / 48,91	
<i>Metabolismo de carbohidratos</i>										
8		FOXG_10275	Fructosa-bisfosfato aldolasa	Glucólisis	+	-3,00	C	2	5,44 / 39,66	
Síntesis de metabolitos secundarios										
10	Bik3	FOXG_04755	O-metiltransferasa	Biosíntesis de bikaverina	+	-8,01	C	4	5,45 / 49,76	<i>Fusarium</i> sp. (Limón <i>et al.</i> , 2010)
<i>Respuesta a estrés</i>										
13	Ssc1	FOXG_08555	Proteína de choque térmico	Chaperona	+	-5,09	Mit	5	5,68 / 73,22	<i>F. oxysporum</i> (Prados-Rosales tesis doctoral)
21		FOXG_11511	Uricasa	Metabolismo de purinas	+	2,03	C/Per	1	6,72 / 33,89	
16,17 y 18	Thi13	FOXG_11035	Síntesis de pirimidina	Síntesis de tiamina	+	2,20 9,08	C	2	5,72 / 38,33	
19 y 20	Sti35	FOXG_10428	Síntesis de tiazol	Síntesis de tiamina	+	3,78 2,03	C/N	1	5,90 / 34,58	<i>F. oxysporum</i> (Ruiz-Roldan <i>et al.</i> , 2008)
22		FOXG_01103	Hipotética similar a Sti35	Síntesis de tiamina	+	2,31	C/N	-	5,50 / 33,04	
Transporte de electrones										
15		FOXG_12350	Citocromo P450 55A1	Des-nitrificación	+	3,29	Mit	4	6,27 / 45,18	
Proteasas										
14		FOXG_17187	Proteína hipotética	Proteasa	+	2,16	C?	2	5,64 / 58,57	

La comparación del proteoma total de la estirpe silvestre y el mutante $\Delta gnt2$ mostró diferencias significativas en la abundancia de proteínas que participan en biosíntesis proteica y de vitaminas, en el metabolismo de azúcares y en la respuesta a estrés.

Proteínas menos abundantes en la estirpe mutante

Algunas proteínas identificadas con menor nivel de representación en el mutante $\Delta gnt2$ están implicadas en la síntesis de compuestos nitrogenados, como la metiltetrahidropteril triglutamato-homocisteinasa metiltransferasa (FOXG_12759), adenosilmetionina sintetasa (FOXG_00630) y la adenosilhomocisteinasa (FOXG_09273). Esto podría redundar en una reducción de la síntesis proteica del mutante, como consecuencia de cambios en el metabolismo primario o secundario. También se observó menor abundancia de la proteína Ssc1 (FOXG_08555), identificada como una chaperona mitocondrial de la familia hsp70 esencial para la importación y plegamiento de proteínas y que previene su agregación en condiciones de choque térmico (Voos & Rottgers, 2002). Por otro lado, se observó una O-metiltransferasa (FOXG_04755) ocho veces menos abundante en el mutante. Esta enzima es ortóloga de bik3 en *F. fijiikuroi* y participa en la síntesis de bikaverina, pigmento rojo del metabolismo secundario de hongos, que algunos clasifican como micotoxina por sus propiedades antibióticas (Limón *et al.*, 2010; Wiemann *et al.*, 2009).

Proteínas más abundantes en el mutante $\Delta gnt2$

El mutante presentó niveles superiores de algunas proteínas relacionadas con estrés celular, como por ejemplo Sti35 y Thi13. Estas enzimas intervienen en la síntesis de tiamina (vitamina B1) participando en la biosíntesis de pirimidina y tiazol, respectivamente. Ambas moléculas están constituidas por anillos orgánicos que unidos por un puente metilo, conforman la molécula de tiamina (Figura 47). Esta vitamina actúa como cofactor enzimático imprescindible en el metabolismo energético y en la síntesis de las pentosas en procariontes y eucariotes. Sin embargo su síntesis *ex novo* está restringida a procariontes, hongos y plantas. Estudios recientes relacionan la proteína Sti35 con respuesta a estrés térmico y oxidativo en *F. oxysporum*, condiciones que inducen su expresión (Ruiz-Roldan *et al.*, 2008).

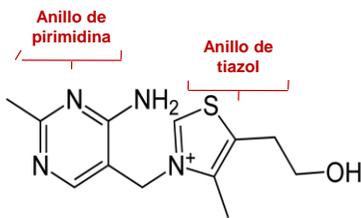


Figura 47. Estructura química de la tiamina.

Por otro lado, $\Delta gnt2$ presentó niveles tres veces superiores del citocromo P450 55A1, también denominado P450nor (FOXG_12350). Esta hemoproteína, perteneciente a un extenso grupo de monooxigenasas/oxidoreductasas, interviene en el transporte de electrones y se presenta en dos formas: una citosólica y otra mitocondrial (Omura, 2010). La enzima tiene actividad óxido nítrico reductasa y está implicada en procesos de desasimilación de nitrato, la reacción inversa a la asimilación de nitrógeno, siendo capaz de reducir nitritos y nitratos hasta su forma gaseosa N_2O (Shoun & Tanimoto, 1991).

El aumento del citocromo P450 55A1 en el mutante podría deberse a un desequilibrio en las especies reactivas de nitrógeno (ERN) en la célula, que desencadenan la respuesta a estrés. Existen estudios que relacionan el estrés nitroactivo con la degradación proteica, como consecuencia del plegamiento incorrecto de proteínas, con procesos de reparación del ADN y con detoxificación de NO (Nittler *et al.*, 2005). En el hongo *Histoplasma capsulatum* incrementos en los niveles de P450nor confieren resistencia a estrés por ERN celular (Nittler *et al.*, 2005).

Por tanto la presencia del citocromo P450nor a niveles hasta tres veces superiores en el mutante respecto al silvestre, junto con niveles más altos de la uricasa FOXG_11511, enzima relacionada con estrés oxidativo y la degradación de purinas, podrían indicar niveles superiores de degradación proteica frente a proteínas deficientemente glicosiladas y en consecuencia mal plegadas.

13. Proteínas de pared

13.1. Extracción de proteínas de pared

Las alteraciones estructurales y funcionales de la pared celular puestas de manifiesto por el ensayo de unión de Alcian Blue (Figura 32) y por la observación microscópica de la agregación de germínulas y esporas (Figura 36 y Figura 37), indujeron a comparar las proteínas de pared en la estirpe silvestre y en el mutante. Para estudiar si la ausencia de *gnt2* alteraba al conjunto de proteínas de superficie, se realizó un análisis comparativo de proteínas de pared obtenidas con SDS y con laminarinasa de la estirpe silvestre y el mutante $\Delta gnt2$ (5.16.3).

Las proteínas de pared celular fúngica extraídas con buffer Laemli resultan solubles en SDS y las extraídas con laminarinasa insolubles, caracterizándose estas últimas por el establecimiento de enlaces fuertes con los polímeros constituyentes de la pared. Para este análisis, ambas fracciones proteicas se solubilizaron en 9M urea y 2 % CHAPS y se visualizaron mediante electroforesis en 10 % SDS-PAGE. Las proteínas de ambas fracciones mostraron un rango de tamaño amplio entre 20-76 kDa; aunque la separación electroforética de las solubles en SDS mostró mayor gradación, llegando hasta péptidos de 14 kDa (Figura 48).

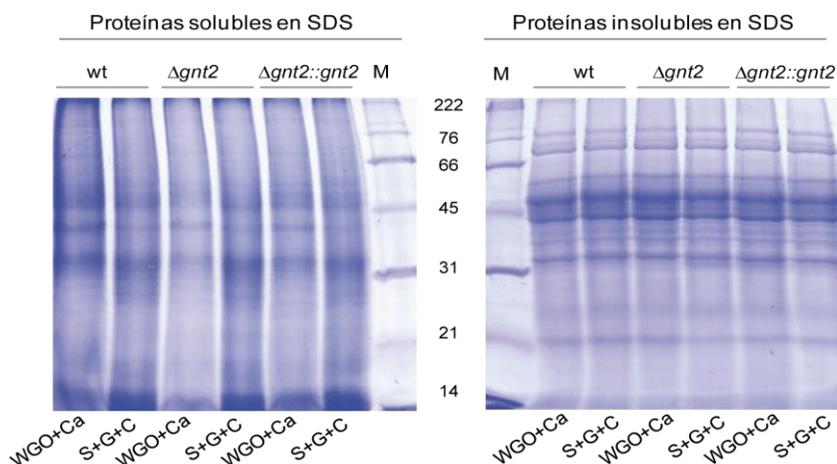


Figura 48. Proteínas de pared de la estirpe silvestre (wt), el mutante $\Delta gnt2$ y el complementado $\Delta gnt2::gnt2$ extraídas a partir de micelio obtenido en medio sintético (SM) con distintas fuentes de carbono o nitrógeno: aceite de germen de trigo (WGO) y casaminoácidos (Ca), sacarosa y glucosa (S+G) y colágeno (C).

Las fracciones solubles en SDS e insolubles en SDS se separaron electroforéticamente en geles SDS-PAGE 10 %. Se indican los tamaños en kDa del proteínas patrón utilizadas.

13.2. Identificación de proteínas de pared

Las muestras se sometieron a una primera separación mediante electroforesis en SDS-PAGE al 10 % de acrilamida y tratamiento con la proteasa tripsina, que hidroliza las proteínas generando péptidos de menor tamaño. Estas mezclas complejas, obtenidas tras digestión enzimática, se separaron por cromatografía líquida en columna acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

La identificación de las proteínas a partir de sus espectros de masas de fragmentación se realizó por comparación en las bases de datos (PFF, Peptide Fragment Fingerprinting).

En los extractos proteicos de la estirpe silvestre se identificaron 1.400 proteínas, de las cuales 497 estaban ausentes en los extractos de $\Delta gnt2$. La clasificación funcional de las proteínas se realizó utilizando la información anotada en la base de datos <http://www.uniprot.org>. La predicción de proteínas hipotéticas se realizó por comparación de las secuencias de amino ácidos mediante análisis *blastp* en las base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y la posterior identificación de proteínas ortólogas.

La clasificación funcional del conjunto de proteínas ausentes en $\Delta gnt2$ se representa en la Figura 49, observándose tanto proteínas no residentes en pared ni en membranas celulares, como proteínas ribosomales, nucleares y citosólicas.

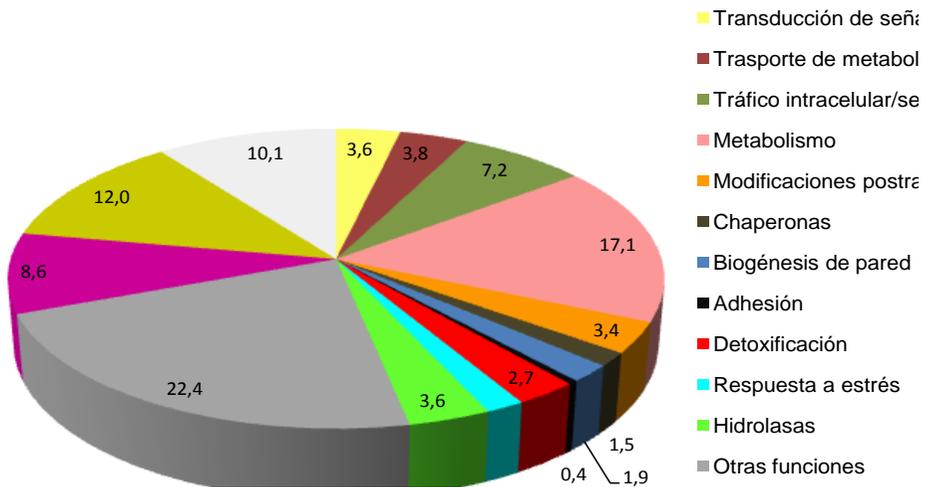


Figura 49. Representación en % del total de proteínas en extractos de pared celular ausentes en $\Delta gnt2$.

De este conjunto, el 20 % se estimaron como asociadas a pared o relacionadas con procesos de secreción, incluyendo proteínas del RE y del AG. La identificación se llevó a cabo utilizando las bases de datos <http://www.cbs.dtu.dk/services/> y http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html para la determinación de los siguientes dominios y su localización celular:

- Péptido señal
- Dominios transmembrana
- Anclaje mediante GPI
- Dominios de unión a carbohidratos
- Unión a lípidos de membrana
- Unión a proteínas de membrana (membrana plasmática, membrana de endosomas y membranas de RE y AG).
- Proteínas asociadas a procesos de secreción y de endocitosis

Las 91 proteínas identificadas como integrales de membrana, extracelulares o asociadas a pared celular, presentes en las fracciones de la estirpe silvestre y ausentes en $\Delta gnt2$, se clasificaron en base a su localización celular y a su función biológica (Tabla 24 y Tabla 25)

Tabla 24. Selección de proteínas de pared ausentes en el mutante $\Delta gnt2$. Se representa presencia (+), ausencia (-) y abundancia relativa respecto a la estirpe silvestre (wt) donde los valores negativos indican menor representación en $\Delta gnt2$, y los positivos mayor representación con respecto al silvestre (wt). 1: localización celular, 2: posibles sitios de N-glicosilación, 3: valores teóricos de punto isoelectrico y masa molecular (kDa). Se indican C: citosol, Mit: mitocondria, V: vesícula, M: membrana, AG: aparato de Golgi, RE: retículo endoplásmico, MV: membrana de vesícula, MAG: membrana de aparato de Golgi, MRE: membrana de retículo endoplásmico RE.

Gen	Número de acceso	Proteína	Met extrac.	Función biológica	Presencia		Loc. celular ¹	Sitios N ²	pl / Mw teórico ³	Identificación anterior/referencia
					wt	$\Delta gnt2$				
Transducción de señales										
	FOXG_01011	Hipothetical	SDS	GTPasa tipo Ras	+	-	?	2	8,73 / 23,97	
	FOXG_03386	Rho GTPasa	SDS	Activación de	+	-	C/MP	1	9,39 / 68,93	
Ras-2	FOXG_05293	Ras-2 GTPasa	SDS	GTPasa Ras 2	+	-	C/MP	1	9,18 / 26,40	<i>S. cerevisiae</i> (Wang & Deschenes, 2006)
	FOXG_06294	Hipotética	SDS	Sensor- regulador de unión a calcio	+	-	AG/V	1	4,81 / 22,03	
	FOXG_08739	Hipotética	SDS	GTPasa tipo RAS (endocitosis)	+	-	AG/V	1	7,64 / 97,48	
Vps21	FOXG_09392	Proteína de vacuola	SDS	Rab GTPase (endocitosis)	+	-	V	2	4,94 / 24,75	<i>S. cerevisiae</i> (Gerrard <i>et al.</i> , 2000)
	FOXG_11274	Hipotética	SDS	Sensor de membrana tipo rodopsina	+	-	MM-	-	9,25 / 32,41	
	FOXG_11383	ATPasa 3	SDS	Transporte de Calcio	+	-	MP/REM	2	6,04 / 123,77	
	FOXG_17753	Hipotética	SDS	Unión a protein quinasas	+	-	PM	-	4,39 / 12,67	
Transporte de metabolitos										
	FOXG_01480	Hipotética	SDS	Asociada a translocón	+	-	RE	1	8,62 / 28,75	
Pmt1	FOXG_03668	Manosiltransferasa	SDS	O-glicosilación	+	-	MRE	3	6,66 / 108,22	
	FOXG_05364	Familia LEM3/CDC50	SDS	De Interacción con flipasa en translocación de lípidos	+	-	EMR	6	9,16 / 47,63	
Alg3	FOXG_08415	Manosiltransferasa	SDS	N-glicosilación	+	-	MRE	-	9,53 / 42,53	Hongos filamentosos (Deshpande <i>et al.</i> , 2008))
	FOXG_11700	Hipotética DUF590	SDS	Proteína de canal de membrana	+	-	MP	2	6,18 / 811,06	
	FOXG_11727	Hipotética	SDS	Transportador de azúcar con dominio MFS	+	-	MP	2	8,39 / 68,91	
	FOXG_13067	ATPasa	SDS	Transporte de cationes	+	-	MP	1	5,59 / 91,32	
Tráfico intracelular y secreción										
	FOXG_00407	Anexin XIV	SDS	Inhibidor de actividad fosfolipasa	+	-	C	-	8,32 / 42,16	
	FOXG_00780	Adaptin AP-2	SDS	Transporte vesicular asociado a clatrina	+	-	AG/E	2	7,64 / 112,54	
Sac1	FOXG_01012	Fosfoinositido fosfatasa	SDS	Implicada en tráfico y secreción de proteínas	+	-	MAG/MRE	4	9,10 / 80,53	
	FOXG_01628	Proteína de vacuola	SDS	Actividad GTPasa (endocitosis)	+	-	V	3	8,52 / 77,09	
Pan1	FOXG_01873	Pan1 (DUF1720)	SDS	Unión a actina, endocitosis	+	-	C	5	5,93 / 158,38	Levaduras (Duncan <i>et al.</i> , 2001)

	FOXG_02319	Proteína con dominio snare	SDS	Receptor Snare	+	-	V/MP	3	9,62 / 39,60	
	FOXG_02422	Hipotética	SDS	Transporte vacuolar	+	-	V	1	8,82 / 24,20	
	FOXG_03184	Proteína similar a Isb5 con dominio VHS	SDS	implicada en endocitosis	+	-	C	4	5,92 / 48,70	<i>S. cerevisiae</i> (Toret <i>et al.</i> , 2008)
Epsin2	FOXG_03290	Epsina 2 con dominio EH	SDS	Transporte vacuolar mediado por clatrina	+	-	C	2	5,09 / 60,91	<i>S. cerevisiae</i> (Mukherjee <i>et al.</i> , 2009)
	FOXG_03401	Proteína de unión a oxysterol	SDS	Transporte de esteroles y homeostasis	+	-	AG/RE/V	6	6,25 / 141,53	
Sla2	FOXG_03618	ontrol ensamblaje a citoesqueleto	SDS	Adaptador de unión a clatrina	+	-	C	2	5,52 / 82,81	<i>S. cerevisiae</i> y <i>C. Albicans</i> (Wang & Shen, 2011)
Sfh5	FOXG_03648	Proteína similar a Sec14	SDS	Transferencia de fosfatidilinositol	+	-	RE	2	5,03 / 44,50	
	FOXG_04151	Fosfolipasa D1	SDS	Hidrólisis de fosfatidilcolina/ secreción	+	-	C	1	5,39 / 93,14	
	FOXG_05269	Proteína vesicular de RE	SDS	Transporte vesicular de RE a AG	+	-	RE/V	1	5,67 / 18,12	
	FOXG_05358	Proteína con dominios Bar y Sh3	SDS	Endocitosis	+	-	C	-	7,07 / 49,21	
Psd2	FOXG_05404	Fosfatidilserina decarboxilasa	SDS	Biosíntesis de fosfatidilcolina	+	-	RE	4	5,51 / 84,35	<i>S. cerevisiae</i> (Kitamura <i>et al.</i> , 2002)
	FOXG_05458	Hipotética con dominio sedlin	SDS	Transporte de RE a AG	+	-	V	-	9,30 / 20,16	
Vps17	FOXG_06305	Proteína de vacuola	SDS	Transporte vesicular	+	-	V	4	6,28 / 66,53	
	FOXG_07663	Hipotética similar a Uso1	SDS	Transporte de proteínas de RE a AG	+	-	AG/V	-	8,64 / 44,86	
	FOXG_07936	Hipotética con dominio Uba	SDS	Endocitosis	+	-	C	5	4,88 / 133,62	<i>S. cerevisiae</i> (Gagny <i>et al.</i> , 2000)
	FOXG_08330	Adaptador AP-2	SDS	Unión a cargo o clatrina	+	-	MV	8	5,86 / 79,38	<i>S. cerevisiae</i> (Rad <i>et al.</i> , 1995)
	FOXG_08416	D-oxidasas de aminoácidos	SDS	Unión a lípidos	+	-	MRE/MP	2	6,30 / 83,50	
	FOXG_09046	ATPasa 3	SDS	Transporte de Calcio en la red <i>trans</i> -golgi	+	-	MAG?	3	5,49 / 117,65	
	FOXG_09230	Hipotética DUF221	SDS	Transporte de AG a membrana plasmática	+	-	MAG/MV	4	8,94 / 99,92	
Mvp1	FOXG_10329	Nexina mvp1	SDS	Transporte vacuolar	+	-	C/V/MP	5	5,97 / 57,93	
Rab6	FOXG_10439	Ras GTPasa	SDS	Unión a GTP, recuperación de membranas de AG	+	-	AG	1	7,69 / 23,33	<i>A. nidulans</i> (Pantazopoulou & Penalva, 2011)
	FOXG_10534	Subunidad 6B de complejo de transporte	SDS	Tráfico de proteínas del RE al AG	+	-	V	2	5,82 / 26,12	
	FOXG_10698	Tiorredoxina	SDS	Tráfico de RE a AG	+	-	C	2	6,89 / 13,07	(Barlowe, 1997)
	FOXG_11880	Hipotética similar a CsaA	SDS	Chaperona	+	-	PM	11	6,27 / 89,45	
Metabolismo primario										
	FOXG_00832	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa	SDS	Síntesis de UDP-GlcNAc	+	-	C	-	5,39 / 54,69	
	FOXG_02740	Hipotética	SDS	UDP glucosil transferasa	+	-	MP/MRE?	-	6,74 / 60,85	
	FOXG_05406	Colina-fosfato citidilil transferasa	SDS	Síntesis de fosfolípidos de membrana	+	-	C	4	6,26 / 48,49	
	FOXG_08629	Fosfatidiletanolamina metiltransferasa (PEMT)	SDS	Biosíntesis de fosfatidilcolina	+	-	MP/MRE	2	6,47 / 102,31	
	FOXG_09807	Hipotética	SDS	Biosíntesis de fosfolípidos	+	-	MP/MRE?	1	6,38 / 30,69	
	FOXG_10166	Hipotética	SDS	Metiltransferasa (6)	+	-	RE	1	6,93 / 33,78	<i>S. cerevisiae</i> (Gaber <i>et al.</i> , 1989)
	FOXG_13171	Hipotética	SDS	Retinol deshidrogenasa	+	-	MP?	-	9,05 / 40,44	
	FOXG_13821	Esfingosina-1P-liasa	SDS	Metabolismo de esfingolípidos	+	-	RE	3	8,72 / 62,70	
	FOXG_14824	Hipotética similar a HMG2	SDS	Biosíntesis de ergosterol	+	-	RE	1	7,54 / 41,32	

Modificaciones postraduccionales										
	FOXG_05157	Hipotética	SDS	Biosíntesis de GPI/Hipersensible a CFW	+	-	MP/MRE?	-	9,16 / 13,33	
	FOXG_11659	Peptidasa de señal I similar a Sec11	SDS	Maduración de proteínas	+	-	RE	1	5,37 / 19,17	
Chaperonas										
Shr3	FOXG_00358	Proteína de secreción	SDS	Chaperona (9)	+	-	MRE/MP?	-	6,30 / 24,51	<i>S. cerevisiae</i> (Gilstring <i>et al.</i> , 1999)
	FOXG_08329	Hipotética DUF 1077	SDS	Plegamiento de proteínas(9)	+	-	MRE?	-	9,55 / 20,30	
	FOXG_11282	Hipotética	SDS	Chaperona, interviene en tráfico de membranas(9)	+	-	MAG/MV?	2	6,19 / 88,43	
Biogénesis de pared										
	FOXG_00159	Cistatió β-sintasa β-tionasa	SDS	Síntesis de aa	+	-	E	1	6,71 / 14,22	
	FOXG_02921	β 1,6 glucanasa	Lam /SDS	Biosíntesis de pared celular	+	-	E	1	5,90 / 48,73	
ChsV	FOXG_04162	Sintasa de quitina (clase V)	SDS	Síntesis de quitina en la pared	+	-	P	11	6,88 / 20,69	<i>F. oxysporum</i> (Madrid <i>et al.</i> , 2003) Prados-Rosales (tesis doctoral)
ChsVb	FOXG_04163	Sintasa de quitina (clase V)	SDS	Síntesis de quitina en la pared	+	-	P	7	5,59 / 198,29	<i>F. oxysporum</i> (Madrid <i>et al.</i> , 2003)
	FOXG_04802	Hipotética	SDS	β-glucanasa	+	-	P	5	4,48 / 73,33	
	FOXG_07678	Subunidad α de glucosidasa II	SDS	Biosíntesis de pared celular	+	-	E	-	5,76 / 109,37	
	FOXG_07845	Hipotética	SDS	Desconocida	+	-	E	3	7,68 / 26,132	
	FOXG_12172	Hipotética	SDS	Glicosiltransferasa	+	-	P	4	8,65 / 44,23	
	FOXG_12882	Precursor de endoquitinasa	Lam	Biosíntesis de pared celular	+	-	P	-	5,35 / 35,61	
	FOXG_16948	Autolisina	SDS	Remodelado de pared celular	+	-	E	-	8,50 / 65,83	
Adhesión										
	FOXG_00537	Hipotética	SDS	Matriz extracelular	+	-	E	1	5,17 / 21,83	<i>F. oxysporum</i> (Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2009)
AfpB	FOXG_10750	Proteína alcalina	SDS	Fungispumina	+	-	P	-	9,35 / 16,30	<i>F. culmorum</i> (Zapf <i>et al.</i> , 2007)
Detoxificación										
Tom3	FOXG_02734	β-2 tomatinasa	SDS	Degradación de α-tomatina	+	-	E	7	6,69 / 83,28	<i>F. oxysporum</i> (Pareja-Jaime <i>et al.</i> , 2008)
	FOXG_10555	Glutatió S transferasa	SDS	Reacción redox	+	-	C?	2	5,93 / 30,39	<i>S. cerevisiae</i> (Choi <i>et al.</i> , 1998)
	FOXG_17180	catalasa/peroxidasa	SDS	Degradación y detoxificación	+	-	E	2	6,57 / 85,09	
	FOXG_15236	Transportador resistente a drogas	SDS	Transporte de poliaminas	+	-	MP	1	9,29 / 65,05	
Epl1	FOXG_13198	Snodprot1	SDS	Respuesta a moléculas de planta	+	-	E	2	9,39 / 14,54	<i>T. atroviride</i> (Frischmann <i>et al.</i> , 2013))
Respuesta a estrés										
	FOXG_00378	Proteína de choque térmico	SDS	ATPasa	+	-	Mit	-	6,65 / 88,61	
	FOXG_05968	Hipotética	SDS	Regulador de respuesta a estrés	+	-	C	1	4,84 / 31,60	
Hidrolasas										
	FOXG_08084	Hipotética Familia subtilasa	SDS	Serina proteasa	+	-	E	7	7,24 / 63,23	
	FOXG_16902	α-N-arabinofuranosidasa	Lam	Degradación de pared vegetal	+	-	E	-	5,79 / 51,66	
	FOXG_16906	Lactonasa	SDS	Degradación	+	-	E	4	5,08 / 43,20	

Otras funciones										
	FOXG_00505	Hipotética	SDS	Adaptador de proteínas con repeticiones ankyrin	+	-	C	6	5,49 / 20,60	
	FOXG_02080	Hipotética DUF 1682	SDS	Desconocida	+	-	RE?	1	7,80 / 48,18	
	FOXG_02983	Hipotética	Lam	Dominio WSC de unión a carbohidratos	+	-	E	2	4,51 / 49,01	<i>F. oxysporum</i> (Prados-Rosales <i>et al.</i> , 2009)
Srp54	FOXG_03041	Receptor subunidad α	SDS	Partícula de reconocimiento	+	-	RE	4	6,62 / 71,50	
	FOXG_03279	Hipotética	SDS	Desconocida	+	-	MP	-	9,30 / 99,29	
	FOXG_03582	Hipotética	SDS	Regulador de ubiquitina	+	-	C	1	5,62 / 50,46	
PTM1	FOXG_09500	Proteína integral de membrana	SDS	Desconocida	+	-	MP	5	5,49 / 60,75	
Srp54	FOXG_09025	Partícula de reconocimiento 54kDa	SDS	Partícula de reconocimiento	+	-	C	2	9,26 / 56,44	
	FOXG_15265	Ceramidasa neutra/alcalina	SDS	Síntesis de esfingosina (regulación metabolismo)	+	-	MP	6	5,32 / 81,41	
	FOXG_15733	Proteína con dominio caleosín	SDS	Estructural	+	-	MP/MRE	1	5,55 / 28,92	

Tabla 25. Clasificación funcional de las proteínas ausentes en $\Delta gnt2$.

Función	Número de proteínas	Proteínas con N-glicosilación	Proteínas con dominio transmembrana	Proteínas con péptido señal
Transducción de señales	9	7	3	0
Transporte de metabolitos	7	5	6	0
Tráfico intracelular y secreción	28	32	6	0
Metabolismo primario	9	6	5	0
Modificaciones postraduccionales	3	1	1	0
Chaperonas	3	1	2	4
Biogénesis de pared celular	9	7	2	1
Adhesión	2	1	1	3
Detoxificación y defensa	7	6	1	2
Hidrolasas	3	2	0	1
Total	91	77	30	11

El 33 % de estas proteínas posee dominios transmembrana, y el 12 % presenta péptido señal (Figura 50 B y Tabla 25). Algunas poseen dominios de unión a fosfolípidos u otras proteínas, lo cual explicaría su localización en membrana o pared celular.

Se destaca en $\Delta gnt2$ la ausencia de proteínas relacionadas con procesos de secreción como: receptores de membrana, de cubierta de vesículas, con actividad GTPasa, que intervienen en la formación de vesículas, y transportadores de calcio, que permiten la fusión de membranas. También están ausentes las implicadas en biosíntesis de amino ácidos y fosfolípidos (típicamente citosólicas), de mecanismos de transducción de señales, como GTPasa de la familia Ras, que podrían intervenir en señalización, y de biogénesis de pared celular.

Aproximadamente un 85 % de ellas posee al menos una secuencia de *N*-glicosilación (Figura 50 A). Esto sugiere que la *N*-glicosilación podría influir en la composición proteica de la pared celular y que la ausencia de *gnt2* provocaría ausencia de algunas proteínas superficiales y/o implicadas en tráfico vesicular.

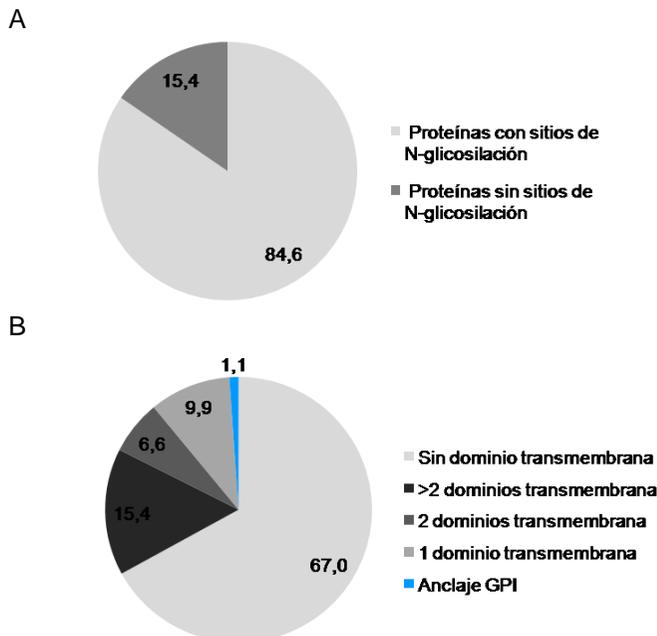


Figura 50. Proteínas de pared (%) con A) posibles sitios de *N*-glicosilación y B) dominios de unión a membrana ausentes en $\Delta gnt2$.

13.3. Desglicosilación de proteínas de pared por tratamiento con PNGasa F

Las fracciones proteicas extraídas de micelio obtenido de cultivos en SM (solubles e insolubles en SDS) se resuspendieron en 2 % CHAPS con 9 M urea para su análisis tras desglicosilación con PNGasa F. Esta endoglicosidasa actúa selectivamente entre la primera *N*-acetilglucosamina del carbohidrato y la asparragina del polipéptido, y solo escinde los glicanos unidos con enlace *N*-glicosídicos. PNGasa F no corta enlaces entre la asparragina y el primer residuo de *N*-acetilglucosamina cuando este monosacárido se encuentra a su vez unido con enlace α (1 \rightarrow 3) a una fucosa, característico de algunas glicoproteínas (Suzuki *et al.*, 2002) (Figura 51).

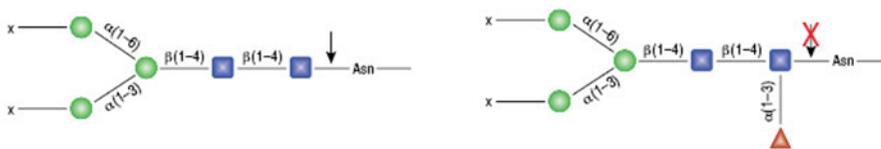
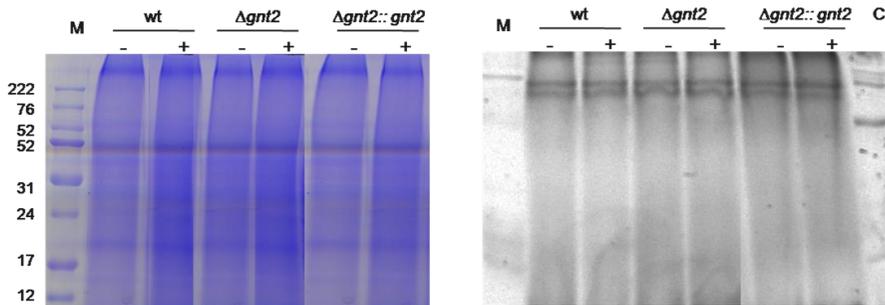


Figura 51. Sitios sensibles a la acción de la desglicosidasa PNGasa F. GlcNAc (cuadrado azul), manosa (círculo verde) y fucosa (triángulo rojo).

Alícuotas conteniendo 20 μ g de proteínas de cada tipo (solubles e insolubles en SDS) se trataron con 1,25 U de PNGasa F, y el producto de estos tratamientos se analizó tras separación en geles de poliacrilamida (10 %) y tinciones específicas para proteínas (Coomasie) o glicoproteínas (proQ-Emerald).

La comparación de proteínas de pared tratadas o no con PNGasa F no mostró diferencias de movilidad ni del tamaño aparente en la mezcla de las proteínas de pared (Figura 52). A pesar de que ambas fracciones contienen proteínas altamente glicosiladas, como se observa en los geles teñidos con proQ-Emerald, la fracción glicosídica no se eliminó con PNGasa, presumiblemente debido a la presencia de enlaces O-glicosídicos.

A



B

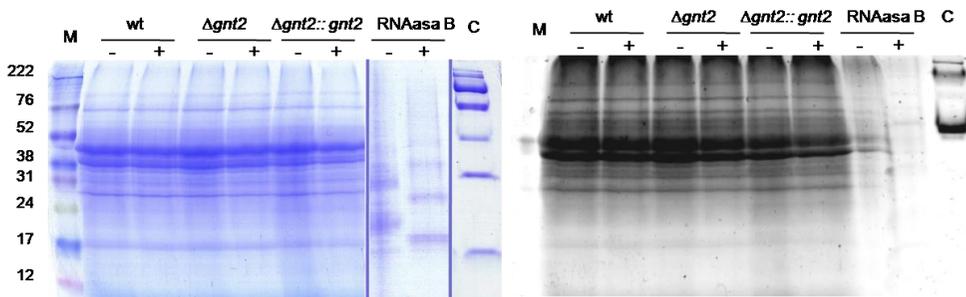


Figura 52. Análisis de las proteínas de pared de la estirpe silvestre (wt), el mutante $\Delta gnt2$ y el complementado $\Delta gnt2::gnt2$ mediante electroforesis en geles SDS-PAGE (10 %) tratadas (+) o no (-) con PNGasa F. Tinción con azul Coomassie (izquierda) y con ProQ-Emerald (derecha). A) Fracción proteica soluble en SDS. B) Fracción proteica insoluble en SDS. Como control del tratamiento se utilizó RNAasa B. La glicoproteína Candy Cane (c) es el control de la tinción proQ-Emerald.

14. Identificación de moléculas glicosiladas secretadas por el hongo

Para estudiar la influencia de Gnt2 en la glicosilación de proteínas y posibles glicolípidos secretados por el hongo, se purificaron las moléculas secretadas por el hongo en condiciones específicas de inducción, para su posterior caracterización mediante SDS-PAGE y otros análisis químicos.

14.1. Enzimas extracelulares

Las proteínas extracelulares se producen para degradar los nutrientes del medio y facilitar su metabolismo; por tanto dichas enzimas son inducidas por metabolitos y nutrientes presentes en el medio de cultivo.

En este estudio se analizaron las proteínas secretadas en medio sintético conteniendo una de las siguientes fuentes de carbono: aceite de germen de trigo (WGO), tejido vascular (TVT), casaminoácidos (Ca) o sacarosa y glucosa (S+G). Los patrones de bandas correspondientes a dichas proteínas observados en geles SDS-PAGE resultaron muy variables (Figura 53).

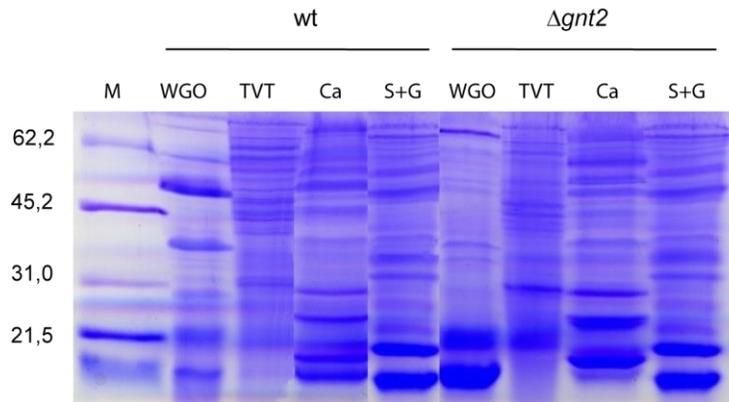


Figura 53. Proteínas extracelulares inducidas en la estirpes silvestre (wt) y el mutante $\Delta gnt2$ en medio sintético conteniendo como única fuente de carbono: aceite de germen de trigo (WGO); tejido vascular de tomate (TVT); casaminoácidos (Ca) o sacarosa y glucosa (S+G). En cada carril se analizaron 6 μ g de proteínas que se visualizaron mediante SDS-PAGE en geles al 12 % poliacrílida y tinción azul Coomasie. M indica el patrón de peso molecular en kDa.

Por otro lado se analizaron muestras conteniendo 10 μ g de proteínas extracelulares tratadas con PNGasa F, así como controles sin tratar. Las muestras se separaron mediante electroforesis y se sometieron a tinción Coomasie.

La comparación del patrón de enzimas extracelulares tratadas o no con PNGasa F mostró cambios de tamaño de algunas bandas como consecuencia de la eliminación del *N*-glicano de dicha glicoproteína (Figura 54).

Se observaron pequeñas diferencias en el patrón de bandas entre la estirpe silvestre y el mutante, como son la ausencia de algunas bandas que en el mutante $\Delta gnt2$ resultaron resistentes a la des-glicosilación (Figura 54), aunque resultó difícil discriminar entre proteínas de tamaño similar en gel SDS-PAGE de una dimensión.

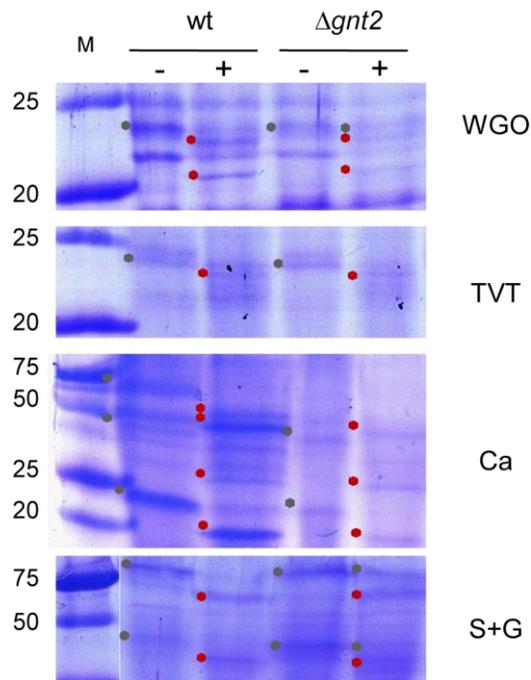


Figura 54. Proteínas extracelulares secretadas por la estirpe silvestre (wt) y el mutante $\Delta gnt2$ en medio sintético suplementado con aceite de germen de trigo (WGO), tejido vascular de tomate (TVT), casaminoácidos (Ca), o sacarosa y glucosa (S+G), separadas en geles SDS-PAGE al 10 %, tras tratamiento (+) o sin (-) de PNGasa, visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. Los asteriscos de color gris indican bandas de proteínas sin des-glicosilar y rojos las proteínas que cambian de tamaño tras tratamiento con PNGasa.

Para optimizar la separación de las proteínas e identificar las diferencias entre ambas estirpes, se compararon las enzimas extracelulares resueltas en 2D-SDS-PAGE. Esto permitió separarlas en función de su pI y masa molecular, y posteriormente identificar los péptidos mediante análisis de MS y comparación de su huella en la base de datos MASCOTT.

Se mezclaron 30 μ g de cada extracto proteico, obtenido de cultivos inducidos en distintas fuentes de carbono (WGO, TVT, Ca y S+G) resultando una mezcla de 120 μ g de cada estirpe. Las cuatro réplicas biológicas independientes de proteínas extracelulares inducidas, se prepararon de forma aleatoria mezclando dos a dos cantidades equivalentes de las réplicas, con objeto de eliminar la posible variabilidad biológica debida al proceso de purificación. Se obtuvieron cuatro nuevas mezclas por cada estirpe, con 120 μ g de proteínas (Tabla 10). Las muestras proteicas se resolvieron en geles 2D-SDS-PAGE y tras tinción fluorescente con Sypro, las imágenes obtenidas se

analizaron con el software PDQuest (Bio Rad) para identificar posibles diferencias en el patrón electroforético del mutante respecto a la estirpe silvestre (Figura 55).

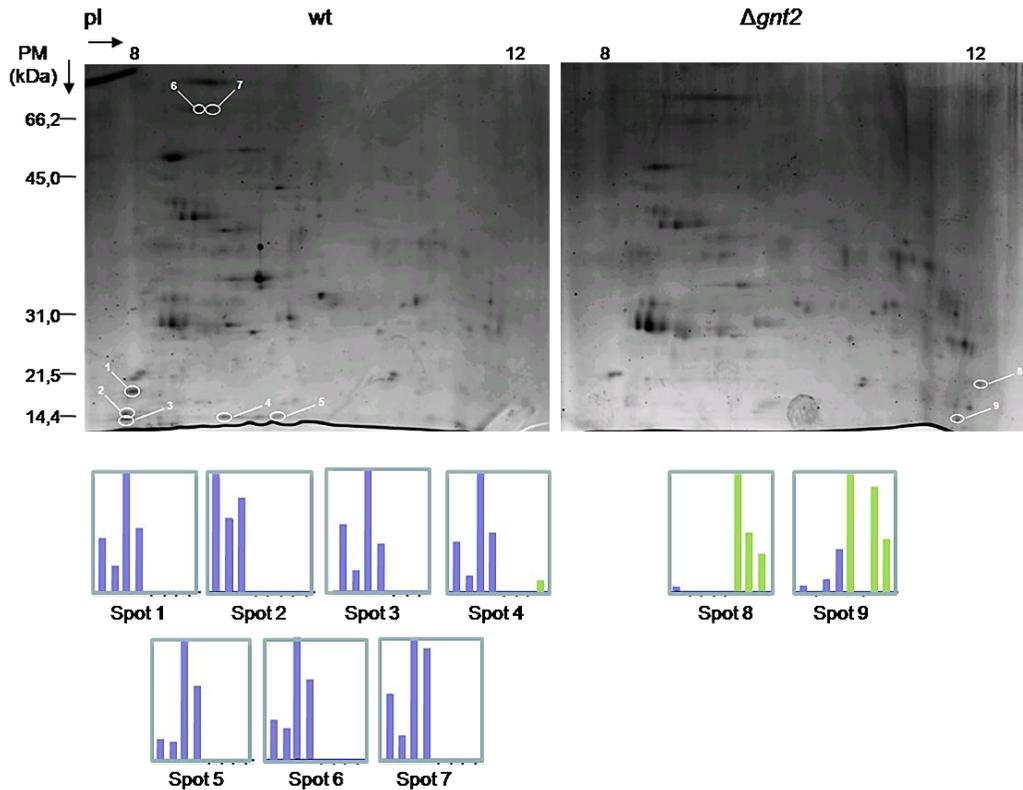


Figura 55. Proteínas extracelulares de la estirpe silvestre (wt) y el mutante $\Delta gnt2$ separadas mediante electroforesis bidimensional y visualizadas tras tinción con Sypro. Se indican las proteínas seleccionadas para su identificación mediante análisis químico. Las gráficas de la parte inferior muestran los niveles de representación de los nueve spots seleccionados mediante análisis digital bioinformático de las imágenes de los geles. Las barras azules indican los valores de representación de las réplicas en la estirpe silvestre, y las verdes los valores en el mutante $\Delta gnt2$.

El análisis bioinformático con el programa PDQuest de las imágenes digitalizadas de los geles permitió detectar nueve manchas con distinto nivel de representación entre las estirpes bajo análisis (Figura 55), que fueron posteriormente identificadas mediante comparación del espectro de fragmentación de cada proteína con la base de datos Mascot, identificándose así las que se detallan en la Tabla 26.

Tabla 26. Proteínas extracelulares identificadas en el análisis 2D-SDS-PAGE mediante Maldi TOFF/TOFF MS. Se representa presencia (+), ausencia (-) y abundancia relativa respecto a la estirpe silvestre (wt). Los valores negativos indican menor representación en el mutante $\Delta gnt2$, y los positivos mayor representación con respecto al silvestre (wt). 1, localización; 2, posibles sitios de *N*-glicosilación; 3, valores teóricos de punto isoeléctrico y masa molecular (kDa).

Spots	Nº acceso	Proteína	Función biológica	Presencia		Loc ¹	Sitios N ²	pI/Mwteórico s ³
				wt	$\Delta gnt2$			
Hidrolasas								
1 y 3	FOXG_10138	Precursor de aspergillopepsina	Pepsina	+	-	E	1	4,88 / 27,56
2	FOXG_03994	Precursor de endotiapepsina	Proteasa aspártica	+	-	E	-	5.59 / 42,57
4	FOXG_16920	α -amilasa1	Amilasa	+	-1,7	E	1	5.53 / 50,55
5	FOXG_02417	LAP2 con dominio PA	Aminopeptidasa	+	-	E	1	8.59 / 53,70
6 y 7	FOXG_09102	LAP1 con dominio PA	Metalopeptidasa	+	-	E	3	5.21 / 48,02
Estrés oxidativo								
8 y 9	FOXG_04049	Isoamil alcohol oxidasa	Óxido-reducción	+/-	4,9/ +	E	3	6.14 / 60,70

Proteínas ausentes o menos abundantes en el mutante: enzimas líticas

Seis manchas proteicas ausentes en el mutante se identificaron como proteasas extracelulares (spots 1, 2, 3, 5, 6 y 7). Estas proteínas fueron: una pepsina presente en dos manchas proteicas con masas moleculares distintas (FOXG_10138), una proteasa aspártica (FOXG_03994) y dos leucín aminopeptidasas (FOXG_02417 y FOXG_09102), de la cuales la segunda se encuentra representada en dos manchas proteicas con distinto punto isoeléctrico (pI).

Se detectó una única proteína menos representada en el mutante e identificada como una α -amilasa (FOXG_16920) (spot 4).

En conjunto, el mutante $\Delta gnt2$ mostró deficiencias en cuatro enzimas líticas, fundamentalmente proteasas, útiles para la degradación de proteínas y

polisacáridos. Esta carencia podría deberse a defectos en glicosilación que afecten a su exportación extracelular.

Proteínas más abundantes en el mutante; metabolismo oxidativo

Se detectó una proteína más abundante en el mutante, identificada como isoamil alcohol oxidasa (FOXG_04049), relacionada con estrés oxidativo. Esta proteína se detectó en dos manchas proteicas con distinto tamaño y punto isoeléctrico. Una de ellas (spot 8) con un nivel cinco veces superior en el mutante. El spot 9 solo estuvo presente en el mutante. La presencia de una proteína con distintos tamaños y puntos isoeléctricos podría explicarse por diferencias en el estado de glicosilación y/o dimerización.

Todas las proteínas identificadas contienen péptido señal característico de proteínas secretadas. Además todas presentan de uno a tres posibles sitios de *N*-glicosilación a excepción de la proteasa aspártica FOXG_03994.

14.2. Lipopolisacáridos

La glicosilación de lípidos extracelulares para formar lipopolisacáridos o lipoquitooligosacáridos es poco conocida en hongos, salvo en micorrizas donde se ha descrito que pueden actuar como factores de inducción de la nodulación (NOD) (Maillet *et al.*, 2011). Están compuestos por un esqueleto oligosacárido, de composición más variable que los de pared bacteriana, y formados por glucosamina en el caso de los factores NOD, unida a una o varias cadenas de lípidos (Figura 56). Concentraciones muy bajas, del orden de 10^{-9} - 10^{-12} M, de estos compuestos desencadenan respuestas en la planta, esenciales para el proceso de simbiosis (D'Haeze & Holsters, 2002).

A pesar de que *F. oxysporum* no establece relaciones simbióticas con ninguna especie vegetal, la secreción de este tipo de moléculas podría jugar un papel activo en el proceso de infección, como sucede en *Rhizobium* y en hongos micorriza (Corradi & Lildhar, 2012; Fraysse *et al.*, 2003).

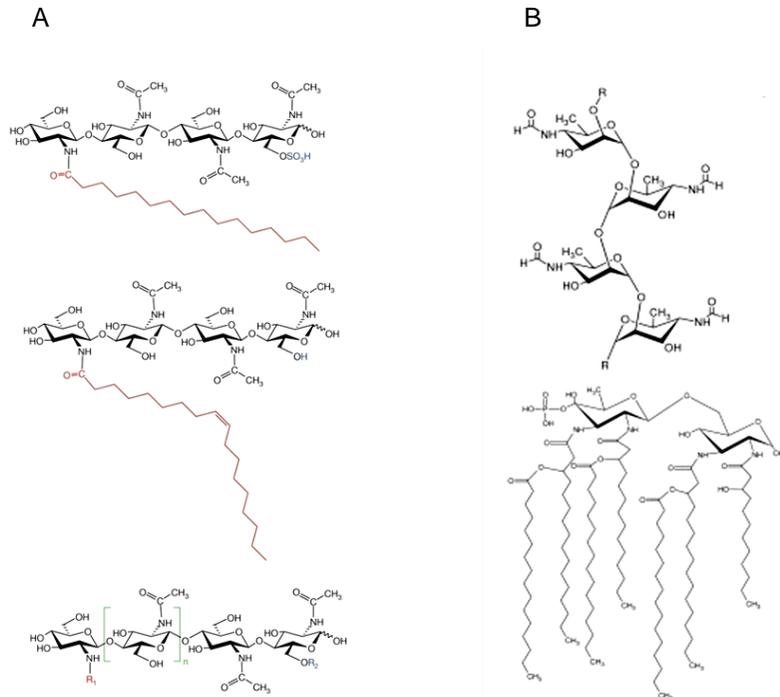


Figura 56. Ejemplo de estructuras de lipopolisacáridos. A) Factor Nod de hongos micorrizas. B) Lipopolisacárido típico de pared bacteriana.

Con objeto de analizar la existencia de lipopolisacáridos en este hongo y determinar diferencias en la producción y/o estructura de los mismos entre la estirpe silvestre y el mutante causadas por defectos en glicosilación, se extrajeron moléculas lipídicas extracelulares producidas bajo condiciones de inducción en 1 % de ácido glutámico, utilizando n-butanol como solvente orgánico para la extracción.

La presencia de ácido glutámico simula la existencia de material vegetal e induce y activa la producción de proteasas y otras moléculas en el hongo para la degradación, invasión e infección de la planta. Los sobrenadantes libres de células, procedentes de cultivos de la estirpe silvestre y del mutante en estas condiciones, se sometieron a extracciones sucesivas líquido-líquido con n-butanol. Este alcohol, debido a su baja miscibilidad en soluciones acuosas, permite extraer eficientemente lípidos en solución, por ser éstos más solubles en solventes orgánicos que en agua. La recuperación de la fracción alcohólica seguida de evaporación del solvente, lavado, liofilización y resuspensión en agua permitió purificar algunos lípidos extracelulares.

Los extractos procedentes de 0,7 L de cultivo se concentraron en 20 μ L de agua, alcanzando una concentración de 3×10^4 veces la inicial, y se separaron para su análisis en geles de poliácridamida. Tras tinciones específicas con plata (proteínas y lipopolisacáridos), proQ-emerald (glicoconjugados) y azul Coomasie (específico de proteínas) se observaron diferencias importantes entre las estirpes (Figura 57).

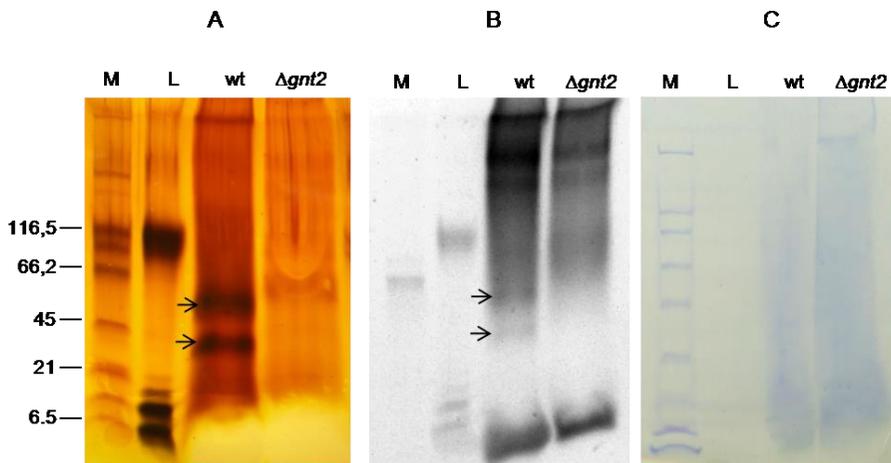


Figura 57. Separación electroforética de lípidos extracelulares de la estirpe silvestre (wt) y mutante $\Delta gnt2$ en geles SDS-PAGE al 12 % y teñidos con A) plata; B) proQ-Emerald; o C) Azul Coomasie. M indica el marcador de peso molecular expresado en kDa (Broad range Bio-Rad), L lipopolisacáridos de *E. coli* utilizados como control de las tinciones. Las flechas indican las bandas de lipopolisacáridos identificadas en el extracto obtenido de la estirpe silvestre.

La estirpe silvestre mostró bandas que estaban ausentes en el mutante $\Delta gnt2$, con migración en gel comprendida entre 21-66,2 kDa (Figura 57 A).

Algo de la naturaleza de dichas bandas se podía deducir de las tinciones realizadas. Mediante Coomasie se comprobó la ausencia de bandas en ambas estirpes, lo que ponía de manifiesto la ausencia de proteínas en los extractos (Figura 57 C). La tinción proQ-Emerald evidenció que las bandas observadas en los extractos del silvestre contenían una fracción glucídica (Figura 57 B). Por lo tanto, estos datos nos inducen a concluir que posiblemente las moléculas observadas en la estirpe silvestre en el gel teñido con plata (Figura 57 A) corresponden a lipopolisacáridos.

Estos lipopolisacáridos producidos por la estirpe silvestre son un resultado muy novedoso ya que nunca se ha descrito con anterioridad en hongos filamentosos no simbiotes.

DISCUSIÓN

La hipótesis planteada en este trabajo ha sido que la glicosilación terminal debe ser esencial para la maduración y funcionamiento de numerosas glicoproteínas de superficie y otras extracelulares. En base a este planteamiento, se esperaría que modificaciones de los glicanos de proteínas de la vía secretora afectarían directamente a la arquitectura y composición de la pared celular, y por otro lado a la secreción de algunas proteínas.

Debido a la cantidad de proteínas modificadas mediante O- y N-glicosilación presentes en eucariotas, la glicosilación proteica abarca muchos aspectos del funcionamiento celular general. Por ello se ha abordado un estudio desde varios puntos de vista, funcional, morfológico y fisiológico, y se ha tratado de dilucidar el papel de las N-acetilglucosamina transferasas (Gnt) en *F. oxysporum*, aún bastante desconocidas en especies de hongos filamentosos y en levaduras.

15. Conservación de las rutas de glicosilación en *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

De todas las rutas de glicosilación, la N-glicosilación inicial localizada en el RE es la más estudiada en eucariotas, incluyendo *S. cerevisiae*. Se trata de un proceso conservado que consiste en la síntesis de un oligosacárido común y su transferencia en bloque a residuos de asparragina, potenciales dianas de N-glicosilación, seguida de la adición y eliminación de residuos de glucosa. Esta estructura es común a todas las proteínas N-glicosiladas y su alteración ocasiona desórdenes y patologías. Un ejemplo son aquellas ligadas a alteraciones de la glicosilación en humanos (CDG), causadas por defectos en enzimas del RE que participan en la N-glicosilación, revisado por Sparks y Krasnewich (1993).

La divergencia en el procesamiento de N-glicanos se produce en las etapas localizadas en el AG. En mamíferos se eliminan manosas y se adicionan galactosa, fucosa y ácido siálico, sin embargo en *S. cerevisiae* no se elimina ningún residuo y se extiende el manano formando uno o dos tipos de estructuras (Munro, 2001).

El análisis *in silico* realizado en este trabajo ha permitido identificar las proteínas que participan en glicosilación en *F. oxysporum* ortólogas a *S. cerevisiae*, y detectar la ausencia de once proteínas del AG. Dentro de las proteínas presentes se observa un número de parálogos, destacando el caso de Gnt1 que en *F. oxysporum* presenta seis miembros de esa familia génica.

Otros estudios han revelado la importancia de la glicosilación de proteínas llevada a cabo en AG, ya que la deficiencia en monosacáridos adicionados al "core", sintetizado previamente en el RE, también altera la función y la pauta de

secreción. La hipoglicosilación proteica puede causar patologías graves en mamíferos.

En el trabajo realizado por Xu y colaboradores (2010) se describe el efecto que provoca la ausencia de los transportadores CMP-ácido siálico y GDP-fucosa del AG, causando acumulación de glicoconjugados y estrés en el RE; y resultando en la inhibición de la síntesis proteica, retención de glicoproteínas en el RE y reducción general de la secreción proteica, tanto de proteínas glicosiladas como no glicosiladas.

16. Papel de ScGnt1 y sus ortólogos de *F. oxysporum* en la elongación de *N*-glicanos

La contribución de la *N*-acetilglucosamina transferasa ScGnt1 en la extensión de *N*-glicanos en *S. cerevisiae* no es clara, ya que las estructuras de sus *N*-glicanos son polímeros de manosa ramificados. Yoko-o y colaboradores (2003) destacaron la ausencia de la *N*-acetilglucosamina transferasa Gnt1 como causante de una masa menor del *N*-glicano unido a la lisozima de huevo G40N, proteína heteróloga modificada con un único sitio de *N*-glicosilación, introducida en el genoma de *S. cerevisiae* para demostrar la función de este gen sobre la *N*-glicosilación.

En mamíferos, los monosacáridos de GlcNAc adicionados en el AG sirven como punto de ramificación, no obstante se desconoce si en *S. cerevisiae* y en *F. oxysporum* están en posición terminal o son monosacáridos que implican puntos de ramificación (bisecting). Cabe señalar que ninguno de los genes responsables de *N*-acetilglucosamina transferasas del AG en mamíferos (GnTI, GnTII, GnTIII, GntIV y GnTV) tienen ortólogos en *S. cerevisiae* o *F. oxysporum*, lo que podría ser indicativo de una función diferente a la desempeñada por los Gnt de hongos. Por esta razón, nos inclinamos a pensar que la función de estos genes en *F. oxysporum* es la adición de GlcNAc en posiciones terminales, aunque no tenemos evidencias definitivas.

Por otro lado, la presencia en *F. oxysporum* de seis parálogos demuestra una elevada redundancia funcional. Sin embargo, el análisis filogenético de las proteínas deducidas permitió su clasificación en dos grupos, uno integrado por Gnt1, Gnt3 y Gnt7, y otro por Gnt2, Gnt4 y Gnt6. Según este modelo, y apoyándonos en el elevado grado de conservación y en la existencia de al menos un gen en otros hongos, cada grupo estaría formado por varios parálogos.

La existencia de dos grupos conservados podría ser consecuencia de una diversificación funcional, es decir, aunque su función sea añadir GlcNAc a los *N*-glicanos durante su elongación en el AG, lo harían sobre diversos sustratos o

estableciendo distintos tipos de enlaces, como sucede en mamíferos (Castilho *et al.*, 2011).

La demostración de que Gnt2 reside en el AG, mediante localización en los mutantes de la proteína etiquetada con GFP bajo el control de un promotor fuerte, es consistente con la localización descrita para Gnt1 de *S. cerevisiae* (Yoko-o *et al.*, 2003) en la región medial del AG. En las imágenes de microscopía de fluorescencia se aprecia el cambio de fluorescencia en las hifas antes y después del tratamiento con brefeldina A, indicando la disgregación de los sáculos del AG por efecto de este compuesto. Estos resultados, junto con el análisis *Western* de fracciones subcelulares de los mutantes GFP::Gnt2, evidencian su localización en el AG.

17. Alteraciones de la pared celular causadas por defectos en *N*-glicosilación

El aspecto de las colonias del silvestre, del mutantes $\Delta gnt2$ y del complementado $\Delta gnt2::gnt2$, en presencia de compuestos tóxicos o enzimas líticas que interfieren con la pared celular y/o la membrana plasmática nos ha permitido identificar las alteraciones en la pared de $\Delta gnt2$.

El mutante resultó ser más sensible a CFW y SDS, compuestos que interfieren con la quitina y la membrana plasmática, respectivamente. Una caracterización posterior de la pared utilizando el colorante Alcian Blue que interacciona con las cargas negativas expuestas en su superficie, y la resistencia a enzimas de degradación, confirmó que la pared del mutante presentaba modificaciones significativas respecto al silvestre. Se observó un descenso del 35 % en su capacidad de unión al Alcian Blue, lo que significa menor cantidad o exposición de azúcares ácidos y/o grupos fosfato terminales en su pared. El mutante además mostró mayor resistencia a la degradación de la pared por acción de enzimas líticas de pared, posiblemente por la compactación y/o la ramificación de los polisacáridos de pared.

Estos resultados indican que el mutante presenta cambios en su composición y/o distribución de polisacáridos. El análisis químico de la pared y la cuantificación de los *N*- y *O*-glicanos unidos a proteínas de pared aportan evidencias directas de la implicación de Gnt2 en la *N*-glicosilación, mostrando una disminución significativa (30 %) de *N*-glicanos en el mutante $\Delta gnt2$, con cadenas de galactofuranosa de menor grado de polimerización que la estirpe silvestre. La estirpe complementada recuperó el fenotipo silvestre en cuanto al grado de polimerización, sin embargo su contenido total de *N*-glicanos resultó menor. Este resultado se podría explicar si las dos copias de *gnt2* introducidas en el mutante hubieran recombinado resultando en menor expresión que en el silvestre.

La reducción en la masa de *N*-glicanos de pared, se podría justificar por una hipoglicosilación proteica, consecuencia de menos *N*-glicanos unidos a cada proteína y/o menor longitud de estos polisacáridos, o alternativamente, por una cantidad inferior de glicoproteínas.

Otro dato interesante es la composición idéntica de los *N*- y *O*-glicanos de las proteínas de pared. Ambas fracciones mostraron estar constituidas por cadenas de galactofuranosa ramificadas con manosa, glucosa y ácido glucurónico, formando galactoproteínas, en lugar de manoproteínas características de levaduras como *S. cerevisiae*. Estos resultados concuerdan con Leal y colaboradores (2010) que identificaron distintos glicanos unidos a proteínas de las pared en varias especies fúngicas.

17.1. Diferencias en las proteínas de pared del mutante *Δgnt2*

La relación entre la deficiencia de *Gnt2* y el contenido proteico de la pared se ha analizado mediante un abordaje proteómico identificando numerosas proteínas. Sorprendentemente muchas de éstas no corresponden con proteínas tradicionalmente descritas como residentes en pared o membrana plasmática. Aunque autores como Bowman y Free (2006) señalan que la presencia de proteínas citosólicas es habitual en la pared celular fúngica, y no es consecuencia de contaminación por proteínas intracelulares. Nuestros análisis se centraron solo en proteínas de pared, de membrana, extracelulares e implicadas en rutas de secreción.

Tras el análisis comparativo de estas proteínas entre ambas estirpes, se detectó la ausencia de 91 proteínas en los extractos de pared del mutante, entre las que se destacan las siguientes:

- Sintetas de quitina (FOXG_04162) *ChsV* y (FOXG_04163) *ChsVb*
- Endoquitinasa (FOXG_12882)
- Hidrolasas de pared (FOXG_12882, FOXG_16948)
- Otras hidrolasas: (FOXG_08084, FOXG_16902, FOXG_16906)
- Glucanasas (FOXG_04802, FOXG_07678)
- Glicosiltransferasa (FOXG_12172)
- Fungispumina (FOXG_10759)
- GTPasas (FOXG_01011, FOXG_01628, FOXG_10439)
- Peroxidasa (FOXG_17180)
- Tomatinasa (FOXG_02734)
- Efectores extracelulares (FOXG_13198) *Epl1* y (FOXG_16948) proteína *lysM*
- Fosfolipasa D (FOXG_04151)
- Transportadores de membrana (FOXG_11700, FOXG_11727, FOXG_13067)
- Transporte vesicular y receptores (FOXG_02319, FOXG_06305, FOXG_08330)

La mayoría se encuentran ancladas mediante dominios transmembrana (33 %) o anclaje GPI (1 %) y presentan sitios posibles de *N*-glicosilación (84 %). Las proteínas de pared ausentes en el mutante se podrían explicar por un estado de hipoglicosilación. Por otro lado, la ausencia de proteínas relacionadas con el tráfico vesicular no sorprende puesto que la reducción en la secreción de proteínas es una respuesta indirecta al estrés por defectos en glicosilación, descrita con anterioridad (Liu & Kaufman, 2003; Xu *et al.*, 2010).

17.2. Mayor agregación de hifas en el mutante $\Delta gnt2$ causada por alteraciones de la pared

El estudio de la morfología de las hifas mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión (TEM) ha puesto de manifiesto la agregación anormal de germínulas durante el crecimiento del mutante. Las imágenes obtenidas por TEM han mostrado la unión superficial entre hifas vecinas, que al establecer un contacto amplio parece provocar la deformación y aplastamiento de algunas hifas.

Considerando en su conjunto estos resultados, se concluye que la presencia/ausencia de *N*-glicanos en la pared influye sobre la capacidad de adhesión de las hifas. Esta hipótesis concuerda con el trabajo de Lamarre y colaboradores (2009) que describen que los polímeros de galactofuranosa de pared en *A. fumigatus* atenúan la capacidad de adhesión de las hifas. Por tanto, la agregación observada en el mutante sería consecuencia del menor contenido en *N*-glicanos identificados como galactofuranosas en su pared celular. Además, esta adhesión estaría favorecida por la producción de una inusual matriz extracelular observada en las imágenes TEM. Este material extracelular producido durante el crecimiento favorecería la cohesión, aunque se desconoce por el momento su composición química.

Además de las alteraciones en la pared de $\Delta gnt2$, se observó una morfología irregular en los septos que aparecían anormalmente torcidos y sinuosos, a diferencia de los de la estirpe silvestre. Esto nos llevó a considerar que la ausencia de las sintasas de quitina ChsV y ChsVb observada en los extractos de pared del mutante podría estar relacionada con defectos de los septos. En un trabajo previo realizado por Martín-Urdíroz y colaboradores (2008) en nuestro grupo, se describe la participación de las sintasas de quitinas ChsV y ChsVb en la formación de septos en *F. oxysporum*. Considerando también que estas enzimas se encuentran fuertemente glicosiladas con once y siete sitios hipotéticos para *N*-glicosilación, respectivamente, los defectos observados en el septo de $\Delta gnt2$ podrían ser consecuencia del estado de glicosilación alterado en ambas enzimas.

18. Alteraciones del contenido proteico relacionadas con defectos en glicosilación en $\Delta gnt2$

18.1. Producción de enzimas de secreción en el mutante $\Delta gnt2$

Los datos obtenidos tras el análisis proteómico sobre proteínas de pared¹ y proteínas extracelulares² permiten correlacionar la ausencia de enzimas extracelulares en el mutante con su reducida virulencia. Se han identificado las siguientes enzimas involucradas en hidrólisis de componentes celulares, detoxificación y remodelación de la pared, ausentes en $\Delta gnt2$, además una amilasa menos representada, y una alcohol deshidrogenasa más abundante:

- **Enzimas proteolíticas:** pepsina² (FOXG_10138), proteasa aspártica² (FOXG_03994), proteasa serínica¹ FOXG_08084), metaloaminopeptidasa² (FOXG_09102), aminopeptidasa² (FOXG_02417).
- **Enzimas para la degradación de azúcares:** amilasa² (FOXG_16920), arabinofuranosidasa¹ (FOXG_16902), autolisina¹ (FOXG_16948).
- **Enzimas de des-toxificación:** β -2 tomatinasa¹ (FOXG_02734), peroxidasa¹ (FOXG_17180), isoamil alcohol oxidasa² (FOXG_04049), snod¹ (FOXG_13198).
- **Endoquitinasa¹** (FOXG_12882) y **β -glucanasas¹** (FOXG_02921, FOXG_07678)
- **Proteína de matriz extracelular¹** (FOXG_00537)

La producción de compuestos y proteínas extracelulares durante la infección en hongos fitopatógenos son factores determinantes para la patogénesis, entre estas destacan las que degradan paredes vegetales, la de biosíntesis de toxinas, las que protegen frente a defensas de las plantas hospedadoras y las de morfogénesis relacionadas con la infección (Idnurm & Howlett, 2001; Movahedi & Heale, 1990). Por esta razón se destacan las proteasas y las hidrolasas de carbohidratos identificadas en este trabajo, capaces de degradar la pared del hospedador y facilitar así la invasión de tejidos.

Algunas enzimas descritas por su papel frente a compuestos tóxicos producidos por la planta, como las tomatinasas, contribuyen a una infección más eficiente ya que hidrolizan la α -tomatina y los productos generados, suprimiendo así la respuesta de defensa de la planta durante la infección (Ito *et al.*, 2004; Pareja-Jaime *et al.*, 2008). En el caso de la β -2 tomatinasa (FOXG_02734) detectada únicamente en la estirpe silvestre (identificada como Tom3), se trata

de una enzima de expresión constitutiva secretada sin el compuesto inductor (α -tomatina) (Pareja-Jaime *et al.*, 2008).

La autolisina FOXG_16948, solo detectada en la estirpe silvestre, pertenece a un conjunto de enzimas extracelulares, de membrana o de pared celular con motivos LysM de unión a carbohidratos con funciones muy diversas (hidrólisis, receptores y/o efectores). Identificadas inicialmente en bacterias y fagos, actualmente se han caracterizado algunas en hongos patógenos y saprofitos que actúan como factores de virulencia al suprimir la respuesta de defensa en el huésped. La unión de estas proteínas a oligosacáridos de quitina y a GlcNA parece estar relacionada con procesos de secuestro y/o enmascaramiento de estos azúcares de pared facilitando así el proceso de infección y evitando la activación del sistema inmune del huésped (de Jonge & Thomma, 2009).

Otra enzima secretada con función en defensa es Snod1 (FOXG_13198), proteína exclusiva de hongos filamentosos con propiedades tóxicas y secretada en respuesta a la defensa del huésped.

Por otro lado, el producto del gen FOXG_17180 ausente en el mutante, es una peroxidasa extracelular bifuncional exclusiva de hongos fitopatógenos responsable de la degradación de compuestos con potencial redox y ligninas, importante para la penetración del huésped y el crecimiento invasivo como han descrito Zamocky y colaboradores (2012). Estudios de la *N*-glicosilación de peroxidases fúngicas revelan la importancia de esta modificación cotraduccional para su estabilidad en condiciones adversas de pH y temperatura (Tams & Welinder, 2001).

También se identificó una isoamil-alcohol oxidasa, cuyas dos isoformas correspondientes al distinto punto isoeléctrico y masa molecular de la proteína, resultaron más abundantes en el mutante $\Delta gnt2$, estando una de ellas ausente en la estirpe silvestre. Este hecho se podría explicar por defectos en *N*-glicosilación y por consiguiente en el proceso de secreción. Específicamente, se trata de una de las ocho alcohol oxidasas extracelulares identificadas en *Fusarium* con dominio de unión a FAD y dominio berberina, ambos sobre-representados en los genomas de oomicetos fitopatógenos (Seidl *et al.*, 2011). Aunque su función en otros ascomicetos está relacionada con el metabolismo oxidativo, algunos autores relacionan estas enzimas con la producción del químico-atrayente isovaleraldehído y el mantenimiento de la homeostasis iónica (Petrovic *et al.*, 2002).

Otra enzima relevante por su papel en virulencia es la proteína de matriz extracelular (FOXG_00537), también ausente en el mutante $\Delta gnt2$, cuya ortóloga EMP1 en *Magnaporthe grisea* es un factor de virulencia conservado en ascomicetos filamentosos (Ahn *et al.*, 2004; Soanes *et al.*, 2008).

Nuestros resultados indican que la ausencia de glicoproteínas extracelulares en $\Delta gnt2$ está relacionada con defectos en glicosilación, y que algunas de estas enzimas con sitios susceptibles de *N*-glicosilación, podrían resultar factores de virulencia en *F. oxysporum*.

18.2. Producción de enzimas relacionadas con rutas de secreción y señalización en el mutante $\Delta gnt2$

La ausencia de algunas proteínas que participan en procesos de secreción, regulación de endocitosis y señalización observada en el mutante $\Delta gnt2$ posiblemente se deba a la reducción general de su secreción por alteraciones en la glicosilación. Algunas de estas proteínas son factores relacionados con virulencia, como la fosfolipasa D (Liscovitch *et al.*, 2000), GTPasas tipo Ras, y las proteínas con dominio Pan relacionado con interacción entre proteínas y adhesión celular en hongos patógenos (Liscovitch *et al.*, 2000; Soanes *et al.*, 2008).

Resulta relevante la ausencia en $\Delta gnt2$ de una fosfolipasa D (PLD) (FOXG_04151), considerando que es una glicoproteína asociada a membrana, con funciones en regulación y señalización molecular mediada por fosfolípidos. Estudios recientes sobre PLDs en hongos han permitido conocer su implicación en esporulación, dimorfismo (Hube *et al.*, 2001; Liscovitch *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2008) y patogénesis (Li *et al.*, 2012). En este último trabajo se analiza el papel de la ortóloga PLD1 en *A. fumigatus* y su relación con patogénesis.

Otra proteína ausente en el mutante es la proteína de membrana transportadora de fosfatidilinositol ortóloga a Sec14 (FOXG_03648), participante en la transducción de señales vía fosfolípidos. Destaca también la ausencia en el mutante de GTPasas tipo Ras y tipo Rab relacionadas con endocitosis, ATPasas transportadoras de cationes imprescindibles para el transporte activo de moléculas, proteínas de tráfico de vacuolas como epsina y nexina, proteínas de cubierta y sus receptores, y proteínas SNARE.

Como se ha mencionado antes, el estrés por defectos en glicosilación puede desencadenar ajustes metabólicos como reducción de la síntesis proteica y la acumulación de proteínas en el AG. Los resultados descritos en este trabajo indican que el mutante $\Delta gnt2$ carece de algunos componentes del sistema de secreción y de transporte vesicular, posiblemente consecuencia de los defectos en la glicosilación que provoca la ausencia de Gnt2 en el AG.

18.3. El mutante $\Delta gnt2$ presenta modificaciones en la abundancia de algunas proteínas intracelulares.

El análisis de proteínas intracelulares reveló que el mutante no es deficiente en ninguna proteína intracelular, aunque si tiene alteraciones en la abundancia relativa de alguna de ellas. Este resultado es coherente con el hecho de que las glicoproteínas son menos abundantes a nivel subcelular. Sin embargo, cuando las células sufren estrés se producen cambios del proteoma que equilibran la homeostasis. La mayoría de las investigaciones sobre defectos en glicosilación se centran en alteraciones a nivel de RE que generan fuerte estrés celular y desencadenan una serie de reacciones y cambios de expresión en genes que reparen los daños y eliminan las proteínas defectuosas (UPR).

Existen estudios en hongos filamentosos que analizan los cambios a nivel de transcripción que sufren la células sometidas a estrés por mal pegamiento de proteínas que conducen a estrés del RE, que han demostrado represión y activación de genes que codifican proteínas que participan en plegamiento y degradación de proteínas, tráfico vesicular, síntesis de pared celular, metabolismo de aminoácidos y de lípidos, factores de transcripción y proteínas de glicosilación (Graf *et al.*, 2008; Guillemette *et al.*, 2007).

De acuerdo con resultados obtenidos en otros hongos filamentosos, si $\Delta gnt2$ sufriera estrés fuerte causado por la producción de proteínas defectuosas o la alteración del funcionamiento normal del proceso de glicosilación, se esperaría una respuesta proteómica con incremento de proteínas chaperonas hsp70 y hsp40 de citosol, RE y mitocondria, de proteínas asociadas al complejo de degradación, y a la vez, menor presencia de proteínas de transporte y del metabolismo de aminoácidos.

En nuestro caso, no se detectaron chaperonas de RE, Golgi o citosol más abundantes en el mutante; por el contrario se observó que una chaperona mitocondrial Ssc1 relacionada con choque térmico era cinco veces menos abundante que en la estirpe silvestre. En un principio este dato resultó contradictorio, sin embargo el hecho de que esta proteína presente cinco sitios posibles de *N*-glicosilación sugiere que su menor abundancia no se debe a un ajuste metabólico, sino a un defecto en glicosilación. La *N*-glicosilación aporta estabilidad a las proteínas y al estar hipoglicosiladas, si son activas y se localizan correctamente, resultan más inestables y con menor tiempo de vida (Clark *et al.*, 2004).

Por otro lado, la reducción de enzimas participantes en la síntesis de aminoácidos y metabolitos secundarios y el aumento de otras relacionadas con estrés, es coherente con la respuesta esperada a estrés celular del mutante. Se detectaron menos enzimas del metabolismo de la metionina y de síntesis de

pigmentos (O-metiltransfera), y más proteínas de estrés, como Thi13 y Sti35, en $\Delta gnt2$. También resulta relevante la abundancia de citocromo P450nor (FOXG_12350) del mutante, una enzima des-toxicadora multifuncional relacionada con estrés (Shoun *et al.*, 2012). En condiciones metabólicas normales se producen especies reactivas de nitrógeno (ERN) tóxicas para la célula, destacando las rutas de degradación de proteínas y la autofagia como procesos de producción de estas moléculas nitroactivas. La citocromo P450nor cataliza la desasimilación del nitrógeno sin consumir oxígeno, en un proceso eficiente y similar al de bacterias. Según datos recientes de Shoun y colaboradores (2012) la detoxificación implica actividad peroxidasa que le permite actuar en respuesta al estrés oxidativo. Nitler y colaboradores (2005) analizaron la inducción por ERN de genes de estrés y establecieron una relación directa entre la degradación de proteínas ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) y la inducción de un conjunto de proteínas, entre ellas P450nor. En base a estos estudios, una explicación al nivel tres veces superior de la citocromo P450nor en el mutante podría ser un metabolismo de degradación de proteínas más acelerado consecuencia de defectos en proteínas o en glicosilación.

Estos resultados revelan que los cambios en el proteoma del mutante no se deben a estrés por UPR (Unfolded Protein Reaction) o del RE, sino un estado más elevado de degradación proteica que, según nuestra hipótesis inicial, estaría causado por defectos en la glicosilación de proteínas.

19. Sensibilidad a temperatura en el mutante $\Delta gnt2$

La principal consecuencia del incremento de temperatura es la pérdida de plegamiento, condicionando la funcionalidad e inestabilidad de las proteínas. Sin embargo los organismos soportan el estrés térmico gracias a sistemas de defensa muy conservados, como la expresión de chaperonas y algunas proteínas de choque térmico que protegen y reparan el daño del proteoma. Se ha propuesto la relación entre estrés térmico y estrés oxidativo, de tal forma que tras el choque térmico se producen especies reactivas de oxígeno y ciertos compuestos oxidantes (Kim *et al.*, 2006). Davidson y colaboradores (1996) describieron que mutantes deficientes en catalasa, superóxido dismutasa y citocromo c peroxidasa eran hipersensibles al choque térmico.

La temperatura óptima de crecimiento de *Fusarium* es 25-30 °C y se considera choque térmico temperaturas superiores a este rango, dependiendo también del tiempo de exposición. En este estudio se ha comprobado que *Fusarium* es incapaz de crecer y desarrollarse a partir de esporas si se someten a temperaturas superiores a 36 °C de manera continuada.

El mutante $\Delta gnt2$ resultó más sensible al incremento de temperatura, siendo incapaz de crecer a 35°C. Los análisis de proteínas intracelulares muestran la relación entre esta termo-sensibilidad y el desequilibrio o deficiencia en proteínas relacionadas con estrés térmico (chaperonas Ssc1 y Shr3), con estrés oxidativo (peroxidasa e isoamil alcohol oxidasa) y con respuesta a estrés celular (Thi13 y Sti35).

Por un lado la estabilidad de las glicoproteínas está condicionada por su contenido en glicanos, por lo que defectos en *N*-glicosilación en el mutante conducen a menor termo-tolerancia y mayor estrés (Clark *et al.*, 2004). Este efecto se potencia por la ausencia de chaperonas como Ssc1, y en consecuencia, la célula responde produciendo proteínas relacionadas con estrés celular, como Thi13 y Sti35, como se observa en el mutante.

Por otro lado el estrés térmico genera estrés oxidativo y ello explicaría el incremento detectado en la isoamil alcohol oxidasa. Estas diferencias en el proteoma del mutante y en la estabilidad de sus proteínas, justificaría la menor tolerancia a temperaturas elevadas.

20. Menor capacidad de fusión vegetativa entre hifas en $\Delta gnt2$

La fusión entre conidias e hifas vegetativas es un fenómeno característico de hongos filamentosos que, combinado con el crecimiento apical y la ramificación, conducen al desarrollo de colonias formadas por una red de hifas interconectadas. Esta unión facilita la comunicación y permite el intercambio de agua, nutrientes y señales moleculares, representando una ventaja para la colonización, en condiciones naturales donde la distribución de nutrientes no es uniforme (Roca *et al.*, 2005).

La base molecular de la fusión es desconocida, aunque se han identificado algunos genes esenciales para la formación de puentes de fusión en distintos hongos y la patogénesis (Charlton *et al.*, 2012; Prados Rosales & Di Pietro, 2008). Durante la fusión de hifas en *N. crassa* se han identificado tres etapas para el establecimiento de puentes de fusión, las proteínas y los mecanismos de señalización implicados (Aldabbous *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2011; Glass *et al.*, 2004). Al inicio del proceso hay un crecimiento dirigido donde intervienen quimio-atrayentes y componentes de la cascada de MAP kinasas. Tras el acercamiento de sus extremos, de las hifas se adhieren y comienza el proceso de remodelación de la pared, que implica la hidrólisis del punto donde se producirá el canal de fusión y el reforzamiento de la región periférica para evitar la lisis osmótica. Por último las membranas se fusionan.

En este trabajo se ha determinado la capacidad de fusión mediante cuantificación de las hifas con puentes de unión y la observación del grado de

aglutinación del micelio en condiciones nutricionales limitantes, lo que reveló menor formación de puentes de anastomosis en el mutante y por tanto un micelio menos interconectado. Esta deficiencia podría estar relacionada con la disminución de enzimas líticas de pared observada en el mutante (β -glucanasas), y con la alteración en glicoproteínas de la pared.

Para identificar los mecanismos moleculares que participan en la fusión de hifas vegetativas sería necesario un análisis global de las proteínas que intervienen en la transducción de señales, el tráfico vesicular, la hidrólisis de pared y la fusión de membranas en condiciones que favorezcan la fusión vegetativa.

21. Comportamiento patotípico: virulencia reducida en $\Delta gnt2$

La capacidad reducida para invadir los tejidos del hospedador y la menor virulencia mostrada por el mutante pone de manifiesto la contribución de la glicosilación terminal de proteínas en la patogénesis fúngica. Aunque desconocemos la base molecular de la reducción en virulencia, los resultados obtenidos se podrían explicar por alteraciones en la pared celular, y la secreción deficiente de enzimas extracelulares líticas y de defensa en el mutante. Estas alteraciones fisiológicas apenas afectan al crecimiento del hongo en condiciones favorables, pero en entornos hostiles conlleva una menor competitividad para colonizar e invadir los tejidos, tanto en plantas como animales, como *Galleria mellonella*, recientemente utilizado como modelo animal (Navarro-Velasco *et al.*, 2011). El hecho de que el mutante exhiba virulencia reducida en ambos sistemas (vegetal y animal), pone de manifiesto que esta reducción sea una alteración en mecanismos generales de patogénesis.

22. Los lípidos como posibles moléculas diana de $gnt2$ y su relación con patogénesis

Aunque el mutante presenta algunas alteraciones morfológicas y fisiológicas que determinan menor capacidad de desarrollo y resistencia, no podemos descartar la existencia de factores adicionales, bien extracelulares o de pared, relacionados con la comunicación planta-patógeno que estén modulando su virulencia.

Es bien conocida la importancia de la pared y la secreción de compuestos extracelulares en la interacción célula-célula con la propiedad que tienen algunas moléculas ligandos para desencadenar reacciones y procesos de reconocimiento. El reconocimiento de algunos compuestos favorece la resistencia al patógeno, por lo que su enmascaramiento favorece la invasión por

parte del hongo. Otros elicitores del hongo actúan desencadenando o inhibiendo la defensa del huésped de forma específica (Ortoneda *et al.*, 2004).

La comunicación entre el patógeno y el huésped implica moléculas extracelulares que actúan como mensajeros, alcoholes, feromonas, compuestos volátiles o lípidos. Se ha descrito que esta comunicación condiciona la respuesta de defensa del huésped y modula la expresión de determinantes de virulencia (Cottier & Muhlschlegel, 2012).

Christensen y Kolomiets (2011) analizaron el papel de las oxilipinas fúngicas y concluyeron que su síntesis y secreción es una respuesta a moléculas de defensa elicidadas por la planta. Estos lípidos extracelulares activan el desarrollo, la esporulación y la producción de metabolitos secundarios en el hongo, resultando factores específicos de virulencia. También se ha descrito la secreción de lipopolisacáridos en hongos micorrizas y su función reguladora en el establecimiento de la simbiosis, un hallazgo novedoso teniendo en cuenta que estos compuestos eran tradicionalmente considerados exclusivos de bacterias simbiosis (Maillet *et al.*, 2011)

De acuerdo con estos hallazgos sobre el papel de algunos lípidos extracelulares en patogénesis y comunicación interespecífica, nuestro trabajo también ha enfocado la búsqueda de lipopolisacáridos secretados por *F. oxysporum* y su posible conexión con *gnt2*. La identificación mediante tinciones específicas de una fracción lipídica y otra glucídica en los extractos extracelulares del silvestre, planteó la hipótesis de la secreción de lípidos glicosilados con función en la comunicación y el reconocimiento. Su ausencia en el mutante indicaría que *Gnt2*, como otras glicosiltransferasas del AG, participaría en glicosilación de proteínas y de lípidos. No obstante, harían falta análisis químicos adicionales que aportasen datos precisos sobre el estado de glicosilación de estos compuestos, ya que los resultados obtenidos son preliminares e insuficientes para confirmar esta hipótesis. Sin embargo, representa una nueva línea de investigación dirigida al estudio de la producción de lípidos extracelulares, y el análisis de su estructura y posibles funciones en la comunicación y la patogénesis fúngica.

CONCLUSIONES

1. El genoma de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* contiene una compleja familia génica de *N*-acetilglucosamina transferasas (Gnts) con siete representantes (*gnts*) parálogos entre sí, todos ellos ortólogos a GNT1 de *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Entre los parálogos identificados existe una duplicación del gen *gnt2*, con ambas copias localizadas en distintos cromosomas.
3. La proteína deducida Gnt2 se localiza en las cisternas del aparato de Golgi y participa en la maduración y elongación de los *N*-glicanos de algunas proteínas de pared, así como de otras intra- o extracelulares.
4. La ausencia de Gnt2 afecta a las proteínas de pared causando disminución de la masa total y menor grado de polimerización de los glicanos unidos a sus proteínas diana.
5. La ausencia de Gnt2 altera las propiedades físico-químicas y la composición glicoproteica en los mutantes, resultando en mayor sensibilidad a compuestos tóxicos que reaccionan con pared y membrana celular, así como en patrones aberrantes de agregación de hifas y septación, con la formación de septos torcidos.
6. Los mutantes $\Delta gnt2$ muestran un perfil proteico alterado: con desaparición de enzimas de degradación de pared vegetal, proteínas de detoxificación de compuestos oxidantes y tomatina, de metabolismo de aminoácidos, de matriz extracelular, de remodelación y biogénesis de pared; estando menos representadas algunas de rutas de secreción, o por el contrario, aumentando otras de respuesta a estrés o del metabolismo del nitrógeno.
7. Los defectos de *N*-glicosilación del mutante $\Delta gnt2$ resultan en mayor sensibilidad al estrés térmico y menor producción de puentes de anastomosis hifal (CATs).
8. Gnt2 participa, aunque no es esencial, en el desarrollo de la enfermedad de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en ambos sistemas modelo, el vegetal sobre plantas de tomate *Lycopersicon esculentum*, y el animal sobre la larva de la polilla de la cera *Galleria mellonella*; resultando el mutante defectivo retrasado en la colonización del hospedador y en el desarrollo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Ades IZ (1990) Mitochondrial biogenesis: do liver mitochondria contain glycoproteins and glycosyltransferases? *Int J Biochem* **22**: 1105-1117
- Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M (2010) N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* **35**: 74-82
- Ahn N, Kim S, Choi W, Im KH, Lee YH (2004) Extracellular matrix protein gene, EMP1, is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and cells* **17**: 166-173
- Ahrazem O, Gómez-Miranda B, Prieto A, Barasoain I, Bernabé M, Leal JA (2000) An acidic water-soluble cell wall polysaccharide: a chemotaxonomic marker for *Fusarium* and *Giberella*. *Mycol Res* **104**: 603-610
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1983) *Molecular Biology of the Cell*, New York: Garland Science.
- Aldabbous MS, Roca MG, Stout A, Huang IC, Read ND, Free SJ (2010) The *ham-5*, *rcm-1* and *rco-1* genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Microbiology* **156**: 2621-2629
- Antebi A, Fink GR (1992) The yeast Ca²⁺-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* **3**: 633-654
- Bacon JS, Jones D, Farmer VC, Webley DM (1968) The occurrence of alpha (1-3) glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and *Polyporus* species, and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. *Biochim Biophys Acta* **158**: 313-315
- Barlowe C (1997) Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *J Cell Biol* **139**: 1097-1108
- Bartnicki-Garcia S (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* **22**: 87-108
- Bartnicki-Garcia S, Reyes E (1968) Polyuronides in the cell walls of *Mucor rouxii*. *Biochim Biophys Acta* **170**: 54-62
- Beckman CH (1987) *The nature of wilt diseases of plants*, Ed St Paul American Phytopathological Society.

- Berninsone P, Lin ZY, Kempner E, Hirschberg CB (1995) Regulation of yeast Golgi glycosylation. Guanosine diphosphatase functions as a homodimer in the membrane. *J Biol Chem* **270**: 14564-14567
- Berninsone PM, Hirschberg CB (2000) Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 542-547
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**: 317-339
- Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **28**: 799-808
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Burnett JH (1984) *Aspects of Fusarium genetics*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Buser R, Lazar Z, Kaser S, Kunzler M, Aebi M (2010) Identification, characterization, and biosynthesis of a novel *N*-glycan modification in the fruiting body of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *J Biol Chem* **285**: 10715-10723
- Casado B, Affolter M, Kussmann M (2009) OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids. *J Proteomics* **73**: 196-208
- Castilho A, Gattinger P, Grass J, Jez J, Pabst M, Altmann F, Gorfer M, Strasser R, Steinkellner H (2011) *N*-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex *N*-glycans. *Glycobiology* **21**: 813-823
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-552
- Ciucanu I, Kerek F (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrate. *Carbohydr Res* **131**: 186-196
- Clark SE, Muslin EH, Henson CA (2004) Effect of adding and removing *N*-glycosylation recognition sites on the thermostability of barley alpha-glucosidase. *Protein Eng Des Sel* **17**: 245-249

- Cole NB, Ellenberg J, Song J, DiEuliis D, Lippincott-Schwartz J (1998) Retrograde transport of Golgi-localized proteins to the ER. *J Cell Biol* **140**: 1-15
- Cole NB, Smith CL, Sciaky N, Terasaki M, Edidin M, Lippincott-Schwartz J (1996) Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* **273**: 797-801
- Colley KJ (1997) Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**: 1-13
- Comer FI, Hart GW (2000) O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J Biol Chem* **275**: 29179-29182
- Corradi N, Lildhar L (2012) Meiotic genes in the arbuscular mycorrhizal fungi: What for? *Commun Integr Biol* **5**: 187-189
- Cottier F, Muhlschlegel FA (2012) Communication in fungi. *International journal of microbiology* **2012**: 351832
- Charlton ND, Shoji JY, Ghimire SR, Nakashima J, Craven KD (2012) Deletion of the fungal gene soft disrupts mutualistic symbiosis between the grass endophyte *Epichloe festucae* and the host plant. *Eukaryotic cell* **11**: 1463-1471
- Chatterjee S, Mayor S (2001) The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1969-1987
- Chege NW, Pfeffer SR (1990) Compartmentation of the Golgi Complex: Brefeldin A Distinguishes trans Golgi Cisternae from trans Golgi Network. *J Cell Biol* **111**: 893-899
- Choi JH, Lou W, Vancura A (1998) A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 29915-29922
- Christensen SA, Kolomiets MV (2011) The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal genetics and biology : FG & B* **48**: 4-14
- D'Haese W, Holsters M (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**: 79R-105R

- Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schiestl RH (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5116-5121
- de Groot WJ, Ram AF, Klis FM (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* **42**: 657-675
- Deshpande N, Wilkins MR, Packer N, Nevalainen H (2008) Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology* **18**: 626-637
- Di Pietro A, Roncero MI (1996) Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol Lett* **145**: 295-299
- Dimmic MW, Rest JS, Mindell DP, Goldstein RA (2002) rtREV: an amino acid substitution matrix for inference of retrovirus and reverse transcriptase phylogeny. *J Mol Evol* **55**: 65-73
- Doucey MA, Hess D, Cacan R, Hofsteenge J (1998) Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol Biol Cell* **9**: 291-300
- Drickamer K, Taylor ME (1998) Evolving views of protein glycosylation. *Trends Biochem Sci* **23**: 321-324
- Dubois M, Guiller KA, Rebers PA, Smith FA (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal Biochem* **28**: 350-356
- Duncan MC, Cope MJ, Goode BL, Wendland B, Drubin DG (2001) Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **3**: 687-690
- Durán A, Nombela C (2004) Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. *Microbiology* **150**: 3099-3103
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**: 1882-1888
- Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* **4**: 837-851
- Eufemi M, Altieri F, Cervoni L, Spoto G, Ferraro A (1991) Nuclear glycoproteins in higher vertebrates. *Biochem Int* **23**: 35-42

- Ewart KV, Lin Q, Hew CL (1999) Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cell Mol Life Sci* **55**: 271-283
- Ferguson MAJ (1991) Lipid anchor of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* **1**: 522-529
- Fernandez-Alvarez A, Elias-Villalobos A, Ibeas JI (2010) Protein glycosylation in the phytopathogen *Ustilago maydis*: From core oligosaccharide synthesis to the ER glycoprotein quality control system, a genomic analysis. *Fungal Genet Biol* **47**: 727-735
- Fink AL (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* **79**: 425-449
- Finlay DR, Forbes DJ (1990) Reconstitution of biochemically altered nuclear pores: transport can be eliminated and restored. *Cell* **60**: 17-29
- Frayse N, Couderc F, Poinot V (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**: 1365-1380
- Friis J, Ottolenghi P (1970) The genetically determined binding of alcian blue by a minor fraction of yeast cell walls. *C R Trav Lab Carlsberg* **37**: 327-341
- Frischmann A, Neudl S, Gaderer R, Bonazza K, Zach S, Gruber S, Spadiut O, Friedbacher G, Grothe H, Seidl-Seiboth V (2013) Self-assembly at air/water interfaces and carbohydrate binding properties of the small secreted protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. *J Biol Chem* **288**: 4278-4287
- Fu C, Iyer P, Herkal A, Abdullah J, Stout A, Free SJ (2011) Identification and characterization of genes required for cell-to-cell fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **10**: 1100-1109
- Furmanek A, Hofsteenge J (2000) Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim Pol* **47**: 781-789
- Gaber RF, Copple DM, Kennedy BK, Vidal M, Bard M (1989) The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol Biol Cell* **9**: 3447-3456
- Gagny B, Wiederkehr A, Dumoulin P, Winsor B, Riezman H, Haguenaer-Tsapis R (2000) A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J Cell Sci* **113** (Pt 18): 3309-3319

- Garcia-Pedrajas MD, Nadal M, Denny T, Baeza-Montanez L, Paz Z, Gold SE (2010) DelsGate: a robust and rapid method for gene deletion. *Methods Mol Biol* **638**: 55-76
- Gaur U, Showalter M, Hickerson S, Dalvi R, Turco SJ, Wilson ME, Beverley SM (2009) *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. *Exp Parasitol* **122**: 182-191
- Gerrard SR, Bryant NJ, Stevens TH (2000) VPS21 controls entry of endocytosed and biosynthetic proteins into the yeast prevacuolar compartment. *Mol Biol Cell* **11**: 613-626
- Gething MJ (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 465-472
- Gilstrig CF, Melin-Larsson M, Ljungdahl PO (1999) Shr3p mediates specific COPII coatomer-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Mol Biol Cell* **10**: 3549-3565
- Giollant M, Guillot J, Damez M, Dusser M, Didier P, Didier E (1993) Characterization of a Lectin from *Lactarius deterrimus* (Research on the Possible Involvement of the Fungal Lectin in Recognition between Mushroom and Spruce during the Early Stages of Mycorrhizae Formation). *Plant Physiol* **101**: 513-522
- Glass NL, Rasmussen C, Roca MG, Read ND (2004) Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends in Microbiology* **12**: 135-141
- Gomme PT, McCann KB, Bertolini J (2005) Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* **10**: 267-273
- Graf A, Gasser B, Dragosits M, Sauer M, Leparac GG, Tuchler T, Kreil DP, Mattanovich D (2008) Novel insights into the unfolded protein response using *Pichia pastoris* specific DNA microarrays. *BMC genomics* **9**: 390
- Grimm LH, Kelly S, Volkerding, II, Krull R, Hempel DC (2005) Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnol Bioeng* **92**: 879-888
- Guillemette T, van Peij N, Goosen T, Lanthaler K, Robson GD, van den Hondel CA, Stam H, Archer DB (2007) Genomic analysis of the secretion stress response in the enzyme-producing cell factory *Aspergillus niger*. *BMC Genomics* **8**: 158

- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704
- Hanahan D (1985) *Techniques for transformation of Escherichia coli, in DNA cloning: a Practical Approach*, Vol. 1.
- Hart GW (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem* **66**: 315-335
- Haynes PA (1998) Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology* **8**: 1-5
- Helenius A (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **5**: 253-265
- Helenius A, Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-1049
- Helenius J, Ng DT, Marolda CL, Walter P, Valvano MA, Aebi M (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* **415**: 447-450
- Herrero AB, Uccelletti D, Hirschberg CB, Dominguez A, Abeijon C (2002) The Golgi GDPase of the fungal pathogen *Candida albicans* affects morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties. *Eukaryot Cell* **1**: 420-431
- Heuskeshven J, Dernik R (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112
- Hofsteenge J, Muller DR, de Beer T, Loffler A, Richter WJ, Vliegenthart JF (1994) New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase *Biochemistry* **33**: 13524-13530
- Hogan LH, Klein BS (1994) Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect Immun* **62**: 3543-3546
- Hube B, Hess D, Baker CA, Schaller M, Schafer W, Dolan JW (2001) The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology* **147**: 879-889

- Huertas-González MD, Ruiz-Roldán, M. C., Di Pietro, A. y Roncero, M. I. G. (1999) Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **54**: 63-72.
- Idnurm A, Howlett BJ (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol* **2**: 241-255
- Ilg T, Overath P, Ferguson MA, Rutherford T, Campbell DG, McConville MJ (1994) O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. *J Biol Chem* **269**: 24073-24081
- Ito S, Eto T, Tanaka S, Yamauchi N, Takahara H, Ikeda T (2004) Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of alpha-tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS Letters* **571**: 31-34
- Jackson SP, Tjian R (1988) O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55**: 125-133
- Kaneko T, Oguri S, Kato S, Nagata Y (1993) Developmental appearance of lectin during fruit body formation in *Pleurotus cornucopiae*. *J Gen Appl Microbiol* **39**: 93-100
- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McLnerney JO (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 1471-2148
- Kelleher DJ, Gilmore R (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* **16**: 47R-62R
- Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* **268**: 10416-10424
- Khan F, Khan MI (2011) Fungal Lectins: Current Molecular and Biochemical Perspectives. *Int J Biol Chem* **5**: 1-20
- Kim NH, Jeong MS, Choi SY, Kang JH (2006) Oxidative modification of cytochrome c by hydrogen peroxide. *Molecules and cells* **22**: 220-227
- Kitamura H, Wu WI, Voelker DR (2002) The C2 domain of phosphatidylserine decarboxylase 2 is not required for catalysis but is essential for in vivo function. *J Biol Chem* **277**: 33720-33726

- Klis FM, de Jong M, Brul S, de Groot PW (2007) Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. *Yeast* **24**: 253-258
- Konska G (2006) Lectins of Higher Fungi (*Macromycetes*)—Their Occurrence, Physiological Role, and Biological Activity. *Int J Biol Chem* **8**: 19-30
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**: 631-664
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamarre C, Beau R, Balloy V, Fontaine T, Wong Sak Hoi J, Guadagnini S, Berkova N, Chignard M, Beauvais A, Latge JP (2009) Galactofuranose attenuates cellular adhesion of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular microbiology* **11**: 1612-1623
- Leal JA, Prieto A, Bernabe M, Hawksworth DL (2010) An assessment of fungal wall heteromannans as a phylogenetically informative character in ascomycetes. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 986-1014
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) *Principles of biochemistry*, 2nd ed. edn. New York, NY: Worth Publishers.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *Fusarium* Laboratory Workshops - A Recent History. *Mycotoxin Research* **22**
- Li X, Gao M, Han X, Tao S, Zheng D, Cheng Y, Yu R, Han G, Schmidt M, Han L (2012) Disruption of the phospholipase D gene attenuates the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity* **80**: 429-440
- Limón MC, Rodríguez-Ortiz R, Avalos J (2010) Bikaverin production and applications. *Applied microbiology and biotechnology* **87**: 21-29
- Lipke PN, Ovalle R (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735-3740
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* **345 Pt 3**: 401-415
- Liu CY, Kaufman RJ (2003) The unfolded protein response. *J Cell Sci* **116**: 1861-1862

- Lopez-Berges MS, Hera C, Sulyok M, Schafer K, Capilla J, Guarro J, Di Pietro A (2012) The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol Microbiol* **87**: 49-65
- Lopez-Berges MS, Hera C, Sulyok M, Schafer K, Capilla J, Guarro J, Di Pietro A (2013) The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol Microbiol* **87**: 49-65
- Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, Houterman PM, Kang S, Shim WB, Woloshuk C, Xie X, Xu JR, Antoniw J, Baker SE, Bluhm BH, Breakspear A, Brown DW, Butchko RA, Chapman S, Coulson R, Coutinho PM, Danchin EG, Diener A, Gale LR, Gardiner DM, Goff S, Hammond-Kosack KE, Hilburn K, Hua-Van A, Jonkers W, Kazan K, Kodira CD, Koehrsen M, Kumar L, Lee YH, Li L, Manners JM, Miranda-Saavedra D, Mukherjee M, Park G, Park J, Park SY, Proctor RH, Regev A, Ruiz-Roldan MC, Sain D, Sakthikumar S, Sykes S, Schwartz DC, Turgeon BG, Wapinski I, Yoder O, Young S, Zeng Q, Zhou S, Galagan J, Cuomo CA, Kistler HC, Rep M (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367-373
- Madrid MP, Di Pietro A, Roncero MI (2003) Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol Microbiol* **47**: 257-266
- Maillet F, Poinot V, Andre O, Puech-Pages V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martínez EA, Driguez H, Becard G, Denarie J (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58-63
- Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzocchio C, Brygoo Y (1989) Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* **78**: 147-156
- Malhotra JD, Kaufman RJ (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 716-731
- Malhotra R (2012) Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* **1**
- Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC (1973) The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J* **135**: 19-30

- Marsh BJ, Mastronarde DN, Buttle KF, Howell KE, McIntosh JR (2001) Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2399-2406
- Martín-Urdiroz M, Roncero MI, González-Reyes JA, Ruiz-Roldán C (2008) ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* **7**: 112-121
- Meijer HJ, van de Vondervoort PJ, Yin QY, de Koster CG, Klis FM, Govers F, de Groot PW (2006) Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1348-1358
- Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* **12**: 3788-3796
- Movahedi S, Heale JB (1990) The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiol Mol Plant Pathol* **36**: 303-324
- Mukherjee D, Coon BG, Edwards DF, 3rd, Hanna CB, Longhi SA, McCaffery JM, Wendland B, Retegui LA, Bi E, Aguilar RC (2009) The yeast endocytic protein Epsin 2 functions in a cell-division signaling pathway. *J Cell Sci* **122**: 2453-2463
- Munro S (1998) Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* **8**: 11-15
- Munro S (2001) What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett* **498**: 223-227
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325
- Navarro-Velasco GY, Prados-Rosales RC, Ortiz-Urquiza A, Quesada-Moraga E, Di Pietro A (2011) *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* **48**: 1124-1129
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ (1994) Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* **7**: 479-504

- Nickel W, Brugger B, Wieland FT (1998) Protein and lipid sorting between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Semin Cell Dev Biol* **9**: 493-501
- Nichols BJ, Pelham HR (1998) SNAREs and membrane fusion in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* **1404**: 9-31
- Nittler MP, Hocking-Murray D, Foo CK, Sil A (2005) Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol Biol Cell* **16**: 4792-4813
- Omura T (2010) Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J Biochem* **147**: 297-306
- Opat AS, van Vliet C, Gleeson PA (2001) Trafficking and localisation of resident Golgi glycosylation enzymes. *Biochimie* **83**: 763-773
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, Di Pietro A (2004) *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect Immun* **72**: 1760-1766
- Pantazopoulou A, Penalva MA (2011) Characterization of *Aspergillus nidulans* RabC/Rab6. *Traffic* **12**: 386-406
- Pareja-Jaime Y, Roncero MI, Ruiz-Roldan MC (2008) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 728-736
- Parodi AJ (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* **69**: 69-93
- Petrovic U, Gunde-Cimerman N, Plemenitas A (2002) Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol* **45**: 665-672
- Powell WA, Kistler HC (1990) In vivo rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *J Bacteriol* **172**: 3163-3171
- Prados-Rosales R, Luque-Garcia JL, Martinez-Lopez R, Gil C, Di Pietro A (2009) The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions. *Proteomics* **9**: 4755-4769

- Prados Rosales RC, Di Pietro A (2008) Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* **7**: 162-171
- Punt PJ, Dingemanse MA, Jacobs-Meijsing BJ, Pouwels PH, van den Hondel CA (1988) Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **69**: 49-57
- Rad MR, Phan HL, Kirchrath L, Tan PK, Kirchhausen T, Hollenberg CP, Payne GS (1995) *Saccharomyces cerevisiae* Apl2p, a homologue of the mammalian clathrin AP beta subunit, plays a role in clathrin-dependent Golgi functions. *J Cell Sci* **108 (Pt 4)**: 1605-1615
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**: 208-212
- Roca MG, Arlt J, Jeffree CE, Read ND (2005) Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **4**: 911-919
- Roche P, Lerouge P, Ponthus C, Prome JC (1991) Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J Biol Chem* **266**: 10933-10940
- Ruiz-Herrera J (1967) Chemical components of the cell wall of *Aspergillus* species. *Arch Biochem Biophys* **122**: 118-125
- Ruiz-Roldan C, Puerto-Galan L, Roa J, Castro A, Di Pietro A, Roncero MI, Hera C (2008) The *Fusarium oxysporum sti35* gene functions in thiamine biosynthesis and oxidative stress response. *Fungal Genet Biol* **45**: 6-16
- Schafer W, Stroh A, Berghofer S, Seiler J, Vey M, Kruse ML, Kern HF, Klenk HD, Garten W (1995) Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *Embo J* **14**: 2424-2435
- Schindler M, Hogan M, Miller R, DeGaetano D (1987) A nuclear specific glycoprotein representative of a unique pattern of glycosylation. *J Biol Chem* **262**: 1254-1260
- Schmitz KR, Liu J, Li S, Setty TG, Wood CS, Burd CG, Ferguson KM (2008) Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer. *Dev Cell* **14**: 523-534

- Schoffemeer EA, Vossen JH, van Doorn AA, Cornelissen BJ, Haring MA (2001) FEM1, a *Fusarium oxysporum* glycoprotein that is covalently linked to the cell wall matrix and is conserved in filamentous fungi. *Mol Genet Genomics* **265**: 143-152
- Seidl MF, Van den Ackerveken G, Govers F, Snel B (2011) A domain-centric analysis of oomycete plant pathogen genomes reveals unique protein organization. *Plant Physiol* **155**: 628-644
- Sentandreu R, Herrero E, Martinez JP, Elorza MV (1991) *Yeast cell wall glycoproteins In: Fungal Cell Wall and Immune response*, Vol. H 53, Berlin Heidelberg: Springer Verlag
- Sharon N, Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**: 53R-62R
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850-858
- Shoun H, Fushinobu S, Jiang L, Kim SW, Wakagi T (2012) Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**: 1186-1194
- Shoun H, Tanimoto T (1991) Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J Biol Chem* **266**: 11078-11082
- Snyder WC, Hansen HN (1940) The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* **27**: 64-67
- Snyder WC, Hansen HN (1954) Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Ann Ny Acad Sci* **60**: 16-23
- Soanes DM, Alam I, Cornell M, Wong HM, Hedeler C, Paton NW, Rattray M, Hubbard SJ, Oliver SG, Talbot NJ (2008) Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. *PLOS One* **3**: e2300
- Souza GM, Hirai J, Mehta DP, Freeze HH (1995) Identification of two novel *Dictyostelium discoideum* cysteine proteinases that carry *N*-acetylglucosamine-1-P-modification. *J Biol Chem* **270**: 28938-28945

- Sparks SE, Krasnewich DM (1993) Congenital Disorders of Glycosylation Overview. In *Gene Reviews*, Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP (eds). Seattle (WA)
- Stolz J, Munro S (2002) The components of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in mannan synthesis. *J Biol Chem* **277**: 44801-44808
- Sun Y, Fang Y, Yoon MS, Zhang C, Roccio M, Zwartkuis FJ, Armstrong M, Brown HA, Chen J (2008) Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8286-8291
- Suzuki T, Park H, Lennarz WJ (2002) Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *Faseb J* **16**: 635-641
- Tams JW, Welinder KG (2001) Kinetic stability of designed glycosylation mutants of *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **286**: 701-706
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599
- Taylor RL, Conrad HE (1972) Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry* **11**: 1383-1388
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680
- Timpel C, Zink S, Strahl-Bolsinger S, Schroppe K, Ernst J (2000) Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol* **182**: 3063-3071
- Toret CP, Lee L, Sekiya-Kawasaki M, Drubin DG (2008) Multiple pathways regulate endocytic coat disassembly in *Saccharomyces cerevisiae* for optimal downstream trafficking. *Traffic* **9**: 848-859
- Torres AM, Weeden NF, Martín A (1993) Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia Faba*. *Theor Appl Genet* **85**: 937-945

- Trombetta ES, Parodi AJ (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 649-676
- Tu L, Banfield DK (2010) Localization of Golgi-resident glycosyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **67**: 29-41
- Turner JR, Tartakoff AM, Greenspan NS (1990) Cytologic assessment of nuclear and cytoplasmic O-linked N-acetylglucosamine distribution by using anti-streptococcal monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5608-5612
- van Meer G (1998) Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol* **8**: 29-33
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 112-124
- Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP (1993) Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 2**: S487-491
- Voos W, Rottgers K (2002) Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 51-62
- Vowels JJ, Payne GS (1998) A role for the luminal domain in Golgi localization of the *Saccharomyces cerevisiae* guanosine diphosphatase. *Mol Biol Cell* **9**: 1351-1365
- Vzorov AN, Marzilli LG, Compans RW, Dixon DW (2003) Prevention of HIV-1 infection by phthalocyanines. *Antiviral Res* **59**: 99-109
- Wang G, Deschenes RJ (2006) Plasma membrane localization of Ras requires class C Vps proteins and functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 3243-3255
- Wang P, Shen G (2011) The endocytic adaptor proteins of pathogenic fungi: charting new and familiar pathways. *Med Mycol* **49**: 449-457
- Weerapana E, Imperiali B (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**: 91R-101R
- Wessel D, Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143

- Wessels JG, Kreger DR, Marchant R, Regensburg BA, De Vries OM (1972) Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochim Biophys Acta* **273**: 346-358
- Wiemann P, Willmann A, Straeten M, Kleigrewe K, Beyer M, Humpf HU, Tudzynski B (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol* **72**: 931-946
- Wildt S, Gerngross TU (2005) The humanization of *N*-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol* **3**: 119-128
- Xu YX, Liu L, Caffaro CE, Hirschberg CB (2010) Inhibition of Golgi apparatus glycosylation causes endoplasmic reticulum stress and decreased protein synthesis. *J Biol Chem* **285**: 24600-24608
- Yin QY, de Groot WJ, de Koster CG, Klis FM (2008) Mass spectrometry-based proteomics of fungal wall glycoproteins. *Trends Microbiol* **16**: 20-26
- Yoko-o T, Wiggins CA, Stolz J, Peak-Chew SY, Munro S (2003) An *N*-acetylglucosaminyltransferase of the Golgi apparatus of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that can modify *N*-linked glycans. *Glycobiology* **13**: 581-589
- Zamocky M, Droghetti E, Bellei M, Gasselhuber B, Pabst M, Furtmuller PG, Battistuzzi G, Smulevich G, Obinger C (2012) Eukaryotic extracellular catalase-peroxidase from *Magnaporthe grisea* - Biophysical/chemical characterization of the first representative from a novel phytopathogenic KatG group. *Biochimie* **94**: 673-683
- Zapf MW, Theisen S, Rohde S, Rabenstein F, Vogel RF, Niessen L (2007) Characterization of AfpA, an alkaline foam protein from cultures of *Fusarium culmorum* and its identification in infected malt. *J Appl Microbiol* **103**: 36-52
- Zhu K, Bressan RA, Hasegawa PM, Murdock LL (1996) Identification of *N*-acetylglucosamine binding residues in *Griffonia simplicifolia* lectin II. *FEBS Lett* **390**: 271-274